

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**

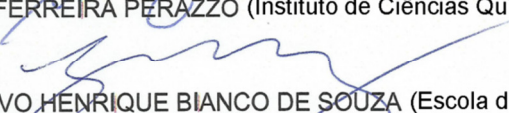
Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

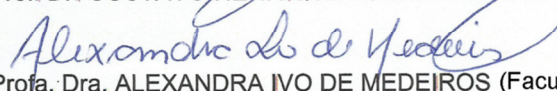
Araraquara, 26 de fevereiro de 2016.

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 "namorado" 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^{oc}ês. 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 caseargreina 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 caseargreina 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 caseargreina F (Casg F).	81
Figura 15	Cromatogramas (CLAE-DAD) dos padrões casearina B (Cas B), casearina J (Cas J) e caseargreina 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 dessecção 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 farmacológicos *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.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Realizar um estudo químico-farmacológico do extrato etanólico e diterpenos clerodânicos de folhas de *C. sylvestris* contribuindo para o desenvolvimento de medicamentos com agentes terapêuticos anti-inflamatórios e gastroprotetores originados a partir de *C. sylvestris*, sejam à base de extratos (fitoterápicos) ou de fármacos.

2.2 Objetivos específicos

- a) Caracterizar padrões de diterpenos clerodânicos por espectrometria de massas (*full scan* e fragmentação) com fonte de ionização por *spray* de elétrons (ESI-MS e ESI-MSⁿ);
- b) Identificar diterpenos clerodânicos no extrato etanólico de folhas de *C. sylvestris* e na fração rica em casearinas por ESI-MS, ESI-MSⁿ e cromatografia em camada delgada de alta eficiência (HPTLC) hifenada com espectrometria de massas através de dessorção por *spray* de elétrons (DESI-MS) seguida de obtenção de imagem química (HPTLC-DESI-MS-IMAGING);
- c) Investigar a atividade anti-inflamatória do extrato etanólico, frações e diterpenos clerodânicos de folhas de *C. sylvestris* por meio dos ensaios *in vivo*, pleurisia induzida pela carragenina e edema de pata induzido por uma fosfolipase A₂ do veneno de *Bothrops jararacussu* (BthTX-II) em ratos, e os seguintes ensaios *in vitro*: atividade enzimática das ciclo-oxigenases 1 e 2 e estimulação de macrófagos por lipopolissacarídeo para avaliar o efeito sobre a produção de óxido nítrico e prostaglandina E₂;
- d) Investigar a atividade gastroprotetora do extrato etanólico, frações e diterpenos clerodânicos de folhas de *C. sylvestris* em modelo de lesões gástricas induzidas por indometacina em ratos e ensaio *in vitro* de atividade anti-*Helicobacter pylori*.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Informações botânicas, etnobotânicas e etnofarmacológicas de *Casearia sylvestris*

Casearia sylvestris, inicialmente descrita por Swartz em 1797 na *Flora Indiae Occidentalis*, é uma espécie arbórea ou arbustiva com altura de 1-20 metros (Figura 1), colonizadora de áreas abertas e característica de matas secundárias que se desenvolvem em associações vegetais como campos, pastagens, várzeas, planícies aluviais, capoeiras e orla de rios (TORRES; YAMAMOTO, 1986). Atualmente, o gênero *Casearia* está classificada na tribo *Samydeae*, família *Salicaceae* e ordem *Malpighiales* (THE ANGIOSPERM PHYLOGENY GROUP, 2003). A *C. sylvestris* é nativa da América do Sul, sendo encontrada em todo território brasileiro (FERREIRA et al., 2011). O nome *Casearia* é uma homenagem ao missionário holandês Casearius e *sylvestris* tem origem no latim e significa floresta ou silvestre (TORRES; YAMAMOTO, 1986).

Figura 1 - *Casearia sylvestris* (AGS 102) – Horto de Plantas Medicinais e Tóxicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, Araraquara-SP.



Fonte: foto tirada pelo autor.

O nome popular principal é guaçatonga, termo de origem Tupi-Guarani. No entanto, também é conhecida pela população por uma enorme variedade de nomes, dentre os quais chá-de-bugre, erva-de-bugre, erva-de-lagarto, pau-de-lagarto, cafezinho-do-mato e paratudo (FERREIRA et al., 2011).

O relato mais antigo encontrado na literatura sobre o uso popular da guaçatonga é como antiofídico (CAMINHOÁ, 1877). Tal uso tem como base uma explicação popular, a observação de que os lagartos picados por cobras curam-se comendo as folhas desta planta (CORREA, 1975). Na medicina indígena da região amazônica utilizavam-se suas folhas, cascas e raízes como antitérmico, de uso externo (banho) ou interno (decocção) (JUNGES; SCHENKEL; SIMÕES, 1985). Há mais de 80 anos, farmacêuticos do sul empregavam *C. sylvestris* no preparo de elixires “depurativos” e antirreumáticos, reconhecidos como eficazes no tratamento de moléstias da pele de origem sífilítica (CORREA, 1975). Nesta época, a planta foi incluída na *Pharmacopeia dos Estados Unidos do Brasil*, na qual é denominada de “Herva de Bugre” e cujo preparo é o extrato hidroalcoólico (etanol: água 1:2, v/v) de folhas obtido por percolação (1:1, massa/volume) (SILVA, 1926).

3.2 Estudos fitoquímicos de *Casearia sylvestris*

Em relação aos metabólitos secundários presentes em folhas de *C. sylvestris*, estudos fitoquímicos iniciais indicaram a presença de saponinas (SCAVONE et al., 1979) e flavonoides (SCAVONE et al., 1979; JUNGES; SCHENKEL; SIMÕES, 1985) em extrato etanólico. A partir da segunda metade da década de 1980, diversos diterpenos clerodânicos passaram a ser identificados em extratos de folhas de *C. sylvestris*, e atualmente são considerados os principais metabólitos secundários da espécie. Por isso, serão tratados numa subseção separada. Paralelamente, outros metabólitos secundários continuaram sendo identificados em folhas desta espécie. No extrato aquoso, compostos fenólicos (flavonoides e não-flavonoides), triterpenos, naftoquinona (RASLAN et al., 2002), ácido elágico e derivados (DA SILVA et al., 2008), no extrato etanólico foram encontrados derivados do ácido gálico (DA SILVA et al., 2009), e no extrato metanólico, *nor*-isoprenoides C₁₁, *nor*-isoprenoides C₁₃ e glicosídeos *nor*-isoprenoides C₁₃ (WANG et al., 2009a), diterpenos *ent*-cauranos glicolizados (WANG et al., 2009c; WANG et al., 2009d) e neolignananas (WANG et al., 2010b). Recentemente, Bueno (2015) identificou o flavonoide rutina em extrato de

folhas utilizando etanol: isopropanol: água 30:20:50 (v/v/v) como solvente extrator. Estes metabólitos secundários estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 - Metabólitos secundários, exceto diterpenos clerodânicos, identificados e/ou isolados de extratos de folhas e outras partes de *Casearia sylvestris*.

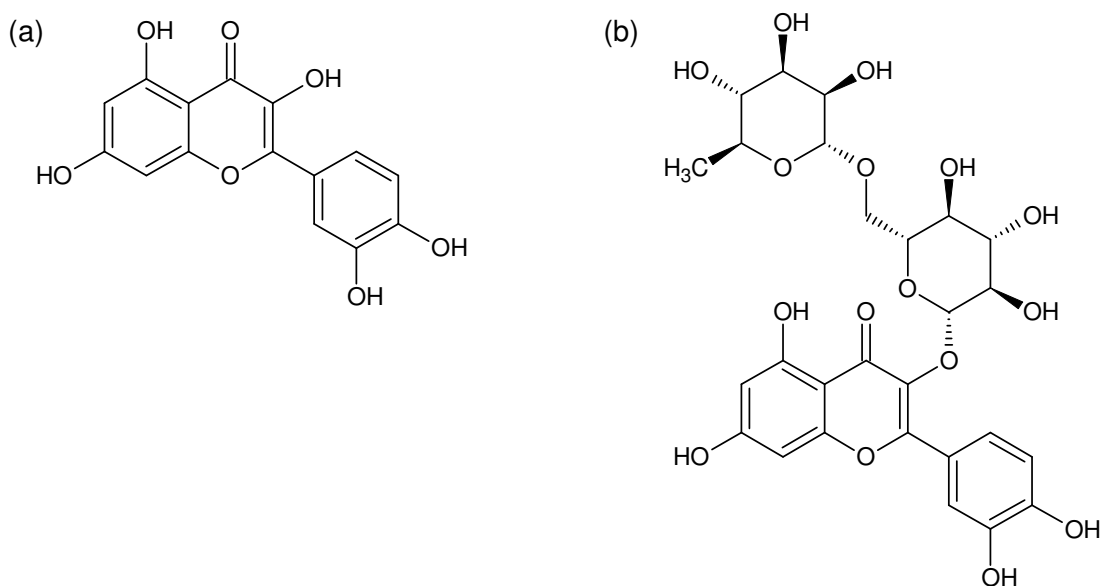
Classe	Metabólitos secundários	Referências
saponinas	-	Scavone et al. (1979)
flavonoides e flavonas	-	Scavone et al. (1979)
	quercetina, 4'- <i>O</i> -metiléter-canferol e isoramnetina	Junges, Schenkel e Simões (1985)
	hesperidina, isoquercetina e rutina	Raslan et al. (2002)
	rutina	Bueno (2015)
triterpenos	lupeol, α e β -amirina	Raslan et al. (2002)
naftoquinona	lapachol	Raslan et al. (2002)
compostos fenólicos (não flavonoides)	ácidos cafeico, clorogênico e vanílico	Raslan et al. (2002)
	ácido elágico e derivados ^{1, 2 e 3}	Da Silva et al. (2008)
	derivados do ácido gálico ^{4 e 5}	Da Silva et al. (2009)
glicosídeos		
<i>nor</i> -isoprenoides C ₁₃	compostos 6 e 7	Wang et al. (2009a)
<i>nor</i> -isoprenoides C ₁₃	icarisideo B ₅ , bizantionosideo B, blumenol B e C	Wang et al. (2009a)
<i>nor</i> -isoprenoide C ₁₁	loliolida	Wang et al. (2009a)
-	tirosol	Wang et al. (2009b)
-	oplopanona	Wang et al. (2009b)
-	composto 8	Wang et al. (2009b)
-	composto 9	Wang et al. (2009b)
diterpenos <i>ent</i> -cauranos glicosidados	silvestresídeos A e B	Wang et al. (2009d)
	silvestresídeos C-E	Wang et al. (2009c)
neolignanas	casearialignanas A– F	Wang et al. (2010b)
lignana	siringaresinol- β -D-glicosídeo	

Legenda dos metabólitos secundários enumerados:

- 1: ácido 3'-*O*-metil elágico
- 2: ácido 3,3'-di-*O*-metil elágico
- 3: ácido 3-*O*-metil-3',4'-metilenodioxil elágico
- 4: 3,5-dimetil éter do galato de metila
- 5: 3,5-dimetil éter do galato de isobutila
- 6: (6*S*,9*S*)-6,9-diidroxi-megastimano-4-en-9-*O*- β -D-glicopiranosídeo
- 7: (6*S*,9*S*)-6,9-diidroxi-megastimano-4-en-9-*O*- β -D-apiofuranosil-(1 $\rightarrow$ 6)- β -D-glicopiranosídeo
- 8: 4-hidroxi-4-metil-2-[(1*R*)-1-(1-metiletil)-4-oxopentil]-2-cicloexen-1-ona
- 9: 1 β ,6 α -diidroxi-eudesmano-4(15)-eno

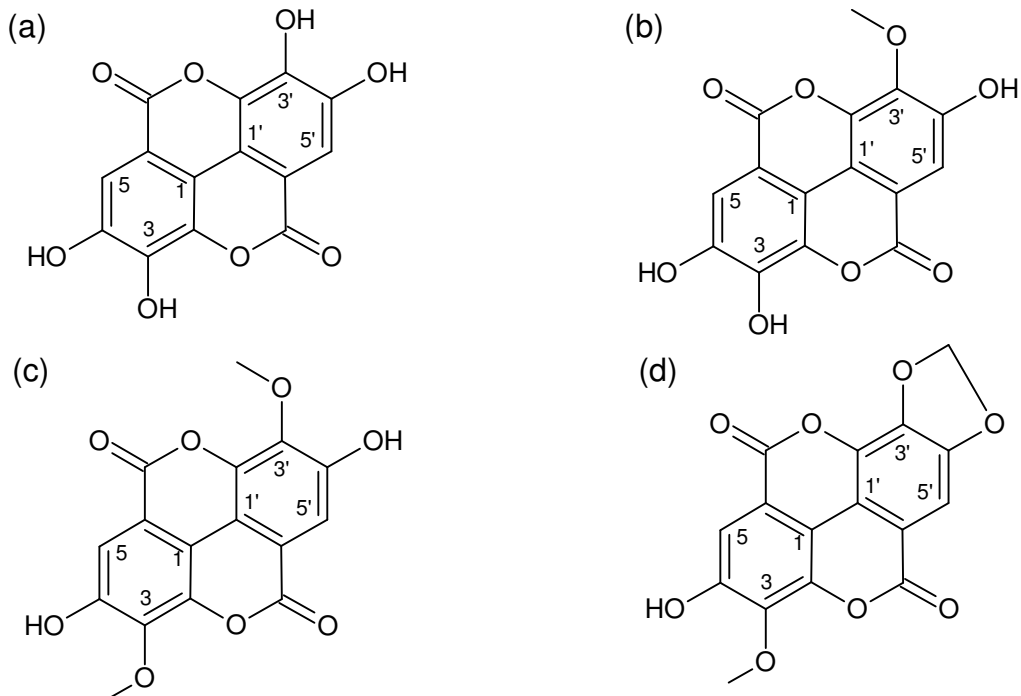
Destes metabólitos secundários, merecem destaque farmacológico os flavonoides quercetina e rutina (Figura 2), o ácido elágico e derivados (Figura 3) e os derivados do ácido gálico (Figura 4).

Figura 2 – Estrutura química da quercetina (a) e da rutina (b).



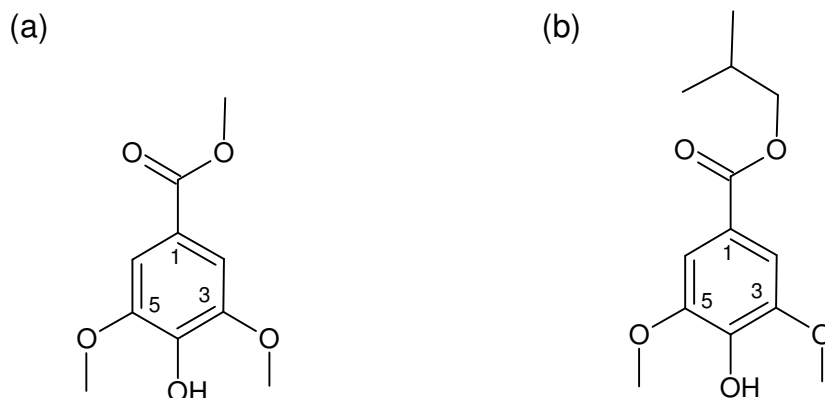
Fonte: elaborado pelo autor.

Figura 3 – Estrutura química do ácido elágico (a) e derivados encontrados em folhas de *Casearia sylvestris*: ácido 3'-O-metil elágico (b), ácido 3,3'-di-O-metil elágico (c) e ácido 3-O-metil-3',4'-metilenodioxielágico (d).



Fonte: elaborado pelo autor.

Figura 4 – Estrutura química de derivados do ácido gálico encontrados em folhas de *Casearia sylvestris*: 3,5-dimetil éter do galato de metila (a) e 3,5-dimetil éter do galato de isobutila (b).



Fonte: elaborado pelo autor.

Em relação ao óleo essencial de folhas de *C. sylvestris*, Scavone et al. (1979) obtiveram um rendimento de 2,1%, mas não analisaram a composição. Esteves et al. (2005) obtiveram um rendimento semelhante (2,5%) e os dois componentes majoritários foram o biciclogermacreno (40,9%) e o β -acoradieno (20,8%). Já no estudo de Tininis et al. (2006b), os dois componentes majoritários foram os germacrenos B e D. Além disso, estes autores demonstraram que a composição do óleo essencial de folhas de *C. sylvestris* sofre variações intraespecífica conforme o período de coleta das folhas. No período da manhã, a concentração destes metabólitos no óleo foi maior do que no período da tarde, 79,2% e 66,2% para o germacreno D e 14,8% e 13,7% para o germacreno B. O rendimento da extração do óleo essencial por Schneider et al. (2006) e Sousa et al. (2007) foi baixo quando comparado com os estudos anteriores (0,6%) sendo que o componente majoritário encontrado foi o cariofileno (27,5%), seguido do biciclogermacreno (24,2%). Muito provavelmente estes dois trabalhos avaliaram o mesmo óleo essencial, pois a única diferença entre os resultados apresentados é que Schneider et al. (2006) citam o α -cariofileno como componente majoritário e Sousa et al. (2007) citam o β -cariofileno. Considerando que o β -cariofileno foi um dos componentes majoritários encontrado por Silva et al. (2008), acredita-se que Schneider et al. (2006) tenha citado o α -cariofileno no lugar do β -cariofileno. O outro componente majoritário encontrado por Silva et al. (2008) foi o biciclogermacreno e o rendimento de óleo essencial encontrado por estes autores foi de 0,98%, também considerado baixo quando

comparado com Scavone et al. (1979) e Esteves et al. (2005). O rendimento mais baixo (0,23%) foi aquele obtido por Bou et al. (2013) que encontrou o α -zingibereno e *E*-cariofileno como os componentes majoritários (Tabela 2).

Tabela 2 – Estudos fitoquímicos sobre o óleo essencial de folhas de *Casearia sylvestris*.

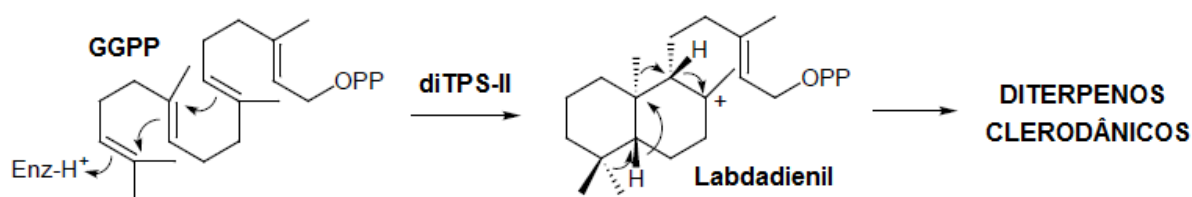
Referência	Rendimento	Componentes majoritários
Scavone et al. (1979)	2,1%	<i>Não determinado</i>
Esteves et al. (2005)	2,5%	biciclogermacreno (40,9%) e β -acoradieno (20,8%)
Tininis et al. (2006b)	<i>não citado</i>	manhã: germacreno B (79,2%) e germacreno D (14,8%) tarde: germacreno B (66,2%) e germacreno D (13,7%)
Schneider et al. (2006)	0,6%	α -cariofileno (27,5%) e biciclogermacreno (24,2%)
Sousa et al. (2007b)	0,6%	β -cariofileno (27,5%) e biciclogermacreno (24,2%)
Silva et al. (2008)	0,98%	biciclogermacreno (43,6%) e o β -cariofileno (18,1%)
Bou et al. (2013)	0,23%	α -zingibereno (48,3%) e <i>E</i> -cariofileno (14,2%)

3.3 Diterpenos clerodânicos

Diterpenos são metabólitos derivados do geranilgeranil-difosfato (GGPP), um composto de 20 átomos de carbono formado a partir de quatro unidades isoprênicas. As plantas produzem milhares de diterpenos (acíclicos, policíclicos e macrocíclicos), a grande maioria metabólitos secundários sintetizados por dezenas de vias metabólicas que envolvem variadas formas da enzima diterpeno sintase (diTPS) (ZERBE; BOHLMANN, 2015).

De acordo com Tokoroyama (2000) e Zerbe e Bohlmann (2015), em uma dessas rotas biossintéticas, uma variação da enzima diTPS da classe II converte o GGPP no precursor cíclico chamado labdadienil que, por sua vez, dá origem aos diterpenos clerodânicos (Figura 5).

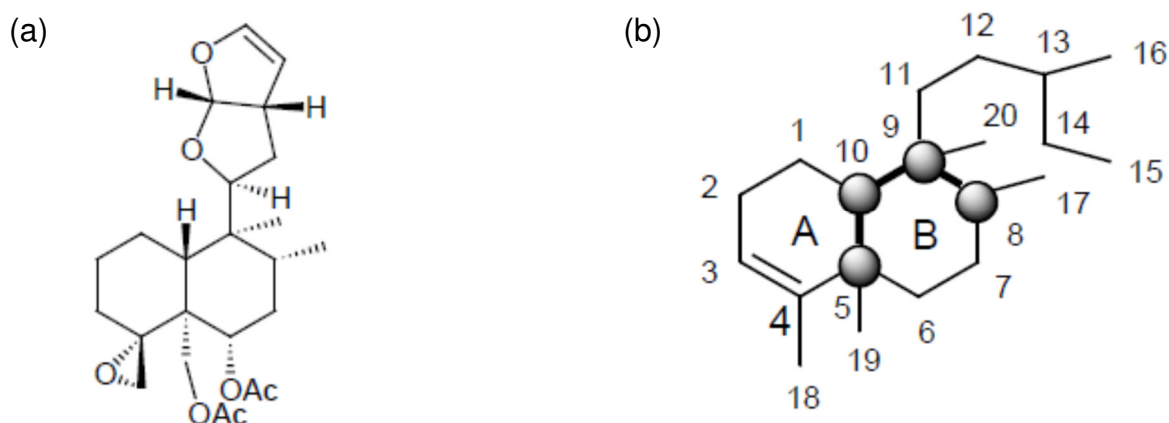
Figura 5 - Biossíntese dos diterpenos clerodânicos.



Fonte: elaborado pelo autor.

O termo clerodânico ou clerodano tem sua origem no composto chamado clerodina (Figura 6a). A clerodina é um diterpeno que foi isolado pela primeira vez em 1936 como o princípio ativo amargo de uma planta indiana chamada *Cleardendron infortunatum* e que teve sua estrutura caracterizada no início da década de 1960 (BARTON et al., 1961). A partir disso, os diterpenos que compartilhavam o mesmo núcleo decalínico da clerodina passaram a ser chamados de clerodânicos. Este núcleo apresenta quatro centros estereogênicos adjacentes conforme destacados na Figura 3b que representa o precursor dos diterpenos clerodânicos que é formado pelos anéis A e B do sistema decalínico com 4 metilas (Me-18 em C-4, Me-19 em C-5, Me-17 em C8 e Me-20 em C9) e uma cadeia lateral com 6 carbonos (C-11 a C-16).

Figura 6 - Estrutura química da clerodina (a) e do precursor dos diterpenos clerodânicos (b).

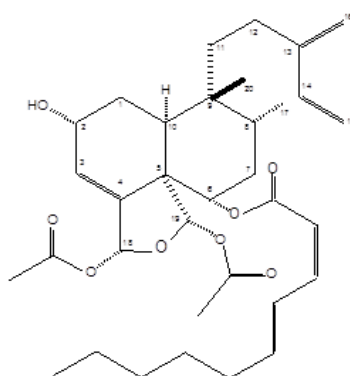


Fonte: elaborado pelo autor.

Durante as décadas de 1960 e 1970 houve muita confusão na literatura em relação à estereoquímica absoluta destes diterpenos. Assim, uma revisão sobre a estereoquímica absoluta da clerodina publicada no final da década de 1970 (ROGERS et al., 1979), passou a classificar os diterpenos clerodânicos em dois tipos: aqueles com estereoquímica semelhante à clerodina em relação à junção dos anéis A e B (H ligado ao C-10 e C ligado ao C-5 em lados opostos do plano do núcleo decalínico) passaram a ser chamados de *neo-clerodânicos* ou *trans-clerodanos* e aqueles com o H ligado ao C-10 e C ligado ao C-5 do mesmo lado do plano do núcleo decalínico ("enantiômeros") passaram a ser chamados de *ent-neo-clerodânicos* ou simplesmente *cis-clerodanos*.

Segundo Xia et al. (2015), mais de mil diterpenos clerodânicos já foram encontrados em diversos gêneros tais como *Labiatae*, *Compositae*, *Verbenaceae* e, principalmente, no gênero *Casearia*. Até 2013, haviam sido isolados e caracterizados um total de 152 diterpenos clerodânicos no gênero *Casearia*, principalmente em *C. sylvestris*, *C. membranacea*, *C. corymbosa* e *C. grewiifolia*. O primeiro deles foi a pitumbina (Figura 7), isolada e caracterizada no final da década de 1980 (GUITTET et al. 1988).

Figura 7 - Estrutura química da pitumbina.



3.3.1 Diterpenos clerodânicos de *Casearia sylvestris*

Em um Congresso realizado também no final da década de 1980, Itokawa et al. (1987) apresentaram os resultados iniciais do estudo da atividade antitumoral do extrato etanólico de folhas de *C. sylvestris* e, por fracionamento biomonitorado, a identificação de um diterpeno clerodânico de fórmula molecular $C_{31}H_{44}O_{10}$ como um dos responsáveis por tal atividade. No ano seguinte, os mesmos autores publicaram, na forma de uma comunicação (ITOKAWA et al., 1988), as primeiras descrições detalhadas de seis diterpenos clerodânicos chamados de casearinas A-F. Dois anos depois, os autores publicaram a caracterização definitiva destes diterpenos clerodânicos (ITOKAWA et al., 1990). No ano seguinte, Morita et al. (1991), isolaram e caracterizaram outras 12 casearinas (G-R) a partir do mesmo tipo de extrato e fração. Sete anos mais tarde, Carvalho et al. (1998) isolaram e caracterizaram mais duas casearinas (S e T) a partir do extrato de folhas obtido com *n*-hexânico e mistura de diclorometano e metanol. Utilizando extrato metanólico, também de folhas, Wang et al. caracterizaram as casearinas U e V (2009d) e outros dez

diterpenos clerodânicos (2009b; 2009c). Utilizando extrato metanólico de folhas e galhos, Oberlies et al. (2002) caracterizaram três novos DC chamados de casearvestrinas (A-C). Por fim, Santos et al. caracterizaram a casearina X e identificaram a caseargrewiina F (2010) e outros dois diterpenos clerodânicos (2007) a partir de extrato etanólico de folhas. Com base no que foi descrito, atualmente existem 39 diterpenos clerodânicos isolados de extratos de *C. sylvestris* e caracterizados quimicamente (Tabelas 3 e 4; Figuras 8-11).

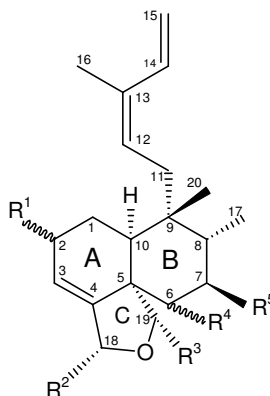
Tabela 3 - Diterpenos clerodânicos isolados de extratos de *Casearia sylvestris*.

Nome	Partes usadas	Solvente(s) extrator(es)	Primeiro Artigo
casearinas A-F	folhas secas	etanol	Itokawa et al. (1990)
casearinas G-R	folhas secas	etanol	Morita et al. (1991)
casearinas S-T	folhas secas	<i>n</i> -hexano e mistura de CH ₂ Cl ₂ /MeOH (2:1, v/v)	Carvalho et al. (1998)
casearinas U-V	folhas secas	metanol	Wang et al. (2009d)
casearina X	folhas secas	etanol	Santos et al. (2010)
casearvestrinas A-C	folhas e galhos secos	metanol	Oberlies et al. (2002)
caseargrewiina F	folhas secas	etanol	Santos et al. (2010)
DC 28-29	folhas secas	etanol	Santos et al. (2007)
DC 30-34	folhas secas	metanol	Wang et al. (2009b)
caseareasídeos A-E	folhas secas	metanol	Wang et al. (2009c)

Legenda dos diterpenos clerodânicos (DC) enumerados: **28:** 15-hidroxi-3-cleroden-2-ona; **29:** (-)-ácido hardwickiico; **30:** 2β-metoxi-cleroda-3,13-dien-18-carboxi-15,16-olide; **31:** 15ξ-metoxi-cleroda-3,12-dien-18-carboxi-15,16-olide; **32:** 15-oxo-equinofilina A; **33:** equinofilina A; **34:** (-)-ácido patagônico.

Destes 39 diterpenos clerodânicos, 27 apresentam o mesmo esqueleto básico (Figura 5) e são representados pelas 23 casearinas (A-X), por três casearvestrinas (A-C) e pela caseargrewiina F. Esta estrutura básica é composta pelo sistema decanílico (anéis A e B) na configuração *cis*-clerodânica com duas metilas, uma em C-8 (Me-17) e outra em C-9 (Me-20), uma cadeia lateral em C-9 com 6 carbonos (C-11 a C-16) e dieno conjugado em C-12 (configuração *cis*) e C-14, além do anel C (diidrofurânico/diacetálico) formado a partir de C-4 e C-5. Já os substituintes oxigenados presentes nos carbonos 2, 6, 7, 18 e 19 deste esqueleto básico conferem a diversidade a estes diterpenos (Tabela 4). Na posição C-2 (R¹), os substituintes são ésteres, hidroxila, metoxila ou cetona. O grupo acetato prevalece nas posições C-18 (R²) e C-19 (R³), seguido de *n*-butanoato, metoxila, etoxila e carbonila. Na posição C-6 (R⁴) predomina a hidroxila e o grupo acetato e em C-7 (R⁵) o *n*-butanoato. O anel C diacetálico é oxigenado e constitui-se em um arranjo funcional pouco presente em substâncias naturais, podendo ser observado como um dialdeído protegido.

Figura 8 - Estrutura química geral de 27 diterpenos clerodânicos de *Casearia sylvestris* (casearinas A-X, casearvestrinas A-C e caseargrewiina F). Os substituintes R¹ a R⁵ encontram-se na Tabela 4.



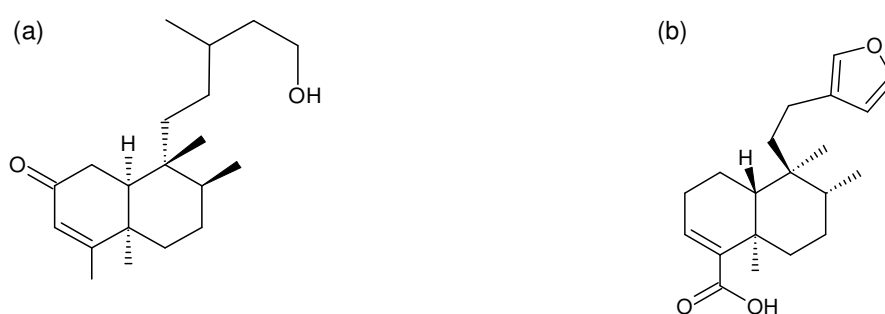
Fonte: elaborado pelo autor.

Tabela 4 - Diterpenos clerodânicos isolados *Casearia sylvestris*, onde os substituintes R¹ a R⁵ referem-se aos substituintes da estrutura representada na Figura 8.

Diterpenos	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵
Casearina A	OCH ₃ (α)	CH ₃ CO ₂	CH ₃ CO ₂	OH (α)	<i>n</i> -C ₃ H ₇ CO ₂
Casearina B	OCH ₃ (α)	CH ₃ CO ₂	CH ₃ CO ₂	CH ₃ CO ₂ (α)	<i>n</i> -C ₃ H ₇ CO ₂
Casearina C	OH (α)	CH ₃ CO ₂	CH ₃ CO ₂	CH ₃ CO ₂ (α)	<i>n</i> -C ₉ H ₁₉ CO ₂
Casearina D	OH (α)	<i>n</i> -C ₃ H ₇ CO ₂	CH ₃ CO ₂	OH (α)	<i>n</i> -C ₃ H ₇ CO ₂
Casearina E	OH (α)	OCH ₂ CH ₃	CH ₃ CO ₂	OH (α)	<i>n</i> -C ₉ H ₁₉ CO ₂
Casearina F	OH (α)	OCH ₂ CH ₃	CH ₃ CO ₂	OH (α)	<i>n</i> -C ₃ H ₇ CO ₂
Casearina G	OCH ₃ (α)	CH ₃ CO ₂	CH ₃ CO ₂	H	<i>n</i> -C ₃ H ₇ CO ₂
Casearina H	OH (α)	CH ₃ CO ₂	CH ₃ CO ₂	H	<i>n</i> -C ₃ H ₇ CO ₂
Casearina I	OH (α)	CH ₃ CO ₂	<i>n</i> -C ₃ H ₇ CO ₂	H	<i>n</i> -C ₃ H ₇ CO ₂
Casearina J	OCH ₃ (α)	<i>n</i> -C ₃ H ₇ CO ₂	CH ₃ CO ₂	OH (α)	<i>n</i> -C ₃ H ₇ CO ₂
Casearina K	CH ₃ CO ₂ (α)	CH ₃ CO ₂	CH ₃ CO ₂	OH (α)	<i>n</i> -C ₃ H ₇ CO ₂
Casearina L	OCH ₃ (α)	<i>n</i> -C ₃ H ₇ CO ₂	CH ₃ CO ₂	CH ₃ CO ₂ (α)	OH
Casearina M	OH (α)	<i>n</i> -C ₃ H ₇ CO ₂	<i>n</i> -C ₃ H ₇ CO ₂	CH ₃ CO ₂ (α)	OH
Casearina N	OCH ₃ (α)	CH ₃ CO ₂	<i>n</i> -C ₃ H ₇ CO ₂	CH ₃ CO ₂ (α)	<i>n</i> -C ₃ H ₇ CO ₂
Casearina O	OCH ₃ (α)	<i>n</i> -C ₃ H ₇ CO ₂	CH ₃ CO ₂	CH ₃ CO ₂ (α)	<i>n</i> -C ₃ H ₇ CO ₂
Casearina P	OCH ₃ (α)	CH ₃ CO ₂	CH ₃ CO ₂	CH ₃ CO ₂ (α)	CH ₃ CO ₂
Casearina Q	OH (α)	CH ₃ CO ₂	CH ₃ CO ₂	CH ₃ CO ₂ (α)	<i>n</i> -C ₃ H ₇ CO ₂
Casearina R	= O	CH ₃ CO ₂	CH ₃ CO ₂	OH (α)	<i>n</i> -C ₃ H ₇ CO ₂
Casearina S	OCH ₃ (α)	= O	CH ₃ CO ₂	H	<i>n</i> -C ₃ H ₇ CO ₂
Casearina T	OCH ₃ (α)	CH ₃ CO ₂	CH ₃ CO ₂	CH ₃ CO ₂ (β)	<i>n</i> -C ₃ H ₇ CO ₂
Casearina U	OCH ₃ (α)	OCH ₃	CH ₃ CO ₂	OH (α)	<i>n</i> -C ₃ H ₇ CO ₂
Casearina V	OH (α)	OCH ₃	CH ₃ CO ₂	OH (α)	<i>n</i> -C ₃ H ₇ CO ₂
Casearina X	<i>n</i> -C ₃ H ₇ CO ₂ (α)	<i>n</i> -C ₃ H ₇ CO ₂	CH ₃ CO ₂	OH (α)	H
Casearvestrina A	(CH ₃) ₂ CHCO ₂ (β)	CH ₃ CO ₂	CH ₃ CO ₂	OH (α)	H
Casearvestrina B	CH ₃ CH ₂ CH(CH ₃)CO ₂ (β)	CH ₃ CO ₂	CH ₃ CO ₂	OH (α)	H
Casearvestrina C	<i>n</i> -C ₅ H ₁₁ CO ₂ (β)	CH ₃ CO ₂	CH ₃ CO ₂	OH (α)	H
Caseargrewiina F	<i>n</i> -C ₃ H ₇ CO ₂ (α)	CH ₃ CO ₂	CH ₃ CO ₂	OH (α)	H

Já os outros 12 diterpenos clerodânicos isolados de folhas de *C. sylvestris* (Figuras 9, 10 e 11) apresentam outros padrões estruturais como, exemplo, ausência do anel diacetálico, menor quantidade de substituintes oxigenados e diferentes padrões de cadeias em C-9. Além disso, apenas o 15-hidroxi-3-cleroden-2-ona (Figura 9a) e o caseareasídeo C (Figura 11, número 3) possuem configuração *cis*-clerodânica.

