

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

CAMPUS DE ARARAQUARA

JHENNIFER PRISCILA NASTRI

**AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTI-INFLAMATÓRIA E CITOTÓXICA DE
AMOSTRAS DE FOLHAS DE *Casearia sylvestris* SW E CLASSIFICAÇÃO
DESSAS AMOSTRAS POR RMN DE ^1H E QUIMIOMETRIA**

ARARAQUARA – SP

2016

JHENNIFER PRISCILA NASTRI

**AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTI-INFLAMATÓRIA E CITOTÓXICA DE
AMOSTRAS DE FOLHAS DE *Casearia sylvestris* SW E CLASSIFICAÇÃO
DESSAS AMOSTRAS POR RMN DE ^1H E QUIMIOMETRIA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao Curso de Graduação em Farmácia-
Bioquímica da Faculdade de Ciências
Farmacêuticas de Araraquara, da Universidade
Estadual Paulista para obtenção do grau de
Farmacêutica-Bioquímica.

Orientador: Prof.Dr. Alberto José Cavalleiro

Co-orientador: Prof^aDr^a Vanderlan da Silva Bolzani

ARARAQUARA

2016

Dedico este trabalho aos meus pais,
Gilberto e Silvia. Sem vocês eu não seria nada.

AGRADECIMENTOS

Aos meus orientadores Dr. Alberto José Cavalheiro e Dr^a Vanderlan da Silva Bolzani, pelo estímulo, orientação e oportunidade.

À prof^a Dr^a Alexandra Ivo de Medeiros e Ms^a Amanda Correia Saraiva pelos ensaios biológicos.

Às prof^a Dr^a Michèle Reboud-Ravaux e prof^a Dr^a Chahrazade El Amri da Universidade Pierre e Marie Curie que me receberam para um treinamento em proteases e contribuíram para a minha formação acadêmica.

À Dr^a Denise Medeiros Selegato por preciosa ajuda com as análises quimiométricas.

Ao Dr. Nivaldo Borallo pela infinda ajuda e obtenção dos espectros de RMN.

À Dr^a Marília Valli pelos conselhos, amizade e simpatia.

À Dr^a Paula Carolina Bueno por gentilmente ter cedido as amostras nativas de *C. sylvestris* usadas neste trabalho.

Aos professores, funcionários e alunos do Departamento de Química Orgânica do Instituto de Química, pelos ensinamentos, convivência e amizade.

Eu também gostaria de agradecer à minha família, amigos próximos e entes queridos pelo apoio e encorajamento ao longo dos anos.

À FAPESP pela bolsa de estudo concedida.

RESUMO

A literatura registra uma série de dados morfoanatômicos, químicos e genéticos sobre *Casearia sylvestris* SW, uma planta medicinal bastante utilizada pela população brasileira em diversas regiões, pelas propriedades anti-inflamatórias e antiúlcero-gênicas. Para esta espécie são conhecidas duas variedades, *C. sylvestris* var. *lingua*, que apresenta predominantemente compostos fenólicos, e *C. sylvestris* var. *sylvestris*, que biossintetiza diterpenos clerodânicos, descritos como antitumorais em pesquisas anteriores do Núcleo de Bioensaios, Biossínteses e Ecofisiologia de Produtos Naturais (NuBBE). Este trabalho tem como objetivo a análise de autenticidade de amostras comerciais de *C. sylvestris* através de padrões das variedades botanicamente classificadas, bem como a avaliação do potencial anti-inflamatório e citotóxico. A análise de autenticidade permitiu inferir que a maioria das amostras comercializadas pertencem a *C. sylvestris* var. *lingua*. Os bioensaios demonstraram que a var. *lingua* possui boa atividade anti-inflamatória e baixa citotoxicidade, em contraste com a var. *sylvestris*, que se apresentou citotóxica e com menor potencial anti-inflamatório. Com isto, foi possível averiguar o perfil químico das amostras de *C. sylvestris* disponíveis para a população. Adicionalmente, o método desenvolvido pode ser usado como ferramenta confiável no controle de autenticidade de extratos vegetais desta espécie medicinal.

Palavras-chave: *Casearia sylvestris* SW, RMN, metabolômica.

ABSTRACT

The literature reports a number of morphological, chemical and genetic on *C. sylvestris* SW, a medicinal plant widely used by the population in different regions due the anti-inflammatory and antiulcerogenic properties. For this specie are known two varieties, *C. sylvestris* SW var. *lingua*, which presents predominantly phenolic compounds, whereas *C. sylvestris* SW var. *sylvestris* biosynthesize diterpenes clerodanes described as antitumor in previous research NuBBE. This work aims to authenticity analyze on commercial samples of *C. sylvestris* through varieties standards botanically classified, as well as the evaluation of anti-inflammatory and cytotoxic potential. The authenticity analysis allowed to infer that the majority of samples commercialized belong to *C. sylvestris* var. *lingua*. The bioassays showed that var. *lingua* has good anti-inflammatory activity and low cytotoxicity, in contrast to var. *sylvestris*, which presented cytotoxic and with lower anti-inflammatory potential. In this way, it was possible to determine the chemical profile of samples of *C. sylvestris* available to the population. Additionally, the method developed can be used as a reliable tool to control the authenticity of plant extracts of this medicinal species.

Keywords: *Casearia sylvestris* SW, NMR, metabolomic.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	9
1.1 Plantas medicinais	9
1.2 Metabolômica	10
1.3 <i>Casearia sylvestris</i> SW.....	11
1.4 Metabólitos secundários de <i>C. sylvestris</i>	13
2. OBJETIVOS	16
3. MATERIAIS E MÉTODOS	16
3.1 Amostras vegetais e extração	16
3.2 Análise de RMN de ^1H dos extratos brutos	17
3.3 Ensaio de atividade anti-inflamatória e citotoxicidade	18
3.3.1 Avaliação do potencial anti-inflamatório.....	19
3.3.2 Avaliação da citotoxicidade celular	20
3.4 Análise multivariada de dados de RMN de ^1H	20
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	21
4.1 Otimização do solvente deuterado de RMN	21
4.2 Análise dos espectros de ^1H RMN obtidos dos extratos brutos de <i>C. sylvestris</i> ..	24
4.3 Análise multivariada de dados de ^1H RMN.....	25
4.3.1 Análise por Componentes Principais (PCA) das amostras nativas usadas como padrões (Modelagem)	25
4.3.2 Análise de Agrupamentos Hierárquicos das amostras comerciais – Análise de similaridade	27
4.4.3 Classificação das amostras comerciais.....	28
4.5 Ensaio de atividade anti-inflamatória e citotoxicidade	29
5. CONCLUSÃO	33

