

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 26/02/2018.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CÂMPUS DE ARARAQUARA
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

**CARACTERIZAÇÃO POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS E INVESTIGAÇÃO
DAS ATIVIDADES ANTI-INFLAMATÓRIA E GASTROPROTETORA
DO EXTRATO ETANÓLICO E DITERPENOS CLERODÂNICOS
DE FOLHAS DE *Casearia sylvestris* Swartz**

ROGÉRIO CARDOSO DE CASTRO

ORIENTADOR: Prof. Dr. ANDRÉ GONZAGA DOS SANTOS

ARARAQUARA - SP

2016

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

CÂMPUS DE ARARAQUARA

Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

**CARACTERIZAÇÃO POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS E INVESTIGAÇÃO
DAS ATIVIDADES ANTI-INFLAMATÓRIA E GASTROPROTETORA
DO EXTRATO ETANÓLICO E DITERPENOS CLERODÂNICOS
DE FOLHAS DE *Casearia sylvestris* Swartz**

ROGÉRIO CARDOSO DE CASTRO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

ORIENTADOR: Prof. Dr. ANDRÉ GONZAGA DOS SANTOS

ARARAQUARA - SP

2016

Ficha Catalográfica

Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

C355c

Castro, Rogério Cardoso de

Caracterização por espectrometria de massas e investigação das atividades anti-inflamatória e gastroprotetora do extrato etanólico e diterpenos clerodânicos de folhas de *Casearia sylvestris* Swartz / Rogério Cardoso de Castro. - Araraquara, 2016
150 f.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas

Orientador: André Gonzaga dos Santos

1. *Casearia sylvestris*. 2. Diterpenos clerodânicos. 3. Casearinas. 4. Espectrometria de massas. 5. Atividade anti-inflamatória. 6. Atividade gastroprotetora. I. Santos, André Gonzaga dos, orient. II. Título.

CAPES: 40300005

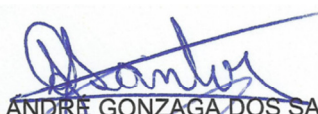
ROGÉRIO CARDOSO DE CASTRO

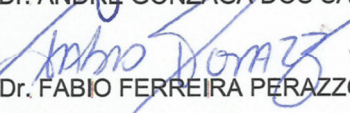
**CARACTERIZAÇÃO POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS E INVESTIGAÇÃO
DAS ATIVIDADES ANTI-INFLAMATÓRIA E GASTROPROTETORA
DO EXTRATO ETANÓLICO E DITERPENOS CLERODÂNICOS
DE FOLHAS DE *Casearia sylvestris* Swartz**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

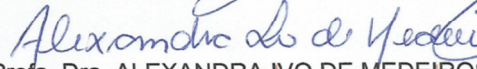
Araraquara, 26 de fevereiro de 2016.

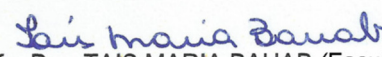
BANCA EXAMINADORA


Prof. Dr. ANDRÉ GONZAGA DOS SANTOS (Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP, Araraquara/SP)


Prof. Dr. FÁBIO FERREIRA PERAZZO (Instituto de Ciências Químicas e Farmacêuticas - UNIFESP, Diadema/SP)


Prof. Dr. GUSTAVO HENRIQUE BIANCO DE SOUZA (Escola de Farmácia, UFOP, Ouro Preto/MG)


Profa. Dra. ALEXANDRA IVO DE MEDEIROS (Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP, Araraquara/SP)


Profa. Dra. TAIS MARIA BAUAB (Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP, Araraquara/SP)

**Dedico este trabalho a pessoa que inspirou
a maior transformação da minha vida, minha
amada esposa Taisa.**

AGRADECIMENTOS

Nenhum homem pode lograr para si o dom de ser autossuficiente. Por isso, agradecer é reconhecer esta condição humana. Acima de tudo, agradeço a Deus, pois sem Ele nem a vida eu teria.

Quanto aos homens, inúmeras pessoas foram fundamentais para esta conquista. Consciente de que é impossível listar todas aqui, agradeço...

Ao meu filho Pedro Lucas que mesmo em plena transição da infância para adolescência, foi paciente, carinhoso e compreensivo durante estes quatro exaustivos anos. Muito obrigado meu filho.

Ao meu pai Luiz Carlos (“Cadinha”) e a minha mãe Lorice pelo amor e apoio incondicionais, não apenas durante o Doutorado, mas em todos os momentos da minha vida.

A minha querida e saudosa “vovó Teca”. Sou eternamente grato à senhora e ao vovô Gumerindo que foram muito além do papel de avós.

A minha filha Hannah e ao seu “namorido” Kleomar que mesmo a distância sempre estiveram na torcida por esta conquista.

Aos meus amigos José Ricardo e Priscila (“Zé e Pri”) que foram imprescindíveis durante todo período do Doutorado. Aliás, “o José é o grande culpado por tudo isso”. Impossível expressar minha gratidão por v^ocs. Assim, peço a Deus a oportunidade de retribuir tudo que fizeram por mim. Vocês permanecerão trancafiados no meu coração para o resto da vida.

A minha tia Lau e a minha amiga Lourdes que apoiaram e torceram por esta conquista da mesma forma que fariam pelos seus filhos.

Ao Marcelo (“Pig”) e sua família (Alessandra e Thales) pela atenção, carinho, disposição, acolhimento e tudo mais que proporcionaram pra mim e pra minha família no período em que estivemos no Canadá.

Ao casal de amigos Danilo e Carla. Muito obrigado pela parceria, ajuda, preocupação e cuidado comigo e com minha família. Além disso, agradecemos por nos proporcionar momentos de muita paz e harmonia.

As minhas amigas Rosana e Suemis (“Ro e Su”). As palavras de coragem e o apoio real foram de valor inestimável. Vocês são bens raros e preciosos em minha vida, amigas que desejam minha felicidade real.

Ao meu orientador Prof. Dr. André Gonzaga dos Santos, a quem me refiro carinhosamente como “Andrejus Korolkas”. Você representa muita coisa pra mim, mais do que um cidadão, uma referência ética e moral, mais do que um professor, um docente completo, mais do que um orientador, um líder nato, e principalmente, mais do que um amigo, um irmão. Repito o que eu disse no dia em que saiu sua aprovação no concurso: “A UNESP ganhou muito mais com você do que você com a UNESP”. Muito obrigado não apenas pelo papel de meu orientador, o qual cumpriu com muita competência, dedicação e compreensão, mas também por ser uma referência em minha vida.

Ao Prof. Dr. Demian Rocha Iba, “meu caro” amigo Dêmian. Dizer obrigado não é suficiente para agradecer tudo que fizestes por mim e por minha família antes, durante e após os “seis meses de Canadá”. Sabemos perfeitamente que o “Projeto Canadá” foi uma grande batalha e você, além de fornecer todas as armas, batalhou junto conosco em todos os momentos. Foi uma honra convivermos com um ser humano tão especial. Você contribuiu muito para nosso crescimento em todos os sentidos.

Aos membros da Comissão Examinadora (Prof. Dr. Fábio Ferreira Perazzo, Prof. Dr. Gustavo Henrique Bianco de Souza, Prof^a. Dr^a. Alexandra Ivo de Medeiros e Prof^a. Dr^a. Taís Maria Bauab). Agradeço do fundo da minha alma a postura profissional, ética e humana que vocês conduziram a defesa. A sensibilidade de cada um de vocês me tocou profundamente.

A Prof^a. Dr^a. Alexandra Ivo de Medeiros e seus alunos (Gustavo e Amanda) e a Prof^a. Dr^a. Taís Maria Bauab e seus alunos (Matheus, Larissa e Kamila) pela oportunidade de colaboração e pela forma atenciosa e gentil que me receberam.

A todos os alunos e ao funcionário Caio do Laboratório de Farmacognosia, especialmente aos membros do “Grupo Guaçatonga” que foram essenciais no desenvolvimento deste trabalho (Elaise, Flávio e Fernando).

Aos alunos do grupo do Dr. Demian (Amin, Rachel) e, especialmente à Consuelo que, além da amizade e ajuda técnica, teve muita paciência e disposição para me auxiliar em diversas demandas.

Aos ex-orientadores e eternos amigos da época do Mestrado, Prof. Dr. Edson Antunes e Prof^a. Dr^a. Elen Cristina Landucci do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina da UNICAMP. Também agradeço ao Prof. Dr. Stephen Hylop pelo fornecimento da BthTX-II e aos funcionários do biotério do Departamento. Foi uma enorme satisfação reencontrá-los e constatar que o respeito e a amizade continuam iguais. A Camila, aluna de Mestrado da Dr^a. Elen, agradeço a importante ajuda nos ensaios de edema de pata e pleurisia.

A todos meus orientados de Trabalhos de Conclusão de Curso (TCC) relacionados com *Casearia sylvestris*. No Centro Universitário de Rio Preto (UNIRP) foram os seguintes grupos: Ana Lúcia, Cláudio, Daiane e Moisés (2008); Bárbara e Tallita (2012); Fernanda e Marcela (2012) e Anahi, Everton, Franciele e Ricardo (2013). No Centro Universitário de Votuporanga (UNIFEV), foram os seguintes grupos: Maira e Moniele (2012); Adriane e Camila (2013) e Priscila e Matheus (2013). Agradeço especialmente à Maira que, além de fazer seu TCC da Graduação sobre *C. sylvestris*, também fez o TCC da sua Pós-Graduação em Farmacologia sobre esta planta (UNIFEV).

A todos aqueles que me ajudaram em relação aos cuidados com os animais, especialmente as funcionárias da Farmacologia (Bete e Rosana), os alunos da Prof^a. Dr^a. Rosângela Peccinini (Edgar, Martina e Michel) e a Andréia, funcionária do Laboratório de Bioequivalência. Ao Paulo e ao Michel, agradeço pelas dicas em relação ao Canadá.

Aos professores e funcionários do Departamento de Princípios Ativos Naturais e Toxicologia. Agradeço especialmente ao Prof. Dr. José Francisco Fracasso que, mesmo em plena aposentadoria, fez questão de assistir a defesa da Tese.

As funcionárias da Seção Técnica de Pós-graduação (Cláudia, Daniela, Flávia e Joice). Além de admirar a competência, dedicação e profissionalismo de vocês, agradeço a maneira atenciosa, respeitosa e gentil que sempre me atenderam.