Figura 9 – Estrutura química do 15-hidroxi-3-cleroden-2-ona (a) e do (-)-ácido hardwickiico (b).



Fonte: elaborado pelo autor.

Figura 10 – Estrutura química dos seguintes diterpenos clerodânicos: 2 β -metoxi-cleroda-3,13-dien-18-carboxi-15,16-olide (a), 15 ξ -metoxi-cleroda-3,12-dien-18-carboxi-15,16-olide (b), 15-oxo-equinofilina A (c), equinofilina A (d) e (-)-ácido patagônico (e).

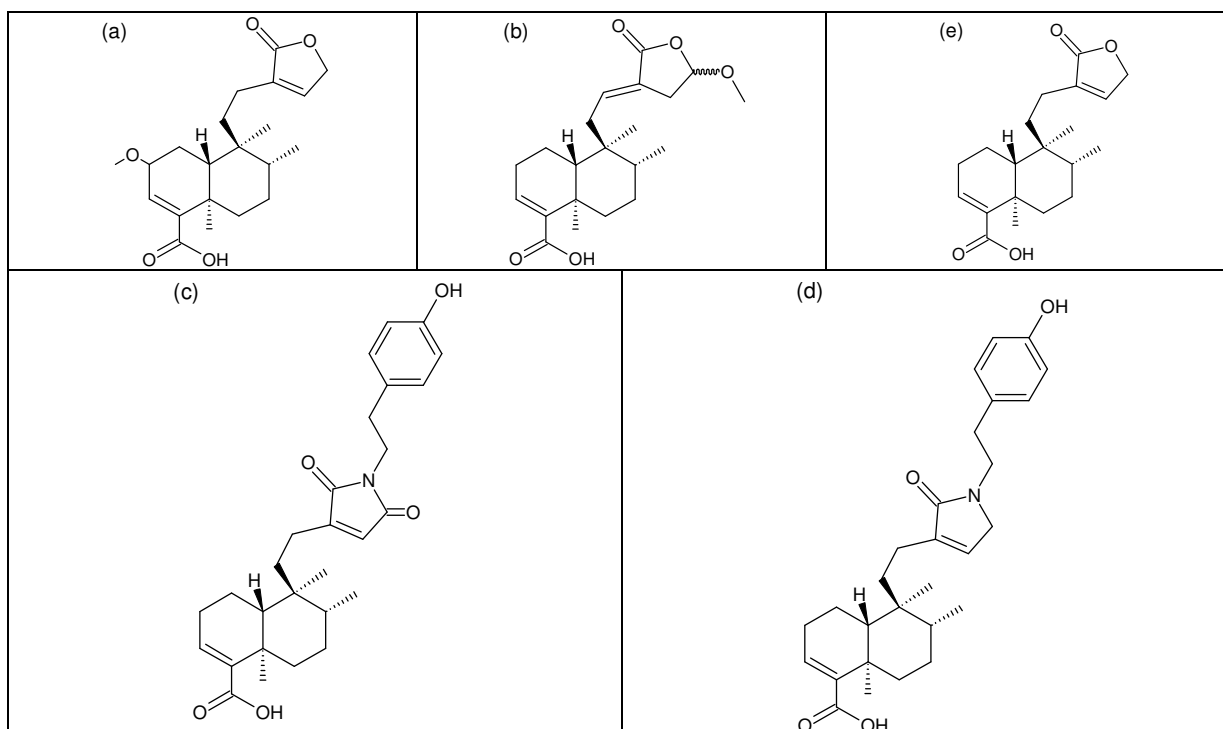
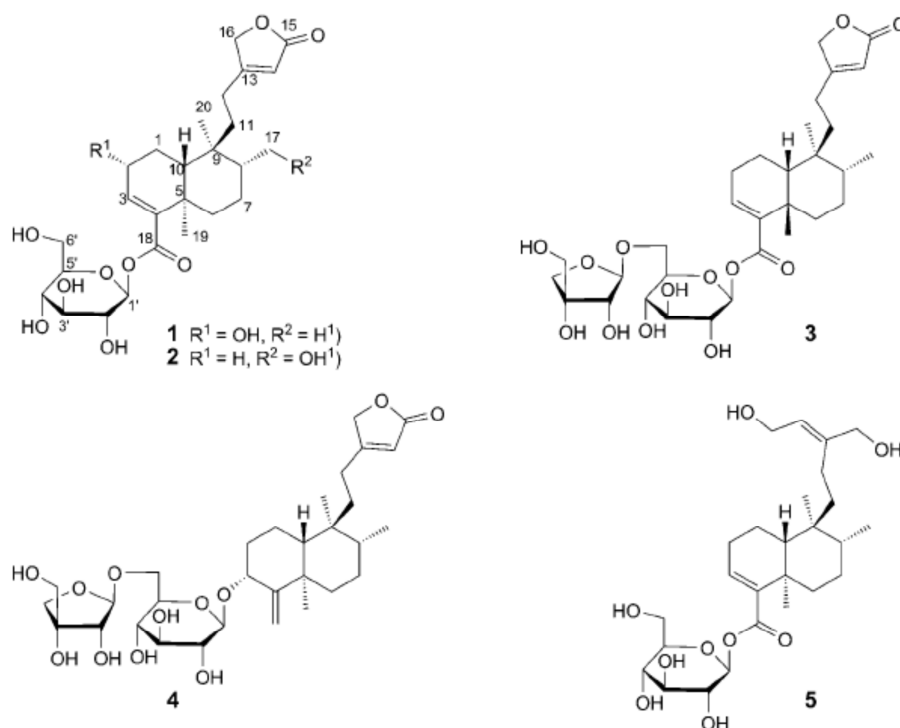


Figura 11 – Estrutura química dos caseareasídeos A-E (1 a 5, respectivamente).



Fonte: Wang et al. (2009c).

3.4 Atividade farmacológica de *Casearia sylvestris*

O levantamento da literatura permitiu concluir as atividades farmacológicas de *C. sylvestris* com maior comprovação científica são as seguintes: antitumoral, citotóxica/citostática, gastroprotetora, especialmente antiulcerogênica, anti-inflamatória, analgésica e antiofídica, especialmente contra fosfolipases A₂ presentes em venenos de serpentes. Já a principal parte utilizada foram as folhas. O resultado deste levantamento encontra-se na Tabela 5.

Tabela 5 – Atividade farmacológica de extratos, preparações ou compostos isolados de folhas de *Casearia sylvestris*.

Atividade farmacológica	Extratos, preparações ou compostos	Referências
antitumoral e/ou citotóxica e/ou citostática	extrato etanólico e casearinas (A-F) casearinas (G-R) EM, frações e casearvestrinas (A-C) óleo essencial derivados do ácido gálico casearinas (X, B, D, L e O) e Casg F casearinas (L, O e X) e ácido hardwickiico casearina G FC, casearinas (B, D e X) e Casg F extrato aquoso extrato metanólico fração rica em casearinas e casearina X	Itokawa et al. (1988,1990) Morita et al. (1991) Oberlies et al. (2002) ¹ Silva et al. (2008) Da Silva et al. (2009) Santos et al. (2010) Ferreira et al. (2010) Dupuy et al. (2013) Ferreira et al. (2014) Felipe et al. (2014) Ameni (2015) Ferreira et al. (2016)
gastroprotetora	extrato hidroalcoólico (etanol 75%) extrato hidroalcoólico (etanol 75%) óleo essencial EEtCs, FC, casearinas B, D, O e X e Casg F extrato etanólico	Basile et al. (1990) Sertié et al. (2000) Esteves et al. (2005) Santos (2008) Fialho et al. (2010)
anti-inflamatória e/ou analgésica <i>in vivo</i>	extrato aquoso extrato hidroalcoólico óleo essencial não informado extrato hidroalcoólico (etanol 70%) extrato hidroalcoólico (etanol 70%) FC, Cas B e Casg F	Ruppelt et al. (1991) ² Silva et al. (2004) Esteves et al. (2005) Sakae et al. (2005) Mattos et al. (2007) Albano et al. (2013) Pierri (2013)
anti-inflamatória <i>in vitro</i>	extrato etanólico extrato etanólico	Napolitano et al. (2005) ³ Gusman et al. (2015)
Antiofídica e/ou anti-PLA ₂ de veneno	extrato aquoso extrato aquoso extrato aquoso extrato aquoso extrato hidroalcoólico extrato aquoso EH, EDM, EAE e EM derivados do ácido elágico	Ruppelt et al. (1990) Borges et al. (2000) Borges et al. (2001) Raslan et al. (2002) Oshima-Franco et al. (2005) Cavalcante et al. (2007) Cintra-Francischinelli (2008) Da Silva et al. (2008)

EM: extrato metanólico. FC: fração rica em diterpenos clerodânicos do tipo das casearinas. EH: extrato hexânico. EDM: extrato dicloro-metano. EAE: extrato acetato de etila. EM: extrato metanólico. 1 – também utilizaram galhos. 2 – também utilizaram cascas. 3 – também utilizaram madeira e casca do caule, madeira e casca da raiz e extrato hexânico da madeira do caule e da casca da raiz.

3.4.1 Atividade antitumoral, citotóxica e citostática

Em relação à atividade antitumoral, estudos publicados entre 1987 e 1990 (ITOKAWA et al.,1987; ITOKAWA et al.,1988; ITOKAWA et al.,1990) demonstraram que o extrato etanólico de folhas de *C. sylvestris* apresentou atividade antitumoral em modelo de ascite induzida pelo sarcoma 180 em camundongos, e por meio de fracionamento biomonitorado, demonstraram que esta atividade foi concentrada na

fração *n*-hexânica, a partir da qual isolaram e caracterizaram seis casearinas (A-F), todas com atividade antitumoral, mas também com atividade citotóxica para fibroblastos normais de pulmão de hamster chinês (células V-79). Destas, a que apresentou maior atividade antitumoral foi a casearina A (a taxa de crescimento do tumor nos animais que receberam esta casearina foi de apenas 4% quando comparado com os animais controle) enquanto que a casearina C apresentou a maior citotoxicidade para células V-79 ($IC_{50} = 0,77 \mu M$). No ano seguinte, Morita et al. (1991), isolaram e caracterizaram outras 12 casearinas (G-R) a partir do mesmo tipo de extrato e fração, e avaliaram a citotoxicidade de todas elas para células V-79. Neste caso, a mais citotóxica foi a casearina G ($IC_{50} = 0,17 \mu M$). Oberlies et al. (2002), utilizando para células de carcinoma epidermoide oral humano (células KB) e fracionamento biomonitorado do extrato metanólico de folhas de *C. sylvestris*, identificaram três novos diterpenos clerodânicos com atividade citotóxica para esta linhagem de células tumorais (casearvestrinas A, B e C).

Posteriormente, diversos estudos de citotoxicidade confirmaram que tanto a fração rica em casearinas (FC) quanto as casearinas isoladas apresentam alta tendência citotóxica e/ou antiproliferativa para linhagens de células de diferentes tipos de tumor tais como leucemia (SANTOS et al., 2010; FERREIRA et al., 2010), melanoma, câncer de cólon e glioblastoma (SANTOS et al., 2010), adenocarcinoma de mama (DUPUY et al. 2015) e sarcoma (FERREIRA et al., 2014). Recentemente, Ferreira et al. (2016) demonstraram atividade antitumoral da casearina X em modelo de ascite induzida pelo sarcoma 180 em camundongos.

Em relação ao óleo essencial de folhas de *C. sylvestris*, Silva et al. (2008) demonstraram citotoxicidade seletiva para células tumorais HeLa, A-549 e HT-29 ($IC_{50} = 63, 61$ e $91 \mu g/ml$, respectivamente) quando comparada com células não-tumorais Vero ($IC_{50} = 210 \mu g/ml$) e macrófagos de camundongos ($IC_{50} = 234 \mu g/ml$). Os autores sugerem envolvimento dos sesquiterpenos β -cariofileno e α -humuleno nesta atividade.

3.4.2 Atividade gastroprotetora

Basile et al. (1990) investigaram a atividade antiulcerogênica do extrato hidroalcoólico (etanol 75%) de folhas de *C. sylvestris* utilizando como modelo experimental a indução de úlcera aguda por estresse em ratos (20 horas de jejum seguida de imersão em água). Os resultados demonstraram que o referido extrato desempenhou efeito antiulcerogênico preventivo mediante redução do volume de suco gástrico. Quando comparado com o misoprostol, um protetor gástrico análogo às prostaglandinas, o extrato de *C. sylvestris* apresentou maior eficácia em relação às úlceras de moderada intensidade. Em relação às lesões mais severas mostrou-se equivalente ao misoprostol e à cimetidina, antagonista do receptor H_2 da histamina.

Sertié, Carvalho e Panizza (2000) demonstraram que, além de úlcera aguda por estresse, o extrato hidroalcoólico (etanol 75%) de folhas da *C. sylvestris* foi capaz de reduzir as lesões em modelo de úlcera crônica induzida por ácido acético em ratos. Além disso, revelaram que houve um aumento no número de fibras colágenas após cinco dias de tratamento com o extrato de *C. sylvestris* e após dez dias com a cimetidina e um tempo de cicatrização duas vezes menor com o extrato de *C. sylvestris* quando comparado com a cimetidina e o misoprostol.

Esteves et al. (2005) também comprovaram a atividade antiulcerogênica da *C. sylvestris*, porém utilizando o óleo essencial de folhas. Quanto aos prováveis mecanismos, demonstraram que o volume da secreção gástrica dos ratos previamente tratados com o óleo essencial de *C. sylvestris* foi significativamente menor do que o grupo controle. Também observaram que não houve alteração do pH da secreção ácida quando comparado com o grupo tratado com a cimetidina. Tais resultados sugerem que o óleo essencial de *C. sylvestris* reduz a secreção gástrica como um todo e não apenas a secreção de H^+ como os inibidores da bomba de prótons e os antagonistas H_2 .

Através de fracionamento biomonitorado, Santos (2008) demonstrou que os diterpenos clerodânicos, especialmente as casearinas, são os princípios ativos antiulcerogênicos presentes no extrato etanólico de folhas de *C. sylvestris*, pois tanto a fração concentrada em diterpenos, quanto diterpenos isoladas (casearinas B, D, O e X caseargrewiina F), apresentaram atividade antiulcerogênica com 100% de inibição na formação de úlceras em modelo de úlcera aguda em ratos. A partir dos

resultados deste e de outros estudos, duas patentes de medicamentos à base de extratos e diterpenos de *C. sylvestris* foram depositadas (FAPESP; USP; UNESP, 2003; USP; FAPESP; UNESP, 2009).

Fialho et al. (2010) avaliaram a atividade do extrato etanólico de folhas da *C. sylvestris* em modelo de úlcera crônica induzida por privação de alimentos sólidos em equinos. Como indicador da presença ou não de ulceração, utilizou-se a sacarose por via oral, pois tal substância só é absorvida na presença de ulceração, o que gera um aumento da sua concentração na urina destes animais. O estudo obteve a comprovação do efeito antiulcerogênico na espécie, pois nos animais tratados preventivamente com o extrato, não houve diferença entre a concentração de sacarose urinária encontrada no início e no término do protocolo de indução de úlcera gástrica, ao contrário do que ocorreu com os animais tratados com veículo.

3.4.3 Atividade anti-inflamatória, analgésica e anti-PLA₂

Ruppelt et al. (1991) foram os primeiros autores que investigaram a atividade anti-inflamatória e analgésica de *C. sylvestris*. Para tanto, utilizaram um modelo no qual os camundongos, após receberem o veículo (controle) ou os extratos de *C. sylvestris* por via oral e o corante azul de Evans por via intravenosa, receberam injeção de ácido acético (agente inflamatório) por via intraperitoneal. Assim, primeiramente avaliou-se a atividade analgésica comparando o número de contorções nos animais tratados e nos animais controle. Em seguida, os animais foram sacrificados e o corante extravasado para cavidade peritoneal foi removido com água destilada e sua concentração determinada por espectrofotometria. Com isso, a atividade anti-inflamatória foi avaliada através da redução do extravasamento do corante. Os resultados demonstraram que o extrato aquoso das folhas e das cascas apresentaram efeitos analgésico e anti-inflamatório significativos. No primeiro caso, houve cerca de 90% de redução do número de contorções abdominais com o extrato das folhas e 60% com o extrato das cascas. No segundo, houve cerca de 50% de redução do extravasamento do corante com o extrato das folhas e 30% com o extrato das cascas. Silva, Almeida e Sousa (2004) também demonstraram que a *C. sylvestris* reduziu o extravasamento do azul de Evans. No entanto, neste caso utilizaram extrato hidroalcoólico da planta e extravasamento do azul de Evans para a pele e não para cavidade peritoneal.

Esteves et al. (2005) avaliaram a atividade antinociceptiva do óleo essencial da *C. sylvestris* (OECS) utilizando o teste de contorções em camundongos. Neste modelo, o OECS inibiu de forma significativa (cerca de 60%) o número de contorções induzidas pela administração intraperitoneal do ácido acético. Ainda em relação à atividade antinociceptiva, Mattos et al. (2007) avaliaram o efeito do extrato hidroalcoólico das folhas de *C. sylvestris* em três modelos de nocicepção em camundongos sendo um de dor não associada à inflamação (teste da chapa quente) e os outros de dor associada à inflamação (número de contorções abdominais e comportamento de lambedura da pata sensibilizada por ovalbumina). Nestes últimos dois testes, o referido extrato de *C. sylvestris* apresentou efeito inibitório significativo em doses testadas (30, 100 e 300 mg/Kg). Já no teste da chapa quente, apresentou efeito inibitório apenas com a maior dose. Tais resultados sugerem que a atividade antinociceptiva da *C. sylvestris* está muito mais relacionada com a inibição de mediadores inflamatórios do que com o aumento do limiar da dor.

Além atividade analgésica, Esteves et al. (2005) também avaliaram a anti-inflamatória do OECS utilizando três modelos experimentais: edema de pata, extravasamento do azul de Evans para cavidade peritoneal e teste do tecido granulomatoso, todos em ratos. Em relação ao edema de pata, o OECS inibiu o edema induzido pela carragenina, mas não pela dextrana. O OECS também não inibiu o extravasamento do azul de Evans para a cavidade peritoneal induzido pela histamina. A dextrana é um polissacarídeo que induz inflamação através da degranulação de mastócitos e consequente liberação de mediadores inflamatórios, principalmente a histamina e a serotonina. Assim, acredita-se que o OECS não seja capaz de inibir este processo e nem de bloquear o receptor H_1 envolvido na inflamação induzida pela histamina. Sakae, Baldisserotton e Bianchini (2005) também utilizaram o edema de pata induzido pela carragenina para demonstrar a atividade anti-inflamatória do extrato de *C. sylvestris*. No entanto, estes autores não descreveram o tipo de extrato que foi utilizado, informaram apenas a dose (100 mg/Kg) e a via de administração (intraperitoneal).

Estudo realizado em nosso grupo de pesquisa por Pierri (2013) avaliou a atividade anti-inflamatória do extrato etanólico de folhas de *C. sylvestris* e derivados em modelo de edema de pata induzido pela carragenina em ratos. Os resultados demonstraram que o extrato, sua fração rica em diterpenos e dois diterpenos

clerodânicos isolados (casearina B e caseargrewiina F) apresentaram atividade anti-inflamatória comparada à indometacina.

Estudo realizado por Albano et al. (2013) demonstraram os efeitos de *C. sylvestris* em modelo de pleurisia induzida pela carragenina em ratos verificando que o extrato hidroalcoólico de folhas inibiu tanto a migração celular quanto a produção de óxido nítrico. Além disso, demonstraram que o extrato apresentou efeito antioxidante neste mesmo modelo experimental.

Quanto à inibição da sPLA₂, Borges et al. (2000) demonstraram que o extrato aquoso das 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 da *C. sylvestris* sobre atividade biológica de sPLA₂s isoladas de venenos (CAVALCANTE et al., 2007; OSHIMA-FRANCO et al., 2005; RASLAN et al., 2002). No entanto, é importante destacar que existem dez diferentes grupos de PLA₂s secretadas sendo que a principal sPLA₂ envolvida com a reação inflamatória em humanos pertence ao grupo V enquanto que as sPLA₂ encontradas em venenos pertencem a outros grupos (DENNIS et al., 2011). Assim, torna-se importante avaliar o possível efeito inibitório de diterpenos clerodânicos da *C. sylvestris* sobre a atividade enzimática *in vitro* da sPLA₂ humana do grupo V (sPLA₂ GV).

3.5 Toxicidade de *Casearia sylvestris*

A Resolução nº 90 de 2004 da ANVISA instituiu o guia para realização de estudos de toxicidade pré-clínica de fitoterápicos (BRASIL, 2004a) com o objetivo de indicar métodos padronizados para avaliação toxicológica de amostras padronizadas do medicamento fitoterápico ou derivado vegetal a partir do qual é produzido. Para tanto, são preconizados testes para avaliar a toxicidade aguda, a toxicidade de doses repetidas, a genotoxicidade (exigido quando há indicação de uso contínuo ou prolongado do medicamento em humanos), e para os fitoterápicos de uso tópico, também a toxicidade local (sensibilização dérmica, irritação cutânea e irritação ocular).

Em relação à avaliação toxicológica de *C. sylvestris*, foram encontrados na literatura estudos de toxicidade aguda, toxicidade de doses repetidas,

genotoxicidade e toxicidade reprodutiva, tanto de extratos e óleo essencial de folhas quanto de diterpenos clerodânicos isolados.

3.5.1 Toxicidade aguda

Quanto à avaliação da toxicidade aguda, o primeiro estudo encontrado na literatura foi conduzido por Silva et al. (1988). Neste estudo, determinou-se a dose letal 50% (DL₅₀) do extrato aquoso de folhas de *C. sylvestris* administrado por via intraperitoneal em camundongos e o valor encontrado pelo método dos probitos foi de 1.792 mg/Kg.

Posteriormente, Basile et al. (1990) avaliaram a toxicidade aguda oral do extrato hidroalcoólico (etanol 75%) de folhas *C. sylvestris* em ratos e concluíram que não foi possível determinar a DL₅₀ porque mesmo a dose mais alta utilizada (1.842 mg/Kg), 32 vezes acima da dose efetiva antiulcerogênica (DE₅₀), não provocou mortalidade no período observado (72 horas).

Já Esteves et al. (2005) determinaram a DL₅₀ do óleo essencial de *C. sylvestris* administrado por via oral em camundongos e encontraram o valor de 1.100 mg/Kg pelo método dos probitos.

Recentemente, Ameni et al. (2015) avaliaram a toxicidade aguda do extrato fluido de folhas de *C. sylvestris* preparado de acordo com a primeira edição da Farmacopeia Brasileira, a qual descreve este preparo por meio de percolação da droga vegetal pulverizada empregando-se como líquido extrato uma mistura de um volume de etanol com dois volume de água (SILVA, 1926). Os autores administraram uma dose de 2.000 mg/Kg deste extrato por via oral para três fêmeas de ratos Wistar e as observaram durante 14 dias conforme preconizado pelas diretrizes da OECD (ORGANIZATION FOR ECONOMIC AND COOPERATION DEVELOPMENT, 2001). Todos animais sobreviveram e não foram encontrados sinais de intoxicação e nem sinais clínicos adversos neste período. Além disso, não foram encontradas alterações em órgãos vitais observados através de exame macroscópico após o sacrifício dos animais. Sendo assim, o extrato foi considerado seguro.

De um modo geral, estes estudos sugerem que preparações de folhas de *C. sylvestris* apresentam baixa toxicidade aguda. Sugerem ainda que os extratos (aquoso e hidroalcoólico) são menos tóxicos do que o óleo essencial, cuja DL₅₀ foi

de 1.100 mg/Kg quando administrado por via oral a camundongos (ESTEVEES et al., 2005). Além disso, é interessante notar que a administração injetável de extrato é mais tóxica do que por via oral uma vez que a DL_{50} do extrato aquoso administrado por via intraperitoneal em camundongos foi de 1.792 mg/Kg (SILVA et al., 1988) enquanto que a administração oral de extratos hidroalcoólicos a ratos não provocou mortes com a dose de 1.842 mg/Kg (BASILE et al., 1990) e sequer sinais de intoxicação com a dose de 2.000 mg/Kg (AMENI et al., 2015).

Em relação à avaliação da toxicidade aguda de compostos isolados de extratos de *C. sylvestris*, a única informação encontrada na literatura foi o trabalho de Santos (2008) que demonstrou que a casearina U, um diterpeno clerodânico isolado do extrato etanólico de folhas de *C. sylvestris*, administrada a ratos por via oral nas doses de 30,0, 65,0 e 172,0 mg/kg não provocou alterações comportamentais ou de peso nos animais submetidos ao teste de toxicidade aguda. Cabe ressaltar que a dose de 172,0 mg/kg foi cerca de 100 vezes maior do que a DE_{100} encontrada para a ação antiulcerogênica desta casearina (1,68 mg/kg).

3.5.2 Toxicidade de doses repetidas

Em relação à toxicidade de doses repetidas, Basile et al. (1990) administraram o mesmo extrato citado acima diariamente por via oral em ratos nas doses de 57,5 mg/Kg (DE_{50} antiulcerogênica) e 143,9 mg/Kg (2,5 vezes superior à DE_{50}) por 30 dias. Em comparação com o grupo controle, os animais dos grupos tratados não mostraram alterações significativas em relação aos parâmetros avaliados durante os 30 dias do experimento (peso corporal e consumo de água e de alimentos). Além disso, não apresentavam sintomas de diarreia, piloereção, atividade estereotipada, convulsões ou sonolência. Ao final dos 30 dias, os animais foram sacrificados para exame macroscópico e pesos relativos de órgãos (fígado, baço e rins) e não foram encontrados desvios significativos da normalidade. Diante destes resultados, conclui-se que o extrato avaliado não provoca toxicidade subcrônica (30 dias) nas doses testadas.

Silva et al. (2006) administraram o extrato aquoso de duas drogas vegetais de *C. sylvestris* adquiridas comercialmente por via oral em ratos por 75 dias na dose de 20 mg/Kg para avaliar a influência deste tratamento sobre a atividade de quatro enzimas do sistema nervoso central (NTPDase, 5'-nucleotidase, Na^+/K^+ -ATPase e

acetilcolinesterase). Por um lado, os resultados demonstraram que houve inibição da atividade destas enzimas, mas por outro, este tratamento subcrônico não causou morte de animais e nem modificações comportamentais ou qualquer outra resposta biológica.

Com o objetivo de investigar a atividade inibitória do extrato hidroalcoólico (etanol 60%) de folhas de *C. sylvestris* e da fração clorofórmica deste extrato sobre a proliferação de células tumorais de Ehrlich *in vivo* (camundongos), Felipe et al. (2014) conduziram um experimento prévio semelhante a uma avaliação de toxicidade subcrônica para se determinar uma dose não tóxica do extrato e da fração a ser utilizada no estudo. Para tanto, administraram a camundongos doses diárias de 75, 150 e 300 mg/Kg de cada amostra por via intraperitoneal durante nove dias e acompanharam sinais de intoxicação (piloereção, embotamento, inatividade e perda de apetite) e mortalidade. As doses de 75 e 150 mg/kg (ambas amostras) não provocaram mortalidade, mas apenas a menor dose não provocou sinais de intoxicação. Já a dose de 300 mg/Kg provocou sinais de intoxicação e mortalidade para ambas amostras, sendo a fração mais tóxica do que o extrato. Por um lado, os autores encontraram uma dose não tóxica para o estudo (75 mg/Kg), e por outro, contribuíram com informações sobre a toxicidade de doses repetidas do extrato hidroalcoólico de folhas de *C. sylvestris* e sua fração.

Recentemente, Ameni et al. (2015) avaliaram a toxicidade subcrônica do mesmo extrato utilizado na avaliação da toxicidade aguda como citado anteriormente. Neste caso, administraram diariamente o extrato por via oral em ratos nas doses diárias de 60, 120 e 240 mg/Kg por dois períodos (28 e 90 dias). Durante estes períodos, foram avaliados sinais clínicos de intoxicação e mortalidade (diariamente) assim como peso corporal e consumo de alimentos (semanalmente). No final destes períodos, os animais foram sacrificados para avaliação dos seguintes desfechos: hemograma completo, bioquímica sérica, celularidade de medula óssea e baço, peso e histopatologia de órgãos (baço, timo, fígado e rins). Nenhuma das doses avaliadas provocou sinais clínicos de intoxicação, mortalidade, alterações significativas de peso corporal ou consumo de alimentos. Também não foram encontradas alterações tóxicas em relação aos desfechos avaliados no final dos períodos. Apesar disso, foram encontradas alterações não adversas, mas significativas, de alguns parâmetros bioquímicos com as doses de 120 e 240 mg/Kg. Os ratos tratados com estas doses durante 28 dias apresentaram aumento de

proteínas totais e de albumina e diminuição dos níveis de triglicérides, cloreto e creatinina. Aqueles tratados durante 90 dias com a dose de 120 mg/kg apresentaram redução de colesterol total e aumento de cloreto e os que receberam a dose de 240 mg/kg tiveram redução de creatinina e colesterol total.

Em outro estudo recente, Araújo et al. (2015) investigaram a atividade antioxidante *in vitro* e *in vivo* de uma fração rica em casearinas obtida a partir do extrato etanólico de folhas de *C. sylvestris*. Apesar desta fração ter apresentado atividade antioxidante *in vitro* contra diferentes espécies reativas que provocam estresse oxidativo, os resultados dos estudos *in vivo* demonstraram efeito contrário, ou seja, a administração de doses diárias da fração (2,5, 5, 10 e 25 mg/kg) a camundongos por via intraperitoneal por 7 dias consecutivos induziu estresse oxidativo em áreas do sistema nervoso central (hipocampo e corpo estriado) observado pelo aumento do nível de nitrito (todas as doses) e redução do nível de glutathiona reduzida e catalase (duas doses menores) nestas áreas. Além disso, estes mesmos animais exibiram alterações histológicas que sugerem neurotoxicidade e hepatotoxicidade, principalmente com as duas menores doses da fração.

Em mais um estudo recente com o extrato fluido de folhas de *C. sylvestris* preparado de acordo com a primeira edição da Farmacopeia Brasileira (BRASIL, 1926), Ameni (2015) avaliou o possível estresse oxidativo hepático da administração oral subcrônica deste extrato em ratos (240 mg/Kg/dia; 6 dias consecutivos). Os resultados demonstraram que não houve alteração da atividade das enzimas superóxido dismutase e catalase e nem da peroxidação lipídica avaliada através da determinação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico. No entanto, houve aumento do nível de glutathiona oxidada (GSSG) e redução do nível de glutathiona reduzida (GSH) e da razão GSH/GSSG, o que sugere algum grau estresse oxidativo hepático.

3.5.3 Genotoxicidade

Para avaliação da genotoxicidade, o guia para realização de estudos de toxicidade pré-clínica de fitoterápicos da ANVISA (BRASIL, 2004a) preconiza até dois testes *in vitro* (avaliação da reversão de mutação em bactérias incluindo ativação metabólica ou de dano a cromossomo de células de mamíferos ou de linfoma de camundongo) e um teste *in vivo* (avaliação do dano em cromossomo em células hematopoiéticas de roedores – teste do micronúcleo).

Em relação à genotoxicidade de extratos de folhas e diterpenos clerodânicos isolados de *C. sylvestris*, foram encontrados quatro estudos e em dois deles foram utilizados testes preconizados pela ANVISA, o do micronúcleo (CARVALHO et al., 2009) e o teste de Ames (PIETRO et al., 2013), um ensaio de mutação reversa com *Salmonella typhimurium*.

No entanto, o primeiro estudo encontrado foi conduzido por Carvalho et al. (1998) que, na mesmo trabalho, publicaram a identificação de duas novas casearinas (S e T), assim como a indução de danos ao DNA por estas casearinas e pela casearina G em cepas mutantes de cepas mutantes de *Saccharomyces cerevisiae* (rad 52 Y, RS 321 e rad 188). Os autores demonstraram que tais casearinas induziram danos ao DNA dos três tipos de cepas, mas de forma seletiva para as cepas com deficiência no sistema de reparo do DNA (rad 52 Y, RS 321). Considerando-se que células tumorais também apresentam deficiência dos sistemas de reparo do DNA, pode-se inferir que tais células sejam mais suscetíveis à atividade genotóxica destas casearinas do que células normais.

Carvalho et al. (2009), além do teste do micronúcleo que revela danos drásticos em nível cromossômico, realizou-se o teste do cometa, o qual detecta danos ao DNA suscetíveis à reparação, em células de medula óssea de camundongos após 14 dias de administração oral do extrato etanólico de folhas de *C. sylvestris* e da caseargrewiina F, um diterpeno clerodânico isolado deste extrato. Os resultados demonstraram que, em concentrações elevadas, tanto o extrato etanólico (50 e 75 mg/Kg) quanto a caseargrewiina F (3,8 mg/kg) provocaram atividade genotóxica nos dois testes, indicando não apenas danos suscetíveis à reparação, mas também lesões irreparáveis ao material genético. Todavia, em baixas concentrações, o extrato (3, 13 e 25 mg/kg) e a caseargrewiina F (0,63; 1,3 e

2,5 mg/kg) minimizaram os danos induzidos pela ciclofosfamida ao DNA nos dois testes.

Outros dois estudos utilizaram o teste do cometa, porém através de ensaios *in vitro* com células de hepatoma de *Rattus norvegicus* (HTC) e células normais V-79 (MAISTRO; CARVALHO; MANTOVANI, 2004) e com células de carcinoma hepático humano (HepG2) (PIETRO et al., 2013). No primeiro estudo, diferentemente do que foi observado por Carvalho et al. (2009), os resultados demonstraram que o extrato etanólico de folhas de *C. sylvestris* (EEtCs) não foi genotóxico e, quando submetido juntamente com agentes alquilantes (ciclofosfamida e metanossulfato de metila), não se observou ação antigenotóxica e nem potencialização dos danos ao DNA provocados por estes agentes. Já os resultados do teste do cometa obtidos por Pietro et al. (2013) para a casearina B foram semelhantes àqueles observados por Carvalho et al. (2009) para o EEtCs e para a Casg F, uma vez que, nas concentração mais alta testadas, a Cas B foi genotóxica para células HepG2, mas em baixas concentrações, apresentou atividade antigenotóxica protegendo o DNA contra danos oxidativos causados pela H₂O₂. Como relatado anteriormente, Pietro et al. (2013) também executaram o teste de Ames. Neste caso, além da cas B não ter sido mutagênica para *Salmonella typhimurium* nas concentrações mais altas testadas, apresentou atividade antimutagênica contra mitomicina C (cepa TA98) e, principalmente, contra aflatoxina B₁ (cepa TA102).

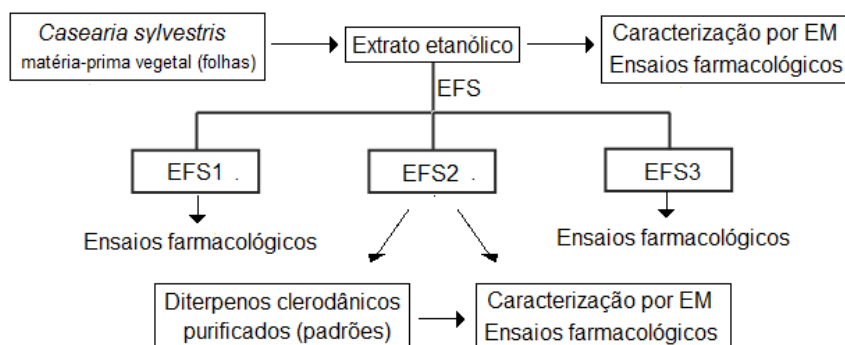
3.5.4 Toxicidade reprodutiva

O uso popular de *C. sylvestris* como abortivo no sul do Brasil estimulou a investigação dos efeitos de extratos desta planta sobre propriedades do útero de ratas (tônus basal, frequência, amplitude e força de contração). Os resultados indicaram que os extratos aquoso e etanólico de folhas foram capazes de modificar a atividade uterina estimulando ou inibindo estas propriedades de forma diferente. As modificações mais significativas foram notadas para o extrato aquoso. Além disso, este potencializou a ação da ocitocina, enquanto que o extrato etanólico inibiu parcialmente sua ação (SILVA et al., 1988). De outro lado, estudos toxicológicos com extrato etanólico de folhas não evidenciaram ação abortiva nem induziram má formação óssea na prole de fêmeas tratadas durante a fase de gestação (FAPESP; UNESP; USP, 2003).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Este trabalho foi desenvolvido conforme o fluxograma abaixo (Figura 12) podendo ser dividido em três partes.