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Morfologia das folhas das duas variedades de <i>C. sylvestris</i> , à direita, var. <i>lingua</i> , com conformação em canoa, e à esquerda, var. <i>sylvestris</i> (Cavallari., 2008).	12
Figura 2: Representação do esqueleto carbônico básico das casearinas.....	15
Figura 3: Representação do esqueleto carbônico básico de flavonoide.	15
Figura 4: Espectro de RMN de ^1H com pré-saturação (600 MHz), dos extratos de <i>C. sylvestris</i> , var. <i>sylvestris</i> . Ampliação de 0,5 a 8,0 ppm. Os dados foram normalizados para área total.	22
Figura 5: Espectro de RMN de ^1H com pré-saturação (600 MHz), dos extratos de <i>C. sylvestris</i> e var. <i>lingua</i> . Ampliação de 0,0 a 8,0 ppm. Os dados foram normalizados para área total.	22
Figura 6: Espectro de RMN de ^1H com pré-saturação (600 MHz, CD_3OD), dos extratos de <i>C. sylvestris</i> var. <i>sylvestris</i> e var. <i>lingua</i> . Ampliação de 0,5 à 9,0 ppm. Os dados foram normalizados para área total.	24
Figura 7: Gráfico de <i>scores</i> da PC1xPC3 da análise de PCA. Gerado com os espectros de ^1H RMN das amostras nativas de <i>C. sylvestris</i>	26
Figura 8: Espectro de RMN de ^1H com pré-saturação (600 MHz, CD_3OD), dos extratos de <i>C. sylvestris</i> var. <i>sylvestris</i> . Ampliação de 0,5 a 9,5 ppm. Os dados foram normalizados para área total.	26
Figura 9: Gráfico de <i>loading</i> da PC3 da análise por PCA realizada com as amostras nativas das duas variedades de <i>C. sylvestris</i>	27
Figura 10: Dendograma dos dados de RMN de ^1H das amostras comerciais de <i>C. sylvestris</i> . var. <i>lingua</i> (A), var. <i>lingua</i> (B), var. <i>sylvestris</i> (C) e amostra <i>outlier</i> (D). ...	28
Figura 11: Avaliação da inibição de NO por tratamento com extratos de <i>C. sylvestris</i> var. <i>lingua</i> . Os resultados correspondem à média de experimento realizado em quadruplicata. * $P < 0,05$ vs meio (controle). # $P < 0,05$ vs LPS.	30
Figura 12: Avaliação da inibição de NO por tratamento com extratos de <i>C. sylvestris</i> var. <i>sylvestris</i> . Os resultados correspondem à média de experimento realizados em quadruplicatas. * $P < 0,05$ vs meio (controle). # $P < 0,05$ vs LPS.	31
Figura 13: Avaliação da inibição de NO por tratamento com extratos de amostras comerciais de <i>C. sylvestris</i> . Os resultados correspondem à média de experimento realizado em quadruplicata. * $P < 0,05$ vs meio (controle). # $P < 0,05$ vs LPS.	33

1. INTRODUÇÃO

1.1 Plantas medicinais

Espécies vegetais são fonte de centenas de metabólitos classificados em primários ou secundários. Os metabólitos primários são produzidos de forma constitutiva e aparecem como compostos majoritários, responsáveis pelo crescimento e desenvolvimento da planta, enquanto que a síntese de compostos secundários é influenciada por fatores ambientais, e desenvolvem função ecológica, como atratividade para agentes polinizadores, competição interespecie e defesa contra predadores e doenças, dentre outras. (Patra et al., 2013; Raja et al., 2015a; Gobbo et al., 2007).

O uso de plantas medicinais como atenção primária à saúde expande rapidamente pela população mundial, devido ao baixo custo e menor relato de efeitos adversos quando comparado com fármacos sintéticos. A literatura registra uma série de plantas medicinais usadas pela população com atividade biológica conhecida para tratamento de doenças, como o uso de extrato de *Calendula officinalis* L. para queimaduras (Bahramsoltani et al., 2014), extrato hidro-alcoólico de *Aloysia polystachya* (Griseb.) Moldenke para depressão (Dhamija et al., 2011), efeito anti-hipertensivo da espécie *Tabernaemontana dichotoma* Roxb. ex Wall. (Zaima et al., 2013) e *Cinchona officinalis* L. usada para malária (Wink., 2012). Em vista de garantir a eficácia e segurança ao paciente, assim como controle da qualidade de plantas medicinais para fins terapêuticos, a autenticidade de extratos vegetais é de crucial importância econômica e analítica (Raja et al., 2015b; Alhamed et al., 2015).

Técnicas analíticas como RMN (Ressonância Magnética Nuclear) e EM (Espectrometria de Massas) são amplamente empregadas no controle do perfil

metabólico de plantas, gerando uma gama de dados químicos, componentes chave na construção de *fingerprints* metabolômicos (KIM et al., 2010; Kim et al., 2011; ZHOU et al., 2010).

A espectrometria de massas é largamente aplicada no estudo metabolômico devido à sua alta sensibilidade, reprodutibilidade, fácil preparo de amostra e baixa quantidade de massa necessária para análise (Zhou et al., 2010), possuindo como desvantagens a destruição da amostra e a ausência de informações relacionados à estrutura química (Kim et al., 2011).

Já espectroscopia de RMN, apesar de possuir menor sensibilidade, apresenta-se complementarmente importante, devido a quantidade de informação química e estrutural proporcionada em um único experimento, alta robustez, possibilidade de recuperação da amostra, rapidez e possibilidade de elucidação conformacional (Boffo et al., 2009; Lawal et al., 2015).

1.2 Metabolômica

A Química de Produtos Naturais busca empregar abordagens holísticas para o estudo de sistemas biológicos de interesse medicinal, permitindo o estudo do metabolismo de maneira global, na chamada análise de perfil metabólico ou *fingerprinting* do sistema biológico. Para se obter um bom resultado, muitos protocolos estão sendo desenvolvidos. E para isso, diversos fatores precisam ser otimizados, tais como o método de extração destes metabólitos da matriz, o solvente utilizado, a adequação da técnica analítica e a forma de interpretação dos resultados (Ali et al., 2011).