Aos animais que involuntariamente doaram suas vidas para o benefício da humanidade, o meu profundo respeito.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

O mais profundo agradecimento não poderia deixar de ser para minha esposa amada. No entanto, não existem palavras suficientes e significativas que me permitam agradecer com justiça. Assim, só me resta expressar através da limitação de meras palavras. Simplesmente dizer que você foi o esteio de tudo, uma esposa dedicada, carinhosa, companheira e, ao mesmo tempo, austera. Este equilíbrio foi fundamental, pois muitas vezes precisei de amor, carinho e compreensão, mas incontáveis vezes precisei da sua austeridade, do seu caráter severo e rígido de opinião. Tenho muito orgulho de caminhar ao lado da mulher que me completa, que pauta sua vida nos verdadeiros valores do ser humano e que compreende nosso casamento como um reencontro de almas para reajustes necessários à nossa evolução. Enfim, meu sentimento de gratidão e meu amor por você transcendem todas as palavras.

“As árvores têm uma vida secreta que só é
revelada àqueles que nela sobem”

Reinaldo Arenas

RESUMO

O objetivo geral deste trabalho foi realizar um estudo químico-farmacológico do extrato etanólico de folhas de *Casearia sylvestris* Swartz (EEtCs), frações obtidas por extração em fase sólida (EFS1: apolar; EFS2: rica em diterpenos clerodânicos; EFS3: polar) e padrões de diterpenos clerodânicos (DC). Os objetivos da parte química foram caracterizar os padrões de DC por espectrometria de massas (*full scan* e fragmentação) com fonte de ionização por *spray* de elétrons (*ESI-MS* e *MSⁿ*) e identificar DC no EEtCs e na EFS2 por *ESI-MS*, *ESI-MSⁿ* e por cromatografia em camada delgada de alta eficiência com detecção por imagem química formada por espectrometria de massas com fonte de dessorção por *spray* de elétrons (*HPTLC-DESI-MS-IMAGING*). A parte farmacológica consistiu na investigação da atividade anti-inflamatória e gastroprotetora do EEtCs, frações (EFS1-3) e padrões de DC. A atividade anti-inflamatória foi avaliada por meio de ensaios em ratos, pleurisia induzida pela carragenina e edema de pata induzido por uma fosfolipase A₂ de veneno de *Bothrops jararacussu* (BthTX-II), e os seguintes ensaios *in vitro*: atividade enzimática das ciclo-oxigenases 1 e 2 (COX-1 e COX-2) e produção de óxido nítrico (NO) e prostaglandina E₂ (PGE₂) por macrófagos estimulados por lipopolissacarídeo. A atividade gastroprotetora foi avaliada em modelo de lesões gástricas induzidas por indometacina em ratos e ensaio *in vitro* de atividade *anti-Helicobacter pylori*. Os resultados levaram às conclusões a seguir. A caracterização dos padrões de DC por espectrometria de massas permitiu estabelecer o padrão de fragmentação dos DC com anel diacetálico do tipo das casearinas, o qual representa uma importante fonte de informação para desreplicação em estudos metabolômicos de extratos vegetais. A análise do EEtCs e da EFS2 por *ESI-MS* (*full scan* e fragmentação) e *HPTLC-DESI-MS-IMAGING* permitiu identificar as casearinas B, C, D, F, J, O e X. Os ensaios farmacológicos confirmaram que o EEtCs apresenta atividade anti-inflamatória e gastroprotetora e que estas dependem essencialmente dos DC, uma vez que a EFS2 e DC isolados, mas não a EFS1 e a EFS3, reproduziram tais efeitos, exceto a atividade anti-*H. pylori* que foi reproduzida apenas pela EFS2. O efeito anti-inflamatório do EEtCs não depende apenas dos DC, mas também de prováveis metabólitos secundários capazes de inibir a PLA₂ e a COX-2, uma vez que o EEtCs inibiu o edema de pata induzido pela BthTX-II, efeito não reproduzido por DC isolados, e a atividade enzimática da COX-2, efeito não reproduzido pela EFS2 ou por DC isolados. A atividade anti-inflamatória dos DC do tipo das casearinas não foi associada à inibição da produção de NO, mas envolveu a redução da produção da PGE₂ por macrófagos por mecanismos independentes da inibição da COX-2. É provável que o efeito gastroprotetor do EEtCs envolva tanto mecanismos de proteção contra lesões gástricas induzidas por anti-inflamatórios não-esteroidais quanto a atividade anti-*H. pylori*. No primeiro caso, a atividade deve estar relacionada com os DC, pois tanto a EFS2 quanto DC isolados reproduziram tal atividade. No segundo caso, apenas a EFS2 apresentou atividade anti-*H. pylori*, sugerindo a participação de outros metabólitos secundários presentes na EFS2.

Palavras-chave: *Casearia sylvestris*. Diterpenos clerodânicos. Casearinas. Espectrometria de massas. Atividade anti-inflamatória. Atividade gastroprotetora.

ABSTRACT

The aim of this study was to carry out a chemical-pharmacological study of the ethanol extract from leaves of *Casearia sylvestris* Swartz (EtECs), fractions obtained by solid phase extraction (SPE1: nonpolar; SPE2: rich in clerodane diterpenes; SPE 3: polar) and standards of clerodane diterpenes (CD). The objectives of the chemical step was to characterize standards of CD by mass spectrometry (full scan and fragmentation) using electrospray ionization (ESI-MS and MSⁿ) and to identify CD in EtECs and SPE2 by ESI-MS, ESI-MSⁿ and high performance thin layer chromatography/desorption electrospray ionization mass spectrometry imaging (HPTLC-DESI-MS-IMAGING). The pharmacological study consisted in investigation of anti-inflammatory and gastroprotective activities of EtECs, fractions (SPE1-3) and CD standards. The anti-inflammatory activity was assessed in rats through pleurisy induced by carrageenan and paw edema induced by phospholipase A₂ from *Bothrops jararacussu* venom (BthTX-II), and the following *in vitro* assays: enzymatic activity of cyclooxygenases 1 and 2 (COX-1 and COX-2) and macrophage stimulation by lipopolysaccharide to investigate the production of nitric oxide (NO) and prostaglandin E₂ (PGE₂). The gastroprotective activity was assessed in a model of indomethacin-induced gastric lesions in rats and *in vitro* assay of anti-*Helicobacter pylori* activity. The results led to the following conclusions. The characterization of the standards of CD by mass spectrometry demonstrated that it was possible to establish the fragmentation pattern of CD with diacetalic ring like casearins, which is an important source of information for dereplication in metabolomics studies of plant extracts. The analysis of EtECs and SPE2 by ESI-MS (full scan and fragmentation) and HPTLC-DESI-MS-IMAGING identified the casearins B, C, D, F, J, O and X. The pharmacological assays have confirmed that the EtECs exhibits anti-inflammatory and gastroprotective activities and these depend essentially on the CD, since SPE2 and isolated CD, but not SPE1 and SPE3, reproduced these effects, except anti-*H. pylori* activity that has been reproduced only by the SPE2. The anti-inflammatory effect of EtECs depends not only on CD, but also likely secondary metabolites can inhibit PLA₂ and COX-2, since EtECs inhibited the paw edema induced by BthTX-II, which was not reproduced for CD isolation, and the enzymatic activity of COX-2, which was not reproduced by SPE2 and isolated CD. The anti-inflammatory activity of the CD casearins-like were not associated with inhibition of NO production but involved the reduction of PGE₂ production by macrophages through independent mechanisms of inhibition of COX-2. It is likely that the gastroprotective effect of EtECs involving both mechanisms of protection against gastric lesions induced by anti-inflammatory nonsteroidal and anti-*H. pylori* activity. In the first case, it must be related to the CD, since both the SPE2 and isolated CD reproduced this activity. In the second case, only SPE2 showed anti-*H. pylori* activity, suggesting the involvement of other secondary metabolites present in SPE2.

Keywords: *Casearia sylvestris*. Clerodane diterpenes. Casearins. Mass spectrometry. Anti-inflammatory activity. Gastroprotective activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	<i>Casearia sylvestris</i> (AGS 102) – Horto de Plantas Medicinais e Tóxicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, Araraquara-SP.	32
Figura 2	Estrutura química da quercetina (a) e da rutina (b).	35
Figura 3	Estrutura química do ácido elágico (a) e derivados encontrados em folhas de <i>Casearia sylvestris</i> : ácido 3'- <i>O</i> -metil elágico (b), ácido 3,3'-di- <i>O</i> -metil elágico (c) e ácido 3- <i>O</i> -metil-3',4'-metilenodioxil elágico (d).	35
Figura 4	Estrutura química de derivados do ácido gálico encontrados em folhas de <i>Casearia sylvestris</i> : 3,5-dimetil éter do galato de metila (a) e 3,5-dimetil éter do galato de isobutila (b).	36
Figura 5	Biossíntese dos diterpenos clerodânicos.	37
Figura 6	Estrutura química da clerodina (a) e do precursor dos diterpenos clerodânicos (b).	38
Figura 7	Estrutura química da pitumbina.	39
Figura 8	Estrutura química geral de 27 diterpenos clerodânicos de <i>Casearia sylvestris</i> (casearinas A-X, casearvestrinas A-C e caseargrewiina F). Os substituintes R ¹ a R ⁵ encontram-se na Tabela 4.	41
Figura 9	Estrutura química do 15-hidroxi-3-cleroden-2-ona (a) e do (-)-ácido hardwickiico (b).	42
Figura 10	Estrutura química dos seguintes diterpenos clerodânicos: 2β-metoxi-cleroda-3,13-dien-18-carboxi-15,16-olide (a), 15ξ-metoxi-cleroda-3,12-dien-18-carboxi-15,16-olide (b), 15-oxo-equinofilina A (c), equinofilina A (d) e (-)-ácido patagônico (e).	42
Figura 11	Estrutura química dos caseareasídeos A-E (1 a 5, respectivamente).	43
Figura 12	Fluxograma do desenvolvimento do trabalho.	56
Figura 13	Cromatografia em camada delgada do extrato etanólico de folhas de <i>Casearia sylvestris</i> (Ext), frações (F1-3) e padrões da casearina J (cas J), casearina B (cas B) e caseargrewiina F (casg F).	79
Figura 14	Cromatogramas do EETCs e EFS2 obtidos por CLAE-DAD. Substâncias identificadas: casearina B (Cas B), casearina J (Cas J) e caseargrewiina F (Casg F).	81
Figura 15	Cromatogramas (CLAE-DAD) dos padrões casearina B (Cas B), casearina J (Cas J) e caseargrewiina F (Casg F) e os respectivos espectros no UV.	82
Figura 16	Espectro de massas ESI-MS no modo positivo <i>full scan</i> da casearina J padrão (1 µg/mL) usando metanol como solvente do <i>spray</i> .	86
Figura 17	Espectros de massas ESI-MS ⁿ usando espectrômetro <i>ion trap</i> linear no modo positivo da casearina J padrão (1 µg/mL) na forma de aduto de sódio (<i>m/z</i> 585) dissolvida em metanol (solvente do <i>spray</i>): (a) Espectro MS ² do íon <i>m/z</i> 585; (b) Espectro MS ³ do íon <i>m/z</i> 497; (c) Espectro MS ⁴ do íon <i>m/z</i> 437.	87