Figura 12 – Fluxograma do desenvolvimento do trabalho.



EFS: extração em fase sólida. EM: espectrometria de massas

A primeira etapa consistiu no preparo e análises do extrato etanólico de folhas de *C. sylvestris* (EEtCs) e frações por extração em fase sólida (EFS1-3) conforme descrito nas subseções 4.1 e 5.1. Esta parte foi realizada em conjunto com o aluno de mestrado Flávio Alexandre Carvalho que defendeu sua Dissertação no dia 29 de outubro de 2015 (CARVALHO, 2015).

Os diterpenos clerodânicos purificados (padrões) utilizados neste trabalho foram as casearinas B e X e a caseargrewiina F, purificados e caracterizados por Santos (2008), a casearina J, purificada e caracterizada por Carvalho (2015), e a casearina O, purificada e caracterizada pelo aluno Fernando Odda durante o seu Mestrado ainda em andamento sob a orientação do Prof. Dr. André Gonzaga dos Santos. Estas duas últimas casearinas foram purificadas a partir do material vegetal obtido neste trabalho.

Em todos os casos, a purificação dos diterpenos foi realizada através de fracionamento da EFS2 por cromatografia em coluna de fase normal seguida de CLAE-DAD preparativa das frações selecionadas em função da massa e do perfil cromatográfico. A determinação estrutural dos diterpenos purificados foi realizada utilizando-se métodos espectrométricos, incluindo ressonância magnética nuclear de ^1H e ^{13}C unidimensional e bidimensional, espectrometria de massas, espectrometria de absorção no infravermelho e no ultravioleta, técnicas hífenadas (CLAE-DAD e

CLAE-EM), bem como consulta aos dados da literatura (SANTOS, 2008; CARVALHO, 2015).

Na segunda parte do trabalho, os padrões de diterpenos clerodânicos, o extrato etanólico de folhas de *C. sylvestris* (EEtCs) e a fração rica em diterpenos (EFS2) foram caracterizados por espectrometria de massas (subseções 4.2 e 5.2).

Por fim, a terceira parte consistiu na avaliação do extrato e das frações obtidos neste trabalho e dos padrões de diterpenos clerodânicos em ensaios farmacológicos para investigar a atividade anti-inflamatória e gastroprotetora (subseções 4.3 e 5.3).

4.1 Material vegetal

A obtenção, o preparo e as análises da matéria-prima vegetal, do extrato etanólico de folhas de *C. sylvestris* e das frações obtidas por extração em fase sólida foram realizados conforme descrito por Santos (2008) utilizando materiais e equipamentos descritos na subseção 4.1.1 e locados em Laboratórios da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP.

Esta etapa foi realizada em conjunto com o aluno de mestrado Flávio Alexandre Carvalho que defendeu sua Dissertação no dia 29 de outubro de 2015 (CARVALHO, 2015).

4.1.1 Materiais e equipamentos

Balança analítica: Marte[®], modelo AY220 (Max 220g. min 0,01g; d = 0,0001g).

Balança por infravermelho: GEHAKA[®], modelo IV 2000.

Banho termostatzado: Tecnal[®], modelo TE – 184.

Cartucho para extração em fase sólida: Agilent SampliQ[®] C18 (15 x 10 mm; 55 µm) / Phenomenex[®] Strata[™] (C-18 E; 15 x 10 mm, 55 µm)

Coluna cromatográfica para CLAE: Hypersil Gold[®] C-18 (250 x 4,6 mm x 5 µm); Phenomenex[®] Luna C-18 (150 x 21,20 mm x 5 µm, 100 Å); Phenomenex[®] Luna C-18 (250 x 21,20 mm x 10 µm, 100 Å); Agilent Eclipse XDB C-18 (250 x 21,20 mm x 7 µm, Zorbax).

Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência 1 (Perkin Elmer[®] Flexar[®], modo analítico e semipreparativo): bomba quaternária, desgaseificador, injetor manual

Rheodyne[®] de 6 p^órticos com *loop* de 20 μ L, detector UV/VIS de comprimento de onda vari^ável, detector DAD, programa gerenciador do cromat^ógrafo e de dados Chromera[®] 4.1.0.6386.

Estufa de secagem de material vegetal com circula^ço de ar: Fanem[®], modelo 315 SE.

Estufa de secagem e esteriliza^ço: Fanem[®], modelo 315 SE.

Fase estacion^ária utilizada em CCD: Sigma-Aldrich[®], S^ílica gel 15-40 μ m; 60 Å; 0,025 mm;

Fases estacion^árias utilizadas na EFS:

- a) **S^ílica gel:** Sigma-Aldrich[®], 63-200 μ m; 60 Å; Sigma-Aldrich[®], 40-63 μ m.
- b) **S^ílica C-18:** Sigma-Aldrich[®], 40-60 μ m.
- c) **Carv^ão ativado em p^ó:** Carlo Erba[®].
- d) **S^ílica C-18:** Discovery[®], 40-63 μ m; DSC-18.

Moinho de facas: Tecnal[®], modelo TE 148.

Placas de Petri: 6 cm d.i.

Rotaevaporador: IKA[®], modelo DEST KV 05S3, acoplado a banho de aquecimento Quimis[®] e banho ultratermostizado Quimis[®], modelo Q214M3.

Solventes:

- a) **águ^a deionizada:** GEHAKA[®], obtida em sistema purificador de águ^a, modelo DG 300.
- b) **Águ^a ultrapura:** Merck Millipore[®], obtida em modelo Direct[®] – Q 3 UV.
- c) **Solventes grau P.A.:** acetato de etila, etanol, hexano, metanol Qhemis[®] e Synth[®].
- d) **Solvente grau cromatogr^áfico (incluindo *clean-up*):** etanol, metanol J.T. Baker[®].

Tamisador vibrat^ório: Produtest[®].

Tamises: Telatest[®].

Ultrassom: Unique[®], modelo USC – 2800, frequ^ência 40 KHz.

Vortex: PHOENIX[®], modelo AP 56, velocidade 3800 rpm.

4.1.2 Preparo da matéria-prima vegetal

As folhas de *C. sylvestris* foram coletadas no Horto de Plantas Medicinais e Tóxicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP, em 10 de outubro de 2013 entre 10h50 e 12h50. O dia estava ensolarado com temperatura em torno de 23º C. A exsicata do espécimen coletado está depositada no herbário "Maria Eneida P. Kaufmann" do Instituto Botânico do Estado de São Paulo sob o número de AGS 102 (S 21,81466, O 48,20215). As folhas foram secas em estufa com circulação de ar a 40º C por 7 dias, posteriormente fragmentado em moinho de facas e armazenado em frasco de vidro, vedado, ao abrigo da luz, refrigerado até a extração.

4.1.3 Análise granulométrica da matéria-prima vegetal

Pesaram-se 3 amostras de 25 g das folhas da droga vegetal seca e moída de *C. sylvestris*, submetendo à passagem forçada por vibração, através de coletor e tamises com abertura de malhas correspondentes a 0,125; 0,180; 0,420; 0,850 e 1,000 mm, utilizando tamisador vibratório, na escala dez do aparelho, por 30 min. Em seguida, retiraram-se as frações dos tamises e coletor pesando-as. Os resultados de passagem e retenção a partir da quantidade de pó de folhas recolhida de cada tamis, foram obtidos através de planilhas no software Excel®, calculando as frequências percentuais cumulativas. O método foi adaptado da Farmacopeia Brasileira 5ª edição (BRASIL, 2010a).

4.1.4 Perda por dessecação da matéria-prima vegetal em balança com infravermelho

Pesaram-se 3 amostras de 1,0 g da droga vegetal pulverizada, submetendo-se a aquecimento (105º C) através de radiação infravermelha por 1 min, estando a balança por infravermelho pré-aquecida. Após este período mediu-se a massa. Os resultados foram expressos através da relação entre a massa inicial e final da droga vegetal em porcentagem (%), através da média de três determinações (BRASIL, 2010a).

4.1.5 Perda por dessecação da matéria-prima vegetal em estufa

Pesou-se 1,010 g da droga vegetal seca e transferiu-se para estufa pré-aquecida, a 105° C, por 2 h, e em seguida, para dessecador com sílica gel até resfriamento. Depois disso, realizou-se a pesagem. Foram necessários três processos de aquecimento, resfriamento e pesagem para que a amostra apresentasse peso constante (BRASIL, 2010a). Os resultados foram expressos por meio da seguinte equação:

$$\frac{P_u - P_s}{P_a} \times 100$$

onde:
 Pa = peso da amostra
 Pu = peso do pesa-filtro contendo a amostra antes da dessecação,
 Ps = peso do pesa-filtro contendo a amostra após a dessecação.

4.1.6 Obtenção do extrato etanólico a partir da matéria-prima vegetal

Obteve-se o extrato a partir da matéria-prima vegetal (1,5 Kg) utilizando-se maceração com agitação ocasional à 40° C (banho-maria) e etanol (22,5 L) como líquido extrator na proporção 1:15 (g/mL), durante 5 dias. Filtrou-se a solução extrativa em papel de filtro, que foi concentrada em evaporador rotativo, seca por exposição ao ar em capela e, finalmente, em dessecador com sílica gel sob vácuo. O extrato bruto concentrado foi armazenado sob refrigeração em frasco de vidro bem vedado.

4.1.7 Fracionamento do EEtCs por extração em fase sólida (EFS)

O EEtCs foi submetido ao fracionamento por EFS de acordo com Santos (2008). Para tanto, empregou-se coluna de vidro (20 x 10 cm) contendo sílica gel (63-200 µm, 60 Å) e carvão ativo em pó (1:1, p/p) como fase estacionária (FE) previamente ativada (2 h em estufa à 110° C). O EEtCs (70,0 g) foi homogeneizado com a FE (1:1, m/m) e a eluição (1.100,0 mL) foi realizada sob pressão reduzida e com 2.400,0 mL dos seguintes eluentes: 1) hexano/acetato de etila 95:05 (v/v) (fração EFS1); 2) acetato de etila (fração EFS2); 3) metanol (fração EFS3). As frações foram concentradas em evaporador rotativo e, em seguida, secas sob fluxo de ar em capela e em dessecador com sílica gel sob vácuo.

4.1.8 Análises cromatográficas do EEtCs e das frações obtidas por EFS

4.1.8.1 Cromatografia em camada delgada (CCD)

O EEtCs e as frações EFS1 a 3 (5,0 mg/mL, MeOH), assim como os padrões das casearina B e J e da caseargrewiina F (1,0 mg/mL, MeOH) foram analisadas por CCD. A finalidade da análise foi verificar a presença dos padrões, no extrato e nas demais frações. As análises foram realizadas em placas de vidro cobertas com sílica gel Sigma-Aldrich® (20 x 20 cm, 15-40 µm, 0,25 mm), a fase móvel (FM) foi constituída de hex: AcOEt: *i*-PrOH 70:28:02 (v/v), o volume de aplicação foi de 20 µL e o revelador utilizado foi o anisaldeído sulfúrico (110° C, 10 min). A distância de eluição (D) foi de 18 cm.

4.1.8.2 Cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD)

O pré-tratamento das amostras (extrato e EFS2) consistiu em EFS com sílica de fase reversa (FR), em cartucho Phenomenex® Strata™ (C-18 E; 15 x 10 mm, 55 µm), solubilizando as amostras (extrato e a EFS2 10,0 mg cada) em 1,0 mL de MeOH 98 % e eluídas com 4,0 mL de MeOH 98 %, sob pressão. As amostras foram secas em capela sob fluxo de ar e em dessecador com sílica gel sob pressão reduzida, solubilizadas em ACN: MeOH: H₂O 44:22:34 (v/v) na concentração de 0,7 mg/mL e filtradas em membrana (0,22 µm, PVDF Millipore®). Os padrões casearina B e caseargrewiina F foram solubilizados na mesma mistura (0,7 mg/mL) e filtrados em membrana (0,22 µm, PVDF Millipore®). A casearina J foi utilizada como padrão externo nas seguintes concentrações (ACN: MeOH: H₂O 44:22:34): 0,025; 0,0375; 0,05; 0,075; 0,1; 0,15 e 0,3 mg/mL; todas estas soluções foram filtradas em membrana (0,22 µm, PVDF Millipore®).

As condições de análises em CLAE-DAD foram em coluna de FR (Hypersil Gold® (C-18, 250 x 4,6 mm, 5 µm), em gradiente linear iniciando com ACN: MeOH: H₂O 44:22:34 para 53:47:00 (v/v/v) em 42 min, mantendo isocraticamente em 53:47:00 por 5 min; vazão de 0,8 mL/min; detecção em λ 190-400 nm, com monitoramento em 235 e 254 nm; volume de injeção de 20 µL. Para identificar

casearinas no extrato e na EFS2 fundamentou-se na comparação do parâmetro cromatográfico de t_R , aplicação de padrão externo e na sobreposição dos espectros de absorção no UV em relação aos padrões, sendo os espectros no UV de todos os picos utilizados como comparativo na identificação de diterpenos.

4.2 Caracterização e identificação de diterpenos clerodânicos de *Casearia sylvestris* por espectrometria de massas

Esta parte do trabalho foi desenvolvida no período de julho a dezembro de 2015 no *Centre for Research in Mass Spectrometry (Department of Chemistry, Faculty of Science)* da *York University* (Toronto – Canadá) sob a supervisão do Prof. Dr. Demian Rocha Ila, conforme projeto de Bolsa de Doutorado Sanduíche no Exterior (SWE) financiado pelo CNPq (nº do processo: 207745/2014-5).

Para espectrometria de massas (MS – *Mass Spectrometry*), utilizou-se um espectrômetro de massas *ion trap* linear controlado pelo software LTQ Tune®. A aquisição dos espectros de massas foi feita pelo software Xcalibur® 3.0.63 na forma de arquivos de extensão *raw*. Foram realizadas duas técnicas de ionização em ambiente, a ionização por *spray* de elétrons (ESI – *Electrospray Ionization*) e a dessorção por *spray* de elétrons (DESI – *Desorption Electrospray Ionization*). A primeira foi utilizada para espectrometria de massas e análises de massas de modo sequencial (MSⁿ ou MS/MS) através de injeção direta das amostras (ESI-MS e ESI-MSⁿ) enquanto que a segunda foi hifenada com a técnica de cromatografia em camada delgada de alta eficiência (HPTLC – *High Performance Thin Layer Chromatography*) para obtenção de imagem química (HPTLC-DESI-MS-IMAGING).

4.2.1 Materiais e equipamentos

Espectrômetro de massas: Finnigan® LTQ® *linear ion trap* (Thermo Electron Corporation)

Fonte automatizada de DESI: Prosolia®, Omni Spray 2D

Placas de vidros cobertas com sílica gel para HPTLC: Macherey-Nagel®, HPTLC-Plates Nano-Sil 20 (5 x 5 cm, 0,20 mm)

Softwares:

- a) LTQ Tune ((Thermo Electron Corporation)

- b) Xcalibur 3.0.63 (Thermo Fischer Scientific)
- c) Image Creator (Novartis)
- d) BioMAP 3.8.0.3 (Novartis)

Solventes:

- a) Água ultrapura: Merck Millipore®, obtida em modelo Direct® – Q 3 UV;
- b) Solventes grau cromatográfico: acetato de etila, etanol, hexano, metanol e isopropanol (Sigma-Aldrich®).

4.2.2 Espectrometria de massas (*full scan* e fragmentação) com fonte de ionização por *spray* de elétrons e injeção direta (ESI-MS e ESI-MSⁿ)

Após ionização em ambiente por *spray* de elétrons (ESI), os padrões de diterpenos clerodânicos e as amostras foram injetados no espectrômetro para obtenção dos espectros de massas (ESI-MS) e análises de massas de modo sequencial (ESI-MSⁿ). A fragmentação foi realizada pela técnica de colisão por dissociação (CID: *Collision Induced Dissociation*) induzida pelo gás hélio. Os espectros de massas foram adquiridos durante 60 s (*full scan*) no caso de ESI-MS ou durante 30 s por fragmentação no caso de ESI-MSⁿ. Todos foram salvos na forma de arquivos do Xcalibur®.

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 *spray* de elétrons (HPTLC-DESI-MS-IMAGING)

Para cromatografia em camada delgada de alta eficiência (HPTLC) utilizou-se placas cobertas com sílica gel (5 x 5 cm, 0,20 mm) nas quais os padrões e as amostras foram aplicados no volume 5,0 µL a 1 cm da borda inferior (1 padrão ou amostra por placa). Tanto os padrões (Cas B, Cas J, Cas O, Cas X e Casg F) quanto as amostras (EEtCs e EFS2) foram dissolvidas em metanol, os primeiros na concentração de 1,0 mg/mL e as amostras na concentração de 5,0 mg/mL. A fase móvel (FM) foi constituída de hex: AcOEt: *i*-PrOH 70:28:02 (v/v), a mesma que fora utilizada para CCD durante a obtenção do material vegetal. A distância de eluição (D) foi de 3 cm.

Após secagem, as placas foram submetidas à dessorção por *spray* de elétrons (DESI) para ionizar e arrastar as amostras para o espectrômetro de massas (HPTLC-DESI-MS), utilizando-se metanol como solvente do *spray* (fluxo: 4 µL/min; voltagem de 3,5 a 5,0 kV) e nitrogênio como gás de nebulização (99,9995 %; pressão: 100 psi). O acoplamento a uma fonte automatizada de DESI permitiu a obtenção de espectros em “varredura” ao longo das faixas nas quais as amostras correram. A distância percorrida pelas amostras (eixo x) foi de 3 cm (30.000 µm) e pelo sistema automatizado de 3,5 cm (35.000 µm), uma vez que este foi posicionado 0,5 cm abaixo do local onde a amostra foi aplicada. Como a velocidade do sistema automatizado foi de 284 µm/s, a varredura de uma linha do eixo x levou 2,05 min (123 s). O *scan time* foi de 0,88, ou seja, um espectro de massas em *full scan* (faixa: *m/z* 150 a 100 Da) a cada 0,88 s. Assim, cada linha gerou um arquivo do Xcalibur (.raw) com uma média de 140 espectros de massas. Como o total de linhas foi de 40, foram obtidos 40 arquivos “raw” que foram convertidos pelo software Image Creator® em imagens químicas analisadas pelo software BioMAP®. Com isso, foram obtidas imagens químicas (bandas) ao longo das placas (HPTLC-DESI-MS-IMAGING).

4.3 Ensaios farmacológicos para avaliação da atividade anti-inflamatória e gastroprotetora

4.3.1 Ensaios farmacológicos *in vivo*

Foram utilizados ratos Wistar machos pesando entre 225 e 275 gramas oriundos do biotério central da UNESP e mantidos em condições ambientais do biotério, ou seja, com temperatura controlada de $24 \pm 1^{\circ}\text{C}$ e ciclo circadiano de 12 horas, em caixas plásticas (50 x 40 x 20 cm) com o máximo de seis animais por caixa, iniciando o período de luz às 7:00 horas. Os animais receberam ração e água *ad libitum*.

Os bioensaios utilizados para investigar a atividade anti-inflamatória foram o edema de pata induzido pela λ -carragenina (Sigma) e pela BthTX-II, além da pleurisia induzida pela carragenina. Para investigar a atividade gastroprotetora utilizou-se o modelo de lesão gástrica induzida pela indometacina.

O trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP de Araraquara-SP conforme protocolos CEUA-FCF-CAR nº 12/2014 (ANEXO A) e CEUA-FCF-CAR nº 17/2014 (ANEXO B).

Em todos bioensaios, o veículo administrado para os grupos controles e utilizado para dissolver as amostras e os padrões (indometacina, dexametasona e ranitidina) foi uma solução aquosa de tween 80 a 8%. As concentrações das soluções das amostras e dos padrões foram calculadas com base nas doses e nos pesos dos animais de maneira que cada animal recebeu 1 mL para cada 100 gramas de peso, o mesmo volume de veículo foi administrado para os animais dos grupos controles.

4.3.1.1 Edema de pata induzido pela carragenina e pela BthTX-II em ratos

Este bioensaio foi baseado no método descrito por Winter, Risley e Nuss (1962) e realizado no Laboratório de Inflamação do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade de Campinas (FCM-UNICAM). Após 12 h de jejum (água *ad libitum*), realizou-se o tratamento dos animais dos diferentes grupos por meio de gavagem. Em seguida, o volume da pata posterior esquerda dos animais foi medida usando um pletismômetro (Ugo Basile®, modelo 37140). Uma hora após os tratamentos, a carragenina (10 mg/mL em solução salina) ou a BthTX-II (500 µg/mL em solução salina) foi injetada na pata posterior esquerda com uma agulha de insulina em um volume de 0,1 mL (carragenina 1.000 µg/pata; BthTX-II 50 µg/pata). Após injeções subplantares, os volumes das patas foram medidos nos seguintes intervalos de tempo: 1h, 2h, 3h e 4h. O edema foi expresso como a diferença, em mililitros, entre os volumes nestes intervalos e o volume inicial. Após o término do ensaio, os animais foram sacrificados em câmara de CO₂.

A BthTX-II utilizada neste trabalho foi obtida sob responsabilidade do Prof. Dr. Stephen Hyslop do Laboratório de Bioquímica e Toxinologia, também do Departamento de Farmacologia da FCM-UNICAMP. O isolamento da BthTX-II foi feito através de cromatografia por exclusão molecular a partir do veneno de *Bothrops jararacussu* (Sephadex® G-75) seguida de cromatografia por troca iônica (SP-Sephadex® C-25) de acordo com o método descrito por Homsí-Brandeburgo et

al. (1988). A purificação e sequenciamento foram feitos de acordo com método descrito por Cintra et al. (1993).

4.3.1.2 Pleurisia induzida pela carragenina em ratos

A pleurisia foi realizada conforme descrito por Vinegar et al. (1973) com pequenas modificações.

Após 12 h de jejum (água *ad libitum*), os animais receberam os diferentes tratamentos por via oral através de gavagem. Uma hora depois, foram submetidos à anestesia/analgesia pela administração intraperitoneal de quetamina (80 mg/Kg) associada com xilazina (7 mg/Kg) e, em seguida, a λ -carragenina (4 mg/mL em solução salina) injetada na cavidade pleural em um volume de 0,1 mL (400 μ g/cavidade pleural). O controle negativo recebeu salina intrapleural (0,1 mL/cavidade pleural). Após 4 h, os animais foram sacrificados em câmara de CO₂ e a cavidade pleural lavada com 2 mL de solução salina tampão fosfato (PBS) contendo heparina. Uma alíquota de 50 μ L do lavado pleural foi diluída em solução de Turk para lisar os eritrócitos e utilizada para contagem do número de leucócitos totais (LT) em câmara de Neubauer. Por meio de fatores de correção, calculou-se o número de LT por pleura. Para contagem diferencial, outra alíquota do lavado foi utilizada para obtenção de esfregaço corado com May-Grunwald-Giemsa no qual se determinou o percentual de leucócitos mononucleares (MN) e polimorfonucleares (PMN). Aplicando-se os percentuais obtidos aos respectivos números de LT, chegou-se ao número de MN e PMN por pleura.

4.3.1.3 Lesão gástrica induzida por indometacina em ratos

Este ensaio foi baseado no método descrito por Main e Whittle (1975). Inicialmente os ratos foram submetidos a um jejum de 24 horas (água *ad libitum*, exceto 2 h antes do início do ensaio). Após este período, os animais dos diferentes grupos receberam os tratamentos por meio de gavagem, e uma hora depois, a indometacina (60 mg/Kg) foi administrada também por gavagem. Após 4 h, os animais foram sacrificados em câmara de CO₂, seus estômagos removidos, lavados com solução salina, abertos ao longo da curvatura maior e observados através de

uma lupa (12,5x) acoplada a uma câmara (Moticam 2000 2.0 M Pixel USB 2.0) ligada ao computador. Através de um software de captura (Motic Images Plus 2.0 ML), as imagens foram capturas, salvas, e posteriormente analisadas quanto ao número, perímetro e área das lesões gástricas encontradas na região glandular através de um software específico (Motic Images Advanced 3.2). Em relação à gravidade, as lesões gástricas foram classificadas em três tipos de acordo com o perímetro (tipo 1 = perímetro inferior a 1 mm; tipo 2 = perímetro de 1 a 2 mm; tipo 3 = perímetro maior do que 2 mm). Calculou-se também a área total das lesões em milímetros quadrados (mm²) de cada estômago.

4.3.2 Ensaios farmacológicos *in vitro*

Os ensaios farmacológicos *in vitro* foram realizados para investigar os mecanismos da atividade anti-inflamatória e gastroprotetora das amostras. No primeiro caso foram conduzidos ensaios com macrófagos para investigar o possível efeito das amostras sobre a síntese e/ou liberação de óxido nítrico e prostaglandina E₂ e ensaios enzimáticos para investigar o possível efeito das amostras sobre a atividade das ciclo-oxigenases 1 e 2 (COX-1 e COX-2). Quanto à gastroproteção, investigou-se a atividade anti-*Helicobacter pylori* das amostras.

4.3.2.1 Ensaios com macrófagos *in vitro*

Estes ensaios foram realizados no Laboratório de Imunologia do Departamento de Ciências Biológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP de Araraquara sob a orientação da Profa. Dra. Alexandra Ivo de Medeiros e responsabilidade dos alunos Luis Gustavo Silva Monnazzi (Pós-Doutorando) e Amanda Correia Saraiva (Mestranda).

Nestes ensaios, macrófagos em cultura são estimulados por agentes que induzem a síntese e liberação de mediadores químicos inflamatórios que podem ser quantificados no meio de cultura tais como citocinas, eicosanoides e óxido nítrico. Desta maneira, torna-se possível investigar o efeito de diferentes amostras sobre a síntese e/ou liberação destes mediadores. No entanto, o primeiro desfecho investigado nestes ensaios é o possível efeito tóxico das amostras sobre os macrófagos (citotoxicidade), uma vez que a redução do nível de mediadores

químicos pode ser consequência da morte celular e não de mecanismos farmacológicos. Neste estudo, além da citotoxicidade, investigou-se o efeito das amostras sobre os níveis de óxido nítrico e prostaglandina E₂ e a estimulação dos macrófagos foi realizada em microplacas de 96 cavidades.

4.3.2.1.1 Obtenção e manutenção da linhagem celular e preparo da microplaca

A linhagem celular utilizada em todos os experimentos foi a RAW 264.7, previamente obtida da Coleção Americana de Cultura de Células (ATCC - *American Type Culture Collection*) e mantida em vapor de nitrogênio líquido em temperaturas abaixo de -130°C. A RAW 264.7 é uma linhagem de macrófagos peritoneais aderentes modificados pelo vírus da leucemia murina de Albelson derivados de camundongos Balb-C.

Para realização dos ensaios, as células foram descongeladas e expandidas em frascos de cultura celular em meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM - *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) contendo 10% de soro fetal bovino (SFB) e gentamicina (1:1.000) e incubadas à temperatura de 37°C, em estufa umidificada contendo 5% de CO₂, conforme orientações da ATCC.

Em seguida, realizou-se a contagem celular utilizando-se câmara de Neubauer e, através de diluição com o próprio DMEM, ajustou-se a concentração celular para 5×10^5 células/mL e adicionou-se 200 µL nas devidas cavidades da microplaca (1×10^5 células por cavidade). Para aderência dos macrófagos nas cavidades, a microplaca foi incubada à temperatura de 37°C, em estufa umidificada contendo 5% de CO₂.

4.3.2.1.2 Estimulação celular e protocolos experimentais

Inicialmente as amostras e o padrão (controle positivo) foram preparados em DMEM nas concentrações a serem testadas e em volumes suficientes para quadruplicata (200 µL por cavidade). Antes, porém, as amostras foram dissolvidas em etanol em concentração, no mínimo, 100 vezes superior a maior concentração da amostra a ser testada (solução-mãe). Sendo assim, na solução-mãe, a concentração de etanol atingiu, no máximo, 1%, valor que não interfere com os resultados do ensaio.

Em seguida, a microplaca com a cultura de macrófagos preparada de acordo com a subseção anterior foi retirada da estufa e o meio de cultura descartado, restando-se assim apenas os macrófagos aderidos às cavidades. Logo após, as cavidades com macrófagos aderidos foram devidamente preenchidas com os controles e com as amostras e a microplaca foi incubada (37°C em estufa umidificada contendo 5% de CO₂) por um período de uma hora e 30 minutos (tratamento profilático ou pré-tratamento).

Após este período, adicionou-se 20 µL de solução de lipopolissacarídeo (LPS) de *Escherichia coli* (1 µg/mL) nas cavidades com macrófagos (20 ng/cavidade), exceto nas cavidades do controle negativo. Em seguida, a microplaca foi incubada novamente (37°C em estufa umidificada contendo 5% de CO₂) por um período de 16 a 18 horas. Após incubação, os sobrenadantes das culturas foram coletados e utilizados para a quantificação de nitrito, e em um dos protocolos, também de prostaglandina E₂. Já a placa com os macrófagos aderidos foi utilizada para o ensaio de citotoxicidade. Os ensaios foram realizados de acordo com os seguintes protocolos experimentais:

Protocolo 1 (n = 2; desfechos: citotoxicidade e quantificação de NO₂⁻)

Controle negativo: apenas DMEM (duplicata)

Controle do LPS: DMEM + LPS (quadruplicata)

Pré-tratamento com EFS2: 200 / 100 / 50 / 25 / 12,5 / 6,25 µg/mL + LPS (quadruplicata)

Pré-tratamento com Cas B: 40 / 20 / 10 / 5 / 2,5 / 1,25 µM + LPS (quadruplicata)

Pré-tratamento com Casq F: 40 / 20 / 10 / 5 / 2,5 / 1,25 µM + LPS (quadruplicata)

Protocolo 2 (n = 3; desfechos: citotoxicidade e quantificação de NO₂⁻)

Controle negativo: apenas DMEM (duplicata)

Controle do LPS: DMEM + LPS (quadruplicata)

Pré-tratamento com Cas B: 1 / 0,5 / 0,25 / 0,125 / 0,063 / 0,031 µM + LPS (quadruplicata)

Pré-tratamento com Casq F: 1 / 0,5 / 0,25 / 0,125 / 0,063 / 0,031 µM + LPS (quadruplicata)

Protocolo 3 (n = 3; desfechos: citotoxicidade e quantificação de NO₂⁻ e PGE₂)

Controle negativo: apenas DMEM (duplicata)

Controle do LPS: DMEM + LPS (quadruplicata)

Controle positivo: DMEM + indometacina + LPS (quadruplicata)

Pré-tratamento com Cas J: 1 / 0,5 / 0,25 / 0,125 / 0,063 / 0,031 µM + LPS (quadruplicata)

Pré-tratamento com Cas O: 1 / 0,5 / 0,25 / 0,125 / 0,063 / 0,031 + LPS (quadruplicata)

4.3.2.1.3 Citotoxicidade

Após a coleta dos sobrenadantes das culturas, a microplaca contendo as células RAW 264.7 aderidas foram utilizadas para a realização do ensaio de citotoxicidade dos respectivos compostos utilizando-se o método colorimétrico de viabilidade celular do MTT (brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio) (MOSMANN, 1983). Neste método, o MTT é captado por células viáveis e reduzido à formazan (cristais azuis) por atividade de oxidoredutases. Assim, a concentração de formazan, medida por espectrofotometria após sua dissolução, é diretamente proporcional ao número de células viáveis (5×10^2 a 10^5 células, dependente do tipo celular). Para tanto, adicionou-se 10 μ L do reagente MTT em todas as cavidades da microplaca que continham macrófagos aderidos e incubou-se a microplaca por um período de duas a quatro horas (37°C em estufa umidificada contendo 5% de CO₂) até a formação do precipitado de formazan. Em seguida, adicionou-se 100 μ L da solução para dissolução do formazan e armazenou-se a microplaca no escuro à temperatura ambiente por cerca de duas horas. Por fim, realizou-se a leitura da microplaca por espectrofotometria para detecção da absorbância a 595 nm. As amostras foram consideradas citotóxicas quando a viabilidade celular foi menor que 95%. Para as amostras citotóxicas, quando possível, calculou-se a IC₅₀ pelo método logarítmico utilizando o software Microsoft® Excel 2010.

4.3.2.1.4 Quantificação de nitrito (NO₂⁻)

O óxido nítrico (NO) formado nas células e nos tecidos se converte rapidamente em nitrito (NO₂⁻). Assim, a quantificação de nitrito é utilizada para investigar o efeito de substâncias anti-inflamatórias sobre a produção de óxido nítrico. Neste estudo, foi utilizado o método descrito por Lane, Wu-Hsieh e Howard (1993). Neste método, 100 μ L dos sobrenadantes das culturas foram adicionados a 100 μ L do reagente de Griess (solução estoque de NEED a 0,1% e sulfanilamida a 1% em H₃PO₄ 5%). Após 5 minutos de incubação à temperatura ambiente, a densidade ótica da solução foi medida em leitor de microplacas, em filtro de 540 nm. A quantidade de nitrito no sobrenadante das culturas foi correlacionada aos valores

de absorbância obtidos na curva padrão (feita com uma solução padrão de nitrito com concentrações variando entre 3 a 200 μM de nitrito de sódio).

4.3.2.1.5 Quantificação da prostaglandina E_2 (PGE_2)

Esta quantificação foi realizada através de ensaio imunoenzimático (ELISA) do kit “*Prostaglandin E_2 ELISA Kit Monoclonal No. 514010*” da Cayman e foi conduzido de acordo com as instruções do fabricante.

4.3.2.2 Atividade enzimática das ciclo-oxigenases 1 e 2 (COX-1 e COX-2)

Investigou-se o efeito das amostras sobre a atividade enzimática *in vitro* da COX-1 e da COX-2 através de ensaio imunoenzimático (ELISA) utilizando-se o kit *COX (ovine) Inhibitor Screening Assay* da Cayman Chemical (Item No. 560101) e conduzindo-se de acordo com as instruções do fabricante (CAYMAN CHEMICAL, 2014a). A COX é uma enzima bifuncional que catalisa inicialmente a conversão do ácido araquidônico em prostaglandina G_2 (PGG_2) por atividade ciclo-oxigenase e, em seguida, a conversão da PGG_2 em prostaglandina H_2 (PGH_2) por atividade peroxidase. Na presença de cloreto de estanho II (SnCl_2), a PGH_2 é convertida em prostaglandina $\text{F}_{2\alpha}$ ($\text{PGF}_{2\alpha}$). Neste ensaio, a atividade da COX (1 e 2) é mensurada por meio da quantificação imunoenzimática de $\text{PGF}_{2\alpha}$. As reações iniciais ocorreram em microtubos de 500 μL aquecidos a 37° C. Nos tubos brancos, adicionou-se apenas o tampão e o grupo heme (condições necessárias para atividade das COXs). Nos tubos de 100% de atividade, além do tampão e do grupo heme, adicionaram-se a enzima em questão (COX-1 ou COX-2) e o solvente das amostras e do controle positivo (indometacina) que foi o metanol. Nos tubos das amostras e do controle positivo, além do tampão, do grupo heme e da enzima em questão (COX-1 ou COX-2), adicionaram-se as substâncias-teste (amostras) e a indometacina em diferentes concentrações. Os tubos foram incubados por 15 minutos a 37° C. Em seguida, a reação foi iniciada pela adição do ácido araquidônico (substrato das COXs) e os tubos incubados por exatamente 2 minutos a 37° C. Para interromper a reação, adicionou-se HCl 1 M. Em seguida, os tubos foram removidos do banho e o SnCl_2 foi adicionado. Aguardou-se 5 minutos em temperatura ambiente e, depois, os tubos

foram mantidos em temperatura entre 0 e 4° C para diluição no tampão do imunoensaio enzimático e transferência para a microplaca de 96 cavidades revestida com IgG anti-coelho de camundongo. Nesta microplaca adicionaram-se as soluções do padrão de prostaglandina, dos brancos e dos tubos de reação (100% de atividade, amostras e controle positivo). Em seguida, a microplaca foi incubada a temperatura de 25° C por 18 horas em agitador orbital e, depois, lavada cinco vezes com o tampão apropriado. Por fim, acrescentou-se o reagente de Ellman's que contém o substrato que dá origem ao agente com o grupo cromóforo cuja absorbância em 410 nm foi detectada pela leitura espectrofotométrica da microplaca.