A quimiometria empregada no estudo metabolômico é uma ferramenta poderosa na análise de autenticidade de plantas medicinais (Farag et al., 2014), assim como na classificação dos principais quimiotipos da espécie em estudo

(Bathia et al., 2013), já que esta permite avaliar uma grande quantidade de variáveis em um único experimento (Souza et al., 2012).

As análises utilizadas em quimiometria podem ser classificadas em não supervisionadas, como PCA (Análise por Componentes Principais) e HCA (Análise de Agrupamento Hierárquico), quando não é necessário um conhecimento prévio da amostra, sendo considerado uma metodologia exploratória dos dados que mostra a tendência geral dos dados (Panero et al., 2009); e as supervisionadas, como o PLS-DA (Análise Discriminante dos Mínimos Quadrados Parciais) e SIMCA (Modelagem Independente e Flexível por Analogia de Classe), em que dispõem de conhecimentos prévios da amostra, sendo considerados métodos classificatórios (Brescia et al., 2002).

1.3 *Casearia sylvestris* SW

Casearia sylvestris SW, popularmente conhecida como guaçatonga, é amplamente distribuída em todo território brasileiro devido a sua alta capacidade adaptativa. Para esta espécie são conhecidas duas variedades: a variedade (var.) *sylvestris*, rica em diterpenos clerodânicos e a var. *lingua*, rica em compostos fenólicos. Estudos demonstram que a ocorrência destes metabólitos secundários pode estar correlacionada ou condicionada por fatores ambientais, resultando em morfotipos distintos, var. *sylvestris* apresenta folhas oblongas verdes escuras, e var. *lingua*, folhas verdes claras de menor largura e comprimento, com conformação em canoa (Figura 1) (Sleumer, 1980; Cavallari, 2008; Bueno et al., 2015).



Figura 1: Morfologia das folhas das duas variedades de *C. sylvestris*, à direita, var. *lingua*, com conformação em canoa, e à esquerda, var. *sylvestris* (Cavallari., 2008).

Esta espécie medicinal se destaca não só pela sua importância fitoquímica por ser uma fonte rica em metabólitos secundários, mas também pelo seu potencial farmacológico e econômico, estando inserida na Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde (RENISUS), que contém espécies vegetais com potencial para se tornarem fitomedicamentos, e assim, prescritos e dispensados no Sistema Único de Saúde (SUS) (Brasil., 2009; Verissimo et al., 2011).

Vários estudos relatam atividades farmacológicas atribuídas a *C. sylvestris* SW. Borges e colaboradores (2000) demonstraram o efeito antiofídico e antiveneno de abelha dos extratos aquosos de *C. sylvestris*, através da inibição de fosfolipases A_2 , enzimas responsáveis por causar neurotoxicidade, miotoxicidade e formação de edema.

Ferreira et al., (2014) relataram que os metabólitos secundários de *C. sylvestris* SW, casearinas X e caseargrewiina F, apresentam atividade citotóxica quando testadas contra linhagens tumorais. Através do uso de células tumorais HL-60 (leucemia) como modelo experimental para a atividade antiproliferativa, foi possível observar redução na síntese de DNA, redução da integridade da membrana e externalização de fosfatidilserina, sinais de característicos do processo de

apoptose. Ameni et al., (2015) realizou ensaios de toxicidade aguda com ratas Wistar fêmeas, tratadas com uma dose única de extrato hidroetanólico das folhas de *C. sylvestris*, o estudo indicou que o LD₅₀ é maior que 2000 mg/kg. No ensaio subcrônico, realizados com três doses de 60, 120 e 240 mg/kg do extrato hidroetanólico das folhas de *C. sylvestris*, por 28 e 90 dias, foi possível constatar que não houve efeitos citotóxicos (Ameni et al., 2015)

Extrato etanólico das folhas de *C. sylvestris* foi utilizado para avaliar a ação antiulcerogênica, sendo mensurado através da lesão gástrica e da secreção de ácido gástrico, desta maneira, foi possível comprovar que o extrato foi capaz de proteger a mucosa do estomago sem que ocorresse alteração de pH (Basile et al., 1990; Santos et al., 2008). Flausino (2009) apresentou o mecanismo de ação, demonstrada através da inibição da enzima pepsina por uma fração enriquecida de casearinas do extrato etanólico de *C. sylvestris*.

1.4 Metabólitos secundários de *C. sylvestris*

A literatura demonstra vários estudos fitoquímicos realizados com *C. sylvestris*, relatando grande acúmulo de diterpenos clerodânicos tricíclicos (Tabela 1) nesta espécie medicinal. A estrutura básica desta classe de metabólitos apresenta configuração *cis* entre os anéis A e B do sistema decalínico, um terceiro anel C diidrofurânico/diacetálico e substituentes oxigenados nas posições C-2, C-6, C-7, C-18 e C-19. Seu esqueleto carbônico está apresentado na Figura 2 (Ferreira et al., 2011).

Dentre os diterpenos clerodânicos de grande importância podemos destacar as casearinas. As casearinas foram inicialmente isoladas por Itokawa e colaboradores (1988) apresentando as casearinas A-F, Morita et al., (1991) isolou e elucidou as estruturas de casearinas G-R, as casearinas S e T foram identificadas

por Carvalho (1998) após fracionamento em sílica-gel. As casearina U e casearina V foram elucidadas pelo grupo de pesquisa de Wang (Wang et al., 2009). E finalmente, a casearina X foi isolada por Santos e colaboradores de extrato etanólico das folhas (Santos et al., 2010).

Tabela 1. Substituintes R1-R5 das casearinas A-Z.