Figura 18	Espectro de massas ESI-MS no modo positivo <i>full scan</i> da casearina B padrão (1 µg/mL) usando metanol como solvente de <i>spray</i> .	88
Figura 19	Espectro de massas ESI-MS no modo positivo <i>full scan</i> da casearina O padrão (1 µg/mL) usando metanol como solvente de <i>spray</i> .	89
Figura 20	Espectro de massas ESI-MS no modo positivo <i>full scan</i> da casearina X padrão (1 µg/mL) usando metanol como solvente de <i>spray</i> .	89
Figura 21	Espectro de massas ESI-MS no modo positivo <i>full scan</i> da caseargrewiina F padrão (1 µg/mL) usando metanol como solvente de <i>spray</i> .	90
Figura 22	Espectros de massas ESI-MS ⁿ usando espectrômetro <i>ion trap</i> linear no modo positivo da casearina B padrão (1 µg/mL) na forma de aduto de sódio (<i>m/z</i> 599) dissolvida em metanol (solvente de <i>spray</i>): (a) Espectro MS ² do íon <i>m/z</i> 599; (b) Espectro MS ³ do íon <i>m/z</i> 539; (c) Espectro MS ⁴ do íon <i>m/z</i> 479.	91
Figura 23	Espectros de massas ESI-MS ⁿ usando espectrômetro <i>ion trap</i> linear no modo positivo da casearina O padrão (1 µg/mL) na forma de aduto de sódio (<i>m/z</i> 627) dissolvida em metanol (solvente de <i>spray</i>): (a) Espectro MS ² do íon <i>m/z</i> 627; (b) Espectro MS ³ do íon <i>m/z</i> 539; (c) Espectro MS ⁴ do íon <i>m/z</i> 479.	93
Figura 24	Espectros de massas ESI-MS ⁿ usando espectrômetro <i>ion trap</i> linear no modo positivo da casearina X padrão (1 µg/mL) na forma de aduto de sódio (<i>m/z</i> 555) dissolvida em metanol (solvente de <i>spray</i>): (a) Espectro MS ² do íon <i>m/z</i> 555; (b) Espectro MS ³ do íon <i>m/z</i> 467; (c) Espectro MS ⁴ do íon <i>m/z</i> 407.	94
Figura 25	Espectros de massas ESI-MS ⁿ usando espectrômetro <i>ion trap</i> linear no modo positivo da caseargrewiina F padrão (1 µg/mL) na forma de aduto de sódio (<i>m/z</i> 527) dissolvida em metanol (solvente de <i>spray</i>): (a) Espectro MS ² do íon <i>m/z</i> 527; (b) Espectro MS ³ do íon <i>m/z</i> 467; (c) Espectro MS ⁴ do íon <i>m/z</i> 407.	95
Figura 26	Proposta de fragmentação molecular da casearina J realizada em espectrômetro <i>ion trap</i> linear até MS ⁴ usando o método de colisão por dissociação (CID: <i>Collision Induced Dissociation</i>).	96
Figura 27	Proposta de fragmentação molecular da casearina B realizada em espectrômetro <i>ion trap</i> linear até MS ⁴ usando o método de colisão por dissociação (CID: <i>Collision Induced Dissociation</i>).	97
Figura 28	Proposta de fragmentação molecular da casearina O realizada em espectrômetro <i>ion trap</i> linear até MS ⁴ usando o método de colisão por dissociação (CID: <i>Collision Induced Dissociation</i>).	98
Figura 29	Proposta de fragmentação molecular da casearina X realizada em espectrômetro <i>ion trap</i> linear até MS ⁴ usando o método de colisão por dissociação (CID: <i>Collision Induced Dissociation</i>).	99
Figura 30	Proposta de fragmentação molecular da caseargrewiina F realizada em espectrômetro <i>ion trap</i> linear até MS ⁴ usando o método de colisão por dissociação (CID: <i>Collision Induced Dissociation</i>).	100
Figura 31	Espectro de massas ESI-MS no modo positivo <i>full scan</i> do EETCs (10 µg/mL em metanol) em toda faixa de detecção analisada (a) e na faixa com a maior densidade de picos (b).	101

Figura 32	Espectro de massas ESI-MS no modo positivo <i>full scan</i> da EFS2 (10 µg/mL em metanol) em toda faixa de detecção analisada (a) e na faixa com a maior densidade de picos (b).	102
Figura 33	Imagens químicas de padrões de diterpenos clerodânicos obtidas por cromatografia em camada delgada de alta eficiência hifenada com espectrometria de massas com fonte de dessorção de <i>spray</i> de elétrons (HPTLC-DESI-MS-IMAGING).	106
Figura 34	Imagens químicas obtidas pela análise do EEtCs por cromatografia em camada delgada de alta eficiência hifenada com espectrometria de massas com fonte de dessorção de <i>spray</i> de elétrons (HPTLC-DESI-MS-IMAGING).	106
Figura 35	Imagens químicas obtidas pela análise da EFS por cromatografia em camada delgada de alta eficiência hifenada com espectrometria de massas com fonte de dessorção de <i>spray</i> de elétrons (HPTLC-DESI-MS-IMAGING).	107
Figura 36	Efeito da caseargrewiina F e da casearina J sobre o edema de pata induzido pela carragenina (1.000 µg/pata) em ratos.	113
Figura 37	Efeito do extrato etanólico de folhas de <i>Casearia sylvestris</i> (EEtCs) sobre o edema de pata induzido pela bothropstoxina-II (BthTX-II; 50 µg/pata) em ratos.	114
Figura 38	Efeito da caseargrewiina F e da casearina J sobre o edema de pata induzido pela bothropstoxina-II (BthTX-II; 50 µg/pata) em ratos.	115
Figura 39	Aspecto morfológico do estômago (A) após jejum de 24 horas e administração da indometacina (60 mg/Kg; via oral) e o aspecto de uma de suas regiões após aumento de 12,5 vezes com lupa (B).	117
Figura 40	Lesões gástricas de três diferentes tipos encontradas na mucosa gástrica glandular após jejum de 24 horas e administração da indometacina (60 mg/Kg; via oral).	118
Figura 41	Efeito da casearina B (a) e da caseargrewiina F (b) sobre a quantificação de nitrito em ensaio de macrófagos estimulados por LPS (100 ng/mL) <i>in vitro</i> .	122
Figura 42	Efeito das casearinas J (a) e O (b) sobre a quantificação de nitrito em ensaio de macrófagos estimulados por LPS (100 ng/mL) <i>in vitro</i> .	122
Figura 43	Efeito das casearinas J e O (1,0 µM) sobre a quantificação da prostaglandina E ₂ (PGE ₂) em ensaio de macrófagos estimulados por LPS (100 ng/mL) <i>in vitro</i> .	125

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Metabólitos secundários, exceto diterpenos clerodânicos, identificados e/ou isolados de extratos de folhas e outras partes de <i>Casearia sylvestris</i> .	34
Tabela 2	Estudos fitoquímicos sobre o óleo essencial de folhas de <i>Casearia sylvestris</i> .	37
Tabela 3	Diterpenos clerodânicos isolados de extratos de <i>Casearia sylvestris</i> .	40
Tabela 4	Diterpenos clerodânicos isolados <i>Casearia sylvestris</i> , onde os substituintes R ¹ a R ⁵ referem-se aos substituintes da estrutura representada na Figura 8.	41
Tabela 5	Atividade farmacológica de extratos, preparações ou compostos isolados de folhas de <i>Casearia sylvestris</i> .	44
Tabela 6	Análise granulométrica do pó de folhas de <i>Casearia sylvestris</i> .	75
Tabela 7	Parâmetros instrumentais otimizados para análise da casearina J por ESI-MS por injeção direta utilizando metanol como solvente (1 µg/mL).	84
Tabela 8	Massas moleculares (Da) de moléculas neutras e valores de <i>m/z</i> dos adutos iônicos de diterpenos clerodânicos isolados de extratos de folhas de <i>Casearia sylvestris</i> .	85
Tabela 9	Resultados da fragmentação por ESI-MS ⁿ dos principais picos encontrados no ESI-MS no modo positivo <i>full scan</i> do EECs (10 µg/mL) usando metanol como solvente de <i>spray</i> .	103
Tabela 10	Resultados da fragmentação por ESI-MS ⁿ dos principais picos encontrados no ESI-MS no modo positivo <i>full scan</i> da EFS2 (1 µg/mL) usando metanol como solvente de <i>spray</i> .	104
Tabela 11	<i>Fingerprint</i> dos diterpenos clerodânicos identificados no EECs e na EFS2 por meio de ESI-MS no modo positivo (<i>full scan</i> e MS ⁿ) e por cromatografia em camada delgada de alta eficiência com detecção por imagem química formada por espectrometria de massas com fonte de dessorção de <i>spray</i> de elétrons (HPTLC-DESI-MS-IMAGING).	112
Tabela 12	Efeito do extrato etanólico de folhas de <i>Casearia sylvestris</i> (EECs) sobre o número de leucócitos presentes na cavidade pleural 4 horas após injeção intrapleural de carragenina (400 µg/cavidade pleural) em ratos.	115
Tabela 13	Efeito das frações do extrato etanólico de folhas de <i>Casearia sylvestris</i> (EFS1, EFS2 e EFS3) sobre o número de leucócitos presentes na cavidade pleural 4 horas após injeção intrapleural de carragenina (400 µg/cavidade pleural) em ratos.	117
Tabela 14	Efeito do extrato etanólico de folhas de <i>Casearia sylvestris</i> (EECs) sobre as lesões gástricas induzidas pela indometacina (60 mg/Kg; via oral) em ratos.	119
Tabela 15	Efeito das frações do extrato etanólico de folhas de <i>Casearia sylvestris</i> (EFS) sobre as lesões gástricas induzidas pela indometacina (60 mg/Kg; via oral) em ratos.	119
Tabela 16	Efeito da caseargrewiina F (Casg F) e da casearina J (Cas J) sobre as lesões gástricas induzidas pela indometacina (60 mg/Kg; via oral) em ratos.	119