Em relação ao protocolo experimental, tanto as amostras (EEtCs, EFS 1 a 3 e casearinas J e O) quanto o fármaco padrão do controle positivo (indometicina, Sigma-Aldrich®) foram dissolvidos em metanol e testados nas seguintes concentrações:

Controle da reação: apenas metanol (concentração final no tubo de reação: 5%)

Controle positivo: indometacina (0,01 / 0,1 / 1 / 10 µM)

Amostras

EEtCs (6 / 60 / 600 µg/mL)

EFS 1 a 3 (0,6 / 6 / 60 µg/mL)

Casearinas J e O (0,4 / 4 / 40 µM)

Foram conduzidos três experimentos independentes, e em cada um deles as concentrações foram testadas em duplicata.

4.3.2.3 Atividade anti-*Helicobacter pylori* pelo método de diluição em microplaca

Este ensaio foi realizado no Laboratório de Fisiologia de Micro-organismos do Departamento de Ciências Biológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP de Araraquara sob a responsabilidade do aluno de doutorado Matheus Aparecido dos Santos Ramos e orientação da Prof^a. Dr^a. Taís Maria Bauab.

A cepa de *H. pylori* utilizada (ATCC 43504) foi mantida em caldo Mueller-Hinton (CMH) acrescido de 50% de glicerol e mantido a -20°C. Para uso, a cepa foi replicada em CMH acrescido de 50% de soro fetal bovino (SFB) e incubado a 37°C

por 72h em 10% de CO₂ e umidade. Em seguida, a suspensão foi padronizada adicionando-se CMH acrescido de 50% de SFB até atingir uma turvação igual à suspensão do tubo 2 da escala McFarland (aproximadamente 6×10^8 UFC/mL). Em seguida a concentração de bactérias foi confirmada por leitura espectrofotométrica a 570 nm utilizando-se espectrofotômetro. Posteriormente foi realizada uma diluição 1:10, em CMH acrescido de 50% de SFB, obtendo-se uma suspensão de 6×10^7 UFC/mL, a qual foi utilizada nos ensaios para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) pela técnica de diluição em microplacas de 96 cavidades de acordo com o método descrito pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) para bactérias fastidiosas (CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE, 2010).

4.3.2.3.1 Protocolo experimental

Inicialmente as amostras (EEtCs, EFS1-2, casearinas B e J e caseargrewiina F) e o controle positivo (amoxicilina) foram dissolvidos no veículo (metanol: água: tween 80 20:78:2; v/v). A concentração inicial (solução-mãe) foi de 2.000 µg/mL para todas as amostras e 100 µg/mL para o controle positivo.

Em seguida, as cavidades da microplaca a serem utilizadas para os controles e para as amostras foram preenchidas com 80 µL do meio de cultura (CMH acrescido de 50% de SFB). Foram conduzidos quatro controles: controle do meio de cultura, controle do crescimento bacteriano, controle do veículo e controle positivo. Utilizou-se uma coluna inteira (8 cavidades) para cada controle. Os dois primeiros controles (meio de cultura e crescimento bacteriano) permaneceram inalterados até o acréscimo da suspensão de *H. pylori*.

Já em relação ao controle do veículo, acrescentou-se 80 µL do veículo na primeira cavidade e realizou-se a homogeneização com o meio de cultura. Em seguida, executou-se diluição seriada a partir da primeira cavidade transferindo-se 80 µL entre cavidades subsequentes até a oitava cavidade, da qual 80 µL foram retirados e desprezados. Assim, as oito cavidades do controle do veículo ficaram com o volume final de 80 µL e as seguintes concentrações do veículo: 50; 25; 12,5; 6,25; 3,12; 1,56; 0,78; 0,39%.

Quanto ao controle positivo, na primeira cavidade acrescentou-se 80 μ L da solução de amoxicilina (100 μ g/mL) realizando-se a homogeneização com o meio de cultura. Em seguida, executou-se diluição seriada conforme descrito para o controle do veículo. Assim, o volume final das oito cavidades do controle positivo permaneceu 80 μ L, mas com as seguintes concentrações de amoxicilina: 50; 25; 12,5; 6,25; 3,13; 1,56; 0,78 e 0,39 μ g/mL.

Por fim, o mesmo foi feito com as amostras, a diferença é que as concentrações finais das amostras foram as seguintes: 1.000; 500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,62 e 7,81 μ g/mL.

Após este procedimento, acrescentou-se 20 μ L da suspensão de *H. pylori* preparada conforme subseção anterior em todas as cavidades, exceto naquelas do controle do meio de cultura. Em seguida, as microplacas foram incubadas à 37°C por 72 h em condições de microaerofilia com 10% de CO₂ e umidade. Após este período, acrescentou-se a resazurina e realizou-se a leitura espectrofotométrica a 595 nm para avaliar o crescimento bacteriano. A concentração inibitória mínima (CIM) foi definida como a menor concentração da amostra que impediu o crescimento bacteriano.

4.3.3 Análise estatística dos ensaios farmacológicos

Os resultados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. As comparações estatísticas foram feitas de acordo com a análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey ou de Bonferroni para comparações múltiplas utilizando-se os *softwares* ORIGIN versão 7.0 e PRISMA versão 5.0. Valores de *p* iguais ou inferiores a 0,05 foram considerados significantes.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Material vegetal

5.1.1 Preparo da matéria-prima vegetal

Após a secagem das folhas de *C. sylvestris* em estufa com circulação de ar a 40° C por 7 dias e posterior fragmentação em moinho de facas, obteve-se cerca de **2,5 Kg** da matéria-prima vegetal (droga vegetal em pó).

A finalidade da secagem é a retirada da água contida no material vegetal, deste modo, impedindo o crescimento microbiano e possíveis reações de degradação (hidrólise). A umidade residual depende do tipo de órgão que constitui este material. A secagem se caracteriza pela exposição a temperaturas relativamente baixas (inferiores a 60° C), com longo tempo de contato (geralmente 7 dias). Independente de como é realizada, a secagem propicia a redução de peso e volume facilitando a moagem do material, acondicionamento e armazenamento. De acordo com Bandeira (2004), a estabilização prévia à secagem não interfere no teor de diterpenos clerodânicos nos extratos obtidos de folhas de *C. sylvestris*. Do mesmo modo, a secagem à sombra nas mesmas condições de temperatura não produz diferenças no teor destas substâncias.

5.1.1.2 Análise granulométrica da matéria-prima vegetal

A análise granulométrica estabelece valores que influenciam na eficiência do processo extrativo. Os resultados da avaliação granulométrica do material vegetal obtido estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6 - Análise granulométrica do pó de folhas de *C. sylvestris*

Abertura da malha (mm)	Massa (g) retida no tamis				Percentual
	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	Média	Retido
1,000	0	0	0,0042	0,0014	0,00 %
0,850	0,0025	0,0048	0,0061	0,0045	0,02 %
0,420	1,7572	1,5649	1,7353	1,6858	6,74 %
0,180	16,6885	16,4483	17,0484	16,728	66,91 %
0,125	3,1724	4,1726	3,7400	3,6950	14,78 %
Coletor	3,3313	2,6074	2,2675	2,7354	

A granulometria (grau de divisão de pós) é expressa em referência à abertura nominal da malha do tamis utilizado. De acordo com a Farmacopeia Brasileira 5ª ed. (BRASIL, 2010a), o pó obtido pode ser classificado como **moderadamente grosso**.

5.1.1.3 Perda por dessecação da matéria-prima vegetal em balança com infravermelho

Mesmo com a secagem, o material vegetal apresenta água em suas células, quantidade que deve ser conhecida para sabermos se suas condições de preparo e conservação foram boas. A água residual encontrada na droga vegetal seca está relacionada com armazenamento correto, podendo acarretar na perda do material por contaminação microbiana ou degradação enzimática (SIMÕES et al., 2010). A determinação da perda por dessecação do pó das folhas de *C. sylvestris* realizou-se em à temperatura de 105° C, por 1 min. Após obter os resultados calculou-se a porcentagem de água retida em cada amostra de droga vegetal pulverizada (triplicata). O valor médio encontrado foi de **6,3% (m/m)** de umidade. O limite máximo de umidade para drogas vegetais é de **14%** (SIMÕES et al., 2010), concluindo que o valor encontrado é aceitável.

5.1.1.4 Perda por dessecação em estufa da matéria-prima vegetal

Realizou-se em estufa pré-aquecida a 105° C, por 4 h, sendo a droga vegetal esfriada em dessecador com sílica gel e pesada, ficando em estufa por mais 2 h, esfriada e pesada a cada 1 h, alcançando peso constante (BRASIL, 2010a). De posse dos valores obtidos, calculou-se a porcentagem de umidade cujo valor foi de **6,7%**, muito semelhante ao encontrado na perda por dessecação em balança com infravermelho, enfatizando que os resultados de ambos são coerentes. Com estes resultados, em armazenamento adequado, é possível manter a qualidade da droga vegetal evitando contaminação e decomposição dos constituintes químicos por hidrólise e reações enzimáticas.

5.1.2 Obtenção do extrato etanólico de folhas de *Casearia sylvestris* (EEtCs) a partir da matéria-prima vegetal

O extrato etanólico foi obtido a partir de 1.500 g da matéria-prima vegetal. Ao se trabalhar com drogas vegetais, deve-se ter conhecimento das melhores condições que levarão a uma eficaz extração das substâncias. De acordo com o solvente empregado na extração determina-se a qualidade da solução extrativa (SIMÕES et al., 2010). Neste caso, utilizou-se um método já proposto por Santos (2008), como descrito anteriormente. A massa de extrato concentrado foi de **180 g**. Assim, o rendimento do extrato concentrado em relação à matéria-prima vegetal foi de **12,0 % (m/m)**, muito semelhante aos 11,8 % (m/m) obtido por Pierre (2013), e superior aos obtidos por Santos (2001) por sonicação e Santos (2008) e Morita et al. (1991) por maceração à quente que obtiveram, respectivamente, os rendimentos de 6,5 %, 7,5 % e 7,0 % (m/m). Assim, o rendimento do processo extrativo foi considerado satisfatório.

5.1.3 Fracionamento do EEtCs por extração em fase sólida (EFS)

Alguns métodos encontrados na literatura para o fracionamento de extratos de *C. sylvestris* são desvantajosos, pois apresentam muitas etapas, utilizam solventes clorados, além de apresentarem muitos interferentes nas frações obtidas tais como clorofila e carotenoides (CARVALHO et al., 1998; ITOKAWA et al., 1990; MORITA et al., 1991; SANTOS, 2001). O método adaptado por Santos (2008) e Tininis (2006a) possibilitou a otimização do fracionamento, sem as desvantagens citadas, obtendo-se frações de composição química distinta em apenas uma etapa.

No fracionamento do EEtCs (70,0 g) foram obtidas as seguintes massas e rendimentos: EFS1 = **3,593 g (5,1%)**, EFS2 = **10,747 g (15,3%)**, EFS3 = **16,248 g (23,2%)**.

5.1.3.1 Análises cromatográficas do EEtCs e suas frações (EFS1-3)

5.1.3.1.1 Cromatografia em camada delgada (CCD)

A identificação de substâncias por CCD é feita comparando-se o perfil cromatográfico, através das bandas cromatográficas das amostras e do padrão, com cores e valores de R_f iguais utilizando-se a seguinte equação:

$$R_f = \frac{d_s}{d_{fm}}$$

onde:

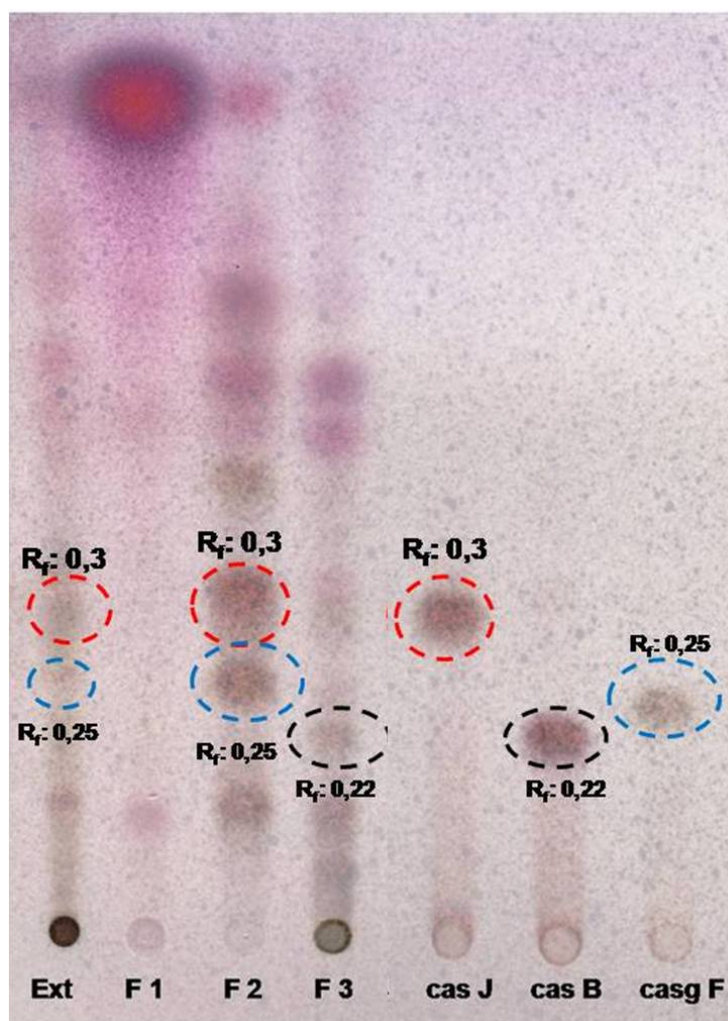
R_f : fator de retenção

d_s : distância percorrida pela substância ou padrão

d_{fm} : distância percorrida pela fase móvel desde o ponto de aplicação

Por meio das análises de CCD, representada na Figura 13, foi possível verificar a presença de casearina J (R_f 0,3) no extrato e na fração EFS2. A caseargrewiina F (R_f 0,25) foi identificada na fração EFS2, porém não identificou-se nenhuma banda correspondente no extrato, o que pode estar relacionado a sua possível presença em menor quantidade no extrato. Na fração EFS3 foi encontrada uma banda correspondente a casearina B, cujo R_f foi de 0,22. Os resultados indicam que, apesar de estarem presentes na fração EFS3, os diterpenos clerodânicos foram concentrados na fração EFS2, a qual foi eluída com AcOEt. SANTOS (2008) também obteve maior concentração das casearinas na fração EFS2, confirmando que tais diterpenos são mais solúveis em AcOEt do que em hexano e metanol utilizados para obtenção da EFS1 e EFS3, respectivamente.

Figura 13 – Cromatografia em camada delgada do extrato etanólico de folhas de *Casearia sylvestris* (Ext), frações (F1-3) e padrões da casearina J (cas J), casearina B (cas B) e caseargreina F (casg F).



Condições: soluções do extrato e das frações: 5,0 mg/mL em MeOH; soluções dos padrões: 1,0 mg/mL em MeOH, FE: sílica gel; FM: hex: AcOEt: *i*-PrOH 70:28:02 (v/v); D: 18 cm; revelador: anisaldeído sulfúrico (110° C, 10 min).

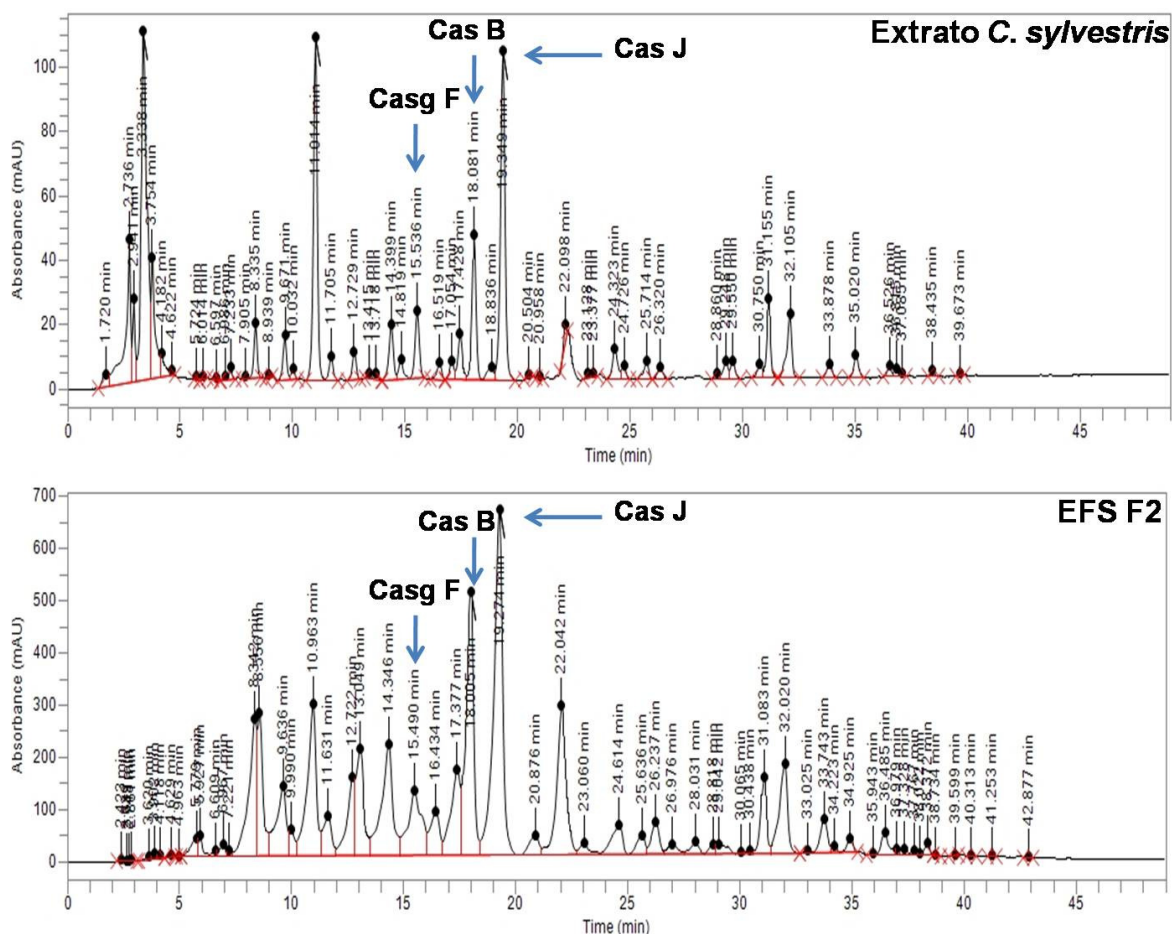
As bandas cromatográficas são menos intensas no extrato, devido este conter uma série de classes de compostos, já as frações apresentaram bandas mais intensas por estarem mais concentradas em determinadas classes de substâncias (EFS 1-3).

5.1.3.1.2 Cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD)

A identificação dos diterpenos clerodânicos nos cromatogramas do extrato etanólico de folhas de *C. sylvestris* e na EFS2 (Figura 14) foi realizada através da comparação do tempo de retenção (t_R) dos padrões e picos em cromatogramas das amostras e por meio da análise dos espectros no UV obtidos por CLAE-DAD do extrato e EFS2.

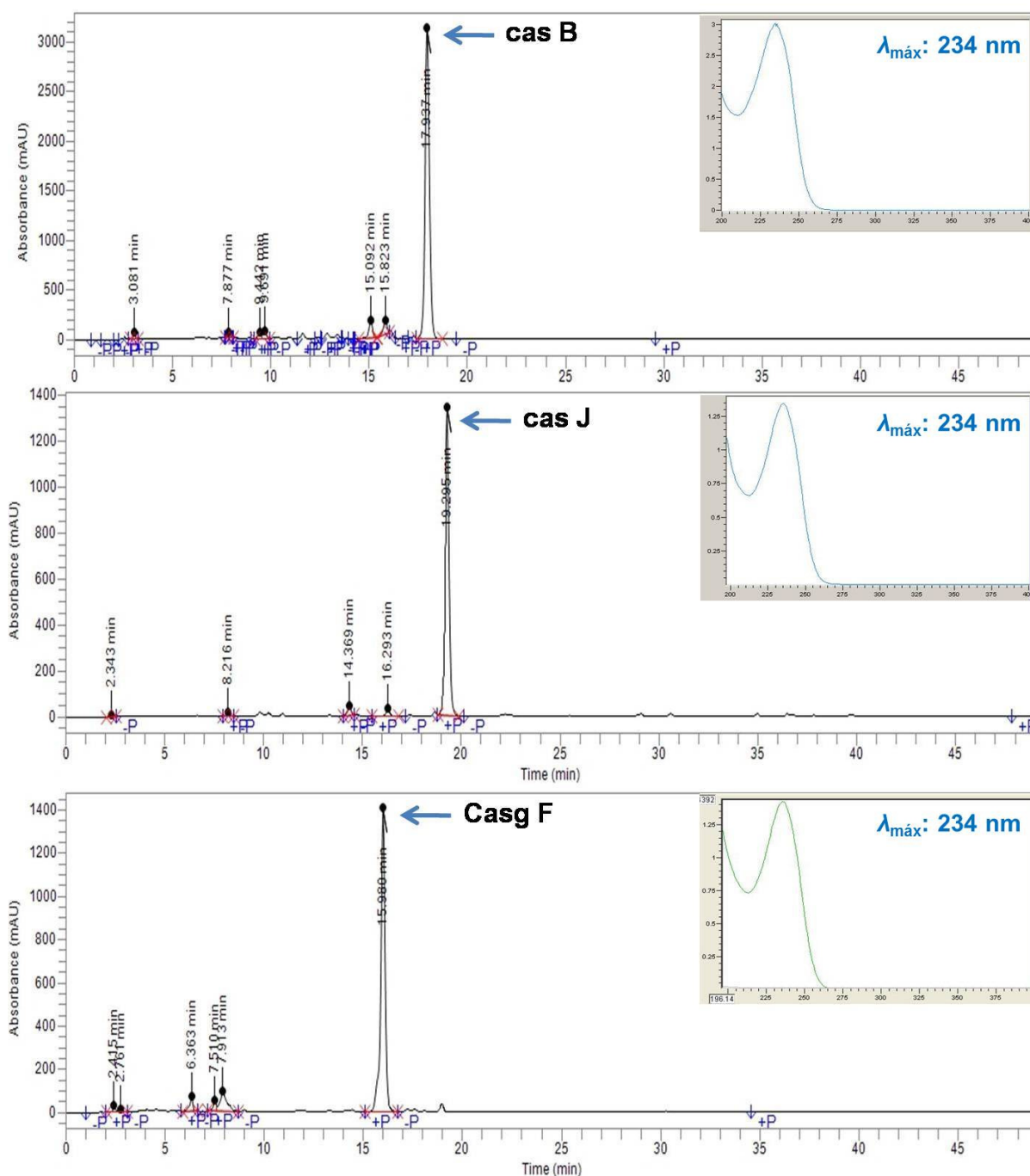
A banda de absorção em 235 nm no espectro no UV é característica do dieno conjugado da cadeia lateral das casearinas (ITOKAWA et al., 1990; MORITA et al., 1991; CARVALHO et al., 1998; SANTOS et al., 2007). Os padrões de diterpenos clerodânicos analisados, casearinas B e J e caseargrewiina F (Figura 15), todos com $\lambda_{\text{máx}}$ de 232-235 nm, foram identificados no extrato e na EFS2, estando mais concentrado nesta última amostra.

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).



Condições: coluna de FR Hypersil Gold® (C-18, 250 x 4,6 mm, 5 µm), em gradiente linear com ACN: MeOH: H₂O 44:22:34 para 53:47:00 (v/v/v) em 42 min, mantendo isocraticamente em 53:47:00 por 5 min; fluxo de 0,8 mL/min; detecção em λ 190-400 nm, com monitoramento em 232 e 254 nm; volume de injeção de 20 µL.

Figura 15 - Cromatogramas (CLAE-DAD) dos padrões casearina B (Cas B), casearina J (Cas J) e caseargreina F (Casg F) e os respectivos espectros no UV.



Condições: coluna de FR Hypersil Gold® (C-18, 250 x 4,6 mm, 5 μm), em gradiente linear com ACN: MeOH: H₂O 44:22:34 para 53:47:00 (v/v/v) em 42 min, mantendo isocraticamente em 53:47:00 por 5 min; fluxo de 0,8 mL/min; detecção em λ 190-400 nm, com monitoramento em 232 e 254 nm; volume de injeção de 20 μL .

5.2 Caracterização de diterpenos clerodânicos de *Casearia sylvestris* por espectrometria de massas

A primeira etapa desta parte do trabalho foi otimizar as condições experimentais para analisar os padrões de diterpenos clerodânicos por ESI-MS e analisar estes diterpenos por ESI-MSⁿ para se obter o perfil de fragmentação destas moléculas. Posteriormente, o EECs e a EFS2 foram analisadas por ESI-MS, ESI-MSⁿ e HPTLC-DESI-MS-IMAGING para identificação de diterpenos clerodânicos nestas amostras.

5.2.1 Análise dos padrões de diterpenos clerodânicos por ESI-MS e ESI-MSⁿ

Inicialmente investigou-se a literatura em relação às análises de diterpenos clerodânicos, especialmente do tipo das casearinas, por espectrometria de massas. Observando-se os trabalhos que isolaram e caracterizaram diterpenos clerodânicos a partir de extratos de *C. sylvestris* (ITOKAWA et al. 1990; MORITA et al., 1991; CARVALHO et al., 1998; WANG et al., 2009b; WANG et al., 2009c; WANG et al., 2009d; SANTOS et al., 2007; SANTOS et al., 2010), nota-se que em todos eles a espectrometria de massas foi utilizada no modo positivo. Por outro lado, estes trabalhos não contêm informações relativas às outras condições experimentais da espectrometria de massas como, por exemplo, solvente das amostras. Informações adicionais foram encontradas apenas em um trabalho recente (BUENO, 2015) no qual a autora analisou diterpenos clerodânicos isolados do extrato etanólico de folhas de *C. sylvestris* por espectrometria de massas de alta resolução com fonte de ionização por *spray* de elétrons (ESI-HRMS) utilizando metanol/água 1:1 como solvente do *spray* (as concentrações dos analitos não foram informadas). Em relação aos parâmetros instrumentais citaram as condições do modo iônico (positivo), voltagem do capilar (3,5 kV), gás de nebulização (nitrogênio; 0,4 bar), gás de secagem (nitrogênio; 180° C; 4 L/min), *end plate* (-500 Volts) e calibração interna (Na-TFA a 10 mg/ml; TOF).

Investigando-se a literatura em relação aos dados de espectrometria de massas por injeção direta de outros diterpenos clerodânicos isolados, foram encontrados estudos com diterpenos *neo-clerodanos* isolados de *Salvia divinorum* (MEDANA et al., 2006) e *Teucrium chamaedrys* (RICCI et al., 2010). Em ambos, o

solvente utilizado foi metanol/água (1:1), ou seja, o mesmo utilizado por Bueno (2015).

Sendo assim, as primeiras análises com a casearina J também foram realizadas utilizando metanol/água (1:1) como solvente nas seguintes concentrações: 0,1, 1,0 e 10,0 µg/mL. Os parâmetros instrumentais foram configurados inicialmente com base em estudos anteriores (MEDANA et al., 2006; RICCI et al., 2010; BUENO, 2015), e posteriormente, otimizados para obtenção do maior nível de intensidade normalizado (NL: *Normalized Intensity Level*). Verificou-se, inclusive, a possibilidade de sinais em modo negativo. Uma vez que as condições controladas manualmente foram otimizadas, iniciou-se o comando para que o equipamento realizasse a otimização das condições não controladas manualmente (*tune*).

Em seguida, foram investigados os seguintes solventes: metanol/água (9:1), metanol, água/metanol (9:1) e água. Os melhores resultados foram obtidos com metanol na concentração de 1,0 µg/mL (Tabela 7). As condições otimizadas para este solvente e concentração também estão elencadas na Tabela 7.

Tabela 7 – Parâmetros instrumentais otimizados para análise da casearina J por ESI-MS por injeção direta utilizando metanol como solvente (1 µg/mL).

Parâmetros	Condições
fluxo do solvente	5 µL/min
voltagem do <i>spray</i>	5 kV
voltagem do capilar	10 V
temperatura do capilar	285°C
gás de nebulização	nitrogênio (99,9995%; pressão: 100 psi)
distância entre o <i>electrospray</i> e o <i>inlet</i>	2 a 5 mm
modo iônico	positivo (<i>full scan</i>)
faixa de detecção	<i>m/z</i> 200 a 800 Da

Corroborando os dados da literatura para os diterpenos clerodânicos encontrados na *C. sylvestris*, foram obtidos picos apenas no modo positivo (*m/z* 601, 585 e 580). De acordo com a Tabela 8, estes picos foram atribuídos respectivamente aos seguintes adutos: $[M + K]^+$, $[M + Na]^+$ e $[M + NH_4]^+$, dados também encontrados na literatura. Usando metanol (puro ou até com 50% de água) ocorreu predomínio do aduto de potássio enquanto que com água ou mistura de água/metanol (9:1), predominou o aduto de amônio. Acredita-se que a origem destes íons inorgânicos sejam as próprias substâncias utilizadas (analito e/ou solventes),

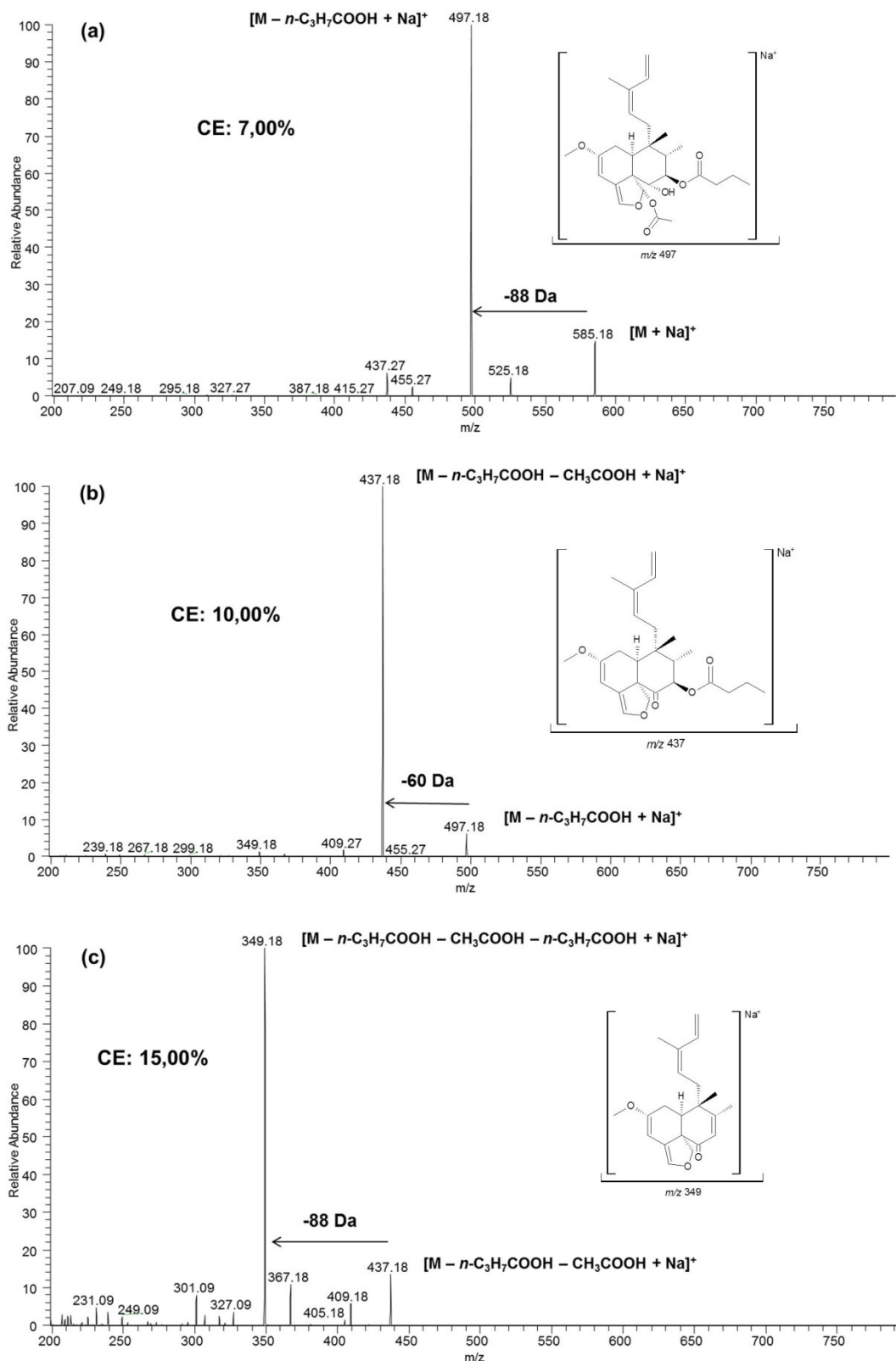
uma vez que estes íons se apresentam como contaminantes traços de muitas substâncias purificadas. Em geral, os espectrômetros de baixa resolução apresentam alta sensibilidade, e por isso, traços destes íons são suficientes para formação de adutos iônicos detectáveis.

Tabela 8 - Massas moleculares (Da) de moléculas neutras e valores de m/z dos adutos iônicos de diterpenos clerodânicos isolados de extratos de folhas de *Casearia sylvestris*.

Diterpeno clerodânico	FM	MM	m/z			
			$[M + H]^+$	$[M + NH_4]^+$	$[M + Na]^+$	$[M + K]^+$
casearina A	$C_{29}H_{42}O_9$	534	535	552	557	573
casearina B	$C_{31}H_{44}O_{10}$	576	577	594	599	615
casearina C	$C_{36}H_{54}O_{10}$	646	647	664	669	685
casearina D	$C_{30}H_{44}O_9$	548	549	566	571	587
casearina E	$C_{34}H_{54}O_8$	590	591	608	613	629
casearina F	$C_{28}H_{42}O_9$	522	523	540	545	561
casearina G	$C_{29}H_{42}O_8$	518	519	536	541	557
casearina H	$C_{28}H_{40}O_8$	504	505	522	527	543
casearina I	$C_{30}H_{44}O_8$	532	533	550	555	571
casearina J	$C_{31}H_{46}O_9$	562	563	580	585	601
casearina K	$C_{30}H_{42}O_{10}$	562	563	580	585	601
casearina L	$C_{29}H_{42}O_9$	534	535	552	557	573
casearina M	$C_{30}H_{44}O_9$	548	549	566	571	587
casearina N	$C_{33}H_{48}O_{10}$	604	605	622	627	643
casearina O	$C_{33}H_{48}O_{10}$	604	605	622	627	643
casearina P	$C_{29}H_{40}O_{10}$	548	549	566	571	587
casearina Q	$C_{30}H_{42}O_{10}$	562	563	580	585	601
casearina R	$C_{26}H_{34}O_9$	490	491	508	513	529
casearina S	$C_{27}H_{38}O_7$	474	475	492	497	513
casearina T	$C_{31}H_{44}O_{10}$	576	577	594	599	615
casearina U	$C_{28}H_{42}O_8$	506	507	524	529	545
casearina V	$C_{27}H_{40}O_8$	492	493	510	515	531
casearina X	$C_{30}H_{44}O_8$	532	533	550	555	571
casearvestrina A	$C_{28}H_{40}O_8$	504	505	522	527	543
casearvestrina B	$C_{29}H_{42}O_8$	518	519	536	541	557
casearvestrina C	$C_{30}H_{44}O_8$	532	533	550	555	571
caseargrewiina F	$C_{28}H_{40}O_8$	504	505	522	527	543
DC 28	$C_{20}H_{34}O_2$	306	307	324	329	345
DC 29	$C_{20}H_{28}O_3$	316	317	334	339	355
DC 30	$C_{20}H_{28}O_4$	332	333	350	355	371
DC 31	$C_{21}H_{30}O_5$	362	363	380	385	401
DC 32	$C_{21}H_{30}O_5$	362	363	380	385	401
equinofilina A	$C_{21}H_{28}O_6$	376	377	394	399	415
DC 34	$C_{28}H_{35}NO_5$	465	466	483	488	504
caseariasida A	$C_{26}H_{38}O_{10}$	510	511	528	533	549
caseariasida B	$C_{26}H_{38}O_{10}$	510	511	528	533	549
caseariasida C	$C_{31}H_{46}O_{13}$	626	627	644	649	665
caseariasida D	$C_{31}H_{48}O_{12}$	612	613	630	635	651
caseariasida E	$C_{26}H_{42}O_9$	498	499	516	521	537

FM: fórmula molecular. MM: massa molecular. m/z : relação massa/carga. DC 28: 15-hidroxi-3-cleroden-2-ona. DC 29: (-)-ácido hardwickiico. DC 30: ácido patagônico. DC 31: 2 β -metoxi-cleroda-3,13-dien-18-carboxi-15,16-olide. DC 32: 15 ξ -metoxi-cleroda-3,12-dien-18-carboxi-15,16-olide. DC 34: 15-oxo-equinofilina A.