	R1	R2	R3	R4	R5
casearina A	OCH ₃ (α)	CH ₃ CO ₂	CH ₃ CO ₂	OH (α)	n-C ₃ H ₇ CO ₂
casearina B	OCH ₃ (α)	CH ₃ CO ₂	CH ₃ CO ₂	CH ₃ CO ₂ (α)	n-C ₃ H ₇ CO ₂
casearina C	OH (α)	CH ₃ CO ₂	CH ₃ CO ₂	CH ₃ CO ₂ (α)	n-C ₉ H ₁₉ CO ₂
casearina D	OH (α)	n-C ₃ H ₇ CO ₂	CH ₃ CO ₂	OH (α)	n-C ₃ H ₇ CO ₂
casearina E	OH (α)	OCH ₂ CH ₃	CH ₃ CO ₂	OH (α)	n-C ₉ H ₁₉ CO ₂
casearina F	OH (α)	OCH ₂ CH ₃	CH ₃ CO ₂	OH (α)	n-C ₃ H ₇ CO ₂
casearina G	OCH ₃ (α)	CH ₃ CO ₂	CH ₃ CO ₂	H	n-C ₃ H ₇ CO ₂
casearina H	OH (α)	CH ₃ CO ₂	n-C ₃ H ₇ CO ₂	H	n-C ₃ H ₇ CO ₂
casearina I	OH (α)	CH ₃ CO ₂	n-C ₃ H ₇ CO ₂	H	n-C ₃ H ₇ CO ₂
casearina J	OCH ₃ (α)	n-C ₃ H ₇ CO ₂	CH ₃ CO ₂	OH (α)	n-C ₃ H ₇ CO ₂
casearina K	CH ₃ CO ₂ (α)	CH ₃ CO ₂	CH ₃ CO ₂	OH (α)	n-C ₃ H ₇ CO ₂
casearina L	OCH ₃ (α)	n-C ₃ H ₇ CO ₂	CH ₃ CO ₂	CH ₃ CO ₂ (α)	OH
casearina M	OH (α)	n-C ₃ H ₇ CO ₂	n-C ₃ H ₇ CO ₂	CH ₃ CO ₂ (α)	OH
casearina N	OCH ₃ (α)	CH ₃ CO ₂	n-C ₃ H ₇ CO ₂	CH ₃ CO ₂ (α)	n-C ₃ H ₇ CO ₂
casearina O	OCH ₃ (α)	n-C ₃ H ₇ CO ₂	CH ₃ CO ₂	CH ₃ CO ₂ (α)	n-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)	n-C ₃ H ₇ CO ₂
casearina R	=O	CH ₃ CO ₂	CH ₃ CO ₂	CH ₃ CO ₂ (α)	n-C ₃ H ₇ CO ₂
casearina S	OCH ₃ (α)	=O	CH ₃ CO ₂	H	n-C ₃ H ₇ CO ₂
casearina T	OCH ₃ (α)	CH ₃ CO ₂	CH ₃ CO ₂	CH ₃ CO ₂ (α)	n-C ₃ H ₇ CO ₂
casearina U	OCH ₃ (α)	OCH ₃	CH ₃ CO ₂	OH (α)	n-C ₃ H ₇ CO ₂
casearina V	OH (α)	OCH ₃	CH ₃ CO ₂	OH (α)	n-C ₃ H ₇ CO ₂
casearina X	n-C ₃ H ₇ CO ₂ (α)	n-C ₃ H ₇ CO ₂	CH ₃ CO ₂	OH (α)	H

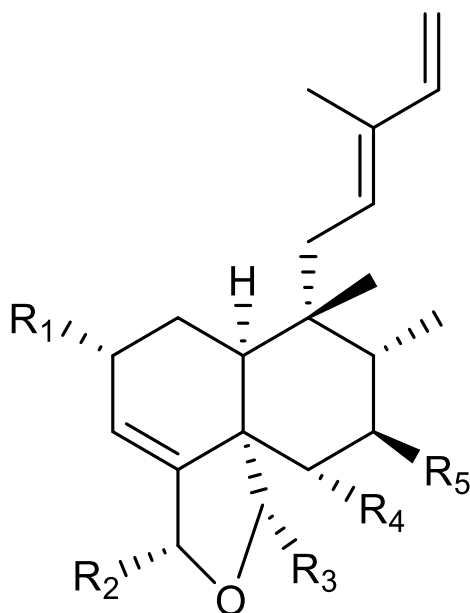


Figura 2: Representação do esqueleto carbônico básico das casearinas.

Outros marcadores fitoquímicos menos descritos nesta espécie são os compostos fenólicos, como derivados do ácido gálico e do ácido elágico (Xia et al., 2015; Silva et al., 2008; Silva et al., 2009) e os flavonoides (Figura 3), como quercetina, rutina e luteolina (Oshima-Franco et al., 2005; Ameni et al., 2015; Bueno et al., 2016)

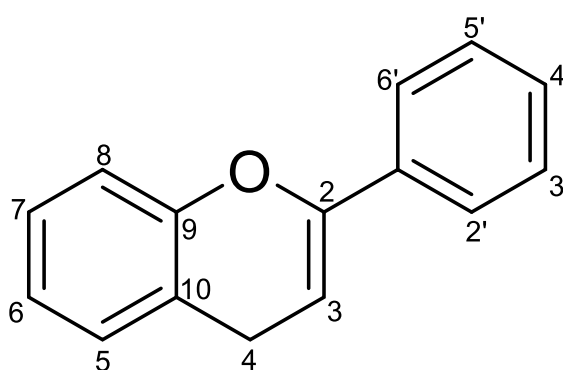


Figura 3: Representação do esqueleto carbônico básico de flavonoide.

2. OBJETIVOS

- Investigar a autenticidade de produtos comerciais de *C. sylvestris*, em comparação com amostras padrões, através de análise de ^1H -RMN (*metabolic fingerprinting*) e métodos quimiométricos;
- Buscar as principais diferenças na constituição química das amostras, permitindo a rápida classificação em grupos específicos, e assim, auxiliar no controle de autenticidade dos produtos comercializados no Brasil;
- Realizar ensaios de citotoxicidade e quantificação de óxido nítrico (NO) com as amostras nativas (usadas como padrões) e comerciais de *C. sylvestris*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Amostras vegetais e extração

Para a análise, 25 amostras de *C. sylvestris* foram coletadas (Tabela 2) em diversas regiões do Brasil e cedidas para este trabalho pela Dr^a Paula C. P. Bueno e classificadas pela botânica Dr^a Roseli B. Torres (Bueno et al., 2015). Foram compradas 10 amostras comerciais de *C. sylvestris* em farmácias, ervanarias e feiras populares conforme a Tabela 2. As folhas de cada amostra foram secas em estufa de circulação de ar forçada à 40 °C, pulverizadas sob nitrogênio líquido e então, foi realizada a extração em banho de ultrassom durante uma hora com 1,0 g de amostra para 10 mL de solvente extrator, composto por água/etanol/isopropanol na proporção 5:3:2 (v/v), seguida da filtração, sendo este procedimento de extração realizado duas vezes (Bueno et al., 2015). Os extratos foram concentrados em rotaevaporador e liofilizados, obtendo-se o extrato bruto seco.