Tabela 17	Atividade citotóxica da casearina B para macrófagos da linhagem RAW 264.7 após um período de 18 a 20 horas de exposição determinada pelo método MTT.	121
Tabela 18	Atividade citotóxica da caseargrewiina F para macrófagos da linhagem RAW 264.7 após um período de 18 a 20 horas de exposição determinada pelo método MTT.	121
Tabela 19	Atividade das ciclo-oxigenases 1 e 2 (COX-1 e COX-2) expressa na forma de concentração de prostaglandina $F_{2\alpha}$ (produto quantificado por ELISA) e valores de IC_{50} da inibição enzimática pela indometacina.	126
Tabela 20	Efeito do extrato etanólico de folhas de <i>Casearia sylvestris</i> (EEtCs) e frações obtidas por extração em fase sólida (EFS1-3) sobre a atividade das ciclo-oxigenases 1 e 2 (COX-1 e COX-2) expressa na forma de concentração de prostaglandina $F_{2\alpha}$ (produto quantificado por ELISA).	127
Tabela 21	Investigação do efeito das casearinas J e O sobre a atividade das ciclo-oxigenases 1 e 2 (COX-1 e COX-2) expressa na forma de concentração de prostaglandina $F_{2\alpha}$ (produto quantificado por ELISA).	128
Tabela 22	Investigação da atividade anti- <i>Helicobacter pylori in vitro</i> do extrato etanólico de folhas de <i>Casearia sylvestris</i> (EEtCs), frações obtidas por extração em fase sólida (EFS1-3) e diterpenos clerodânicos (casearinas B e J e caseargrewiina F) pelo método de diluição em microplaca.	130

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

A) PARTE QUÍMICA

Compostos, íons, grupos e radicais químicos

ACN: acetonitrila

AcOEt: acetato de etila

HCl: ácido clorídrico

CH₂Cl₂: diclorometano

hex: hexano

H₂O: água

H₂O₂: peróxido de hidrogênio

i-PrOH: isopropanol

MeOH: metanol

NO₂⁻: nitrito

SnCl₂: cloreto de estanho II

Cromatografia

CCD: cromatografia em camada delgada

CLAE: cromatografia líquida de alta eficiência

DAD: *diode array detection* (detecção por arranjo de diodos)

FE: fase estacionária

FM: fase móvel

FR: fase reversa

HPLC: *high performance liquid chromatography* (cromatografia líquida de alta eficiência)

HPTLC: *high performance thin layer chromatography* (cromatografia em camada delgada de alta eficiência)

R_f: fator de retenção

t_r: tempo de retenção

TLC: *thin layer chromatography* (cromatografia em camada delgada)

UHPLC: *ultra high performance liquid chromatography* (cromatografia líquida de ultra eficiência)

UV - ultravioleta

Espectrometria de massas

CE: *collision energy*

CID: *collision induced dissociation*

DESI: *desorption electrospray ionization* (dessorção por *spray* de elétrons)

EM: espectrometria de massas

ESI: *electrospray ionization* (ionização por *spray* de elétrons)

ESI-HRMS: *high resolution electrospray ionization mass spectrometry* (espectrometria de massas de alta resolução com fonte de ionização por *spray* de elétrons)

ESI-MS: *electrospray ionization mass spectrometry* (espectrometria de massas com fonte de ionização por *spray* de elétrons)

ESI-MSⁿ: *electrospray ionization multi-stage or tandem mass spectrometry* (espectrometria de massas de fragmentação com fonte de ionização por *spray* de elétrons)

HRMS: *high resolution mass spectrometry* (espectrometria de massas de alta resolução)

MM: massa molecular

MS: *mass spectrometry* (espectrometria de massas)

MSⁿ ou MS/MS: *multi-stage or tandem mass spectrometry* (espectrometria de massas de fragmentação)

m/z: relação massa/carga

NL: *normalized intensity level* (nível de intensidade normalizado)

TIC: *total ion current* (análise de íons totais)

TOF: *time of flight* (tempo de voo)

Técnicas hífenadas

CLAE-DAD: cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por arranjo de diodos

CLAE-EM: cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por espectrometria de massas

HPLC-DAD: *high performance liquid chromatography with diode array detection* (cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por arranjo de diodos)

HPLC-MS: *high performance liquid chromatography with mass spectrometry detection* (cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por espectrometria de massas)

HPTLC-DESI-MS-IMAGING: cromatografia em camada delgada de alta eficiência com detecção por imagem química formada por espectrometria de massas com fonte de dessorção por *spray* de elétrons

UHPLC-DAD-ESI-Orbitrap: cromatografia líquida de ultra eficiência com detecção por arranjo de diodos e espectrometria de massas de fragmentação com fonte de ionização por *spray* de elétrons em espectrômetro *orbitrap*

Material Vegetal

Cas B: casearina B

Cas J: casearina J

Cas O: casearina O

Cas X: casearina X

Casg F: caseargrewiina F

DC: diterpeno(s) clerodânico(s)

EEtCs – extrato etanólico de folhas de *Casearia sylvestris*

EFS: extração em fase sólida

EFS1: fração 1 da EFS (hexano/acetato de etila 95:05 v/v) do EEtCs

EFS2: fração 2 da EFS (acetato de etila) do EEtCs

EFS3: fração 3 da EFS (metanol) do EEtCs

Sw: Swartz

Unidades de medida

Da: dalton

kV: quilovolts

V: volts

M: molaridade

μM: micromolar

psi: *pound force per square inch* (libra-força por polegada quadrada)

v/v: volume/volume

B) PARTE FARMACOLÓGICA

Ensaio farmacológico *in vitro* e linhagens celulares

ATCC: *American Type Culture Collection* (Coleção Americana de Cultura de Células)

DMEM: *Dulbecco's modified Eagle's medium* (meio de Eagle modificado por Dulbecco)

HepG2: células de carcinoma hepático humano

HTC: hepatoma de *Rattus norvegicus*

L-929: células normais de tecido conjuntivo de camundongo C3H/An

LPS: lipopolissacarídeo

RAW 264.7: macrófagos peritoneais aderentes derivados de camundongos Balb/c

SFB: soro fetal bovino

THP-1 – monócitos humanos associados à leucemia

V-79: fibroblastos normais de pulmão de hamster chinês

Enzimas

BthTX-II: bothropstoxina II

COX: ciclo-oxigenase

COX-1: ciclo-oxigenase tipo 1

COX-2: ciclo-oxigenase tipo 2

diTPS: *diterpene synthase* (diterpeno sintase)

PLA₂: *phospholipase A₂* (fosfolipase A₂)

sPLA₂: *secretory phospholipase A₂* (fosfolipase A₂ secretada)

Mediadores químicos

IFN- γ : interferon γ

IL-1: interleucina 1

IL-6: interleucina 6

LTB₄: leucotrieno B₄

NO: *nitric oxide* (óxido nítrico)

PGE₂: prostaglandina E₂

PGF_{2 α} : prostaglandina F_{2 α}

TNF- α - *tumor necrosis factor α* (fator de necrose tumoral α)

Parâmetros farmacológicos

CIM: concentração inibitória mínima

DE₅₀: dose efetiva de um composto, extrato ou fração para 50% dos animais de uma determinada espécie

DL₅₀: dose letal de um composto, extrato ou fração para 50% dos animais de uma determinada espécie

IC₅₀: concentração de um composto, extrato ou fração necessária para interagir com 50% de um determinado alvo molecular ou para provocar 50% de uma determinada resposta

Miscelânea

AINEs: anti-inflamatórios não-esteroidais

DNA: *deoxyribonucleic acid* (ácido desoxirribonucleico)

LPS: lipopolissacarídeo

MN – leucócitos mononucleares

NF-κB – *nuclear factor kappa B* (fator nuclear kappa B)

PMN – leucócitos polimorfonucleares

TLRs – *toll-like receptors* (receptores *toll-like*)

C) INSTITUIÇÕES

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

OECD: *Organization for Economic and Cooperation Development*

CLSI: *Clinical and Laboratory Standards Institute*

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	25
2	OBJETIVOS	31
2.1	Objetivo geral	31
2.2	Objetivos específicos	31
3	REVISÃO DE LITERATURA	32
3.1	Informações botânicas, etnobotânicas e etnofarmacológicas de <i>Casearia sylvestris</i>	32
3.2	Estudos fitoquímicos de <i>Casearia sylvestris</i>	33
3.3	Diterpenos clerodânicos	37
3.3.1	Diterpenos clerodânicos de <i>Casearia sylvestris</i>	39
3.4	Atividade farmacológica de <i>Casearia sylvestris</i>	43
3.4.1	Atividade antitumoral, citotóxica e citostática	44
3.4.2	Atividade gastroprotetora	46
3.4.3	Atividade anti-inflamatória, analgésica e anti-PLA ₂	47
3.5	Toxicidade de <i>Casearia sylvestris</i>	49
3.5.1	Toxicidade aguda	50
3.5.2	Toxicidade de doses repetidas	51
3.5.3	Genotoxicidade	54
3.5.4	Toxicidade reprodutiva	55
4	MATERIAIS E MÉTODOS	56
4.1	Material vegetal	57
4.1.1	Materiais e equipamentos	57
4.1.2	Preparo da matéria-prima vegetal	59
4.1.3	Análise granulométrica da matéria-prima vegetal	59
4.1.4	Perda por dessecação da matéria-prima vegetal em balança com infravermelho	59
4.1.5	Perda por dessecação em estufa da matéria-prima vegetal	60
4.1.6	Obtenção do extrato etanólico a partir da matéria-prima vegetal	60

4.1.7	Fracionamento do EECs por extração em fase sólida (EFS)	60
4.1.8	Análises cromatográficas do EECs e das frações obtidas por EFS	61
4.1.8.1	Cromatografia em camada delgada (CCD)	61
4.1.8.2	Cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD)	61
4.2	Caracterização e identificação de diterpenos clerodânicos de <i>Casearia sylvestris</i> por espectrometria de massas	62
4.2.1	Materiais e equipamentos	62
4.2.2	Espectrometria de massas (<i>full scan</i> e fragmentação) com fonte de ionização por <i>spray</i> de elétrons e injeção direta (ESI-MS e ESI-MS ⁿ)	63
4.2.3	Cromatografia em camada delgada de alta eficiência com detecção por imagem química formada por espectrometria de massas com fonte de dessorção por <i>spray</i> de elétrons (HPTLC-DESI-MS-IMAGING)	63
4.3	Ensaio farmacológico para avaliação da atividade anti-inflamatória e gastroprotetora	64
4.3.1	Ensaio farmacológico <i>in vivo</i>	64
4.3.1.1	Edema de pata induzido pela carragenina e pela BthTX-II em ratos	65
4.3.1.2	Pleurisia induzida pela carragenina em ratos	66
4.3.1.3	Lesão gástrica induzida por indometacina em ratos	66
4.3.2	Ensaio farmacológico <i>in vitro</i>	67
4.3.2.1	Ensaio com macrófagos <i>in vitro</i>	67
4.3.2.1.1	Obtenção e manutenção da linhagem celular e preparo da microplaca	68
4.3.2.1.2	Estimulação celular e protocolos experimentais	68
4.3.2.1.3	Citotoxicidade	70
4.3.2.1.4	Quantificação de nitrito (NO ₂ ⁻)	70
4.3.2.1.5	Quantificação da prostaglandina E ₂ (PGE ₂)	71
4.3.2.2	Atividade enzimática das ciclo-oxigenases 1 e 2 (COX-1 e COX-2)	71
4.3.2.3	Atividade anti- <i>Helicobacter pylori</i> pelo método de diluição em microplaca	72
4.3.2.3.1	Protocolo experimental	73
4.3.3	Análise estatística dos ensaios farmacológicos	74