Figura 17 - Espectros de massas ESI-MSⁿ usando espectrômetro *ion trap* linear no modo positivo da casearina J padrão (1 µg/mL) na forma de aduto de sódio (m/z 585) dissolvida em metanol (solvente do *spray*): (a) Espectro MS² do íon m/z 585; (b) Espectro MS³ do íon m/z 497; (c) Espectro MS⁴ do íons m/z 437.



CE (*Collision Energy*): energia de colisão.

Nota-se que o produto iônico principal da fragmentação MS^2 (m/z 497) é resultado da perda de um fragmento neutro de 88 Da (Figura 17a) atribuído ao ácido *n*-butanoico, uma vez que a casearina J apresenta dois radicais *n*-butanoato, um em R^2 e outro em R^5 . Já o principal produto da fragmentação MS^3 (m/z 427) resulta da perda de um fragmento neutro de 60 Da (Figura 17b) atribuído ao ácido acético, uma vez que a casearina J possui um radical acetato em R^3 . Por fim, o principal produto da fragmentação MS^4 (m/z 339) resulta da quebra do segundo *n*-butanoato gerando o fragmento neutro ácido *n*-butanoico (88 Da) (Figura 17c).

Também na análise dos outros diterpenos clerodânicos (cas B, cas O, cas X e casg F) por ESI-MS e MS^n formaram-se adutos de potássio, sódio e amônio (Figuras 18 a 21).

Figura 18 - Espectro de massas ESI-MS no modo positivo *full scan* da casearina B padrão (1 $\mu\text{g/mL}$) usando metanol como solvente de *spray*.

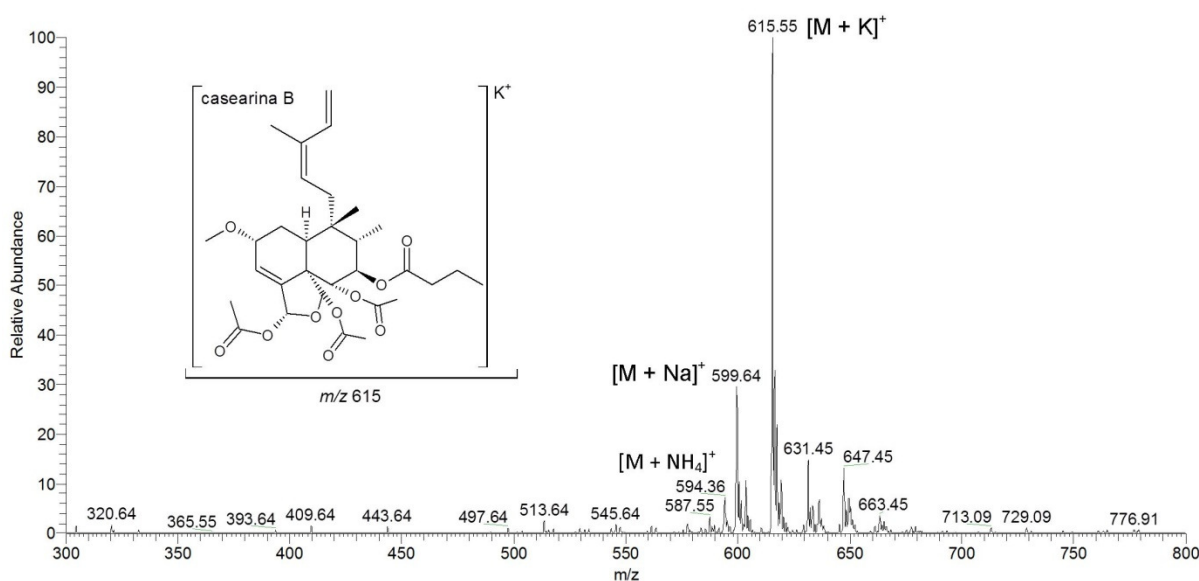


Figura 19 - Espectro de massas ESI-MS no modo positivo *full scan* da casearina O padrão (1 $\mu\text{g/mL}$) usando metanol como solvente de *spray*.

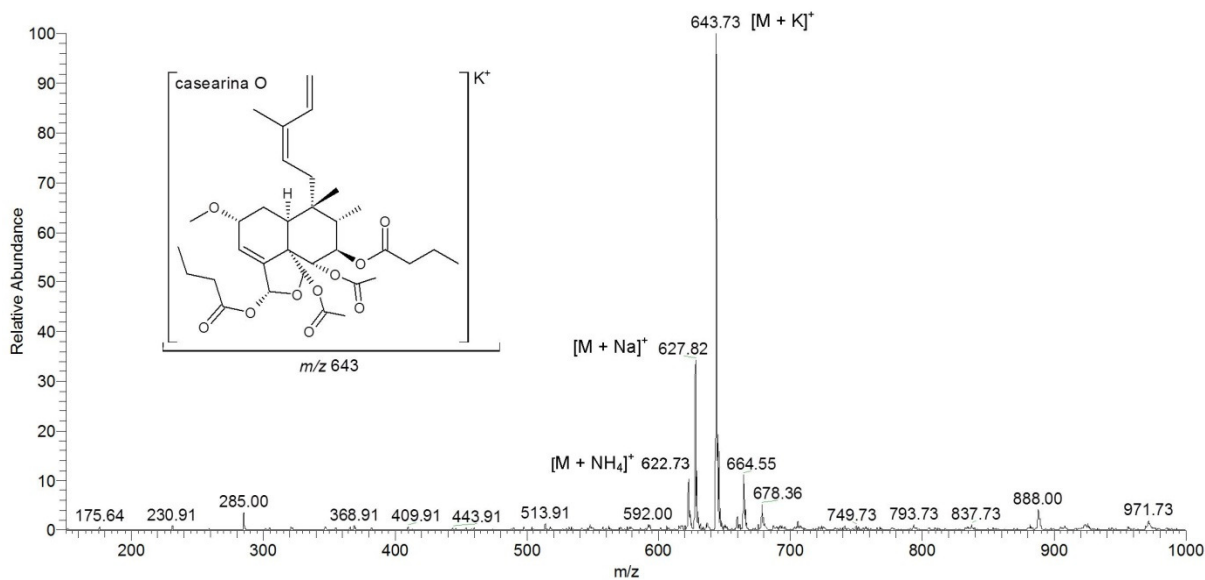


Figura 20 - Espectro de massas ESI-MS no modo positivo *full scan* da casearina X padrão (1 $\mu\text{g/mL}$) usando metanol como solvente de *spray*.

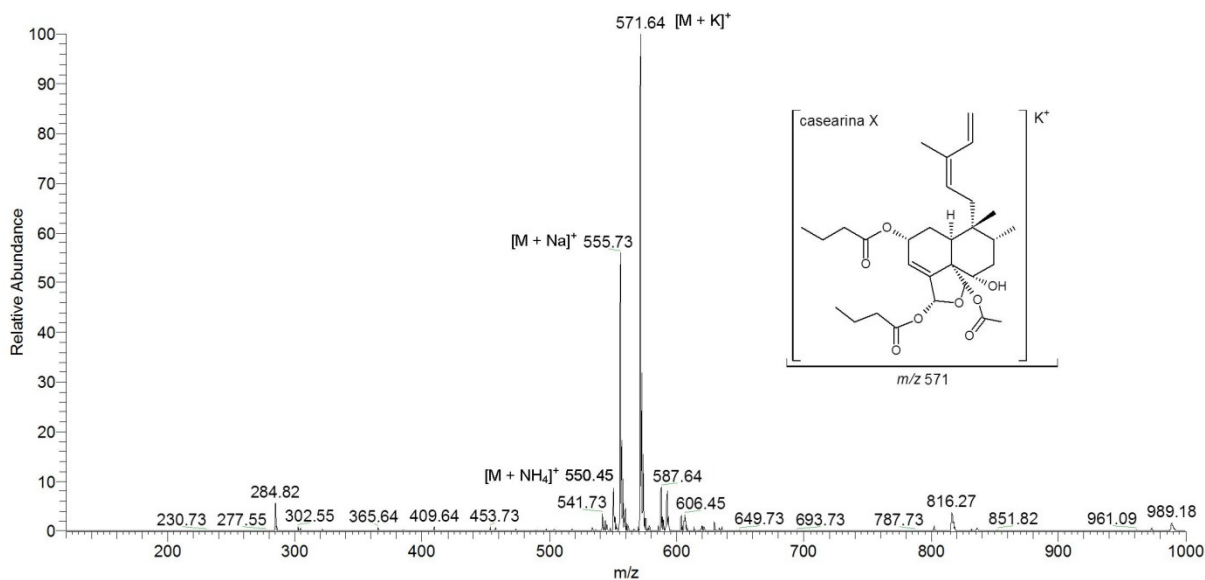
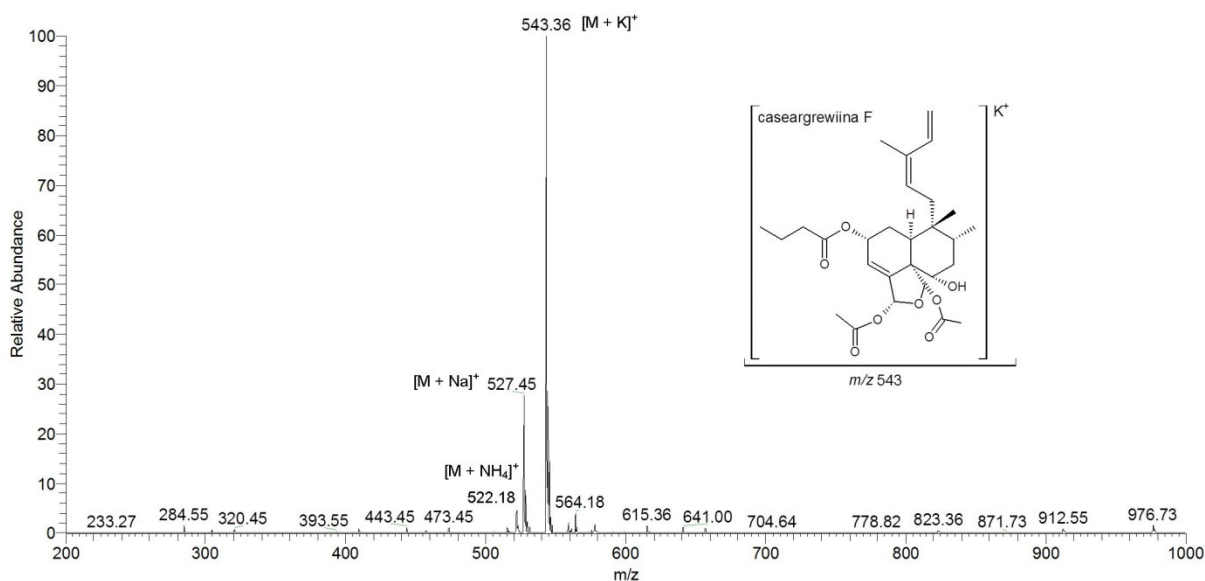
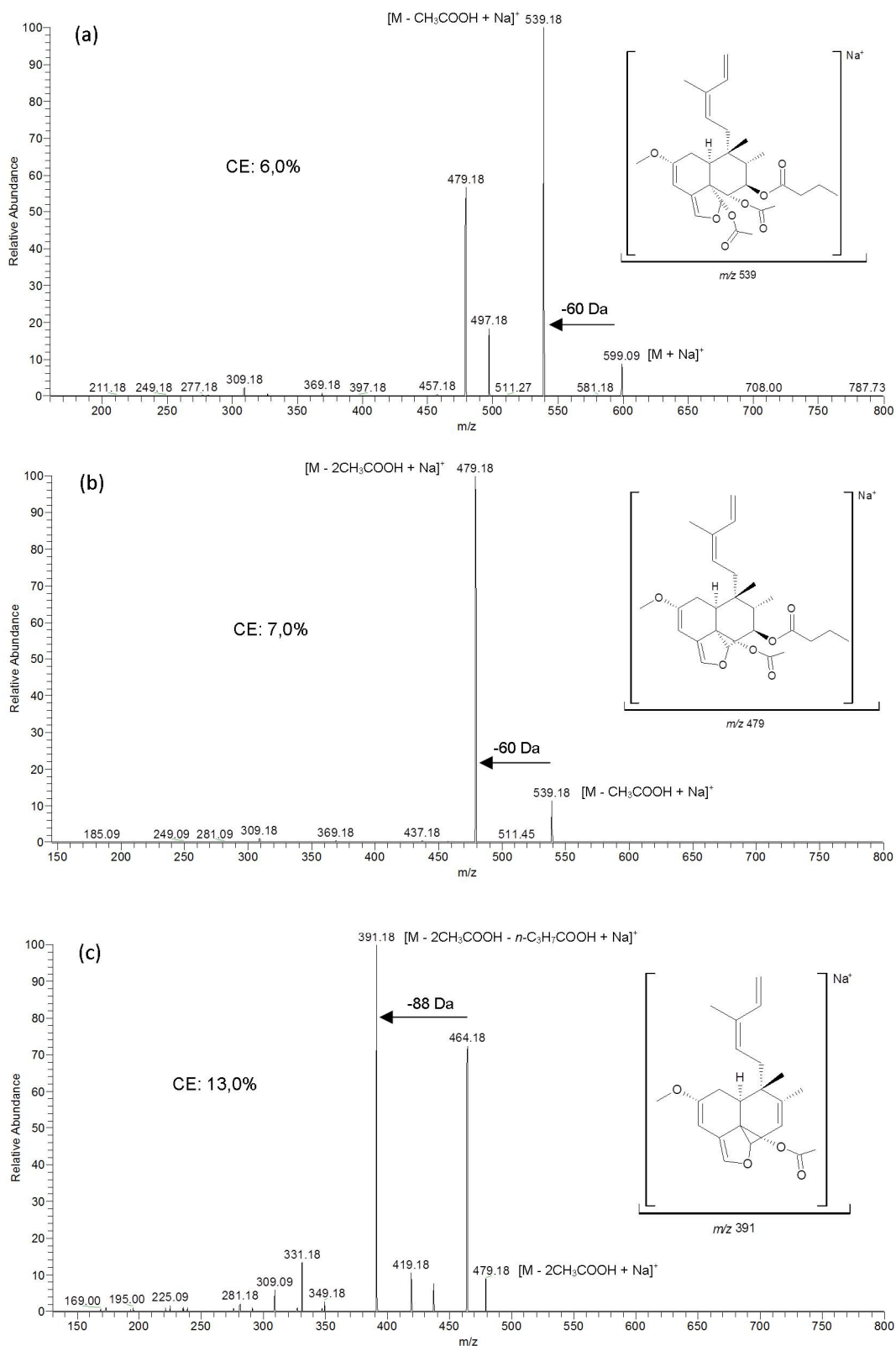


Figura 21 - Espectro de massas ESI-MS no modo positivo *full scan* da caseargreina F padrão (1 µg/mL) usando metanol como solvente de *spray*.



Em relação ao ESI-MSⁿ da casearina B, as fragmentações MS² e MS³ resultaram na perda consecutiva de dois fragmentos neutros de 60 Da correspondentes a moléculas de ácido acético (Figura 21a e 21b). Já a fragmentação MS⁴ resultou na perda de um fragmento neutro de 88 Da (Figura 21c).

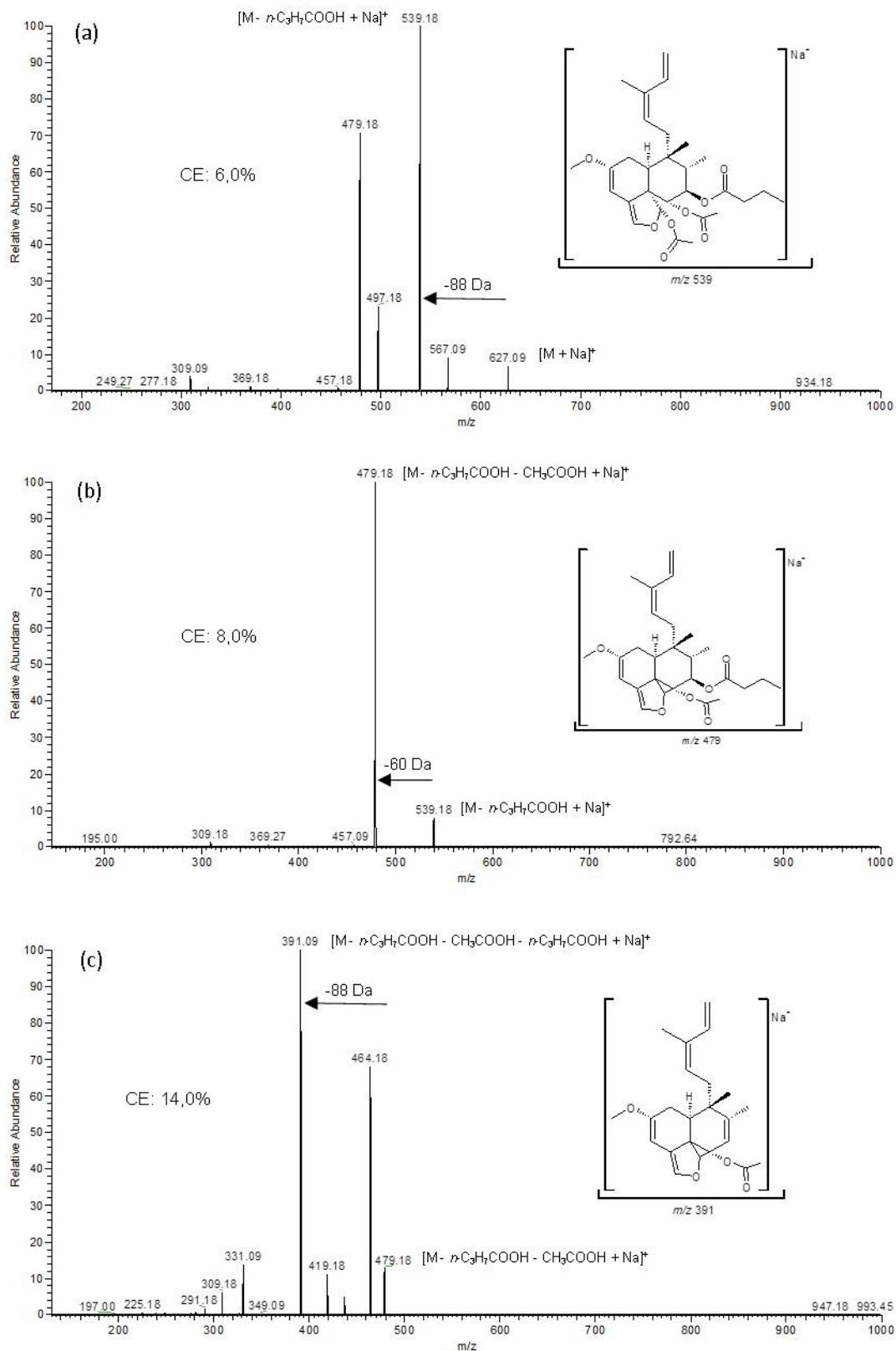
Figura 22 - Espectros de massas ESI-MSⁿ usando espectrômetro *ion trap* linear no modo positivo da casearina B padrão (1 µg/mL) na forma de aduto de sódio (*m/z* 599) dissolvida em metanol (solvente de *spray*): (a) Espectro MS² do íon *m/z* 599; (b) Espectro MS³ do íon *m/z* 539; (c) Espectro MS⁴ do íons *m/z* 479.



CE (*Collision Energy*): energia de colisão.

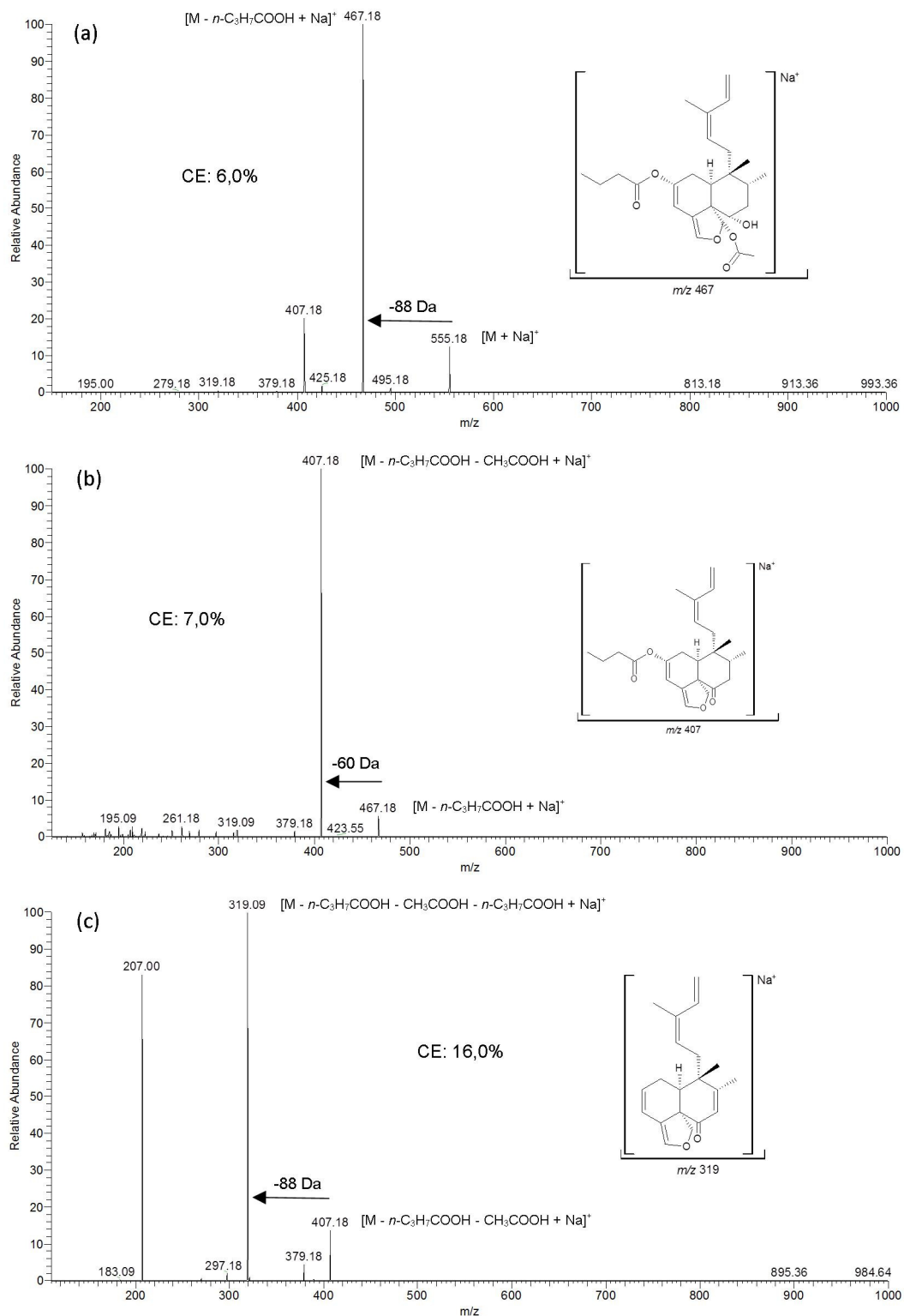
Já o ESI-MSⁿ das casearinas O e X, a fragmentação MS² (Figuras 23a e 24a, respectivamente) resultou na perda de um fragmento neutro de 88 Da, mesmo resultado encontrado para a casearina J. Tal fragmento corresponde ao ácido *n*-butanoico, uma vez que estas três casearinas apresentam dois radicais *n*-butanoatos, um deles encontrado na posição R² das três casearinas e outro na posição R¹ (casearinas O e X) e R⁵ (casearina J). Comparando-se este resultado com as fragmentações da casearina B (Figura 22) e da caseargrewiina F (Figura 25), conclui-se que, no caso das casearinas O e X, o primeiro *n*-butanoato fragmentado é o da posição R². Tanto a casearina B quanto a caseargrewiina F possuem apenas um radical *n*-butanoato (R⁵ e R¹, respectivamente) e nos dois casos este radical foi perdido apenas na fragmentação MS⁴, depois da perda de dois fragmentos neutros de 60 Da (ácido acético) resultantes da fragmentação dos radicais acetatos da posição R² e R³ encontrados nestas casearinas. Quanto à fragmentação MS³ das casearinas O e X (Figuras 22b e 23b, respectivamente), foram liberados fragmentos neutros de 60 Da formados a partir de radicais acetatos. No caso da casearina X, o único radical acetato está presente na posição R³ e este resultado demonstra a tendência da quebra do R³ em relação ao R¹ durante a fragmentação MS₃, o mesmo observado na fragmentação MS³ da casearina J na qual o R³ foi fragmentado preferencialmente em relação ao R⁵. Deste modo, conclui-se que dos dois radicais acetatos da casearina O (R³ e R⁴), o que sofre quebra durante a fragmentação MS³ é o da posição R³. Por fim, a fragmentação MS⁴ das casearinas O e X também foi igual (Figuras 23c e 24c, respectivamente), ou seja, em ambas houve a perda de um fragmento neutro de 88 Da (ácido *n*-butanoico) formado a partir do radical *n*-butanoato encontrado na posição R⁵ da casearina O e R¹ da casearina X.

Figura 23 - Espectros de massas ESI-MSⁿ usando espectrômetro *ion trap* linear no modo positivo da casearina O padrão (1 µg/mL) na forma de aduto de sódio (m/z 627) dissolvida em metanol (solvente de *spray*): (a) Espectro MS² do íon m/z 627; (b) Espectro MS³ do íon m/z 539; (c) Espectro MS⁴ do íons m/z 479.



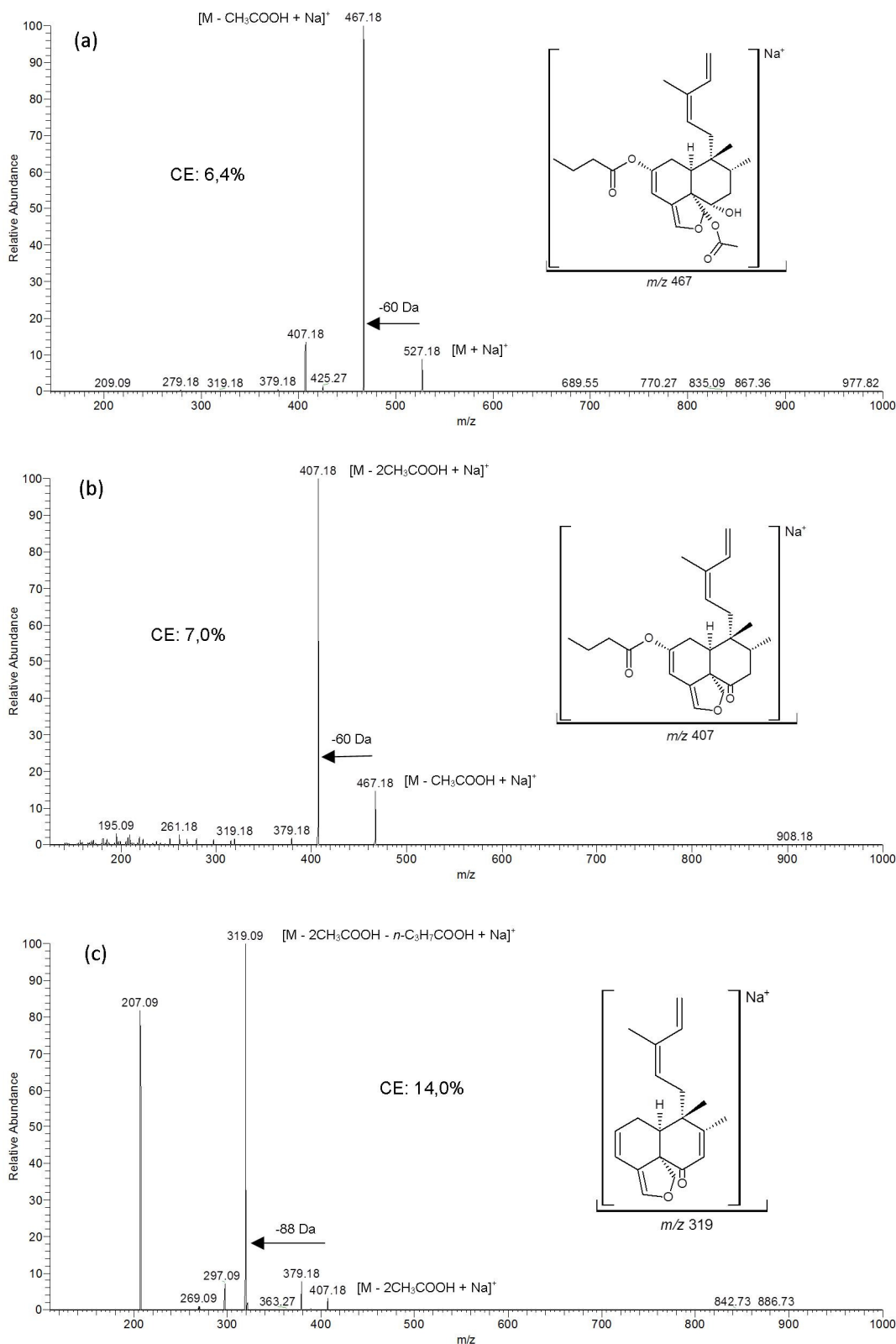
CE (*Collision Energy*): energia de colisão.

Figura 24 - Espectros de massas ESI-MSⁿ usando espectrômetro *ion trap* linear no modo positivo da casearina X padrão (1 µg/mL) na forma de aduto de sódio (*m/z* 555) dissolvida em metanol (solvente de *spray*): (a) Espectro MS² do íon *m/z* 555; (b) Espectro MS³ do íon *m/z* 467; (c) Espectro MS⁴ do íons *m/z* 407.



CE (*Collision Energy*): energia de colisão.

Figura 25 - Espectros de massas ESI-MSⁿ usando espectrômetro *ion trap* linear no modo positivo da caseagrewiina F padrão (1 µg/mL) na forma de aduto de sódio (*m/z* 527) dissolvida em metanol (solvente de *spray*): (a) Espectro MS² do íon *m/z* 527; (b) Espectro MS³ do íon *m/z* 467; (c) Espectro MS⁴ do íons *m/z* 407.



CE (*Collision Energy*): energia de colisão.

Os resultados da fragmentação destes cinco diterpenos clerodânicos indicam um padrão no qual os radicais esterificados no anel diacetálico (posições R² e R³) são fragmentados inicialmente, pois o principal produto iônico da fragmentação MS² resulta da perda do grupo esterificado em R², e este produto por sua vez, perde preferencialmente o grupo esterificado em R³ na fragmentação MS³. Em seguida, são fragmentados os grupos presente em R¹ ou R⁵. Desta forma, as Figuras 25 a 29 demonstram, respectivamente, as propostas de fragmentação molecular das casearinas J, B, O e X e da caseargrewiina F.

Figura 26 - Proposta de fragmentação molecular da casearina J realizada em espectrômetro *ion trap* linear até MS⁴ usando o método de colisão por dissociação (CID: *Collision Induced Dissociation*).

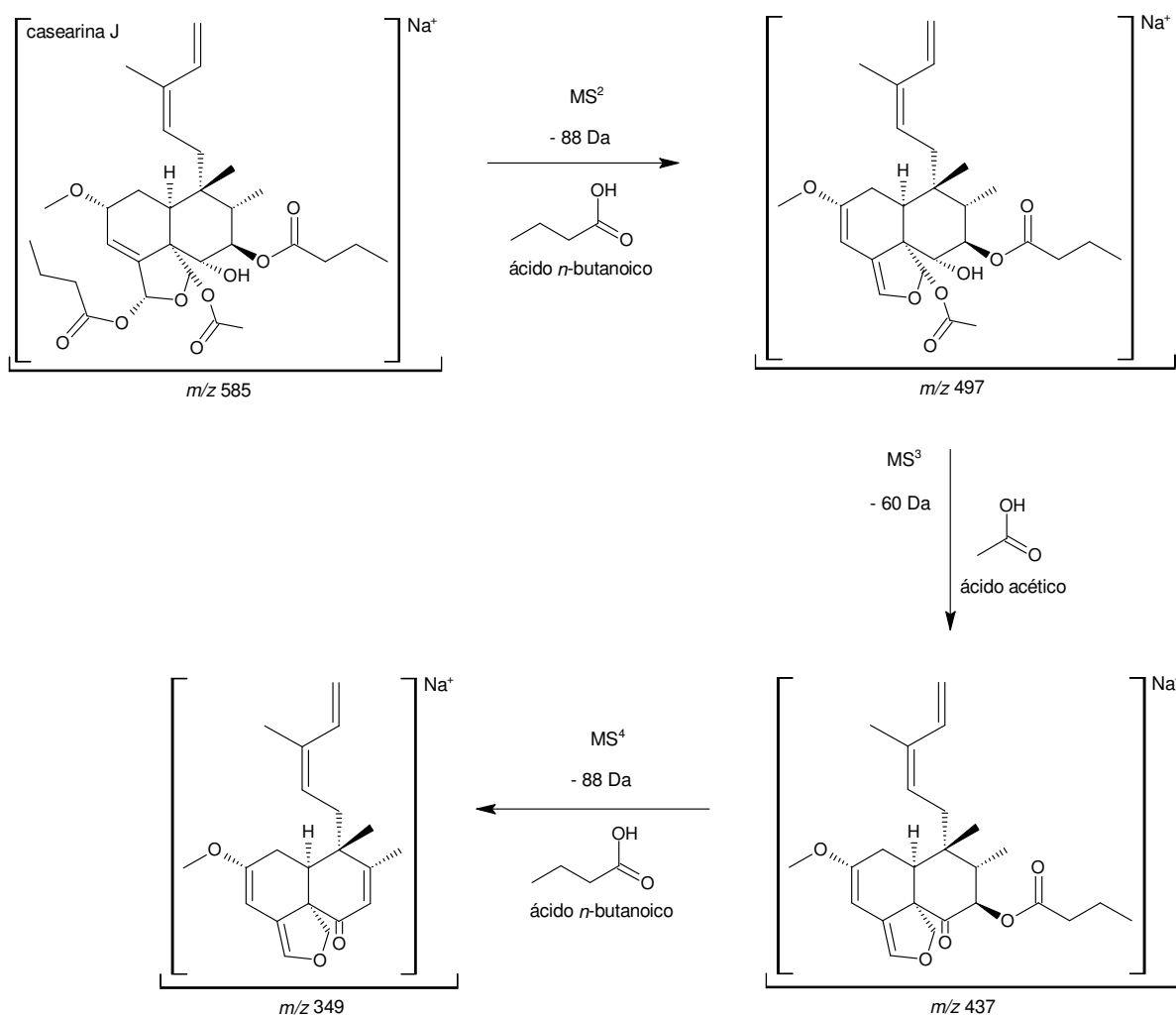


Figura 27 - Proposta de fragmentação molecular da casearina B realizada em espectrômetro *ion trap* linear até MS^4 usando o método de colisão por dissociação (CID: *Collision Induced Dissociation*).