Tabela 2: Origem das amostras nativas e comerciais de *C. sylvestris* que foram avaliadas neste período.

Amostras nativas			Amostras comerciais	
Origem	Código dos Morfotipos		Origem	Código das triplicatas
	<i>Lingua</i>	<i>Sylvestris</i>	Araraquara/SP	A01, A02 e A03
Angatuba/SP		ANG 01 e ANG 02	Araraquara/SP	B01, B02 e B03
Araraquara/SP	ARA 03, ARA 09, ARA 11 e ARA 12		Araraquara/SP	C01, C02 e C03
Cáceres/MT	CAC 03		São Paulo/SP	D01, D02 e D03
Campinas/SP	CAM 07 e CAM 11	CAM 03 e CAM 14	Porto Alegre/RS	E01, E02 e E03
Cedro/CE		CEA 01, CEA 02 e CEA 04	São Carlos/SP	F01, F02 e F03
Florianópolis/SC		FLO 01, FLO 03 e FLO 05	Toledo/PR	G01, G02 e G03
Luís Antônio/SP	LUI 01, LUI 05 e LUI 06		Cáscavel/PR	H01, H02, H03
Mogi-Guaçu/SP	MOG 02		São José dos Campos/SP	I01, I02 e I03
Presidente Venceslau/SP		PRE 05, PRE 08, PRE 09 e PRE 10	Ribeirão Preto/SP	J01, J02 e J03

3.2 Análise de RMN de ^1H dos extratos brutos

Os espectros de RMN de ^1H foram adquiridos sob automação sample express à temperatura de 299 K no espectrômetro Bruker Avance III® 600 (Fahrenheitstr, Bremen, Alemanha) com criossonda descrever. O sinal da água foi suprimido pelo

método da presaturação, e os principais parâmetros utilizados foram: número de pontos, 57K; janela espectral, 15 ppm; *delay time*, 2.39 s; número de scans, 208.

Após a aquisição, os espectros foram pré-processados utilizando *software* TopSpin 3.2 (Bruker), sendo realizado Transformada de Fourier, ajuste de fase, ajuste da linha de base e referenciamento segundo TMS, garantindo que os espectros estejam nas mesmas condições de análise (Wang et al., 2009).

Uma das etapas cruciais para o trabalho é a escolha do solvente deuterado mais adequado para a solubilização das amostras, sendo assim, para fins de comparação, foram usados os solventes CDCl_3 , $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, CD_3OD e D_2O , para o teste de solubilidade. Para tanto, foram diluídos 15 mg de cada variedade em 750 μL solvente, colocado em ultrassom por 20 minutos e centrifugado por 5 minutos. Retirou-se o sobrenadante e após seco, pesou-se o precipitado. Foi realizado o mesmo procedimento para a aquisição dos espectros, mas foi diluído 3 mg em 200 μL de cada solvente deuterado (Aldrich, São Paulo-Brasil) e o filtrado foi transferido para tubo de RMN de 3 mm.

3.3 Ensaio de atividade anti-inflamatória e citotoxicidade

Os experimentos foram conduzidos no laboratório de Imunologia Celular da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP, sob supervisão de Prof^a Dr^a Alexandra Ivo Medeiros. Foram utilizadas culturas de macrófagos da linhagem RAW 264-7 obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ). O cultivo dessas células foi conduzido em garrafas de cultura com meio DMEM (Meio de Eagle modificado por Dulbecco), suplementado com 10% de soro bovino fetal e tampão HEPES com pH final entre 7,2 a 7,4. Estas células foram mantidas em estufa com atmosfera umidificada a 95%, 5% de CO_2 à 37 °C.

3.3.1 Avaliação do potencial anti-inflamatório

Para avaliar o potencial anti-inflamatório, foi realizado a quantificação de nitrito (NO_2^-) do sobrenadante de macrófagos para cada amostra. Os extratos brutos selecionados de *C. sylvestris* foram ressuspensos em DMSO, e posteriormente, diluídos de maneira seriada em DMEM, obtendo concentrações entre 50 $\mu\text{g/mL}$ e 1,56 $\mu\text{g/mL}$ com diluição em base dois. Paralelamente, as células foram plaqueadas numa proporção de 5×10^4 células/poço em meio DMEM suplementado com 5% de soro bovino fetal, incubadas com 1 $\mu\text{g/mL}$ de lipopolissacarídeo (LPS) por 90 min, e em seguida os extratos foram adicionados nos poços, a placa foi incubada por 18 horas.

A quantificação de NO foi determinada indiretamente através da dosagem de NO_2^- utilizando o método de Griess (Lane et al., 1993). A técnica baseia-se na reação do nitrito com a sulfanilamida em meio ácido, e então, o diazo formado reage com o cloridrato de N-(1-naftil)etilenodiamina (NED), gerando um composto de coloração vermelha intensa. Para tanto, 100 μL do reagente de Griess (solução estoque de 0,1% NED, 1% sulfanilamida em 5% H_3PO_4 (Sigma, St. Louis, MO)) foram adicionados a 100 μL de sobrenadante de cultura. Para análise quantitativa, concomitante às amostras, foi realizada uma curva padrão de nitrito nas concentrações entre 3 a 200 μM . Após 5 minutos de incubação à temperatura ambiente, a densidade ótica da solução foi determinada em leitor de microplacas com comprimento de onda de 540 nm (Metertech Inc., modelo 960). A quantidade de nitrito das amostras foi correlacionada aos valores de absorbância obtidos na curva padrão. Controle positivo foi realizado com LPS e o controle negativo foi realizado com o meio de cultura.

3.3.2 Avaliação da citotoxicidade celular

Para analisar a viabilidade celular, foi realizado o ensaio colorimétrico MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazólio), que baseia-se na capacidade das células vivas em reduzir o substrato MTT através da enzima mitocondrial desidrogenase succínica, resultando no acúmulo de cristais de formazan de cor azul escura no citoplasma (Mosmann., 1983). Após a remoção do sobrenadante das culturas de macrófagos, foi adicionado meio DMEM sem vermelho de fenol e, em seguida, MTT (5 mg/ml). A placa foi incubada por 3 horas, e posteriormente, adicionados 50 µL de SDS 20% - HCL 0,01M para a lise das células. A placa foi incubada por 24 horas protegida da luz e, após esse período, a absorbância foi determinada em comprimento de onda de 595nm.