5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	75
5.1	Material vegetal	75
5.1.1	Preparo da matéria-prima vegetal	75
5.1.1.2	Análise granulométrica da matéria-prima vegetal	75
5.1.1.3	Perda por dessecação da matéria-prima vegetal em balança com infravermelho	76
5.1.1.4	Perda por dessecação em estufa da matéria-prima vegetal	76
5.1.2	Obtenção do extrato etanólico de folhas de <i>Casearia sylvestris</i> (EEtCs) a partir da matéria-prima vegetal	77
5.1.3	Fracionamento do EEtCs por extração em fase sólida (EFS)	77
5.1.3.1	Análises cromatográficas do EEtCs e suas frações (EFSCs)	78
5.1.3.1.1	Cromatografia em camada delgada (CCD)	78
5.1.3.1.2	Cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD)	80
5.2	Caracterização de diterpenos clerodânicos de <i>Casearia sylvestris</i> por espectrometria de massas	83
5.2.1	Análise dos padrões de diterpenos clerodânicos por ESI-MS e ESI-MS ⁿ	83
5.2.2	Análise do EEtCs e da EFS2 por ESI-MS, ESI-MS ⁿ e HPTLC-DESI-MS-IMAGING	100
5.3	Ensaio farmacológicos <i>in vivo</i>	113
5.3.1	Edema de pata induzido pela carragenina e pela BthTX-II em ratos	113
5.3.2	Pleurisia induzida pela carragenina em ratos	115
5.3.3	Lesão gástrica induzida por indometacina em ratos	117
5.4	Ensaio com macrófagos <i>in vitro</i>	120
5.4.1	Citotoxicidade	120
5.4.2	Quantificação de nitrito (NO ₂ ⁻)	122
5.4.3	Quantificação de prostaglandina E ₂ (PGE ₂)	124
5.5	Atividade enzimática das ciclo-oxigenases 1 e 2 (COX-1 e COX-2)	125
5.6	Ensaio <i>in vitro</i> da atividade anti- <i>H. pylori</i>	130

6	CONCLUSÕES	133
	REFERÊNCIAS	135
	ANEXO A - Parecer nº 12/2014 – Comissão de Ética no Uso de Animais (Protocolo CEUA/FCF/CAR nº 15/2014)	149
	ANEXO B - Parecer nº 28/2014 – Comissão de Ética no Uso de Animais (Protocolo CEUA/FCF/CAR nº 17/2014)	150

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Uma das primeiras estratégias utilizadas para obtenção de fármacos foi o isolamento a partir de plantas medicinais, identificadas inicialmente por registros e estudos etnofarmacológicos (ELISABETSKY, 1999). Com o avanço científico e tecnológico, inúmeras estratégias foram desenvolvidas para obtenção de novos fármacos e, atualmente, uma das mais avançadas é o rastreamento de alto rendimento (*high-throughput screening*) a partir de quimiotecas (coleção de dezenas, centenas ou milhares de moléculas diferentes sintetizadas a partir de um ou mais substratos de partida) obtidas por química combinatória baseada no alvo molecular (planejamento racional) com auxílio de recursos computacionais de modelagem molecular (EVERETT, 2015). Apesar disso, dados comprovam que os produtos naturais continuam sendo importantes fontes de novos fármacos e medicamentos.

Uma revisão recente (NEWMAN; CRAGG, 2016) realizou um levantamento dos novos agentes terapêuticos (fármacos, extratos vegetais, macromoléculas biológicas e vacinas) aprovados no mundo num período de 34 anos (janeiro de 1981 a dezembro de 2014). O total encontrado foi de 1.211, e destes, 55% relacionados com produtos naturais (1% de extratos vegetais, 6% de fármacos naturais, 21% de fármacos derivados de produtos naturais e 27% de fármacos sintéticos análogos a produtos naturais). Dentre os fármacos naturais, por sua vez, predominaram aqueles extraídos de plantas medicinais.

Um exemplo clássico de planta medicinal que deu origem a diversos agentes terapêuticos é uma espécie de Salicaceae conhecida mundialmente como salgueiro branco (*Salix alba* L.), cuja história foi revista recentemente por Wood (2015). O uso do extrato da casca e de folhas do salgueiro branco para aliviar dor, febre e inflamação remonta à antiguidade. A partir destes extratos, isolou-se a salicina, composto cuja hidrólise dá origem ao ácido salicílico, a partir do qual foram desenvolvidos outros fármacos tais como o salicilato de metila e o ácido acetilsalicílico.

Durante as primeiras décadas do século XX o ácido acetilsalicílico foi o principal fármaco utilizado como anti-inflamatório até que a cortisona, um análogo semissintético dos glicocorticoides, fora introduzido na terapêutica. A partir daí, os glicocorticoides (naturais e seus análogos) passaram a ser chamados de anti-inflamatórios esteroidais e o ácido acetilsalicílico de anti-inflamatório não-esteroidal

(SCHIMMER; FUNDER, 2011). Apesar do ácido acetilsalicílico ser um exemplo bem sucedido da obtenção de um fármaco anti-inflamatório com origem na etnofarmacologia, praticamente todos os outros anti-inflamatórios não-esteroidais (AINEs) disponíveis atualmente no mercado são totalmente sintéticos (GROSSER; SMYTH; FITZGERALD, 2011).

Curiosamente, na atualidade outra espécie de Salicaceae com uso tradicional, *Casearia sylvestris* Swartz, destaca-se pela atividade anti-inflamatória, mas diferentemente da *Salix alba* L., também se destaca pelas atividades antiulcerogênica, antitumoral e antiofídica sendo amplamente distribuída no Brasil onde o principal nome popular é guaçatonga (FERREIRA et al. 2011).

O fato de apresentar atividade gastroprotetora e anti-inflamatória destaca a *C. sylvestris* como uma provável fonte de agentes terapêuticos indicados para distúrbios gástricos e inflamatórios. No segundo caso seria uma excelente alternativa aos AINEs, pois uma das restrições quanto ao uso desta classe de fármacos é justamente o aparecimento de lesões gastroduodenais (GROSSER; SMYTH; FITZGERALD, 2011).

Estudos comprovaram que extratos de folhas de *C. sylvestris* apresentam tanto atividade anti-inflamatória (RUPPELT et al., 1991; SILVA et al., 2004; ALBANO et al., 2013) quanto antiulcerogênica (BASILE et al., 1990; SERTIÉ, CARVALHO E PANIZZA, 2000; FIALHO et al., 2010). No entanto, nenhum destes estudos investigou os possíveis metabólitos envolvidos com tais atividades. Já Pierri (2013) e Santos (2008) o fizeram, respectivamente, para a atividade anti-inflamatória e antiulcerogênica. Em ambos os casos, a estratégia utilizada foi o fracionamento biomonitorado, o qual permitiu identificar o envolvimento de diterpenos clerodânicos (DC) típicos da espécie. Tais diterpenos vêm sendo descritos como as principais substâncias ativas e marcadores da espécie desde que Itokawa et al. (1990) publicaram a caracterização definitiva de seis DC inéditos (casearinas A-F) purificados a partir do extrato etanólico de folhas de *C. sylvestris*. Tais autores também utilizaram o fracionamento biomonitorado em ensaios de atividade antitumoral e citotóxica. Utilizando basicamente esta mesma estratégia, outros 33 DC, majoritariamente inéditos, foram identificados em extratos de folhas de *C. sylvestris* (MORITA et al., 1991; CARVALHO et al., 1998, OBERLIES et al., 2002; SANTOS et al., 2007; WANG et al., 2009b, 2009c, 2009d; SANTOS et al., 2010). É evidente que a estratégia do fracionamento biomonitorado foi e continua sendo

extremamente importante, principalmente na identificação de moléculas inéditas, mas por outro lado, apresenta algumas desvantagens tais como a necessidade de diversos ensaios farmacológicos e diversas técnicas de separação, purificação e caracterização estrutural, principalmente quando se trata da identificação de moléculas já descritas na literatura.

Uma alternativa emergente ao fracionamento biomonitorado é a abordagem baseada na metabolômica, ou seja, na ampla identificação de metabólitos presentes em uma determinada matriz biológica complexa. Para tanto, pode-se utilizar o processo de desreplicação dos dados obtidos a partir da análise de um extrato vegetal por modernas técnicas de separação hifenadas com técnicas de detecção espectrométricas avançadas. Além disso, informações sobre espectrometria de massas de padrões de fragmentação (MS^n ou MS/MS) são extremamente úteis no processo de desreplicação (ATANASOV et al., 2015).

Recentemente, Bueno (2015) desenvolveu um método analítico abrangente para análise simultânea de diterpenos clerodânicos e compostos fenólicos em extratos de folhas de *C. sylvestris* por técnica de cromatografia líquida de ultra eficiência (UHPLC) com detecção por arranjo de diodos (DAD) e espectrometria de massas de fragmentação com fonte de ionização por *spray* de elétrons em espectrômetro *orbitrap* (UHPLC-DAD-ESI-Orbitrap). Apesar de ter identificado 15 DC em extrato de folhas de *C. sylvestris*, a autora relata que uma das dificuldades foi obter informações sobre espectrometria de massas destes DC, especialmente sobre a fragmentação molecular. De fato, não foram encontrados trabalhos na literatura sobre o padrão de fragmentação de DC do tipo das casearinas, o que justifica um dos objetivos deste trabalho que foi justamente estabelecer este padrão. Outro objetivo foi identificar DC em extratos e frações de folhas *C. sylvestris* através de técnica hifenada de cromatografia em camada delgada de alta eficiência com detecção por imagem química formada por espectrometria de massas com fonte de dessorção por *spray* de elétrons (HPTLC-DESI-MS-IMAGING).

Além desta parte química, este trabalho explorou aspectos farmacológicos de *C. sylvestris* através da comprovação e investigação dos mecanismos das atividades anti-inflamatória e gastroprotetora.

Em relação aos prováveis mecanismos da atividade anti-inflamatória de *C. sylvestris*, a literatura é relativamente escassa, mas alguns estudos sugerem que podem estar associados à redução da produção óxido nítrico (NO) ou de

prostaglandinas (PGs) por inibição da ciclo-oxigenase (COX) ou da fosfolipase A₂ secretada (sPLA₂).

Foram encontrados dois trabalhos que avaliaram o efeito de extratos de folhas de *C. sylvestris* sobre a produção de NO, um deles em modelo de macrófagos *in vitro* (NAPOLITANO et al., 2005) e o outro em modelo de pleurisia em ratos (ALBANO et al., 2013). Já em relação às casearinas, encontrou-se um trabalho que investigou o efeito da casearina G sobre a produção de NO *in vitro* (DUPUY et al., 2013). Apesar disso, os resultados destes três trabalhos foram contraditórios, o que justifica a investigação do efeito de DC isolados sobre a produção deste mediador químico.