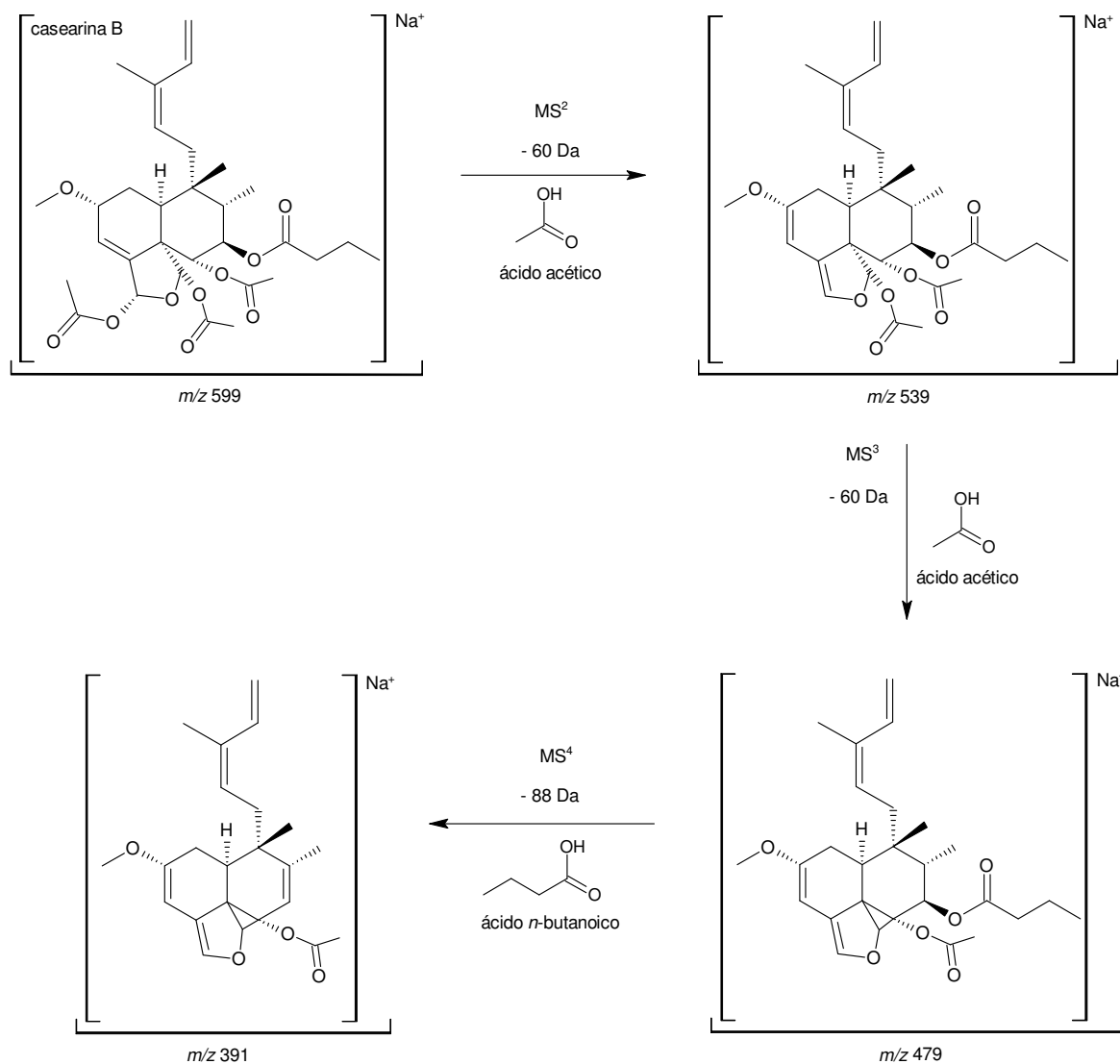


Figura 28 - Proposta de fragmentação molecular da casearina O realizada em espectrômetro *ion trap* linear até MS⁴ usando o método de colisão por dissociação (CID: *Collision Induced Dissociation*).

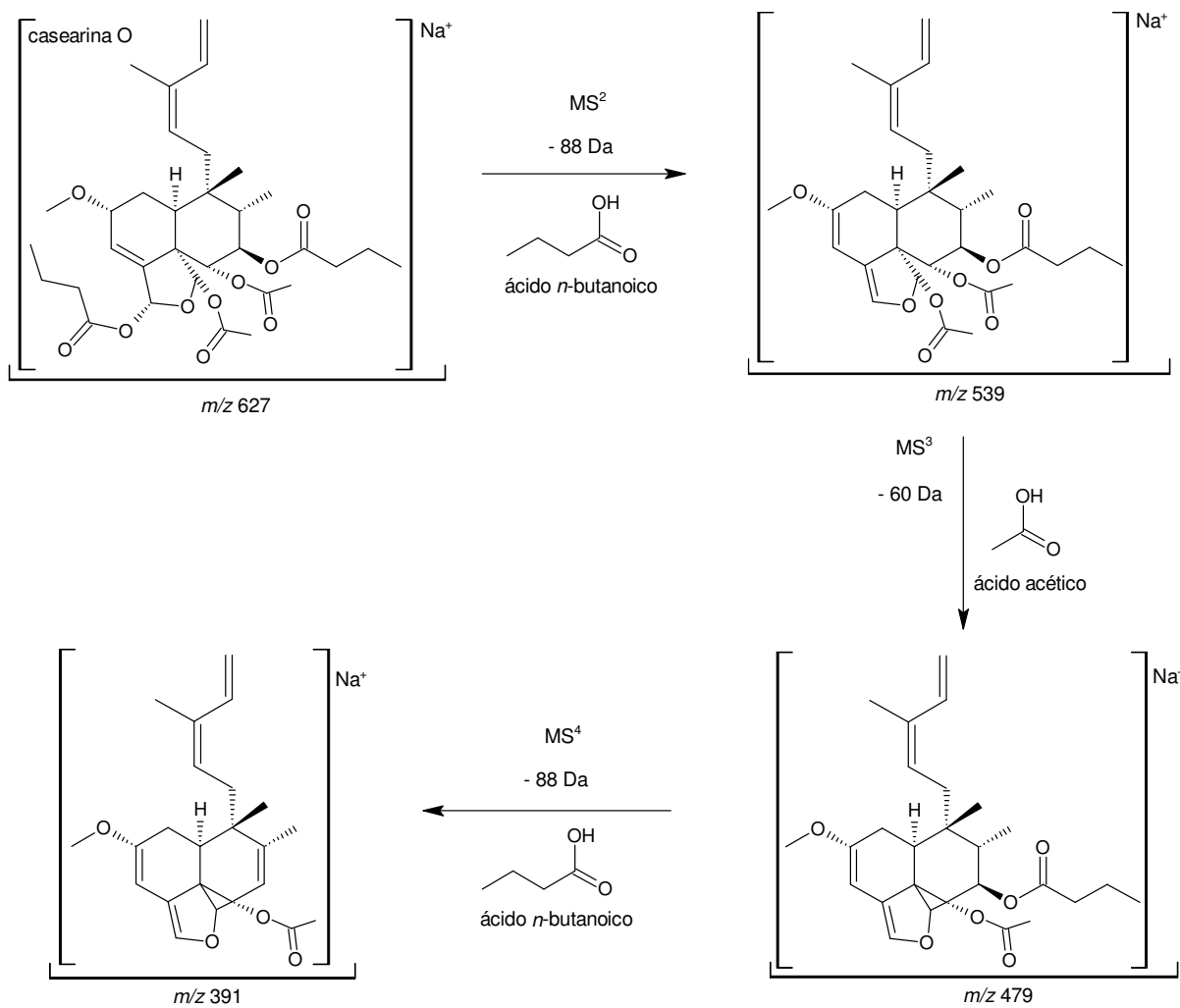


Figura 29 - Proposta de fragmentação molecular da casearina X realizada em espectrômetro *ion trap* linear até MS^4 usando o método de colisão por dissociação (CID: *Collision Induced Dissociation*).

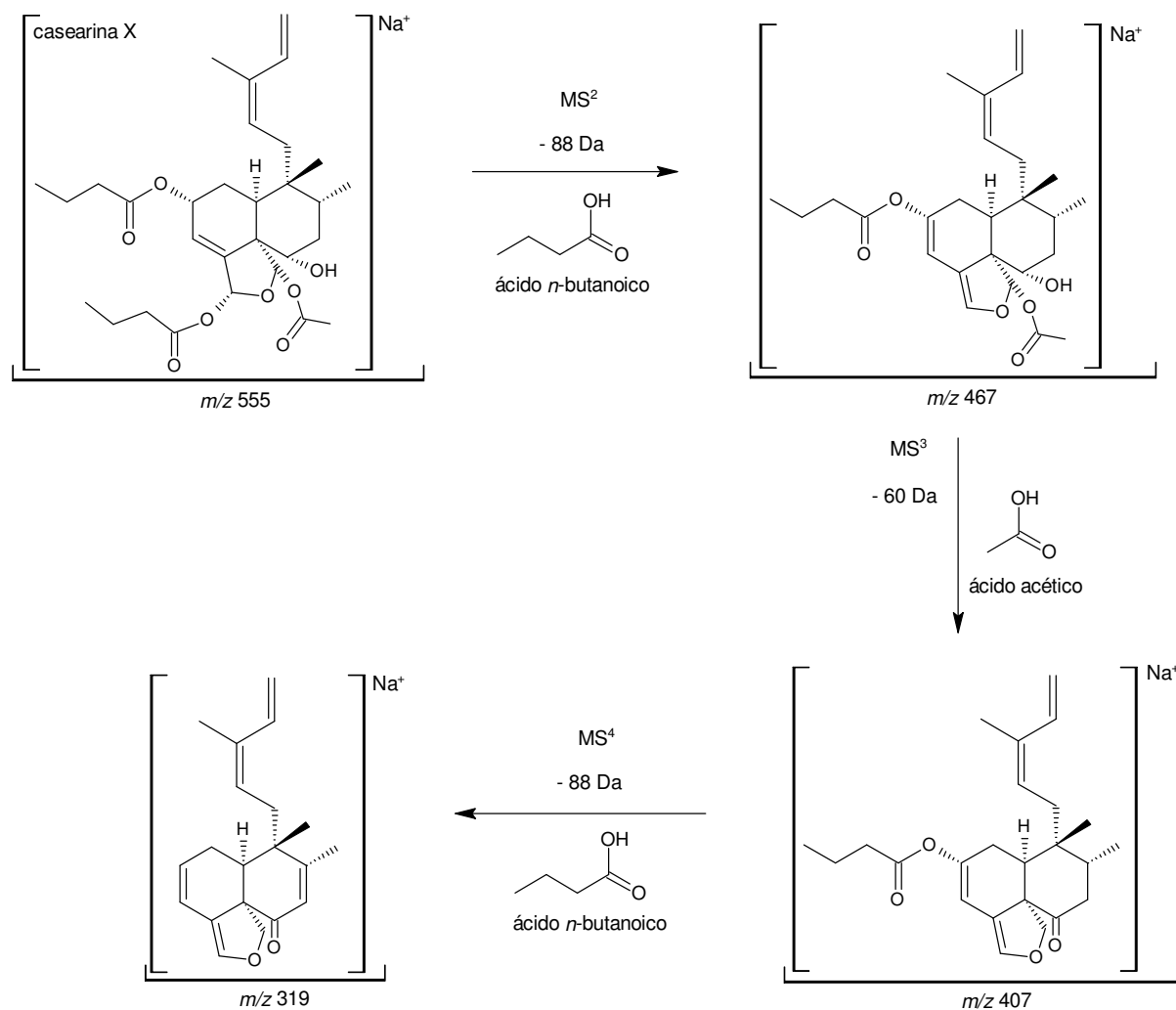
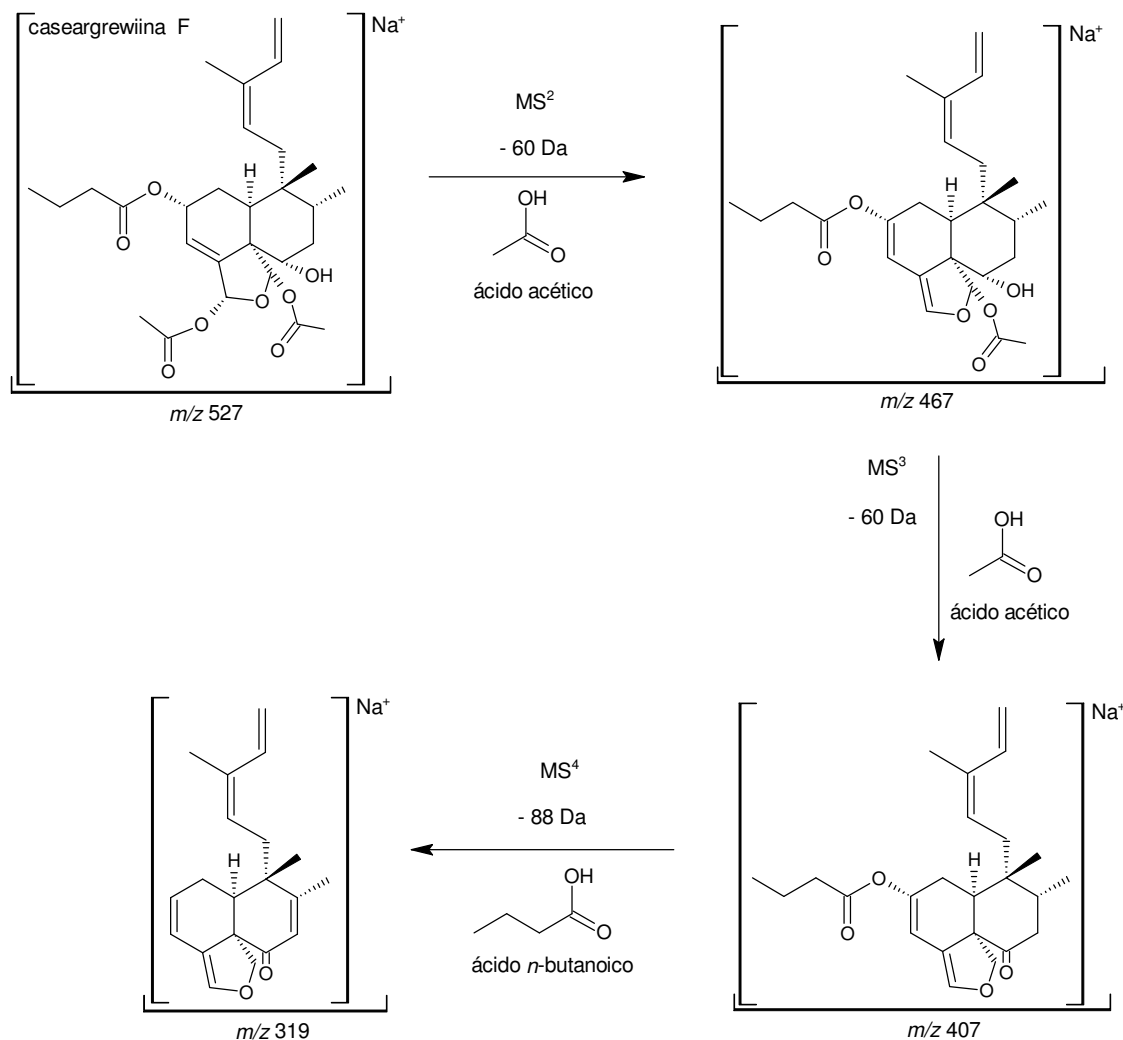


Figura 30 - Proposta de fragmentação molecular da caseargrewiina F realizada em espectrômetro *ion trap* linear até MS⁴ usando o método de colisão por dissociação (CID: *Collision Induced Dissociation*).



5.2.2 Análise do EEtCs e da EFS2 por ESI-MS, ESI-MSⁿ e HPTLC-DESI-MS-IMAGING

Inicialmente estas análises foram analisadas por ESI-MS e ESI-MSⁿ nas condições experimentais otimizadas para os padrões de diterpenos, exceto em relação à concentração. Para otimizar este parâmetro, utilizou-se metanol como solvente e foram testadas as concentrações de 10, 30 e 100 µg/mL para o EEtCs e 1, 10 e 30 µg/mL para a EFS2. Para o EEtCs, os melhores resultados (maior nível de intensidade normalizada e menor formação de *clusters*) foram obtidos com a

concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 31), e para a EFS2 com a concentração de 1 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 32).

Figura 31 - Espectro de massas ESI-MS no modo positivo *full scan* do EEtCs (10 $\mu\text{g/mL}$ em metanol) em toda faixa de detecção analisada (a) e na faixa com a maior densidade de picos (b).

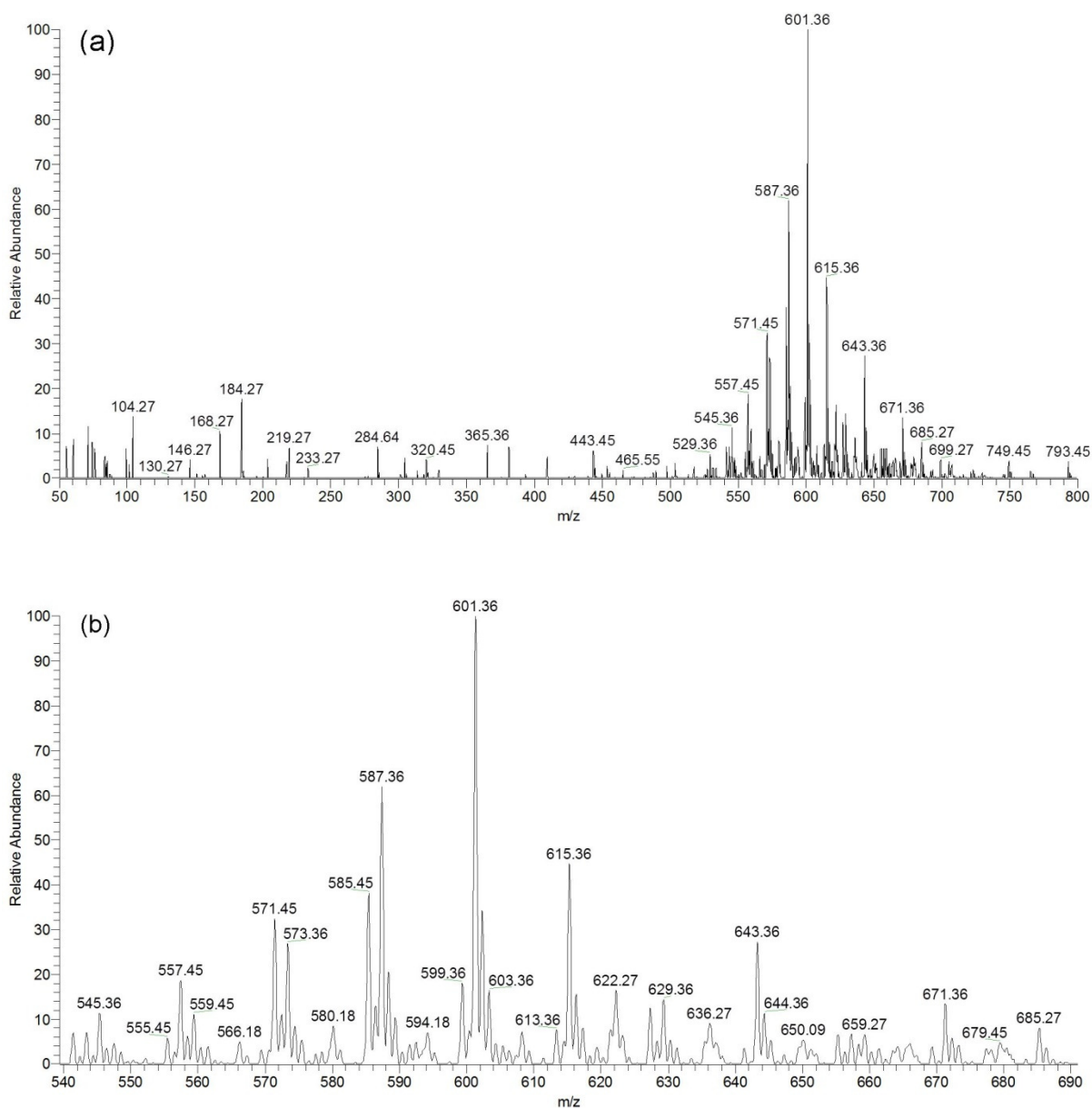
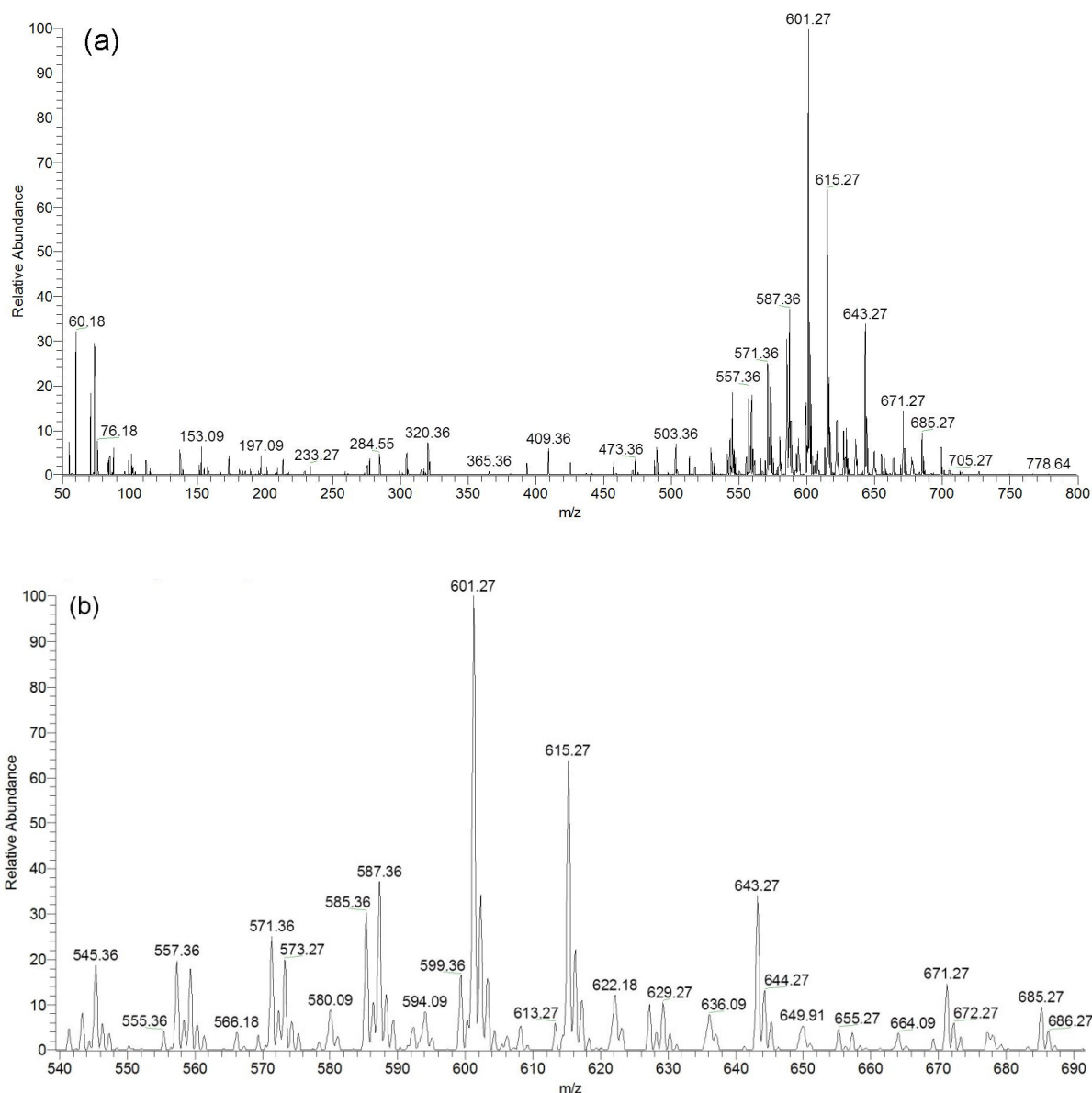


Figura 32 - Espectro de massas ESI-MS no modo positivo *full scan* da EFS2 (10 µg/mL em metanol) em toda faixa de detecção analisada (a) e na faixa com a maior densidade de picos (b).



Após otimização da concentração, realizou-se o ESI-MSⁿ dos principais picos encontrados nestas amostras. Com base nos resultados obtidos, nos valores de m/z dos adutos de amônio, sódio e potássio de todos diterpenos clerodânicos identificados até o momento na *C. sylvestris* (Tabela 8), na estrutura química destes diterpenos (Figuras 8 a 11 e Tabela 4) e no perfil de fragmentação determinado com padrões destes compostos, chegou-se aos candidatos aos principais picos encontrados nas amostras (Tabelas 9 e 10).

Tabela 9 - Resultados da fragmentação por ESI-MSⁿ dos principais picos encontrados no ESI-MS no modo positivo *full scan* do EECs (10 µg/mL) usando metanol como solvente de *spray*.

íon precursor <i>m/z</i>	candidato(s) inicial(is)	Adutos	MS ² <i>m/z</i> NL 100% (MM _{fn})	MS ³ <i>m/z</i> NL 100% (MM _{fn})	MS ⁴ <i>m/z</i> NL 100% (MM _{fn})
545	casearina F	[M + Na] ⁺	485	-	-
	casearina U	[M + K] ⁺	(60)		
555	casearina I	[M + Na] ⁺	467 (88)	407 (60)	-
	casearina X	[M + Na] ⁺			
	casearvestrina C	[M + Na] ⁺			
557	casearina A	[M + Na] ⁺	497 (60)	437 (60)	349 (88)
	casearina L	[M + Na] ⁺			
	casearina G	[M + K] ⁺			
	casearvestrina B	[M + K] ⁺			
571	casearina D	[M + Na] ⁺	483 (88)	423 (60)	335 (88)
	casearina M	[M + Na] ⁺			
	casearina P	[M + Na] ⁺			
	casearina I	[M + K] ⁺			
	casearina X	[M + K] ⁺			
573	casearina A	[M + K] ⁺	513 (60)	453 (60)	-
	casearina L	[M + K] ⁺			
585	casearina J	[M + Na] ⁺	497 (88)	437 (60)	349 (88)
	casearina K	[M + Na] ⁺			
	casearina Q	[M + Na] ⁺			
587	casearina D	[M + K] ⁺	499 (88)	439 (60)	-
	casearina M	[M + K] ⁺			
	casearina P	[M + K] ⁺			
599	casearina B	[M + Na] ⁺	539 (60)	479 (60)	391 (88)
	casearina T	[M + Na] ⁺			
601	casearina J	[M + K] ⁺	513 (88)	453 (60)	-
	casearina K	[M + K] ⁺			
	casearina Q	[M + K] ⁺			
615	casearina B	[M + K] ⁺	555 (60)	495 (60)	-
	casearina T	[M + K] ⁺			
627	casearina N	[M + Na] ⁺	539 (88)	479 (60)	391 (88)
	casearina O	[M + Na] ⁺			
629	casearina E	[M + K] ⁺	541 (88)	-	-
643	casearina N	[M + K] ⁺	555 (88)	495 (60)	-
	casearina O	[M + K] ⁺			
685	casearina C	[M + K] ⁺	-	-	-

NL: nível de intensidade normalizado. MM_{fn} – massa molecular do fragmento neutro.

Tabela 10 - Resultados da fragmentação por ESI-MSⁿ dos principais picos encontrados no ESI-MS no modo positivo *full scan* da EFS2 (1 µg/mL) usando metanol como solvente de *spray*.

íon precursor <i>m/z</i>	candidato(s) inicial(is)	Adutos	MS ² <i>m/z</i> NL 100% (MM _{fn})	MS ³ <i>m/z</i> NL 100% (MM _{fn})	MS ⁴ <i>m/z</i> NL 100% (MM _{fn})
545	casearina F casearina U	[M + Na] ⁺ [M + K] ⁺	485 (60)	439 (46)	-
555	casearina I casearina X casearvestrina C	[M + Na] ⁺ [M + Na] ⁺ [M + Na] ⁺	467 (88)	407 (60)	-
557	casearina A casearina L casearina G casearvestrina B	[M + Na] ⁺ [M + Na] ⁺ [M + K] ⁺ [M + K] ⁺	497 (60)	437 (60)	349 (88)
559	-	-	499 (60)	439 (60)	-
571	casearina D casearina M casearina P casearina I casearina X casearvestrina C	[M + Na] ⁺ [M + Na] ⁺ [M + Na] ⁺ [M + K] ⁺ [M + K] ⁺ [M + K] ⁺	483 (88)	423 (60)	335 (88)
573	casearina A casearina L	[M + K] ⁺ [M + K] ⁺	513 (60)	453 (60)	-
585	casearina J casearina K casearina Q	[M + Na] ⁺ [M + Na] ⁺ [M + Na] ⁺	497 (88)	437 (60)	349 (88)
587	casearina D casearina M casearina P	[M + K] ⁺ [M + K] ⁺ [M + K] ⁺	499 (88)	439 (60)	-
588	-	-	500 (88)	440 (60)	-
599	casearina B casearina T	[M + Na] ⁺ [M + Na] ⁺	539 (60)	479 (60)	391 (88)
601	casearina J casearina K casearina Q	[M + K] ⁺ [M + K] ⁺ [M + K] ⁺	513 (88)	453 (60)	-
615	casearina B casearina T	[M + K] ⁺ [M + K] ⁺	555 (60)	495 (60)	-
622	casearina N casearina O	[M + NH ₄] ⁺ [M + NH ₄] ⁺	-	-	-
629	casearina E	[M + K] ⁺	541 (88)	481 (60)	-
643	casearina N casearina O	[M + K] ⁺ [M + K] ⁺	555 (88)	495 (60)	-
671	-	-	611 (60)	551 (60)	-
685	casearina C	[M + K] ⁺	625 (60)	-	-

NL: nível de intensidade normalizado. MM_{fn} – massa molecular do fragmento neutro.

As informações obtidas com o ESI-MS e ESI-MSⁿ em conjunto com os dados sobre os diterpenos clerodânicos (valores m/z dos adutos, estrutura química e padrão de fragmentação) já permitem sugerir o candidato mais provável para cada um dos picos encontrados, mas assim outras técnicas analíticas poderiam contribuir neste sentido como, por exemplo, a cromatografia em camada delgada (CCD) na qual se compara valores de R_f das bandas das amostras e dos padrões, inclusive esta técnica foi utilizada neste estudo durante a fase de obtenção do material vegetal. Porém, quando revelada com indicador químico, esta técnica apresenta baixa resolução. Isto pode ser observado na Figura 14 que mostra o resultado da CCD do EEtCs e das frações EFS. Por outro lado, esta limitação é resolvida através do acoplamento da CCD, especialmente da cromatografia em camada delgada de alta eficiência (HPTLC), com a técnica de DESI-MS-IMAGING conforme descrito na subseção 4.2.3. A resolução desta técnica hifenada é alta uma vez que as bandas formadas correspondem a valores específicos de m/z . Sendo assim, optou-se pela realização desta técnica.

Inicialmente a técnica foi realizada com padrões de diterpenos. Na técnica de ESI-MS, usando o mesmo solvente do *spray* de elétrons (metanol), todos os padrões mostraram maior tendência em forma adutos com potássio e este fenômeno se repetiu na técnica de HPTLC-DESI-MS-IMAGING para as casearinas B e X e caseargrewiina F, cujas bandas correspondem aos seus adutos de potássio (Figura 33). O mesmo aconteceu com as bandas destas casearinas que apareceram na cromatografia da EFS2 (Figura 35).

Já as bandas dos padrões das casearinas J e O (Figura 33) correspondem aos seus adutos de sódio (m/z 585 e 627, respectivamente), o mesmo ocorrendo com as bandas destas casearinas que apareceram na imagem química da cromatografia da EFS2 (Figura 35). Por outro lado, na imagem química da cromatografia do EEtCs (Figura 34), as casearinas J e O formaram bandas como adutos de potássio (m/z 601 e 643, respectivamente). Aparentemente, quando estas casearinas são ionizadas por técnica de DESI, os adutos de sódio são preferenciais em concentrações maiores (padrões e EFS2) e de potássio em concentrações menores (EEtCs).

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 *spray* de elétrons (HPTLC-DESI-MS-IMAGING).

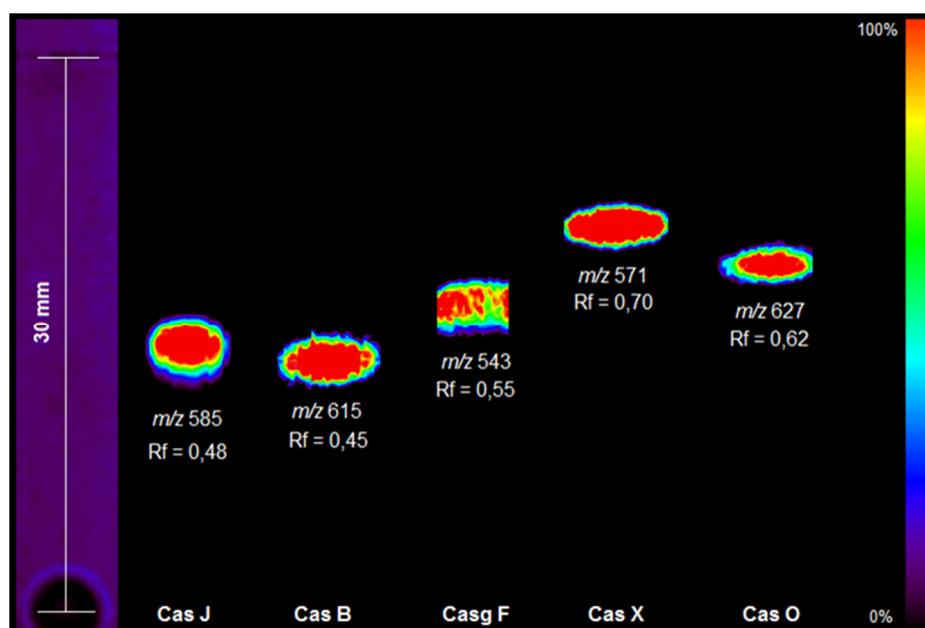


Figura 34 – Imagens químicas obtidas pela análise do EEtCs por cromatografia em camada delgada de alta eficiência hifenada com espectrometria de massas com fonte de dessorção de *spray* de elétrons (HPTLC-DESI-MS-IMAGING).