3.4 Análise multivariada de dados de RMN de¹H

Para a realização das análises quimiométricas por PCA, HCA e SIMCA, os espectros de ¹H RMN com presaturação foram exportados em formato txt, utilizando o programa MestReNova[®] 6.0.2-5474, sendo estes agrupados em formato de uma matriz numérica (amostras x intensidade x ppm) e analisados pelo programa MatLab[®] 7.5.0.342.

Para o pré-processamento dos espectros, foi realizada correção de fase manualmente, correção de linha de base por algoritmo AirPLS, referenciamento pelo TMS, alinhamento pelo algoritmo ICOSHIFT e normalização segundo área do TMS, reduzindo a influência de variações indesejadas.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Otimização do solvente deuterado de RMN

Uma das principais dificuldades encontradas no estudo metabolômico é a extração de metabólitos com diferentes graus de polaridades, por isso, a seleção do solvente deuterado mais adequado para a obtenção dos espectros é uma etapa crucial para o desenvolvimento do projeto (Kim et al., 2010).

O solvente ideal deve possuir boa solubilidade do extrato, baixa viscosidade, baixo custo, ser pouco higroscópico e ter baixo sinal residual do solvente, impedindo possíveis interferências em regiões importantes do espectro. Tanto a variedade *lingua* como a variedade *sylvestris* possuem boa solubilidade nos solventes analisados, exceto no CDCl_3 . A Tabela 3 mostra o teste de solubilidade para ambas as variedades, a Figura 4 apresenta os espectros adquiridos para a var. *sylvestris* e a Figura 5 para a var. *lingua*.

Tabela 3: Solubilidade da variedade *sylvestris* e *lingua* em diferentes solventes.

solvente	Massa solubilizada (mg)	
	<i>sylvestris</i>	<i>lingua</i>
CDCl_3	8	6
CD_3OD	10	11
D_2O	12	14
$(\text{CD}_3)_2\text{SO}$	13	14

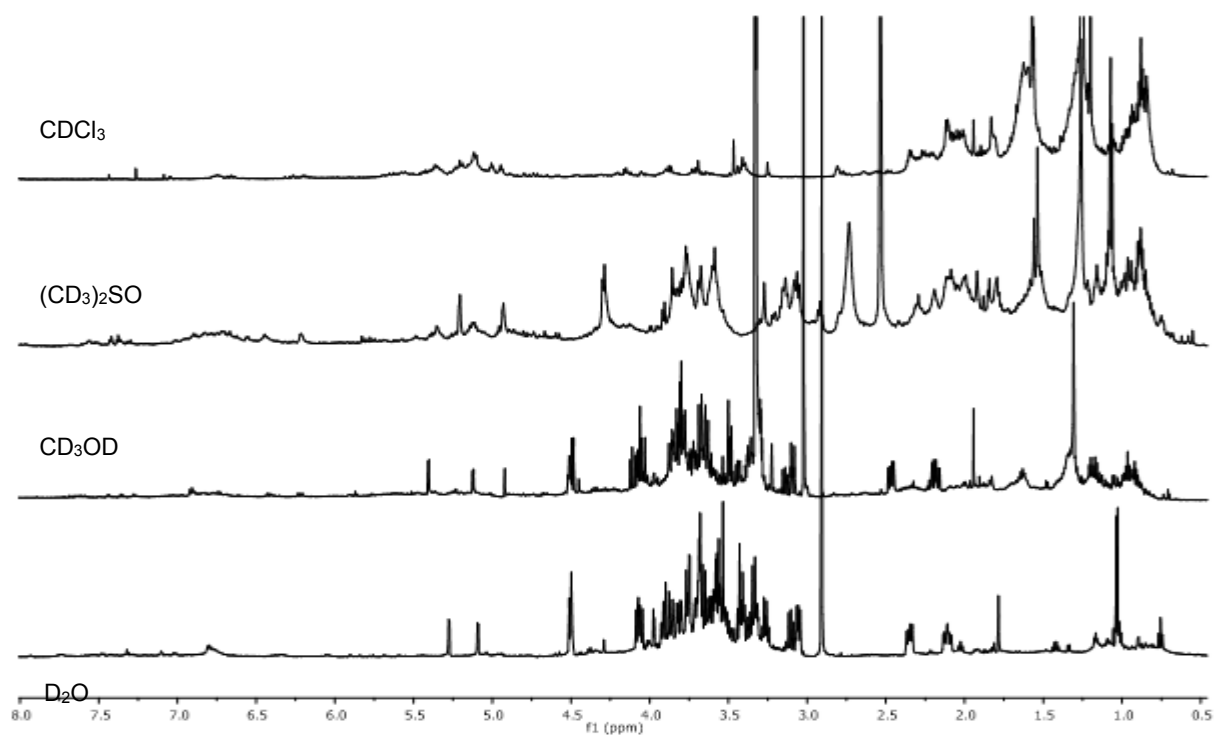


Figura 4: Espectro de RMN de ^1H com pré-saturação (600 MHz), dos extratos de *C. sylvestris*, var. *sylvestris*. Ampliação de 0,5 a 8,0 ppm. Os dados foram normalizados para área total.