Em relação à inibição da COX, existem poucas e fracas evidências, uma delas sugerida por Sassioto et al. (2004) que verificaram que o decocto de folhas de *C. sylvestris* apresentou um efeito semelhante aos AINEs, clássicos inibidores de COX, em um modelo de osteogênese. Esteves et al. (2005) sugerem mecanismo semelhante, pois o óleo essencial de folhas de *C. sylvestris* reduziu o edema de pata induzido por carragenina, mas não o aumento da permeabilidade vascular induzido por substâncias que degranulam mastócitos. Por outro lado, esta hipótese gera a seguinte indagação: como pode um mesmo extrato ou diterpeno clerodânico de folhas de *C. sylvestris* inibirem a COX e, ao mesmo tempo, apresentar efeito antiulcerogênico? Uma possível resposta para tal indagação seria a inibição altamente seletiva da COX-2 que é a isoforma da COX envolvida com a produção de PGs no local da inflamação. Assim, a produção de PGs no estômago pela COX-1 não seria afetada. Uma maneira extremamente útil para esclarecer tal dúvida é a investigação do efeito do extrato, frações e DC sobre a atividade enzimática *in vitro* das ciclo-oxigenases 1 e 2, o que foi realizado neste estudo. Também se investigou o efeito destas amostras sobre a produção de prostaglandina E₂ (PGE₂) em macrófagos estimulados *in vitro* por lipopolissacarídeo, uma vez que a inibição da produção de prostaglandinas pode ocorrer por mecanismos independentes da inibição da COX.

Quanto à inibição da sPLA₂, Borges et al. (2000) demonstraram que o extrato aquoso de folhas da *C. sylvestris* inibiu a atividade enzimática *in vitro* de sPLA₂s isoladas dos venenos de *Bothrops pirajai* e *Bothrops jararacussu*. Além disso, trabalhos têm demonstrado efeito de extratos de *C. sylvestris* sobre atividade biológica de sPLA₂s isoladas de venenos (CAVALCANTE et al., 2007; OSHIMA-

FRANCO et al., 2005; RASLAN et al., 2002). Sendo assim, neste estudo investigou-se o efeito do extrato etanólico de folhas de *C. sylvestris* (EEtCs) e diterpenos clerodânicos isolados sobre o edema de pata em ratos induzido por uma sPLA₂ isolada do veneno de *Bothrops jararacussu* chamada de bothropstoxina II (BthTX-II).

Quanto à atividade gastroprotetora de folhas de *C. sylvestris*, o extrato hidroalcoólico (BASILE et al., 1990) e o óleo essencial (ESTEVES et al., 2005) preveniram o aparecimento de lesões gástricas induzidas por estresse em ratos. Sertié, Carvalho e Panizza (2000) comprovaram que o mesmo tipo de extrato, além de prevenir úlcera por estresse, também foi capaz de reduzir lesões gástricas em modelo de úlcera crônica induzida por ácido acético em ratos. Além disso, o extrato etanólico apresentou efeito antiulcerogênico em modelo de úlcera aguda induzida por álcool em ratos (SANTOS, 2008) e por privação de alimentos sólidos em equinos (FIALHO et al., 2010). Através de fracionamento biomonitorado, Santos (2008) demonstrou que as casearinas são os princípios ativos antiulcerogênicos presentes no extrato etanólico de folhas de *C. sylvestris*.

Nota-se que nenhum destes trabalhos utilizou AINE para induzir úlcera cuja fisiopatologia é bem conhecida e foi descrita anteriormente. Além disso, os AINEs, juntamente com a bactéria *Helicobacter pylori*, representam os principais agentes etiológicos de úlceras pépticas. O *H. pylori* é um bacilo gram-negativo que coloniza o estômago humano e sua presença está associada ao maior risco de incidência de várias doenças, incluindo úlceras pépticas, linfomas gástricos e adenocarcinomas gástricos, segunda causa de mortes por câncer no mundo (ATHERTON; BLASER, 2009). Em uma recente e extensa revisão sobre a atividade anti-*H. pylori* de plantas medicinais, Wang (2014) elencou inúmeros trabalhos que investigaram a ação de extratos e substâncias isoladas de dezenas de plantas medicinais. No entanto, nenhum destes trabalhos foi realizado com espécies do gênero *Casearia* ou com diterpenos clerodânicos típicos deste gênero. Levantamento bibliográfico atual sobre o assunto confirmou esta situação.

Diante do exposto, justifica-se a avaliação de extratos, frações e substâncias purificadas a partir de *C. sylvestris* em modelos de úlcera induzida por AINEs e nos ensaios de atividade anti-*H. pylori*, até porque foi justamente o uso tradicional em doenças do trato digestório que resultou na presença da droga vegetal derivada da espécie no Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira (BRASIL, 2011). Apesar disso, esta planta não foi incluída na última lista de medicamentos ou

produtos tradicionais fitoterápicos de registro simplificado (BRASIL, 2014) e atualmente não há nenhum fitoterápico a base de *C. sylvestris* registrado na ANVISA (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2016). Também não há medicamentos a base de casearinas, ou mesmo fármacos semissintéticos ou análogos sintéticos destes metabólitos secundários.

6 CONCLUSÕES

- a) A caracterização dos padrões de DC do tipo das casearinas por espectrometria de massas permitiu estabelecer o padrão de fragmentação no qual os radicais esterificados no anel diacetálico são fragmentados em MS^2 e MS^3 , enquanto que os radicais esterificados nas posições R^1 e R^5 são retirados na fragmentação MS^4 . Este padrão representa uma importante fonte de informação para desreplicação em estudos metabolômicos de extratos vegetais;
- b) Nas condições otimizadas, a análise do EEtCs e a EFS2 por ESI-MS (*full scan* e fragmentação) e HPTLC-DESI-MS-IMAGING permitiu identificar as casearinas B, C, D, F, J, O e X, inclusive com indicações sobre as abundância destes diterpenos nas amostras. Além disso, sugere a existência de novos DC ou ainda não descritos em extratos de *C. sylvestris*, uma vez que foram encontrados picos com fragmentação típica das casearinas, mas não atribuídos a nenhum dos 39 DC já descritos na espécie;
- c) Os ensaios farmacológicos confirmaram que o EEtCs apresenta atividade anti-inflamatória e gastroprotetora e que estas dependem essencialmente dos DC, uma vez que a EFS2 e DC isolados, mas não a EFS1 e a EFS3, reproduziram tais efeitos, exceto a atividade anti-*H. pylori* que foi reproduzida apenas pela EFS2;
- d) O efeito anti-inflamatório do EEtCs não depende apenas dos diterpenos clerodânicos, mas também de prováveis metabólitos secundários capazes de inibir a PLA2 e a COX-2, uma vez que o EEtCs inibiu o edema de pata induzido pela BthTX-II, efeito não reproduzido por DC isolados, e a atividade enzimática da COX-2, efeito não reproduzido pela EFS2 ou por DC isolados;
- e) A atividade anti-inflamatória dos DC do tipo das casearinas não foi associada à inibição da produção de óxido nítrico, mas envolveu a redução da produção da PGE_2 por macrófagos por mecanismos independentes da inibição da COX-2. Em conjunto, estes dados levantam a hipótese de que os DC inibem a sinalização celular através da qual as citocinas induzem a expressão da COX-2, mas não a sinalização via NF- κ B através da qual o LPS induz a expressão de citocinas e da enzima óxido nítrico sintase;

- f) É provável que o efeito gastroprotetor do EECs envolva tanto mecanismos de proteção contra lesões gástricas induzidas por anti-inflamatórios não-esteroidais quanto a atividade anti-*H. pylori*. No primeiro caso, a atividade deve estar relacionada com os DC, pois tanto a EFS2 quanto DC isolados reproduziram tal atividade. No segundo caso, apenas a EFS2 apresentou atividade anti-*H. pylori*, sugerindo a participação de outros metabólitos secundários presentes na EFS2.

REFERÊNCIAS

- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Consulta de produto – medicamentos**. Disponível em: <http://www7.anvisa.gov.br/datavisa/Consulta_Produto/consulta_medicamento.asp>. Acesso em: 05 fev 2016.
- ALBANO, M. N.; SILVEIRA, M. R.; DANIELSKI, L. G.; FLORENTINO, D.; PETRONILHO, F.; PIOVEZAN, A. P. Anti-inflammatory and antioxidante properties of hydroalcoholic crude extract from *Casearia sylvestris* Sw. (Salicaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 147, p. 612-617, 2013.
- AMENI, A. Z. **Estudo do extrato fluido de *Casearia sylvestris***: constituintes químicos, potencial terapêutico e interações medicamentosas. 2015. 103 f. Tese (Doutorado em Patologia Experimental e Comparada) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.
- AMENI, A. Z.; LATORRE, O. A.; TORRES, L. M. B.; GÓRNIK, S. L. Toxicity study about a medicinal plant *Casearia sylvestris*: A contribution to the Brazilian Unified Health System (SUS). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 175, p. 9-13, 2015.
- ARAÚJO, E. J. F.; OLIVEIRA, G. A. L.; SOUSA, L. Q.; BOLZANI, V. S.; CAVALHEIRO, A. J.; TOME, A. R.; PERON, A. P.; SANTOS, A. G.; CITÓ, A. M. G. L.; PESSOA, C.; FREITAS, R. M.; FERREIRA, P. M. P. Counteracting effects on free radicals and histological alterations induced by a fraction with casearins. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 87, n. 3, p. 1791-1807, 2015.
- ATANASOV, A. G.; WALTENBERGER, B.; PFERSCHY-WENZIG, E.-V.; LINDER, T.; WAWROSCHE, C.; UHRIN, P.; TEMML, V.; WANG, L.; SCHWAIGER, S.; HEISS, E. H.; ROLLINGER, J. M.; SCHUSTER, D.; BREUSS, J. M.; BOCHKOV, V.; MIHOVILOVIC, M. D.; KOPP, B.; BAUER, R.; DIRSCH, V. M.; STUPPNER, H. Discovery and resupply of pharmacologically active plantderived natural products: a review. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 8, p. 1582-1614, 2015.
- ATHERTON, J. C.; BLASER, M. J. Coadaptation of *Helicobacter pylori* and humans: ancient history, modern implications. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 119, n. 9, p. 2475-2487, 2009.
- 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.
- BARTON, D. H. R.; CHEUNG, H. T.; CROSS, A. D.; JACKMAN, L. M.; MARTIN-SMITH, M. Diterpenoid bitter principles. Part III. The Constitution of clerodin. **Journal of the Chemical Society**, p. 5061-5073, 1961.
- 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.

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.

BRASIL (2004a). Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RE nº 90 de 16 de março de 2004. Aprova o guia para realização de estudos de toxicidade pré-clínica de fitoterápicos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 18 mar 2004.