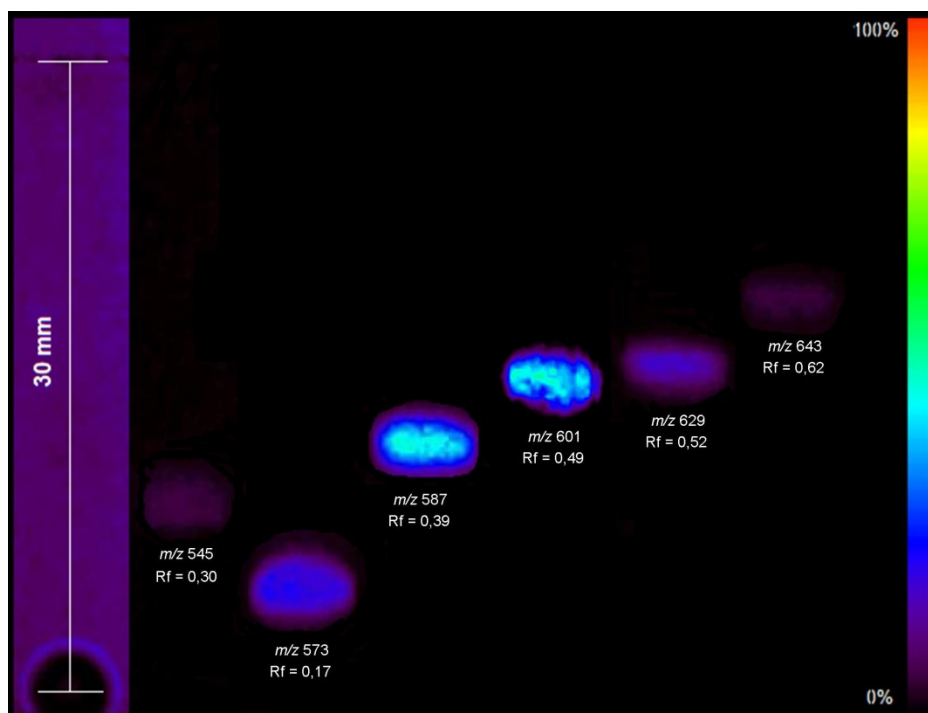
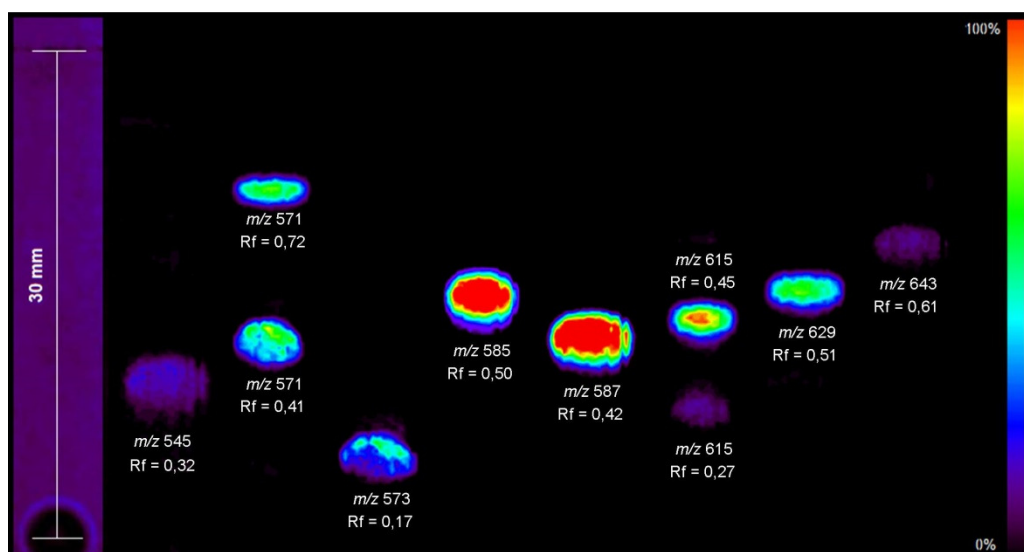


Figura 35 – Imagens químicas obtidas pela análise da EFS por cromatografia em camada delgada de alta eficiência hifenada com espectrometria de massas com fonte de dessorção de *spray* de elétrons (HPTLC-DESI-MS-IMAGING).



Analisando os resultados obtidos com as análises das amostras (EEtCs e EFS2) por ESI-MS, ESI-MSⁿ e HPTLC-DESI-MS-IMAGING em conjunto com os dados sobre os diterpenos clerodânicos (valores m/z dos adutos, estrutura química e padrão de fragmentação), chegou-se às seguintes conclusões.

Os candidatos iniciais do pico m/z 545 foram a casearina F na forma de aduto de sódio e a casearina U na forma de aduto de potássio. A fragmentação MS² deste pico (EEtCs e EFS2) gerou a perda de um fragmento neutro de 60 Da atribuído ao ácido acético formado a partir da quebra de um radical acetato e a fragmentação MS³ (EFS2) gerou a perda de um fragmento neutro de 46 Da atribuído ao etanol formado a partir da quebra de um radical etoxila. Estas duas casearinas possuem apenas um radical acetato e na mesma posição (R³), mas apenas a casearina F possui radical etoxila (R²). Com isso, o pico m/z 545 foi atribuído à casearina F na forma de aduto de sódio. Vale ressaltar que a fragmentação desta casearina ajudou estabelecer o padrão de fragmentação destes diterpenos, pois os cinco diterpenos utilizados para tal padronização (casearinas B, J, O e X e caseargrewiina F) apresentam radicais esterificados em R² e R³ e os resultados demonstraram que na primeira fragmentação (MS²) o radical éster em R² é quebrado preferencialmente. Já a casearina F apresenta um grupo éter em R² e um éster em R³ e os resultados demonstraram que, neste caso, a preferência de quebra é do éster em R³ e, em seguida, do grupo éter em R² que, por sua vez, tem preferência sobre o grupo éster

em R^5 , uma vez que a casearina F apresenta um radical *n*-butanoato em R^5 que não foi quebrado. Confirmando se tratar de apenas uma casearina, as imagens químicas das cromatografias do EEtCs e da EFS2 indicaram a presença de apenas uma banda.

Os candidatos iniciais ao pico m/z 555 foram as casearinas I e X e a casearvestrina C, todas na forma de adutos de sódio. Estes mesmos diterpenos, na forma de adutos de potássio, são candidatos ao pico m/z 571 juntamente com as casearinas D, M e P na forma de adutos de sódio. Estas, por sua vez, na forma de adutos de potássio, foram os candidatos iniciais do pico m/z 587. As fragmentações MS^2 e MS^3 de ambos os picos geraram, respectivamente, um fragmento neutro de 88 Da atribuído ao ácido *n*-butanoico e outro de 60 Da atribuído ao ácido acético. Além disso, a fragmentação MS^3 do pico 571 gerou outro fragmento neutro de 88 Da atribuído ao ácido *n*-butanoico. Considerando o padrão de fragmentação encontrado neste estudo, acredita-se que os fragmentos neutros formados resultem, respectivamente, da quebra de um radical *n*-butanoato presente em R^2 (MS^2), seguida pela quebra de um radical acetato presente em R^3 (MS^3) e, finalmente, a quebra de outro radical *n*-butanoato presente em R^1 ou R^5 (MS^4). Este padrão de radicais pode ser encontrado apenas nas casearinas D e X. Desta maneira, foram descartados as casearinas M, P e I e a casearvestrina C. As análises por HPTLC-DESI-MS-IMAGING corroboram esta hipótese. Na imagem química da HPTLC da EFS2 houve a formação tanto da banda m/z 571 quanto da banda m/z 587, sendo que a primeira foi atribuída à casearina X, já que o seu valor de R_f (0,72) ficou muito próximo daquele apresentado pelo padrão da casearina X (0,70). Sendo assim, a banda m/z 587 foi atribuída à casearina D, cujo valor de R_f (0,42) foi semelhante ao da banda m/z 587 do EEtCs (0,39).

Os candidatos iniciais do pico m/z 557 foram as casearinas A e L na forma de adutos de sódio, a casearina G na forma de aduto de potássio e a casearvestrina B, também na forma de aduto de potássio. As duas primeiras, na forma de adutos de potássio, também foram candidatas ao pico m/z 573. As fragmentações MS^2 e MS^3 de ambos os picos geraram dois fragmentos neutros de 60 Da atribuídos ao ácido acético oriundos da quebra de radicais acetatos. Já a fragmentação MS^4 do pico m/z 557 gerou um fragmento neutro de 88 Da atribuído ao ácido *n*-butanoico originado da quebra de um radical *n*-butanoato, o que descarta a casearvestrina B que não possui este radical. Os outros três candidatos possuem dois radicais acetatos e um

radical *n*-butanoato, mas considerando o padrão de fragmentação, descarta-se a casearina L na qual o *n*-butanoato encontra-se em R^2 e os acetatos em R^3 e R^4 , diferentemente das casearinas A e G nas quais os acetatos encontram-se em R^2 e R^3 e o *n*-butanoato em R^5 , ou seja, de acordo com o padrão de fragmentação encontrado. No entanto, a análise por HPTLC-DESI-MS-IMAGING indicou a presença apenas da banda m/z 573, tanto para o EEtCs quanto para a EFS2, ambas com R_f igual a 0,17. Sendo assim, descartou-se a casearina G cujos adutos não correspondem a esta m/z , ao contrário da casearina A na forma de aduto de potássio.

Os candidatos iniciais ao pico m/z 585 foram as casearinas J, K e Q na forma de adutos de sódio e estas mesmas casearinas foram as candidatas do pico m/z 601 na forma de adutos de potássio. A fragmentação MS^2 e MS^3 de ambos os picos geraram, respectivamente, fragmentos de ácido *n*-butanoico (88 Da) e ácido acético (60 Da), tanto na análise do EEtCs quanto da EFS2. Também nestas duas amostras, a fragmentação MS^4 foi possível apenas com o pico m/z 585 e esta gerou outro fragmento de ácido *n*-butanoico (88 Da). Considerando o padrão de fragmentação encontrado neste estudo, os fragmentos neutros resultaram, respectivamente, da quebra de um radical *n*-butanoato presente em R^2 (MS^2), de um radical acetato presente em R^3 (MS^3) e de outro radical *n*-butanoato presente em R^1 ou R^5 (MS^4). Este padrão de radicais pode ser encontrado apenas na casearina J. Corroborando esta hipótese, as análises por HPTLC-DESI-MS-IMAGING de ambas as amostras produziram bandas com valores de R_f muito próximos daquele observado para o padrão de casearina J (m/z 585; $R_f = 0,48$). No caso do EEtCs houve a formação de uma banda m/z 601 com R_f de 0,49, enquanto que a EFS2 gerou duas bandas de mesmo valor de R_f (0,50), uma na forma de aduto com sódio (m/z 585) e outra com potássio (m/z 601).

Em relação aos picos m/z 599 e m/z 615, os candidatos iniciais foram as casearinas B e T na forma de adutos de sódio e potássio, respectivamente. Nas duas amostras (EEtCs e EFS2), as fragmentações MS^2 e MS^3 de ambos os picos geraram dois fragmentos neutros de 60 Da atribuídos ao ácido acético. Já a fragmentação MS^4 só foi possível com o pico m/z 599 e esta gerou um fragmento neutro de 88 Da atribuído ao ácido *n*-butanoico. Neste caso, não há como descartar uma dessas casearinas, pois ambas possuem radicais acetatos em R^2 e R^3 e *n*-butanoato em R^5 , compatível com a fragmentação citada acima. Além disso, na

imagem química da cromatografia da EFS2 apareceram duas bandas m/z 615 confirmando a presença das duas casearinas na amostra, sendo que uma das bandas apresentou exatamente o mesmo valor de R_f do padrão da casearina B (0,45). Já na imagem química da cromatografia do EEtCs não apareceram bandas relativas a estas casearinas.

Os candidatos iniciais aos picos m/z 622 e m/z 643 foram as casearinas N e O na forma de adutos de amônio e potássio, respectivamente. Em ambas as amostras, só foi possível fragmentar o pico m/z 643 que em MS^2 gerou um fragmento neutro de 88 Da (ácido *n*-butanoico) e em MS^3 um fragmento neutro de 60 Da (ácido acético). Com base no padrão de fragmentação, concluiu-se que se trata da casearina O que possui um radical *n*-butanoato em R^2 e um radical acetato em R^3 . Além disso, as imagens químicas da cromatografia das duas amostras (EEtCs e EFS2) produziram bandas do aduto da casearina O com potássio (m/z 643) com valores de R_f iguais ao do padrão de casearina O (0,62), que neste caso, formou aduto com sódio (m/z 627).

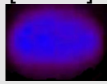
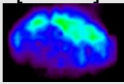
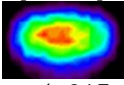
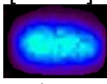
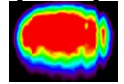
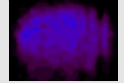
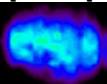
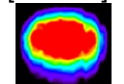
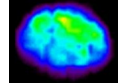
O pico m/z 685 teve apenas um candidato inicial, a casearina C na forma de aduto com potássio. Quanto à fragmentação, só foi possível obter o MS^2 do pico encontrado da EFS2 que gerou um fragmento neutro de 60 Da atribuído ao ácido acético que deve ter sido gerado pela quebra do radical acetato presente na posição R^2 desta casearina.

O pico m/z 629 encontrado nos espectros de massas das amostras e nas imagens químicas da cromatografia do EEtCs e da EFS2, também foi atribuído a um único candidato inicial, a casearina E na forma de aduto com potássio. No entanto, a análise de massas de modo sequencial não confirmou se tratar desta molécula, pois a primeira fragmentação (MS^2) deste pico, tanto do EEtCs quanto da EFS2, gerou um fragmento neutro de 88 Da atribuído ao ácido *n*-butanoico. Porém, a casearina E não apresenta o radical *n*-butanoato em sua estrutura, o que exclui este candidato. Por outro lado, a fragmentação MS^3 do pico m/z 629 presente na EFS2 gerou um fragmento neutro de 60 Da atribuído ao ácido acético, perfil característico da fragmentação encontrada neste estudo. Este fragmento até poderia resultar da quebra do acetato presente na posição R^3 da casearina E já que em R^2 esta casearina apresenta um grupo éter, mas de acordo com a fragmentação da casearina F, este acetato seria quebrado na fragmentação MS^2 e não MS^3 . Baseado nestas informações, levantou-se a hipótese de que este pico m/z 629 ser atribuído

ao aduto de novo diterpeno clerodânico ou a algum diterpeno clerodânico ainda não descrito na *C. sylvestris*. Nesta mesma linha, encontram-se os picos m/z 559 e 671 presentes na EFS2. Estes dois picos também apresentam fragmentação típica das casearinas, mas não é possível atribuí-los a nenhum dos diterpenos clerodânicos já identificados na *C. sylvestris*. O fato destes picos aparecerem na espectrometria de massas da EFS2, mas não do EEtCs, poderia ser atribuído a maior concentração destes compostos na EFS 2, mas outra hipótese seria a formação de artefato durante o processo de extração em fase sólida, ou seja, compostos gerados a partir de alterações da estrutura química dos diterpenos clerodânicos já existentes na *C. sylvestris*.

Em conjunto, os métodos desenvolvidos neste estudo e os respectivos resultados permitiram obter uma espécie de *fingerprint* dos diterpenos clerodânicos presentes no EEtCs e na EFS2 (Tabela 11), inclusive com indicações sobre as abundância destes diterpenos nas amostras, já que a casearina J, diterpeno majoritário nestas amostras (0,5% no EEtCs e 6,3% na EFS2) como demonstrado por Carvalho (2015), também foi o diterpeno que gerou o pico com maior NL nos espectros de massas (Figuras 30 e 31) e as bandas com as colorações mais intensas nas imagens químicas das cromatografias destas amostras (Figuras 34 e 35).

Tabela 11 – *Fingerprint* dos diterpenos clerodânicos identificados no EEtCs e na EFS2 por meio de ESI-MS no modo positivo (*full scan* e MS^n) e 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).

Casearina	ESI-MS e ESI-MS ⁿ		HPTLC-DESI-MS-IMAGING	
	EEtCs	EFS2	EEtCs	EFS2
A	[M + K] ⁺ <i>m/z</i> 573 NL: 26% 513→453	[M + K] ⁺ <i>m/z</i> 573 NL: 20% 513 →453	[M + K] ⁺  <i>m/z</i> 573 <i>R_f</i> = 0,17	[M + K] ⁺  <i>m/z</i> 573 <i>R_f</i> = 0,17
B	[M + K] ⁺ <i>m/z</i> 615 NL: 45% 555→495	[M + K] ⁺ <i>m/z</i> 615 NL: 64% 555 →495	sem banda	[M + K] ⁺  <i>m/z</i> 615 <i>R_f</i> = 0,45
C	[M + K] ⁺ <i>m/z</i> 685 NL: 8% sem MS ⁿ	[M + K] ⁺ <i>m/z</i> 685 NL: 10% MS ² (625)	sem banda	sem banda
D	[M + K] ⁺ <i>m/z</i> 587 NL: 60% 499→439	[M + K] ⁺ <i>m/z</i> 587 NL: 38% 499 →439	[M + K] ⁺  <i>m/z</i> 587 <i>R_f</i> = 0,39	[M + K] ⁺  <i>m/z</i> 587 <i>R_f</i> = 0,42
F	[M + Na] ⁺ <i>m/z</i> 545 NL: 12% MS ² (485)	[M + Na] ⁺ <i>m/z</i> 545 NL: 19% 485 →439	[M + Na] ⁺  <i>m/z</i> 545 <i>R_f</i> = 0,30	[M + Na] ⁺  <i>m/z</i> 545 <i>R_f</i> = 0,32
J	[M + K] ⁺ <i>m/z</i> 601 NL: 100% 513→453	[M + K] ⁺ <i>m/z</i> 601 NL: 100% 513 →453	[M + K] ⁺  <i>m/z</i> 601 <i>R_f</i> = 0,49	[M + Na] ⁺  <i>m/z</i> 585 <i>R_f</i> = 0,50
O	[M + K] ⁺ <i>m/z</i> 643 NL: 27% 555→495	[M + K] ⁺ <i>m/z</i> 643 NL: 33% 555 →495	[M + K] ⁺  <i>m/z</i> 643 <i>R_f</i> = 0,62	[M + K] ⁺  <i>m/z</i> 643 <i>R_f</i> = 0,61
X	[M + K] ⁺ <i>m/z</i> 571 NL: 33% 483→423→335	[M + K] ⁺ <i>m/z</i> 571 NL: 24% 483→423→335	sem banda	[M + K] ⁺  <i>m/z</i> 571 <i>R_f</i> = 0,41

0%  100%

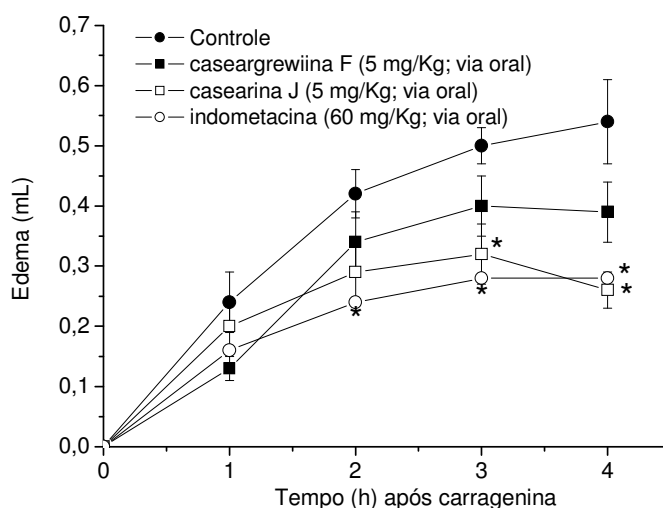
NL: nível de intensidade normalizado.

5.3 Ensaios farmacológicos *in vivo*

5.3.1 Edema de pata induzido pela carragenina e pela BthTX-II em ratos

Comparando-se os grupos de receberam os diterpenos clerodânicos (Casg F e Cas J) com o grupo controle, apenas a Cas J inibiu o edema de pata induzido pela carragenina em ratos (3ª e 4ª hora). Já a indometacina (controle positivo) reduziu o edema em três intervalos de tempo (2ª, 3ª e 4ª hora) (Figura 36). O resultado encontrado para a Casg F é contraditório àquele encontrado por Pierre (2013) que demonstrou que este diterpeno clerodânico inibiu o edema de pata induzido pela carragenina em ratos. Tal discrepância pode ser atribuída à diferença da dose da carragenina uma vez que Pierre (2013) utilizou a dose de 200 µg/pata e neste estudo utilizou-se a dose de 1.000 µg/pata. Já o resultado encontrado para a Cas J reforça que estes diterpenos apresentam atividade anti-inflamatória.

Figura 36 - Efeito da caseargrewiina F e da casearina J sobre o edema de pata induzido pela carragenina (1.000 µg/pata) em ratos.

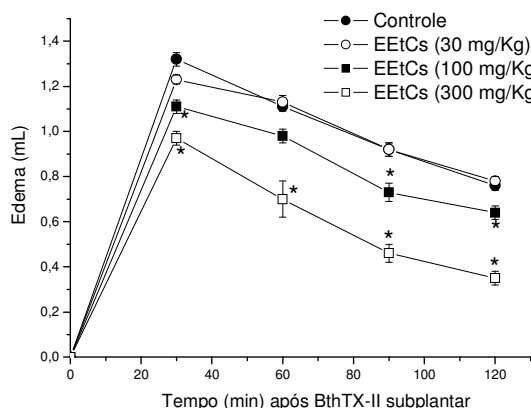


Os resultados estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média ($n = 6$ animais por grupo). Controle: veículo via oral + carragenina subplantar. * $P \leq 0,05$ comparado com o controle (ANOVA, teste de Tukey).

Comparando-se os grupos que receberam o EEtCs com o grupo controle, a dose de 30 mg/kg não apresentou efeito, mas as doses de 100 e 300 mg/kg reduziram significativamente o edema de pata induzido pela BthTX-II em ratos (Figura 37). Estes resultados são compatíveis com trabalhos que demonstram que a

pré-incubação do extrato aquoso de folhas de *C. sylvestris* com a BthTX-II inibe a atividade fosfolipase A_2 *in vitro* (BORGES et al., 2000; RASLAN et al., 2002) e a atividade edematogênica *in vivo* desta toxina (DA SILVA et al., 2008).

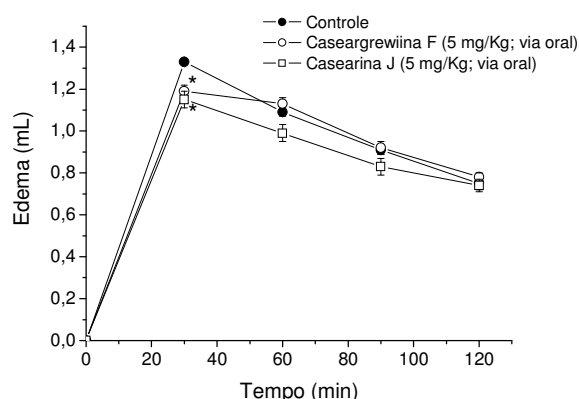
Figura 37 - Efeito do extrato etanólico de folhas de *Casearia sylvestris* (EEtCs) sobre o edema de pata induzido pela bothropstoxina-II (BthTX-II; 50 μ g/pata) em ratos.



Os resultados estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média ($n = 6$ animais por grupo). Controle: veículo via oral + BthTX-II subplantar. $*P \leq 0,05$ comparado com o controle (ANOVA, teste de Tukey).

Comparando-se os grupos de receberam os diterpenos clerodânicos (Casg F e Cas J) com o grupo controle, observa-se que tais substâncias apresentaram um pequeno efeito inibitório apenas no primeiro intervalo de tempo (30 min) após a administração da BthTX-II (Figura 38). Tais resultados sugerem que o efeito inibitório apresentado pelo EEtCs no edema induzido pela BthTX-II não depende destes diterpenos. Provavelmente tal atividade depende da presença de derivados do ácido elágico no EEtCs uma vez que Da Silva et al. (2008) demonstram que tais substâncias inibem tanto a atividade de fosfolipase A_2 *in vitro* quanto a atividade edematogênica *in vivo* da BthTX-II.

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.



Os resultados estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média ($n = 6$ animais por grupo). Controle: veículo via oral + BthTX-II subplantar. * $P \leq 0,05$ comparado com o controle (ANOVA, teste de Tukey).

5.3.2 Pleurisia induzida pela carragenina em ratos

Na avaliação do EEtCs, a injeção intrapleural da carragenina (controle de migração), provocou contagens de LT, MN e PMN significativamente maiores do que àquelas do controle negativo. Comparando-se os grupos que receberam o EEtCs com o controle de migração, a dose de 100 mg/kg não apresentou efeito, mas as doses de 300 e 500 mg/kg reduziram significativamente o número de LT (36 e 42%, respectivamente) e PMN (41 e 49%, respectivamente). Já a dexametasona (controle positivo) reduziu em 57, 45 e 60% o número de LT, PMN e MN, respectivamente, comparado com o controle da migração (Tabela 12).

Tabela 12 - Efeito do extrato etanólico de folhas de *Casearia sylvestris* (EEtCs) sobre o número de leucócitos presentes na cavidade pleural 4 horas após injeção intrapleural de carragenina (400 µg/cavidade pleural) em ratos.

Grupo	(células/cavidade pleural) $\times 10^6$		
	Leucócitos Totais	Mononucleares	Polimorfonucleares
Controle negativo	8,29 $\pm$ 1,27	5,78 $\pm$ 0,94	2,51 $\pm$ 0,50
Controle de migração	47,47 $\pm$ 4,17 ^a	10,85 $\pm$ 1,58 ^a	36,62 $\pm$ 5,01 ^a
Controle positivo	20,58 $\pm$ 1,09 ^{a,b}	5,96 $\pm$ 0,82 ^b	14,62 $\pm$ 1,44 ^{a,b}
EEtCs			
100 mg/Kg	43,33 $\pm$ 2,84 ^a	7,76 $\pm$ 2,03	35,57 $\pm$ 2,87 ^a
300 mg/Kg	30,37 $\pm$ 3,84 ^{a,b}	8,74 $\pm$ 2,01	21,63 $\pm$ 1,87 ^{a,b}
500 mg/Kg	27,40 $\pm$ 4,47 ^{a,b}	8,68 $\pm$ 2,27	18,72 $\pm$ 2,45 ^{a,b}

Os resultados estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média ($n = 6$ animais por grupo). Controle negativo: veículo via oral + salina intrapleural (0,1 mL/cavidade pleural). Controle de migração: veículo via oral + carragenina intrapleural. Controle positivo: dexametasona via oral (0,5 mg/Kg) + carragenina intrapleural. ^a $P \leq 0,05$ comparado com o controle negativo; ^b $P \leq 0,05$ comparado com o controle de migração (ANOVA, teste de Tukey).

A avaliação do efeito dos extratos de *C. sylvestris* em modelo de migração celular ajuda elucidar se a redução do edema por estes extratos deve-se apenas à redução do extravasamento proteico (exsudato) ou também ao extravasamento de células para o tecido (transexsudato). Deste modo, os resultados deste estudo, assim como os resultados obtidos por Albano et al. (2013), sugerem que os extratos etanólico e hidroalcoólico de folhas de *C. sylvestris* apresentam atividade anti-inflamatória não apenas através da redução do extravasamento proteico, mas também por meio da inibição da migração celular para o tecido.

Além disso, existem diferenças entre a fisiopatologia do edema e da migração celular. Uma delas, por exemplo, é que as prostaglandinas são mais importantes do que os leucotrienos na formação do edema enquanto que na migração celular os leucotrienos são os mais importantes devido à indução do aparecimento de diversas proteínas de adesão (GROSSER; SMYTH; FITZGERALD, 2011). Assim, os resultados destes estudos sugerem que nos extratos das folhas de *C. sylvestris* existam substâncias capazes de inibir a produção leucotrienos, o que poderia ocorrer através da inibição da fosfolipase A₂ (PLA₂), pois diversos autores enfatizam que o mecanismo de ação da atividade anti-inflamatória da *C. sylvestris* se deve à inibição da PLA₂ devido à sua capacidade de inibir a atividade enzimática *in vitro* e anti-inflamatória *in vivo* de várias PLA₂ isoladas de venenos de serpentes (BORGES et al., 2000; RASLAN et al., 2002; DA SILVA et al., 2008). Borges et al. (2000) demonstraram que o extrato aquoso das folhas da *C. sylvestris* inibiu a atividade enzimática *in vitro* de PLA₂ miotóxicas isoladas dos venenos de *Bothrops pirajai* e *Bothrops jararacussu*.

A Tabela 13 demonstra que a injeção intrapleural de carragenina no grupo que recebeu apenas veículo por via oral (controle de migração) provocou contagens de LT, MN e PMN significativamente superiores àquelas encontradas para o controle negativo. Comparando-se os grupos que receberam as frações com o controle de migração, a EFS1 e a EFS2 não apresentaram efeito, mas a EFS2 reduziu significativamente o número de LT e PMN (47 e 48%, respectivamente). Já a dexametasona (controle positivo) reduziu em 61, 51 e 65% o número de LT, MN e PMN respectivamente, quando comparado com o controle de migração. Os resultados obtidos sustentam que a atividade anti-inflamatória do EEtCs deve-se aos diterpenos clerodânicos uma vez que apenas a fração rica nestas substâncias

apresentou efeito no modelo empregado. Deste modo, tais diterpenos parecem estar envolvidos tanto com a atividade anti-inflamatória (PIERRI, 2013) quanto antiulcerogênica (SANTOS, 2008) desta planta, o que faz destas substâncias potenciais alternativas para o tratamento de doenças inflamatórias.

Tabela 13 - Efeito das frações do extrato etanólico de folhas de *Casearia sylvestris* (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.

Grupo	(células/cavidade pleural) x 10 ⁶		
	Leucócitos Totais	Mononucleares	Polimorfonucleares
Controle negativo	7,41 ± 0,78	5,18 ± 0,60	2,23 ± 0,40
Controle de migração	46,82 ± 3,45 ^a	11,15 ± 2,23 ^a	35,66 ± 3,95 ^a
Controle positivo	17,88 ± 1,19 ^{a,b}	5,41 ± 1,10 ^b	12,47 ± 0,92 ^{a,b}
EFS1 (30 mg/Kg)	44,03 ± 2,47 ^a	8,26 ± 1,29	35,77 ± 2,22 ^a
EFS2 (30 mg/Kg)	24,74 ± 3,86 ^{a,b}	6,23 ± 0,95	18,44 ± 3,32 ^{a,b}
EFS3 (30 mg/Kg)	47,55 ± 4,05 ^a	10,23 ± 1,13	37,32 ± 2,76 ^a

Os resultados estão expressos como média ± erro padrão da média (n = 6 animais por grupo). Controle negativo: veículo via oral + salina intrapleural (0,1 mL/cavidade pleural). Controle de migração: veículo via oral + carragenina intrapleural. Controle positivo: dexametasona via oral (0,5 mg/Kg) + carragenina intrapleural. ^aP ≤ 0,05 comparado com o controle negativo; ^bP ≤ 0,05 comparado com o controle de migração (ANOVA, teste de Tukey).

5.3.3 Lesão gástrica induzida por indometacina em ratos

A Figura 39 mostra a morfologia (A) de um estômago após indução de lesões gástricas pela administração da indometacina e o aspecto de uma de suas regiões após aumento de 12,5 vezes com lupa (B). Já a Figura 40 mostra lesões gástricas de três diferentes tipos neste mesmo estômago.

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).

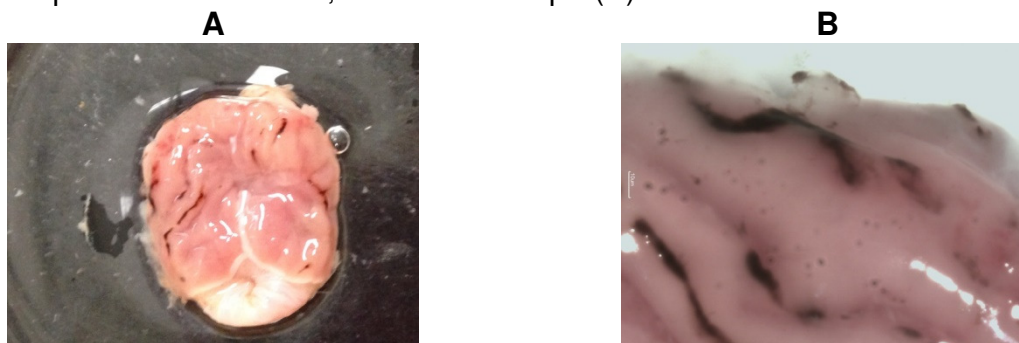
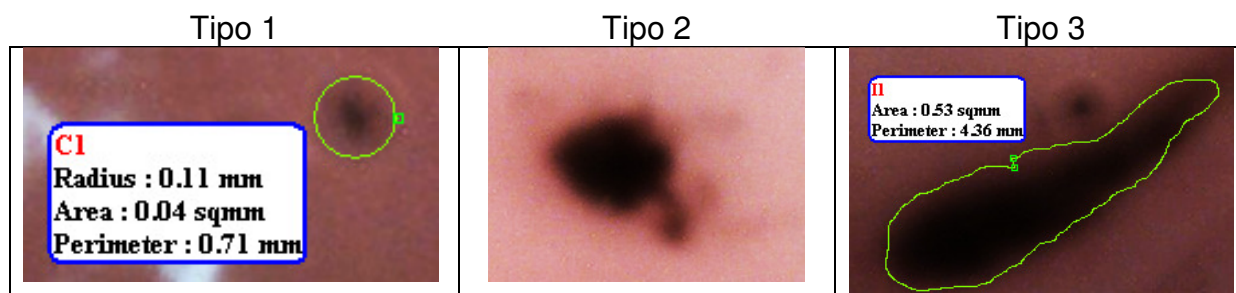


Figura 40 - Lesões gástricas de três diferentes tipos encontradas na mucosa gástrica glandular após jejum de 24 horas e administração da indometacina (60 mg/Kg; via oral).



A Tabela 14 mostra que o EEtCs apresentou efeito gastroprotetor significativo no modelo de lesões gástricas induzida pela indometacina (redução tanto do número de lesões dos tipos 2 e 3 quanto da área média das lesões). Tais resultados são compatíveis com trabalhos que demonstraram que extratos de folhas de *C. sylvestris* apresentam efeito gastroprotetor em modelos de lesões gástricas induzidas por estresse (BASILE et al., 1990; SERTIÉ, CARVALHO, PANIZZA, 2000), ácido acético (SERTIÉ, CARVALHO, PANIZZA, 2000), etanol (SANTOS, 2008) e privação de alimentos (FIALHO et al., 2010). Além disso, Esteves et al. (2005) demonstraram que o óleo essencial da *C. sylvestris* apresenta efeito em modelo de úlcera induzida por estresse. Nenhum destes trabalhos utilizou um AINE como a indometacina para induzir lesões gástricas, cuja fisiopatologia básica envolve a inibição da COX-1 presente na mucosa gástrica e, conseqüentemente, a redução da produção de PGE₂ no estômago, o que favorece o aumento da acidez do suco gástrico e a redução da produção de muco. Neste sentido, o atual estudo contribui para demonstrar que o efeito gastroprotetor da *C. sylvestris* ocorre tanto em lesões gástricas induzidas por agentes que provocam estresse oxidativo como, por exemplo, o etanol, quanto por agentes que reduzem a produção de PGE₂ no estômago. Além disso, contribui para demonstrar que tal atividade deve-se basicamente aos diterpenos clerodânicos, uma vez que apenas a fração rica em tais substâncias (EFS2) apresentou efeito gastroprotetor neste modelo (Tabela 15), assim como os diterpenos isolados caseargrewiina F e casearina J (Tabela 16).

Tabela 14 - Efeito do extrato etanólico de folhas de *Casearia sylvestris* (EEtCs) sobre as lesões gástricas induzidas pela indometacina (60 mg/Kg; via oral) em ratos.

Grupo	Número de lesões			Área total média das lesões (mm ²)
	Tipo 1	Tipo 2	Tipo 3	
Controle de lesões	44,33 ± 4,04	20,50 ± 2,90	10,50 ± 2,60	7,15 ± 0,50
Controle positivo	25,67 ± 4,29*	9,33 ± 1,63*	2,67 ± 1,09*	4,60 ± 0,28*
EEtCs 50 mg/Kg	29,83 ± 4,15	9,00 ± 1,21*	4,00 ± 0,45*	4,71 ± 0,26*

Os resultados estão expressos como média ± erro padrão da média (n = 6 animais por grupo). Controle de lesões: veículo via oral. Controle positivo: ranitidina via oral (50 mg/Kg) *P ≤ 0,05 comparado com o controle de lesões (ANOVA, teste de Tukey).

Tabela 15 - Efeito das frações do extrato etanólico de folhas de *Casearia sylvestris* (EFS) sobre as lesões gástricas induzidas pela indometacina (60 mg/Kg; via oral) em ratos.