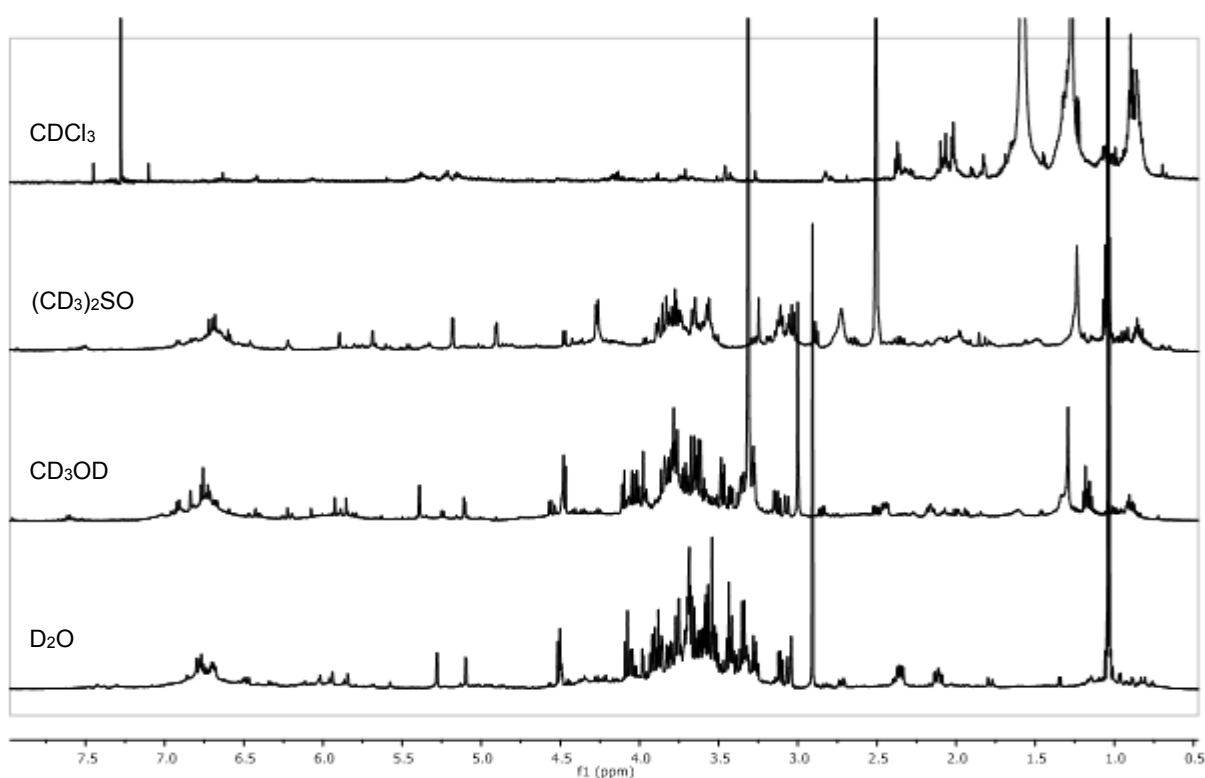


Figura 5: Espectro de RMN de ^1H com pré-saturação (600 MHz), dos extratos de *C. sylvestris* e var. *lingua*. Ampliação de 0,0 a 8,0 ppm. Os dados foram normalizados para área total.

Embora a literatura relate que as casearinas se solubilizam em clorofórmio, no espectro de RMN de ^1H pode-se notar a degradação da amostra, como já relatado por Santos e colaboradores (2010), que demonstraram que a casearina X é instável em condições ácidas e se degrada formando um dialdeído, sendo este solvente excluído da continuidade dos experimentos. Também há relatos de casearinas solubilizadas em piridina, mas devido ao sinal residual do solvente deuterado, o mesmo não foi aplicado no estudo.

A fim de extrair em uma única análise diterpenos clerodânicos e fenólicos, conduziu-se o estudo para solventes de maior faixa de polaridade: CD_3OD , D_2O , $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$. $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ e D_2O possuem maior abrangência de escala de polaridade do que o CD_3OD , como podemos notar pela Tabela 3 de solubilidade, porém o sinal residual de solvente deuterado para o espectro de RMN de ^1H está na região de 2,5 ppm e 4,8 ppm, respectivamente, que se encontram em uma região de sinais de ^1H rica em casearinas, o que, mesmo com melhor solubilidade do que o metanol, os tornam desinteressante para a análise. E ainda, o $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ por ser um solvente mais viscoso, aumenta o tempo de relaxação transversal T_2 , causando sinais mais largos, e assim, diminui a qualidade de resolução do espectro (Claridge, 2009), prejudicando assim o estudo desenvolvido.

Já em relação ao D_2O , podemos observar que nas mesmas condições de parâmetros de RMN, o extrato de *C. sylvestris* no solvente CD_3OD possui maior intensidade de sinais. Por tanto, o CD_3OD foi o solvente selecionado para a continuidade dos estudos, o que foi concluído pela diversidade de sinais em todas as regiões do espectro de ^1H RMN, evidenciando também uma grande diversidade química no extrato.

4.2 Análise dos espectros de ^1H RMN obtidos dos extratos brutos de *C. sylvestris*

É possível observar três regiões características de ocorrência de metabolitos nos espectros de RMN de ^1H (Figura 6) das duas variedades: região dos alifáticos (e.g., diterpenos, aminoácidos, ácidos orgânicos; 0,5-3,0 ppm), açúcares (e.g., monossacáridos, dissacáridos; 3,0 -4,2 ppm) e compostos aromáticos (e.g., compostos fenólicos, aminoácidos aromáticos; 5,0-9,0 ppm).

A análise preliminar dos espectros ^1H NMR (Figura 6) evidenciou que o perfil químico das duas variedades é distinto, sendo a var. *sylvestris* abundante em diterpenos clerodânicos (0,5-3,0 ppm) e a var. *lingua* em compostos fenólicos (5,0-8,0 ppm), apresentando diterpenos clerodânicos em uma concentração muito inferior à var. *sylvestris*.