Disponível em: <<http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=10242&word=>>>. Acesso em: 05 fev 2016.

BRASIL (2004b). Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). 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 2004b.

Disponível em: <<http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=10230>>. Acesso em: 05 fev 2016.

BRASIL (2010a). Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Farmacopeia Brasileira**. 5. ed. v. 1. Brasília: Anvisa, 2010a. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/hotsite/cd_farmacopeia/pdf/volume1.pdf>. Acesso em: 05 fev 2016.

BRASIL (2010b). Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Farmacopeia Brasileira**. 5. ed. v. 2. Brasília: Anvisa, 2010b. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/hotsite/cd_farmacopeia/pdf/volume2.pdf>. Acesso em: 05 fev 2016.

BRASIL (2011). Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira, Brasília: Anvisa, 2011. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/hotsite/farmacopeiabrasileira/conteudo/Formulario_de_Fitoterapicos_da_Farmacopeia_Brasileira.pdf>. Acesso em: 05 fev 2016.

BRASIL (2014). Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Instrução Normativa nº 2 de 13 de maio de 2014. Publica a lista de medicamentos fitoterápicos de registro simplificado e a lista de produtos tradicionais fitoterápicos de registro simplificado. **Diário Oficial da União**, Brasília, 14 mai 2014. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2014/int0002_13_05_2014.pdf>. Acesso em: 05 fev 2016.

BUENO, P. C. P. **Variabilidade química infraespecífica e dinâmica de metabólitos secundários fenólicos e diterpênicos em *Casearia sylvestris* Sw. (Salicaceae): correlação metabolômica e proteômica utilizando cromatografia, espectrometria de massas, ressonância magnética nuclear e quimiometria.** 2015. 255 f. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2015.

BUENO, P. C. P.; PEREIRA, F.M.V.; TORRES, R.B.; CAVALHEIRO, A. J. Development of a comprehensive method for analysing clerodane-type diterpenes and phenolic compounds from *Casearia sylvestris* Swartz (Salicaceae) based on ultra-high performance liquid chromatography combined with chemometric tools. **Journal of Separation Science**, v. 38, p. 1649-1656, 2015.

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, 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.

CARVALHO, E.S.; SANTOS, A.G.; CAVALHEIRO, A.J. Identificação de diterpenos clerodânicos em diferentes órgãos de *Casearia sylvestris* Swartz. **Rev Cienc Farm Básica Apl.** v. 30, p. 277-284, 2009.

CARVALHO, F. A. **Desenvolvimento e caracterização de membranas de látex natural de *Hevea brasiliensis* (Wild. ex A.Juss.) Müll.Arg. com extrato de *Casearia sylvestris* Swartz e seus componentes.** 2015. 168 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2015.

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.

CAYMAN CHEMICAL. **Prostaglandin E₂ EIA kit - Monoclonal** (Item No. 514010). Disponível em: <<https://www.caymanchem.com/pdfs/514010.pdf>>. Acesso em: 02 out 2014a.

CAYMAN CHEMICAL. **COX (ovine) Inhibitor Screening Assay Kit** (Item No. 560101). Disponível em: <<https://www.caymanchem.com/pdfs/560101.pdf>>. Acesso em: 19 ago 2014b.

CHIRUMBOLO, S. The role of quercetin, flavonols and flavones in modulating inflammatory cell function. **Inflammation and Allergy Drug Targets**. v. 9, p. 263–285, 2010.

CINTRA, A. C. O.; MARANGONI, S.; OLIVEIRA, B.; GIGLIO, J. R. Bothropstoxin-I: Amino acid sequence and function. **Journal of Protein Chemistry**, v. 12, p. 57-64, 1993.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Methods for antimicrobial dilution and disk susceptibility testing of infrequently isolated or fastidious bacteria**. 2. ed. CLSI guideline M45-A2. Wayne: CLSI, 2010.

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

DA SILVA, S. L.; CALGAROTTO, A. K.; CHAAR, J.; MARANGONI, S. Isolation and characterization of ellagic acid derivatives isolated from *Casearia sylvestris* Swartz. aqueous extract with anti-PLA₂ activity. **Toxicon**, v. 52, p. 655-666, 2008.

DA SILVA, S. L.; CHAAR, J. S.; YANO, T. Chemotherapeutic potencial of two gallic acid derivate compounds from leaves of *Casearia sylvestris* Sw (*Flacourtiaceae*). **European Journal of Pharmacol.** v. 608, p. 76-83, 2009.

DE NARDO, D. Toll-like receptors: activation, signalling and transcriptional modulation. **Cytokine**, v. 74, n. 2, p. 181-189, 2015.

DENNIS, E. A.; CAO, J.; HSU, Y-H.; MAGRIOTI, V.; KOKOTOS, G. Phospholipase A₂ enzymes: physical structure, biological function, disease implication, chemical inhibition, and therapeutic intervention. **Chemical Reviews**, v. 111, n. 10, p. 6130-6185, 2011.

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

DUPUY, O. A.; BONILLA, J. A.; MURILLO, R.; TAYLOR, P.; ABAD, M. J.; GONZÁLEZ, L.; JULIAO, J. Efecto in vitro de los terpenos lupeol y casearina G sobre células sanguíneas y tumorales. **Revista Médica de Chile**, v. 141, p. 1150-1157, 2013.

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.

EL-SHITANY, N. A.; EL-BASTAWISSY, E. A.; EL-DESOKY, K. Ellagic acid protects against carrageenan-induced acute inflammation through inhibition of nuclear factor kappa B, inducible cyclooxygenase and proinflammatory cytokines and enhancement of interleukin-10 via an antioxidant mechanism. **International Immunopharmacology**, v. 19, p. 290–299, 2014.

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.; SERTIÈ, 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.

EVERETT, J. R. Academic drug discovery: current status and prospects. **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 10, n. 9, p. 937-944, 2015.

FELIPE, K. B.; KVIECINSKI, M. R.; SILVA, F. O.; BÜCKER, N. F.; FARIAS, M. S.; CASTRO, L. S. E. P. W.; GRINEVICIUS, V. M. A. S.; MOTTA, N. S.; CORREIA, J. F. G.; ROSSI, M. H.; PEDROSA, R. C. Inhibition of tumor proliferation associated with cell cycle arrest caused by extract and fraction from *Casearia sylvestris* (Salicaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 155, p.1492-1499, 2014.

FERREIRA, P.M.P.; SANTOS, A. G.; TININIS, A. G.; COSTA, P. M.; CAVALHEIRO, A. J.; BOLZANI, V. S.; MORAES, M. O.; COSTA-LOTUFO, L. V.; MONTENEGRO, R.C.; PESSOA, C.. Casearin X exhibits cytotoxic effects in leukemia cells triggered by apoptosis. **Chemico-Biological Interactions**, v. 188, p.497–504, 2010.

FERREIRA, P. M. P.; COSTA-LOTUFO, L. V. MORAES, M. O.; BARROS, F. W. A.; MARTINS, A. M. A.; CAVALHEIRO, A. J.; BOLZANI, V. S.; SANTOS, A. G.; PESSOA, C. Folk uses and pharmacological properties of *Casearia sylvestris*: a medicinal review. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**. v. 83, n. 4, p. 1373-1384, 2011.

FERREIRA, P. M. P.; MILITÃO, G. C. G.; LIMA, D. J. B.; COSTA, N. D. J.; MACHADO, K. C.; SANTOS, A. G.; CAVALHEIRO, A. J.; BOLZANI, V. S.; SILVA, D. H. S.; PESSOA, C. Morphological and biochemical alterations activated by antitumor clerodane diterpenes. **Chemico-Biological Interactions**, v. 222, p. 112-125, 2014.

FERREIRA, P. M. P.; BEZERRA, D. P.; SILVA, J. M.; COSTA, M. P.; FERREIRA, J. R. O.; ALENCAR, N. M. N.; FIGUEIREDO, I. S. T.; CAVALHEIRO, A. J.; MACHADO, C. M. L.; CHAMMAS, R.; ALVES, A. P. N. N.; MOROES, M. O.; PESSOA, C. Preclinical anticancer effectiveness of a fraction from *Casearia sylvestris* and its component Casearin X: *in vivo* and *ex vivo* methods and microscopy examinations. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 186, p. 270-279, 2016.

FIALHO, S. S.; NOGUEIRA, G. M.; DUARTE, C. A.; PAIVA NETO, A. O.; MACORIS, D. G. *Casearia sylvestris* na permeabilidade gástrica à sacarose em equinos submetidos a protocolo de indução de úlcera gástrica. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 40, n. 2, p. 348-355, 2010.

FRANCISCHINELLI, M.C.; SILVA, M.G.; ANDREO FILHO, N.; GERENUTTI, M.; CINTRA, A.C.O.; GIGLIO, J.R.; LEITE, G.B.; HÖFLING, M.A.C.; SIMIONI, L.R.; FRANCO, Y.O. Antibothropic action of *Casearia sylvestris* Sw. (*Flacourtiaceae*) extracts. **Phytother Res.** v. 22, p. 784-790, 2008.

FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA NO ESTADO DE SÃO PAULO (FAPESP); UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO (USP); UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA (UNESP) (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.

GARRO, M. F.; SALINAS IBÁÑEZ, A. G.; VEGA, A. E.; ARISMENDI SOSA, A. C.; PELZER, L.; SAAD, J. R.; MARIA, A. O. Gastroprotective effects and antimicrobial activity of *Lithraea molleoides* and isolated compounds against *Helicobacter pylori*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 176, p. 469-474, 2015.

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.

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.

GROSSER, T.; SMYTH, E. M.; FITZGERALD, G. A. Anti-inflammatory, antipyretic, and analgesic agents; pharmacotherapy of gout. In: BRUNTON, L.; CHABNER, B.; KNOLLMAN, B. **Goodman and Gilman's: the pharmacological basis of therapeutics.** 12. ed. New York: McGraw-Hill, 2011. cap. 34.

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.

GUSMAN, G. S.; CAMPANA, P. R. V.; CASTRO, L. C.; CASTILHO, R. O.; TEIXEIRA, M. M.; BRAGA, F. C. Evaluation of the effects of some brazilian medicinal plants on the production of TNF- α and CCL2 by THP-1 cells. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2015, article ID 497123, 2015.

HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; QUEIROZ, L. S.; SANTO-NETO, H.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; GIGLIO, J. R. Fractionation of *Bothrops jararacussu* snake venom: partial chemical characterization and biological activity of bothropstoxin. **Toxicon**, v. 26, p. 615-627, 1988.

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.

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.

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.; 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.

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.

KIM, H. P.; MANI, I.; IVERSEN, L.; ZIBOH, V. A. Effects of naturally-occurring flavonoids and bioflavonoids on epidermal cyclooxygenase and lipoxygenase from guinea-pigs. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 58, p. 17-24, 1998.