Grupo	Número de lesões			Área total média das lesões (mm ²)
	Tipo 1	Tipo 2	Tipo 3	
Controle de lesões	47,00 ± 3,86	19,83 ± 3,06	9,50 ± 1,41	7,00 ± 0,43
Controle positivo	21,83 ± 3,94*	8,83 ± 1,14*	2,17 ± 0,70*	4,15 ± 0,29*
EFS1 (15 mg/Kg)	34,83 ± 3,65	17,67 ± 1,69	5,67 ± 1,12	5,04 ± 0,27*
EFS2 (15 mg/Kg)	24,83 ± 3,66*	7,50 ± 1,09*	2,17 ± 1,13*	4,52 ± 0,33*
EFS3 (15 mg/Kg)	42,33 ± 4,08	21,33 ± 2,53	10,00 ± 1,13	7,90 ± 0,279

Os resultados estão expressos como média ± erro padrão da média (n = 6 animais por grupo). Controle de lesões: veículo via oral. Controle positivo: ranitidina via oral (50 mg/Kg) *P ≤ 0,05 comparado com o controle de lesões (ANOVA, teste de Tukey).

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.

Grupo	Número de lesões			Área total média das lesões (mm ²)
	Tipo 1	Tipo 2	Tipo 3	
Controle de lesões	46,83 ± 3,70	17,83 ± 1,56	9,00 ± 1,06	9,21 ± 0,28
Controle positivo	20,00 ± 3,92*	7,00 ± 1,00*	1,67 ± 0,42*	3,32 ± 0,22*
Casg F (2 mg/Kg)	18,17 ± 2,30*	7,67 ± 1,69*	2,00 ± 0,93*	4,19 ± 0,40*
Cas J (2 mg/Kg)	22,50 ± 2,57*	9,50 ± 1,09*	4,50 ± 0,81*	5,44 ± 0,33*

Os resultados estão expressos como média ± erro padrão da média (n = 6 animais por grupo). Controle de lesões: veículo via oral. Controle positivo: ranitidina via oral (50 mg/Kg) *P ≤ 0,05 comparado com o controle de lesões (ANOVA, teste de Tukey).

5.4 Ensaios com macrófagos *in vitro*

5.4.1 Citotoxicidade

No primeiro protocolo dos ensaios com macrófagos *in vitro*, avaliou-se a EFS2 (200 / 100 / 50 / 25 / 12,5 / 6,25 $\mu\text{g/mL}$) e dois diterpenos clerodânicos isolados, a casearina B e a caseargrewiina F, ambas nas seguintes concentrações: 40 / 20 / 10 / 5 / 2,5 / 1,25 μM . Tais concentrações foram estabelecidas a partir das doses máximas utilizadas por Pierre (2013) na avaliação destas amostras no modelo de edema de pata induzido pela carragenina em ratos e em cálculos farmacocinéticos teóricos. No caso da EFS2, a dose oral máxima utilizada por Pierre (2013) foi de 50 mg/Kg. Assim, um animal de 200 g, recebeu uma dose total de 10 mg. Supondo-se que toda esta dose tenha atingido a circulação sistêmica e se distribuído em um volume de 100 mL (volume de distribuição teórico: 0,5 L/Kg), a concentração teórica nos líquidos corporais seria de 0,1 mg/mL (100 $\mu\text{g/mL}$). Em relação aos diterpenos, a dose oral máxima utilizada por Pierre (2013) foi de 5 mg/Kg (dose total para um animal de 200 g = 1 mg). De acordo com os cálculos acima, a concentração teórica destes compostos nos líquidos corporais seria de 0,01 mg/mL (10 mg/L = 0,01 g/L). Como a massa molar destes diterpenos encontra-se na faixa de 500 g/mol, a concentração molar seria de 0,00002 M (20 μM). Para os ensaios *in vitro*, decidiu-se começar pelo dobro das concentrações teóricas e reduzi-las utilizando-se o fator 2 até a obtenção de seis diferentes concentrações.

Os resultados do ensaio de citotoxicidade deste primeiro protocolo demonstraram que todas as concentrações testadas da EFS2 foram altamente citotóxicas, pois a mortalidade ficou acima de 90% para todas elas, ou seja, bem acima da IC_{50} . Os diterpenos isolados também apresentaram citotoxicidade alta, porém menos intensa do que a EFS2, o que permitiu a obtenção da IC_{50} (Tabelas 17 e 18). Estes resultados corroboram a literatura, uma vez que diversos estudos de citotoxicidade indicam que tanto a fração rica em casearinas (EFS2) quanto as casearinas isoladas apresentam alta tendência citotóxica e/ou antiproliferativa não apenas para células tumorais, mas também para células normais. A fração rica em casearinas, por exemplo, apresentou atividade antiproliferativa para células mononucleares normais de sangue periférico humano (PBMC) com valor de IC_{50} de

0,65 µg/mL (FERREIRA et al., 2014), valor 10 vezes inferior a menor concentração utilizada neste trabalho. Já a casearina B foi citotóxica para células normais V-79 ($IC_{50} = 8,5 \mu M$) (ITOKAWA et al., 1990) e L-929 ($IC_{50} = 6,5 \mu M$) (SANTOS et al., 2010) e apresentou atividade antiproliferativa para PBMC ($IC_{50} = 6,3 \mu M$) (FERREIRA et al., 2014), valores semelhantes ao encontrado neste estudo para macrófagos RAW 264.7 (5,1 µM). Da mesma forma, a caseargrewiina F foi citotóxica para células normais L-929 ($IC_{50} = 1,1 \mu M$) (SANTOS et al., 2010) e antiproliferativa para PBMC ($IC_{50} = 10,7 \mu M$) (FERREIRA et al., 2014), também semelhantes ao encontrado neste estudo para macrófagos RAW 264.7 (4,3 µM).

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.

Concentração (µM) (x)	Mortalidade (%) (y)		Média
	Experimento 1	Experimento 2	
1,25	14,96	12,36	13,66
2,5	13,81	15,05	14,43
5	51,85	48,72	50,26
10	90,61	88,89	89,75
20	93,64	92,71	93,18
40	93,43	93,11	93,27

Equação da linha de tendência logarítmica: $y = 27,774 \ln(x) + 4,7663$. $IC_{50} = 5,1 \mu M$.

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.

Concentração (µM) (x)	Mortalidade (%) (y)		Média
	Experimento 1	Experimento 2	
1,25	12,90	15,77	14,36
2,5	29,46	25,61	27,56
5	59,03	57,56	58,30
10	92,38	90,32	91,36
20	93,44	93,01	93,23
40	93,26	92,97	93,12

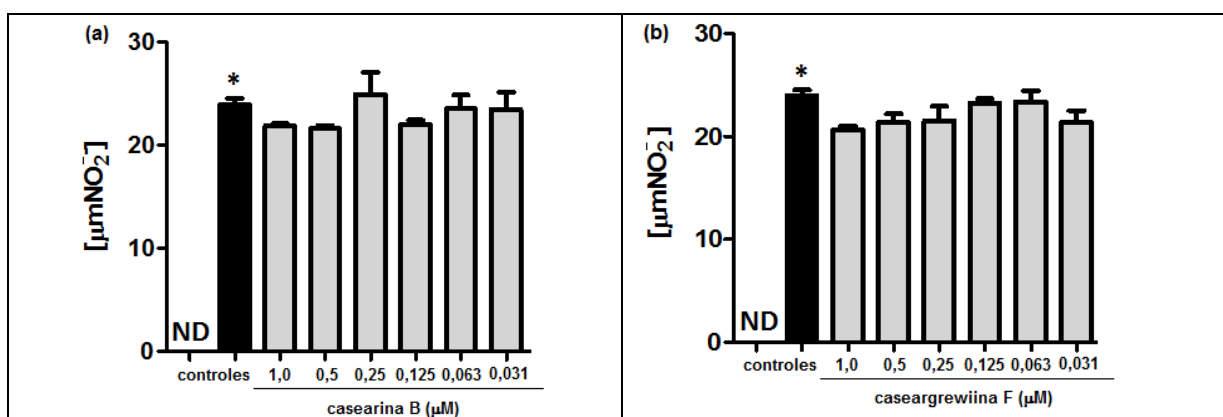
Equação da linha de tendência logarítmica: $y = 25,716 \ln(x) + 12,688$. $IC_{50} = 4,3 \mu M$.

A partir dos resultados obtidos neste protocolo 1, decidiu-se utilizar apenas diterpenos clerodânicos isolados em concentrações abaixo de 1 µM (protocolos 2 e 3. Desta maneira, as amostras não foram citotóxicas.

5.4.2 Quantificação de nitrito (NO_2^-)

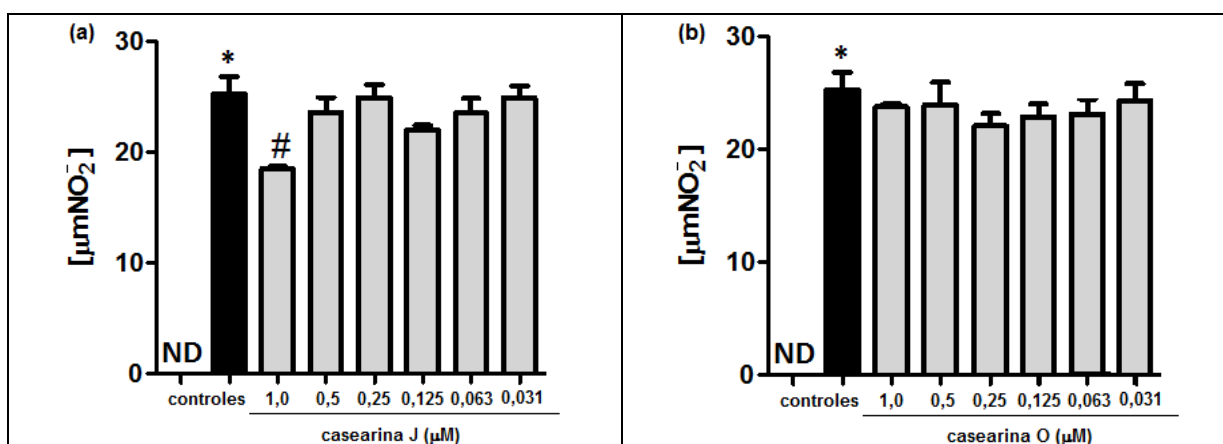
As Figuras 41 e 42 demonstram que as casearinas B, J e O e a caseargreina F não reduziram a quantificação de nitrito em ensaio de macrófagos estimulados por LPS *in vitro* indicando que tais diterpenos não inibem a produção de óxido nítrico. A única exceção foi o resultado obtido com a maior concentração da casearina J.

Figura 41 – Efeito da casearina B (a) e da caseargreina F (b) sobre a quantificação de nitrito em ensaio de macrófagos estimulados por LPS (100 ng/mL) *in vitro*.



A concentração micromolar de nitrito [μmNO_2^-] está expressa como média $\pm$ erro padrão da média ($n = 3$). * $P < 0,05$ comparado com o controle negativo (ND: não detectado); # $P < 0,05$ comparado com o controle LPS (barra preta) (ANOVA, teste de Bonferroni).

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) *in vitro*.



A concentração micromolar de nitrito [μmNO_2^-] está expressa como média $\pm$ erro padrão da média ($n = 3$). * $P < 0,05$ comparado com o controle negativo (ND: não detectado); # $P < 0,05$ comparado com o controle LPS (barra preta) (ANOVA, teste de Bonferroni).

Na literatura foi encontrado um trabalho que avaliou o efeito da casearina G sobre a produção de NO *in vitro* (DUPUY et al., 2013) e 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).

Dupuy et al. (2013) demonstraram que a casearina G não inibiu a produção de NO, corroborando os resultados obtidos neste trabalho para as casearinas B, J e O e caseargrewiina F.

Napolitano et al. (2005) avaliaram o efeito do extrato etanólico de cinco partes de *C. sylvestris* (folhas; madeira e casca do caule; madeira e casca da raiz) e do extrato hexânico da madeira do caule e da casca da raiz sobre a produção de NO por macrófagos de camundongos estimulados por LPS e IFN- γ *in vitro*. Nenhum dos extratos etanólicos inibiram a produção de NO, o que também é compatível os resultados deste estudo. Já os extratos hexânicos inibiram a produção de NO. No entanto, os autores não levaram em consideração que estes extratos foram justamente os mais citotóxicos (IC₅₀ ~ 18 μ g/mL) e que a concentração utilizada para avaliar a inibição de NO (50 μ g/mL) foi cerca de três vezes superior à IC₅₀ da citotoxicidade. Assim, é muito provável que estes extratos não tenham inibido a produção de NO, mas sim destruído os macrófagos. Outro aspecto a ser destacado é que Carvalho et al. (2009) demonstraram que a composição química de folhas é distinta de demais órgãos de *C. sylvestris*, sendo que em folhas há predomínio dos diterpenos clerodânicos do tipo das casearinas e nos demais órgãos estes estão presentes em menor número e quantidade. Por um lado, esta informação reforça a hipótese das casearinas não inibirem a produção de NO e, por outro, poderia explicar as diferenças encontradas por Napolitano et al. (2005).

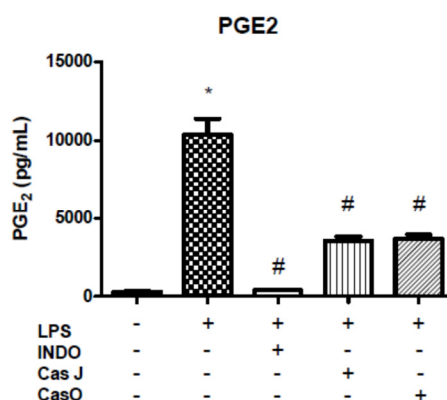
Albano et al. (2013), utilizando o modelo de pleurisia induzida pela carragenina em ratos, demonstraram que o extrato hidroalcoólico de folhas de *C. sylvestris* reduziu a quantificação de nitrito e nitrato no lavado pleural, o que indica inibição da produção de NO. Diante dos resultados apresentados e discutidos até aqui, é pouco provável que tal efeito tenha relação com as casearinas, a não ser que estejam relacionados com produtos formados *in vivo*. De qualquer forma, é mais provável que o efeito observado por Albano et al. (2013) esteja relacionados a outros metabólitos secundários presentes no extrato tais como o ácido elágico (EL-

SHITANY; EL-BASTAWISSY; EL-DESOKY, 2014) e os flavonoides quercetina e rutina (CHIRUMBOLO et al., 2010) pois tais compostos estão presentes em extratos de folhas e já demonstraram capacidade de inibirem a produção NO.

5.4.3 Quantificação de prostaglandina E₂ (PGE₂)

A Figura 43 demonstra que as casearinas J e O inibiram em mais de 50% a produção de (PGE₂) em ensaio de macrófagos estimulados por LPS *in vitro*. Neste ensaio, a redução da produção de prostaglandinas pode ocorrer tanto por inibição de enzimas envolvidas com a cascata do ácido araquidônico, principalmente a COX-2, quanto por inibição de um ou mais processos envolvidos entre a estimulação dos macrófagos pelo LPS e a expressão da COX-2. Assim, estes resultados serão discutidos na subseção 5.5 que apresenta os resultados do efeito do EEtCs, das frações EFS1-3 e das casearinas J e O sobre a atividade enzimática *in vitro* das ciclo-oxigenases 1 e 2.

Figura 43 – Efeito das casearinas J e O (1,0 μ M) sobre a quantificação da prostaglandina E₂ (PGE₂) em ensaio de macrófagos estimulados por LPS (100 ng/mL) *in vitro*.



A concentração de PGE₂ está expressa como média $\pm$ erro padrão da média (n = 3). INDO: indometacina (10 μ M). * P <0,05 comparado com o controle negativo; # P <0,05 comparado com o controle LPS (ANOVA, teste de Bonferroni).

5.5 Atividade enzimática das ciclo-oxigenases 1 e 2 (COX-1 e COX-2)

Inicialmente vale destacar os critérios adotados para se estabelecer as concentrações testadas. No caso do EEtCs, considerou-se a dose oral efetiva no ensaio de pleurisia que foi de 300 mg/Kg. Assim, um animal de 200 g, recebeu uma dose total de 60 mg. Supondo-se que toda esta dose tenha atingido a circulação sistêmica e se distribuído em um volume de 100 mL (volume de distribuição teórico: 0,5 L/Kg), a concentração teórica máxima nos líquidos corporais seria de 0,6 mg/mL (600 μ g/mL). Em relação às frações EFS, a dose utilizada neste mesmo ensaio foi 10 vezes inferior, o que geraria uma concentração máxima nos líquidos corporais de 60 μ g/mL. Sendo assim, estas foram as concentrações máximas utilizadas para estas amostras neste ensaio. A partir das concentrações máximas foram testadas duas concentrações inferiores aplicando-se o fator 10. Quanto aos diterpenos, utilizou-se o mesmo critério adotado para se determinar as concentrações testadas nos ensaios com macrófagos *in vitro* conforme descrito na subseção 5.4.1. No entanto, ao invés de se começar com a concentração de 20 μ M optou-se em começar com a concentração de 40 μ M. Ainda em relação às concentrações testadas, é extremamente importante salientar que o objetivo da escolha de apenas 3 concentrações com distância de 100 vezes entre a menor e maior foi verificar se uma ou mais destas concentrações apresentaria ou não efeito inibitório significativo

sobre estas enzimas, ou seja, o objetivo não foi obter a IC_{50} a partir da curva de percentual de inibição em função da concentração.

Já no caso do controle positivo (indometacina), foram planejadas quatro concentrações baseadas na literatura, justamente para se obter a IC_{50} deste AINE. Assim, a Tabela 19 demonstra que foi possível obter valores de IC_{50} da indometacina para as duas isoformas da COX e os resultados foram compatíveis com a literatura, ou seja, a indometacina apresentou maior atividade sobre a COX-1. Estes resultados são importantes para validação do ensaio.

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

Experimento	Concentração de $PGF_{2\alpha}$ ($\mu g/mL$)		IC_{50} indometacina (μM)	
	COX-1	COX-2	COX-1	COX-2
1	2,19	1,98	0,179	2,359
2	1,48	1,84	0,202	1,088
3	1,92	1,63	0,281	2,139
-	$1,86 \pm 0,21^a)$	$1,82 \pm 0,10^a)$	$0,22 \pm 0,03^a)$	$1,86 \pm 0,39^a)$

a) média $\pm$ erro padrão da média (n = 3 experimentos independentes).

A Tabela 20 demonstra que a EFS2 não apresentou atividade inibitória sobre as COXs 1 e 2 em nenhuma das concentrações testadas. Por um lado, o fato desta fração não inibir a COX-1 é compatível com a atividade gastroprotetora confirmada neste estudo. Por outro lado, conclui-se que a atividade anti-inflamatória desta fração, também confirmada neste estudo, não depende da inibição desta enzima. Já o EEtCs, a EFS1 e a EFS3 não inibiram as COXs nas menores concentrações, mas na concentração mais alta, o EEtCs inibiu seletivamente a COX-2, a EFS1 seletivamente a COX-1 e a EFS3 ambas as enzimas. Estes resultados sugerem que estas amostras possam conter inibidores destas enzimas, mas a princípio, em baixas concentrações, pois a inibição foi observada apenas nas concentrações mais altas das amostras, e mesmo assim, a atividade inibitória da EFS1 sobre a COX-1 (23%) e da EFS2 sobre a COX-1 (19%) e COX-2 (22%) foi considerada baixa.

Tabela 20 - Efeito do extrato etanólico de folhas de *Casearia sylvestris* (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).

Tubos de reação	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Concentração de $\text{PGF}_{2\alpha}$ ($\mu\text{g/mL}$)		Inibição enzimática	
		COX-1	COX-2	COX-1	COX-2
Controle	-	$1,86 \pm 0,21$	$1,82 \pm 0,10$	-	-
EEtCs	6	$1,92 \pm 0,21$	$1,81 \pm 0,10$	-	-
	60	$1,87 \pm 0,23$	$1,45 \pm 0,01$	-	-
	600	$1,76 \pm 0,20$	$0,72 \pm 0,02^*$	-	60%
EFS1	0,6	$1,93 \pm 0,26$	$1,87 \pm 0,13$	-	-
	6	$1,68 \pm 0,18$	$1,79 \pm 0,10$	-	-
	60	$1,44 \pm 0,18^*$	$1,71 \pm 0,12$	23%	-
EFS2	0,6	$1,84 \pm 0,22$	$1,94 \pm 0,17$	-	-
	6	$1,85 \pm 0,21$	$1,83 \pm 0,15$	-	-
	60	$1,82 \pm 0,25$	$1,79 \pm 0,09$	-	-
EFS3	0,6	$1,80 \pm 0,19$	$1,90 \pm 0,15$	-	-
	6	$1,80 \pm 0,24$	$1,81 \pm 0,09$	-	-
	60	$1,50 \pm 0,18^*$	$1,41 \pm 0,08^*$	19%	22%

Os resultados estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média ($n = 3$ experimentos independentes). Controle: solvente das amostras (metanol; concentração final no tubo de reação: 5%). $P \leq 0,05$ comparado com o controle (ANOVA, teste de Bonferroni).

De qualquer forma, estes resultados podem ser interpretados da seguinte maneira. O EEtCs deve conter três tipos de inibidores de COX em diferentes concentrações: não seletivos, seletivos para COX-1 e seletivos para COX-2. Os inibidores não seletivos e os seletivos para COX-1 estariam em concentrações desprezíveis no EEtCs. Porém, na EFS1 os não seletivos atingiram concentrações suficientes para provocar o efeito inibitório observado com a concentração de 60 $\mu\text{g/mL}$ desta fração, e na EFS3, aconteceria o mesmo para os inibidores seletivos para COX-1. Já os inibidores seletivos da COX-2 estariam em concentrações baixas no EEtCs, mas suficientes para provocar o efeito inibitório observado. No entanto, tais inibidores não foram concentrados no processo de extração em fase sólida, ou seja, sua concentração nas frações EFS passou a ser desprezível. Outros dados reforçam esta hipótese. O EEtCs apresenta atividade anti-inflamatória e gastroprotetora, inclusive ambas foram confirmadas neste estudo. Assim, a inibição da COX-1 seria incompatível com tal situação e realmente o EEtCs não inibiu esta enzima. Por outro lado, a inibição seletiva da COX-2 pode estar envolvida, pelo menos em parte, com a atividade anti-inflamatória do extrato.

Mas quais seriam os possíveis inibidores de COX presentes no extrato etanólico de folhas de *C. sylvestris*? Não devem ser os diterpenos clerodânicos, pois nem a fração rica nestes compostos (EFS2) e nem as duas casearinas avaliadas (J

e O) mostraram atividade inibitória sobre as COXs (Tabelas 20 e 21). Já em relação aos outros metabólitos secundários descritos em extratos de *C. sylvestris* (Tabela 1), um dos candidatos é a quercetina cuja atividade inibitória sobre a COX é conhecida (KIM et al. 1998; CHIRUMBOLO et al., 2010).

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)

Tubos de reação	Concentração (μ M)	Concentração de $PGF_{2\alpha}$ (μ g/mL)	
		COX-1	COX-2
Controle	-	1,86 $\pm$ 0,21	1,82 $\pm$ 0,10
Casearina J	0,4	1,90 $\pm$ 0,20	1,93 $\pm$ 0,01
	4	1,82 $\pm$ 0,19	1,89 $\pm$ 0,14
	40	1,79 $\pm$ 0,16	1,68 $\pm$ 0,03
Casearina O	0,4	2,03 $\pm$ 0,28	1,82 $\pm$ 0,16
	4	1,88 $\pm$ 0,23	1,74 $\pm$ 0,16
	40	1,78 $\pm$ 0,15	1,76 $\pm$ 0,16

Os resultados estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média ($n = 3$ experimentos independentes). Controle: solvente das amostras (metanol; concentração final no tubo de reação: 5%). Adotando-se $P \leq 0,05$, não houve diferenças estatísticas significativas entre as amostras e o controle (ANOVA, teste de Bonferroni).

Assim como a EFS2, as casearinas J e O não inibiram as COXs em nenhuma das concentrações testadas (Tabela 21). Da mesma forma que a fração, o fato destas casearinas não inibirem a COX-1 é compatível com a atividade gastroprotetora destes compostos. Por outro lado, a ausência de efeito sobre a COX-2 suscitou uma questão extremamente interessante, pois nos ensaios com macrófagos *in vitro*, estas casearinas inibiram a produção de PGE_2 (Figura 43). Sendo assim, estes resultados sugerem que as casearinas J e O inibem a produção de PGE_2 em macrófagos *in vitro* através da supressão de um ou mais passos das vias de sinalização celular que levam à expressão da COX-2 a partir da estimulação de receptores de membrana pelo LPS ou através da inibição de outras enzimas da cascata do ácido araquidônico como a fosfolipase A_2 e a PGE_2 sintase.

O LPS leva à expressão da COX-2 através da síntese de citocinas via ativação de receptores *toll-like* (TLRs) que são receptores de membrana encontrados especialmente em células do sistema imune e responsáveis pelo reconhecimento dos padrões moleculares associados a patógenos. Em macrófagos, a ativação do TLR-4 pelo LPS leva a uma cascata de eventos que culmina com a formação do NF- κ B, importante fator de transcrição nuclear que induz a expressão de diversas citocinas tais como IL-1, IL-6, IFN- γ e TNF- α . Estas, por sua vez, são liberadas e, através de processo autócrino, estimulam receptores de citocinas na

própria membrana dos macrófagos levando a nova cascata de eventos que culmina com a expressão de enzimas envolvidas com a síntese de mediadores inflamatórios, especialmente a COX-2 (DE NARDO, 2015; STOREK; MONACK, 2015). Desta maneira, as casearinas poderiam inibir um ou mais passos destes processos de sinalização celular. Sabe-se que diversos produtos naturais inibem o NF- κ B, dentre eles os terpenoides (SALMINEN et al., 2008). No entanto, não foram encontrados estudos sobre o possível efeito de diterpenos clerodânicos sobre o NF- κ B. Já em relação à possível inibição de citocinas, Gusman et al. (2015) avaliou o efeito de 18 plantas medicinais brasileiras, dentre elas *C. sylvestris*, sobre a produção do TNF- α em linhagem celular THP-1 (monócitos humanos associados à leucemia) estimulados por LPS. Os resultados demonstraram que o extrato etanólico de folhas inibiu a produção de TNF- α e foi o mais potente entre todos extratos avaliados (IC_{50} = 124 μ g/mL). Curioso notar que, no estudo de Gusman et al. (2015), o extrato etanólico de folhas de *C. sylvestris* não foi citotóxico para linhagem celular THP-1 nem na concentração de 250 μ g/mL, enquanto que em neste trabalho, a EFS2, obtida a também a partir do extrato etanólico de folhas, foi altamente citotóxica para macrófagos da linhagem RAW 264.7, mesmo na menor concentração testada (62,25 μ g/mL).

Em relação à possível inibição da PLA₂, apesar da casearina J e da caseargrewiina F não terem inibido o edema de pata induzido por uma sPLA₂ do veneno de *Bothrops jararacussu* (bothropstoxina II), estes diterpenos poderiam inibir a PLA₂ de macrófagos por dois motivos. Primeiro porque existem dez diferentes grupos de PLA₂s secretadas sendo que a principal sPLA₂ envolvida com a reação inflamatória em macrófagos pertence ao grupo V, enquanto que as sPLA₂ encontradas em venenos pertencem a outros grupos (DENNIS et al., 2011). Além disso, muitos efeitos provocados pelas sPLA₂ de venenos independem da atividade enzimática destas enzimas, o próprio edema de pata induzido por estas toxinas depende, em sua fase inicial, da degranulação de mastócitos por mecanismo não catalítico (LANDUCCI et al., 1998; LANDUCCI et al., 2000).

5.6 Ensaio *in vitro* da atividade anti-*Helicobacter pylori*

A investigação da atividade anti-*H. pylori in vitro* do extrato etanólico de folhas de *C. sylvestris* (EEtCs), frações obtidas por extração em fase sólida (EFS1-3) e diterpenos clerodânicos isolados (casearinas B e J e caseargrewiina F) foi realizada pelo método de diluição em microplaca. Como controle positivo utilizou-se a amoxicilina cuja concentração inibitória mínima (CIM) foi de 15 µg/mL. Em relação às amostras, a Tabela 22 demonstra que as frações 1 e 3 e as casearinas B e J, mesmo na concentração mais alta testada, não inibiram o crescimento do *H. pylori*, diferentemente do EEtCs e da caseargrewiina F cuja CIM foi de 1.000 µg/mL e da EFS2 que apresentou uma CIM foi de 62,5 µg/mL. Wang (2014) classificou a atividade anti-*H. pylori* de produtos naturais nas seguintes categorias: forte (CIM: < 10 µg/mL), moderadamente forte (CIM: 10-100 µg/mL), moderadamente leve (CIM: 100-1000 µg/mL) e leve (CIM: > 1.000 µg/mL). De acordo com esta classificação, o EEtCs e a caseargrewiina F apresentaram atividade moderadamente leve, enquanto que a EFS2 apresentou atividade moderadamente forte.

Tabela 22 – Investigação da atividade anti-*Helicobacter pylori in vitro* do extrato etanólico de folhas de *C. sylvestris* (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.

Amostra	Concentração Inibitória Mínima (µg/mL)
EEtCs	1.000
EFS1	acima de 1.000
EFS2	62,5
EFS3	acima de 1.000
casearina B	acima de 1.000
casearina J	acima de 1.000
caseargrewiina F	1.000

n = 3 experimentos independentes

Interpretando-se os resultados obtidos para o EEtCs e suas frações, pode-se inferir que existem compostos com atividade anti-*H. pylori* em baixas concentrações no EEtCs, e que no processo de extração em fase sólida, atingem concentrações maiores na EFS2, o que ocorre justamente com os diterpenos clerodânicos. Neste caso, a concentração total de diterpenos clerodânicos no EEtCs utilizado neste trabalho foi de 14,6% e na EFS2 de 54,3 % (CARVALHO, 2015), sugerindo que a atividade anti-*H. pylori* do EEtCs e da EFS2 dependam da participação destes

compostos. No entanto, os resultados obtidos para as casearinas B e J e para a caseargrewiina F não confirmaram esta hipótese, pois as duas primeiras não apresentaram atividade e a atividade da terceira foi muito inferior àquela demonstrada pela EFS2. Por outro lado, deve-se destacar que dos 39 diterpenos clerodânicos encontrados em extratos de folhas de *C. sylvestris* (Tabela 3), 27 apresentam o mesmo esqueleto básico *cis*-clerodânico com anel diacetálico (Figura 8 e Tabela 4), incluindo as casearinas B e J e a caseargrewiina F, enquanto que os outros 12 possuem outros padrões estruturais como, por exemplo, ausência do anel diacetálico. Sendo assim, estes últimos poderiam estar envolvidos com a atividade anti-*H. pylori* atuando através de mecanismos não compartilhados pelos diterpenos com esqueleto básico *cis*-clerodânico com anel diacetálico.

Outras substâncias poderiam estar envolvidas com a atividade anti-*H. pylori* do EEtCs e da EFS2 tais como os flavonoides quercetina e rutina, o ácido clorogênico (fenólico não flavonoide) e o lapachol (naftoquinona). Além de existirem trabalhos demonstrando a atividade anti-*H. pylori* destas substâncias (WANG, 2014; GARRO et al., 2015), as quatro já foram descritas em extratos de folhas de *C. sylvestris*, a quercetina em extrato etanólico (JUNGES; SCHENKEL; SIMÕES, 1985), o ácido clorogênico e o lapachol em extrato aquoso (RASLAN et al., 2002) e a rutina tanto em extrato aquoso (RASLAN et al., 2002) quanto em extrato obtido com etanol: isopropanol: água 30:20:50 (v/v/v) (BUENO, 2015). Além disso, Carvalho (2015) demonstrou a existência de compostos fenólicos no EEtCs por meio de três métodos de doseamento de fenólicos totais e encontrou os seguintes valores: 8,5% (fotometria: 269 nm; padrão: ácido gálico), 11,9% (fotometria: 269 nm; padrão: rutina) e 12,1% (Folin-Ciocalteu). Por outro lado, apesar deste doseamento não ter sido realizado nas frações (EFS1-3), é provável que tais substâncias estejam mais concentradas na EFS3, pois são mais solúveis em metanol (solvente da EFS3) do que em hexano (solvente da EFS1) e em acetato de etila (principal solvente da EFS2). Sendo assim, é pouco provável que a atividade anti-*H. pylori* da EFS2 esteja relacionado com compostos fenólicos tais como quercetina, rutina e ácido clorogênico. Em relação ao lapachol, apesar deste composto ter sido descrito apenas em extrato aquoso de folhas de *C. sylvestris* (RASLAN et al., 2002), é possível que também esteja presente no extrato etanólico uma vez que sua solubilidade em etanol é maior do que em água. Já o comportamento do lapachol durante o processo de extração em fase sólida é de difícil previsão, uma vez que

sua a solubilidade nos solventes orgânicos utilizados é semelhante. Desta maneira, este metabólito secundário pode ser considerado como um dos candidatos à atividade anti-*H. pylori* da EFS2.

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.; WALTEBERGER, 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 griwiifolia*. **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 griwiifolia*. **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.

ANEXO A - Parecer nº 12/2014 – Comissão de Ética no Uso de Animais
(Protocolo CEUA/FCF/CAr nº 15/2014)

Protocolo CEUA/FCF/CAr nº 15/2014

Interessado: ROGÉRIO CARDOSO DE CASTRO

Orientador: Prof. Dr. André Gonzaga dos Santos

Projeto: Investigação dos Mecanismos da Atividade Anti-inflamatória do
do Extrato Etanólico e de Substâncias Isoladas das Folhas da
Casearia sylvestris

Parecer nº 12/2014 – Comissão de Ética no Uso de Animais

A Comissão de Ética no Uso de Animais desta Faculdade, reunida em 16 de abril de 2014, considerou que o protocolo para uso de animais na pesquisa: “Investigação dos Mecanismos da Atividade Anti-inflamatória do do Extrato Etanólico e de Substâncias Isoladas das Folhas da *Casearia sylvestris*”, apresentado pelo pós-graduando ROGÉRIO CARDOSO DE CASTRO, sob orientação do Prof. Dr. André Gonzaga dos Santos, do Departamento de Princípios Ativos Naturais e Toxicologia desta Faculdade, está estruturado dentro dos princípios éticos na experimentação animal do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA, manifestando-se FAVORÁVEL à sua execução.

O relatório final do protocolo de pesquisa deverá ser entregue em DEZEMBRO de 2014 em formulário para este fim.

Araraquara, 30 de abril de 2014.



Prof. Dr. CARLOS CÉSAR CRESTANI
Coordenador da CEUA

ANEXO B - Parecer nº 28/2014 – Comissão de Ética no Uso de Animais
(Protocolo CEUA/FCF/CAR nº 17/2014)

Protocolo CEUA/FCF/CAR nº 17/2014

Interessada: ROGÉRIO CARDOSO DE CASTRO

Orientador: Prof. Dr. André Gonzaga dos Santos

Projeto: Efeito do Extrato Etanólico e de Diterpenos Clerodânicos de Folhas de *Casearia sylvestris* Swartz sobre a Atividade Inflamatória e Enzimática da Bothropstoxina II

Parecer nº 28/2014 – Comissão de Ética no Uso de Animais

O Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais, desta Faculdade, aprovou **ad-referendum** as adequações feitas no protocolo do projeto de pesquisa “Efeito do Extrato Etanólico e de Diterpenos Clerodânicos de Folhas de *Casearia sylvestris* Swartz sobre a Atividade Inflamatória *in vivo* e Catalítica *in vitro* de uma Fosfolipase A2 Isolada do Veneno de *Bothrops jararacussu*”, apresentado pela graduanda HELENA SAYURI UCHINA, sob orientação do Professor Doutor André Gonzaga dos Santos, do Departamento de Princípios Ativos Naturais e Toxicologia desta Faculdade. Assim, fica determinado o novo título do projeto: “Efeito do Extrato Etanólico e de Diterpenos Clerodânicos de Folhas de *Casearia sylvestris* Swartz sobre a Atividade Inflamatória e Enzimática da Bothropstoxina II”, assim como a alteração do pesquisador responsável, que passa a ser o pós-graduando ROGÉRIO CARDOSO DE CASTRO.

O relatório final do protocolo de pesquisa deverá ser entregue em AGOSTO de 2015, em formulário para este fim.

Araraquara, 06 de junho de 2014.



Prof. Dr. CARLOS CÉSAR CRESTANI
Coordenador da CEUA