LANDUCCI, E. C.; CASTRO, R. C.; PEREIRA, M. F.; CINTRA, A. C.; GIGLIO, J. R.; MARANGONI, S.; OLIVEIRA, B.; CIRINO, G.; ANTUNES, E.; De NUCCI, G. Mast cell degranulation induced by two phospholipase A₂ homologues: dissociation between enzymatic and biological activities. **European Journal of Pharmacology**, v. 343, n. 2-3, p. 257-63, 1998.

LANDUCCI, E. C.; CASTRO, R. C.; TOYAMA, M.; GIGLIO, J. R.; MARANGONI, S.; De NUCCI, G.; ANTUNES, E. Inflammatory oedema induced by the lys-49 phospholipase A(2) homologue piratoxin-I in the rat and rabbit. Effect of polyanions and *p*-bromophenacyl bromide. **Biochemical Pharmacology**, v. 59, n. 10, p. 289-94, 2000.

LANE, T. E.; WU-HSIEH, B.A.; HOWARD, D. H. Gamma interferón cooperates with lipopolysaccharide to activate mouse splenic macrophages to an antihistoplasma state. **Infection and Immunity**, v. 61, n. 4, p. 1468-1473, 1993.

MAIN, I. H. M.; WHITTLE, B. J. R. Investigation of the vasodilator and antisecretory role of prostaglandins in the rat gastric mucosa by use of non-steroidal anti-inflammatory drugs. **British Journal of Pharmacology**, v. 53, p. 217-224, 1975.

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.

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.

MEDANA, C.; MASSOLINO, C.; PAZZI, M.; BAIOCCHI, C. Determination of salvinorins and divinorins in *Salvia divinorum* leaves by liquid chromatography/multistage mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 20, p. 131-136, 2006.

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.

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.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

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.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. **Journal of Natural Products**, v. 79, n. 3, p. 629-661, 2016.

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, 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.

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.

ORGANIZATION FOR ECONOMIC AND COOPERATION DEVELOPMENT. **OECD Guidelines for the Testing of Chemicals: Acute Oral Toxicity - Acute Toxic Class Method**. Guideline OECD/OCED 423, 2011. Disponível em: <<http://www.oecd-ilibrary.org/docserver/download/9742301e.pdf?expires=1445397078&id=id&accname=guest&checksum=0764C6BF7CF0C402CDAA47EA8E515020>>. Acesso em: 20 out 2015.

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.

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.

PIERRI, E.G. **Avaliação das atividades cicatrizante e anti-inflamatória de *Casearia sylvestris* Swartz em animais e identificação dos marcadores químicos**. 125 f. 2013. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2013.

PRIETO, A. M.; SANTOS, A. G.; CSIPAK, A. R.; CALIRI, C. M.; SILVA, I. C.; ARBEX, M. A.; SILVA, F. S.; MARCHI, M. R. R.; CAVALHEIRO, A. J.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; SOARES, C. P. Chemopreventive activity of compounds extracted from *Casearia sylvestris* (Salicaceae) Sw against DNA damage induced by particulate matter emitted by sugarcane burning near Araraquara, Brazil. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 265, p. 368-372, 2012.

PRIETO, A. M.; DOS SANTOS, A. G.; OLIVEIRA, A. P. S.; CAVALHEIRO, A. J.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; VARANDA, E. AP.; SOARES, C. P.. Assessment of the chemopreventive effect of casearin B, a clerodane diterpene extracted from *Casearia sylvestris* (Salicaceae). **Food and Chemical Toxicology**, v. 53, p. 153-159, 2013.

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.

RAINTREE NUTRITION INC. Guacatonga capsules *Casearia sylvestris*. Disponível em: <<http://www.rain-tree.com/guacatonga-capsules.htm>>. Acesso em: 15 jan 2016.

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 Farmacie**, v. 141, n. 6, p. 457-460, 2002.

RICCI, A.; PICCOLELLA, S.; FIORENTINO, A.; PEPI, F.; D'ABROSCA, B.; MONACO, P. A tandem mass spectrometric investigation of the low-energy collision-activated fragmentation of neo-clerodane diterpenes. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 24, p. 1543-1556, 2010.

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.

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, 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.

ROGERS, D.; ÜNAL, G. G.; WILLIAMS, D. J.; LEY, S. V.; SIM, G. A.; JOSHI, B. S.; RAVINDRANATH, K. R. The crystal structure of 3-epicaryoptin and the reversal of the currently accepted absolute configuration of clerodin. **Journal of the Chemical Society, Chemical Communications**, p. 97-99, 1979.

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. Pharmacological screening of plants recommended by folk medicine as anti-snake venom – I. Analgesic and anti-inflammatory activities. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 86, n. 2, 203-205, 1991.

SAKAE, T. M.; BALDISSEROTTON, C. M.; BIANCHINI, N. Comparação da *Casearia sylvestris* com indometacina e placebo na diminuição de edema em pata traseira de Ratos Wistar, induzido pelo uso de carragenina. **Arquivos Catarinenses de Medicina**, v. 34, p. 33-36, 2005.

SALMINEN, A.; LEHTONEN, M.; SUURONEN, T. KAARNIRANTA, K.; HUUSKONEN, J. Terpenoids: natural inhibitors of NF-kappaB signaling with anti-inflammatory and anticancer potencial. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 65, n. 19, p. 2979-2999, 2008.

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.

SANTOS, A. G. **Identificação dos princípios ativos antiulcerogênicos do extrato das folhas de *Casearia sylvestris***: contribuição para o desenvolvimento de um fitoterápico. 2008. 335 f. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2008.

SANTOS, A. G.; FERREIRA, P. M. P.; VIEIRA JÚNIOR, G. M.; PEREZ, C. C.; TININIS, A. G.; SILVA, G. H.; BOLZANI, V. S.; COSTA-LOTUFO, L. V.; PESSOA, C. do Ó; CAVALHEIRO, A. J. Casearin X, its degradation product and other clerodane diterpenes from leaves of *Casearia sylvestris*: evaluation of cytotoxicity against normal and tumour human cells. **Chemistry and Biodiversity**, v. 7, n. 1, p. 205-215, 2010.

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 Cirurgica 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.

SCHIMMER, B. P.; FUNDER, J. W. ACTH, adrenal steroids, and pharmacology of the adrenal cortex. In: BRUNTON, L.; CHABNER, B.; KNOLLMAN, B. **Goodman and Gilman's: the pharmacological basis of therapeutics**. 12. ed. New York: McGraw-Hill, 2011. cap. 42.

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

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.

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

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, 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, 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. 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, 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, S.L.; CHAAR, J.S.; FIGUEIREDO, P.M.S.; YANO, T. Citotoxic evaluation of essential oil from *Casearia sylvestris* Sw on human cancer cells and erythrocytes. **Acta Amazonica**, v. 38, n. 1, p. 107-18, 2008.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; PALAZZO de MELLO, J.C.; MENTZ, L.A.; ROS PETROVICK, P. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 6 ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. UFRGS/ Ed. UFSC. p. 833, 2010.

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.

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.

STOREK, K. M.; MONACK, D. M. Bacterial recognition pathways that lead to inflammasome activation. **Immunological Reviews**, v. 265, p. 112-129, 2015.

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.

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, 2006a.

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 Medicinais**, v. 8, n. 4, p. 132-136, 2006b.

TOKOROYAMA, T. Synthesis of Clerodane Diterpenoids and Related Compounds - Stereoselective Construction of the Decalin Skeleton with Multiple Contiguous Stereogenic Centers. **Synthesis**, v. 2000, n. 5, p. 611-633, 2000.

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.

USP; FAPESP; UNESP (Brasil). SERTIÉ, J. A. A.; WOISKY, R. G.; SANTOS, A. G.; CAVALHEIRO, A. J.; TININIS, A. G.; BOLZANI, V. S.; RODRIGUES, M. **Extratos, frações ativas e/ou compostos isolados de *Casearia sylvestris*, formulações farmacêuticas e seu uso.** Patente depositada no INPI sob o protocolo 018090011951, 11 mar. 2009.

VANISREE, M.; LEE, C.Y.; LO, S.F.; NALAWADE, S.M.; LIN, C.Y.; TSAY, H.S. Studies on the production of some important secondary metabolites from medicinal plants by plant tissue cultures. **Bot Bull Acad Sinica**. v. 45, p. 1-22, 2004.

VINEGAR, R.; TRUAX, J. F.; SELPH, J. L. Some quantitative temporal characteristics of carrageenin induced pleurisy in the rat. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**. v. 143, n. 3, p. 711–714, 1973.

WALLACE, J. L. Prostaglandins, NSAIDs, and gastric mucosal protection: why doesn't the stomach digest itself? **Physiological Reviews**. v. 88, p. 1547-1565, 2008.

WANG, Y-C. Medicinal plant activity on *Helicobacter pylori* related diseases. **World Journal of Gastroenterology**, v. 20, n. 30, p. 10368-10382, 2014.

WANG, W.; LI, X. C.; ALI, Z.; KHAN, I. A. Two new C₁₃ *nor*-isoprenoids from the leaves of *Casearia sylvestris*. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, v. 57, n. 6, p. 636-638, 2009a.

WANG, W.; ALI, Z.; LI, X-C.; SMILLIE, T. A.; GUO, D-A; KHAN, I. A. New clerodane diterpenoids from *Casearia sylvestris*. **Fitoterapia**, v. 80, n. 7, p. 404-407, 2009b.

WANG, W.; ALI, Z.; LI, X-C.; KHAN, I. A. Clerodane and *ent*-kaurane diterpene glycosyl and glycoside derivatives from the leaves of *Casearia sylvestris*. **Helvetica Chimica Acta**, v. 92, n. 9, p. 1829–1839, 2009c.

WANG, W.; ZHAO, J.; WANG, Y-H.; SMILLIE, T. A.; LI, X-C.; KHAN, I. A. Diterpenoids from *Casearia sylvestris*. **Planta Medica**, v. 75, n. 13, p. 1436-1441, 2009d.

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.

WINTER, C.; RISLEY, E.; NUSS, G. Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for anti-inflammatory drugs. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.** v.111, p.544-547, 1962.

WOOD, J. N. From plant extract to molecular panacea: a commentary on Stone (1763) "An account of the success of the bark of the willow in the cure of the agues". **Philosophical transactions of the Royal Society of London (Series B Biological Sciences)**, v. 370, 2015.

XIA, L.; GUO, Q; TU, P.; CHAI, X. The genus *Casearia*: a phytochemical and pharmacological overview. **Phytochem Rev.** v. 14, p. 99-135, 2015.

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

ZERBE, P.; BOHLMANN, J. Plant diterpene synthases: exploring modularity and metabolic diversity for bioengineering. **Trends in Biotechnology**, v. 33, n. 7, 2015.