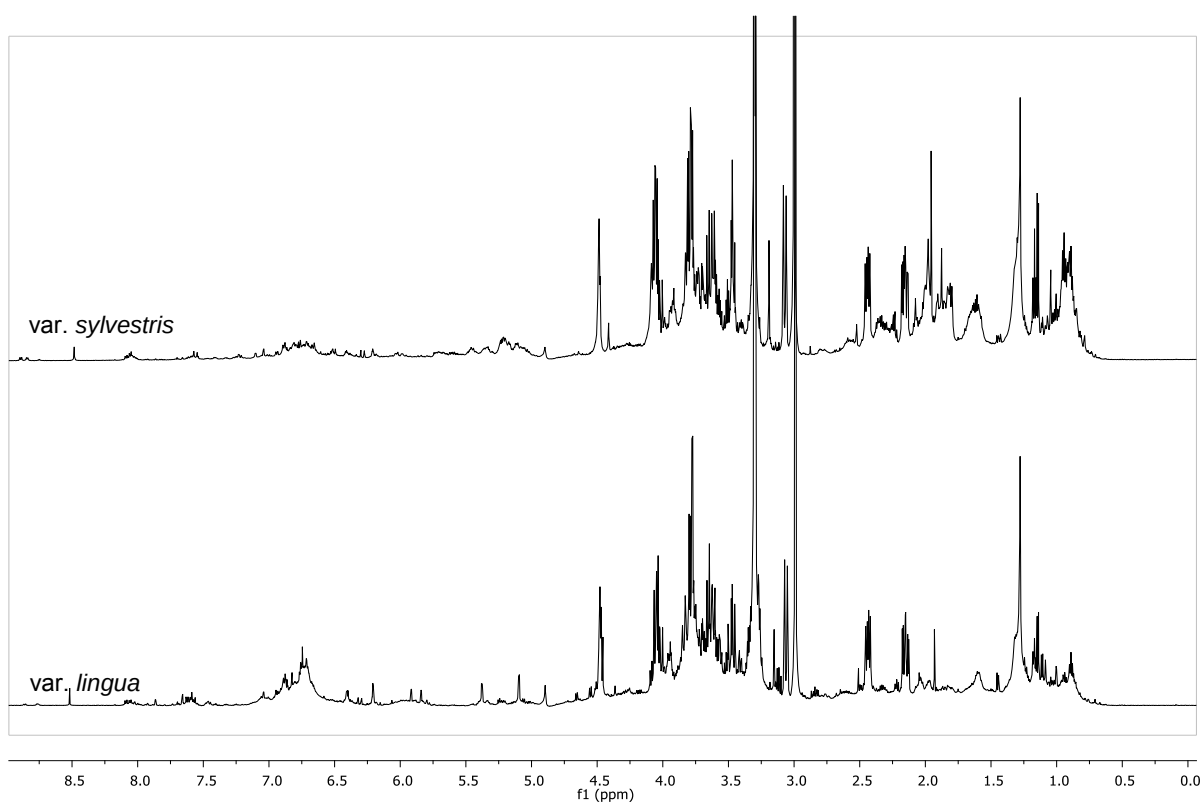


Figura 6: Espectro de RMN de ^1H com pré-saturação (600 MHz, CD_3OD), dos extratos de *C. sylvestris* var. *sylvestris* e var. *lingua*. Ampliação de 0,5 à 9,0 ppm. Os dados foram normalizados para área total.

4.3 Análise multivariada de dados de ^1H RMN

4.3.1 Análise por Componentes Principais (PCA) das amostras nativas usadas como padrões (Modelagem)

Em um primeiro momento, a nossa atenção foi focada na construção de um modelo que pudesse prover a melhor discriminação entre as variedades *C. sylvestris* var. *sylvestris* e *C. sylvestris* var. *lingua*. Para este propósito, foi utilizado a análise exploratória PCA através do algoritmo NIPALS, em que buscamos a componente principal (PC) que melhor separasse as amostras de ambas as variedades.

Baseado no gráfico de Variância vs PCs, selecionamos as 5 primeiras PCs, sendo que estas explicam 99% da variância das amostras. Para modelagem, foi selecionada a região entre 5,0 à 11,0 ppm dos espectros de ^1H RMN devido à similaridade das matrizes de dados na região de alifáticos e açúcares (Figura 6).

A Figura 7 apresenta o gráfico de *scores* entre a primeira (PC1) e terceira PC (PC3), que descrevem 70,53 e 6,07% da variância total, respectivamente. À um nível de 95% de confiança, pode ser observado que as variedades se separaram através da PC3, sendo amostras da variedade *sylvestris* presentes nos valores positivos da PC3 enquanto amostras da variedade *lingua* predominam nos valores negativos da mesma PC. Ainda na mesma Figura, é possível notar a aproximação das amostras da var. *sylvestris* FLO 05 e ANG 02 das amostras da var. *lingua*, que acontece devido à alta concentração de sinais na região de fenólicos destas 2 amostras (Figura 8), bem como a identificação de *outlier* LUI 05. Por fim, pode-se avaliar também que as amostras de ambas variedades se encontram dispersas nas suas respectivas regiões da PC, evidenciando alta variabilidade química entre amostras da mesma variedade.

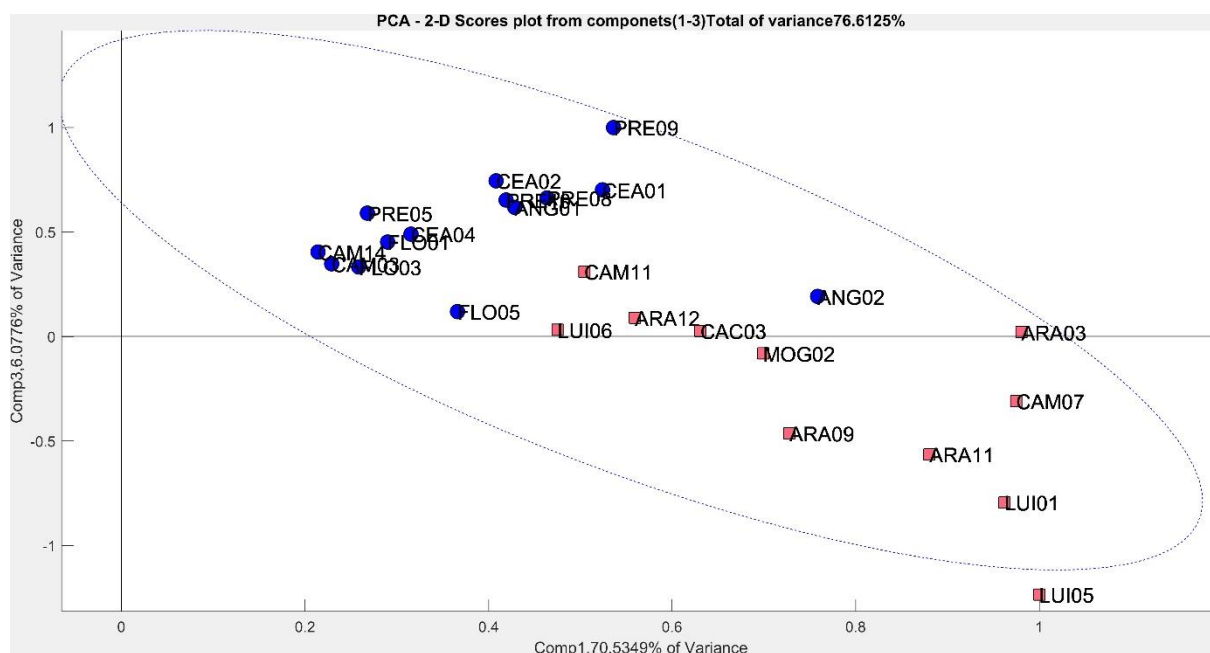


Figura 7: Gráfico de *scores* da PC1xPC3 da análise de PCA. Gerado com os espectros de ^1H RMN das amostras nativas de *C. sylvestris*.

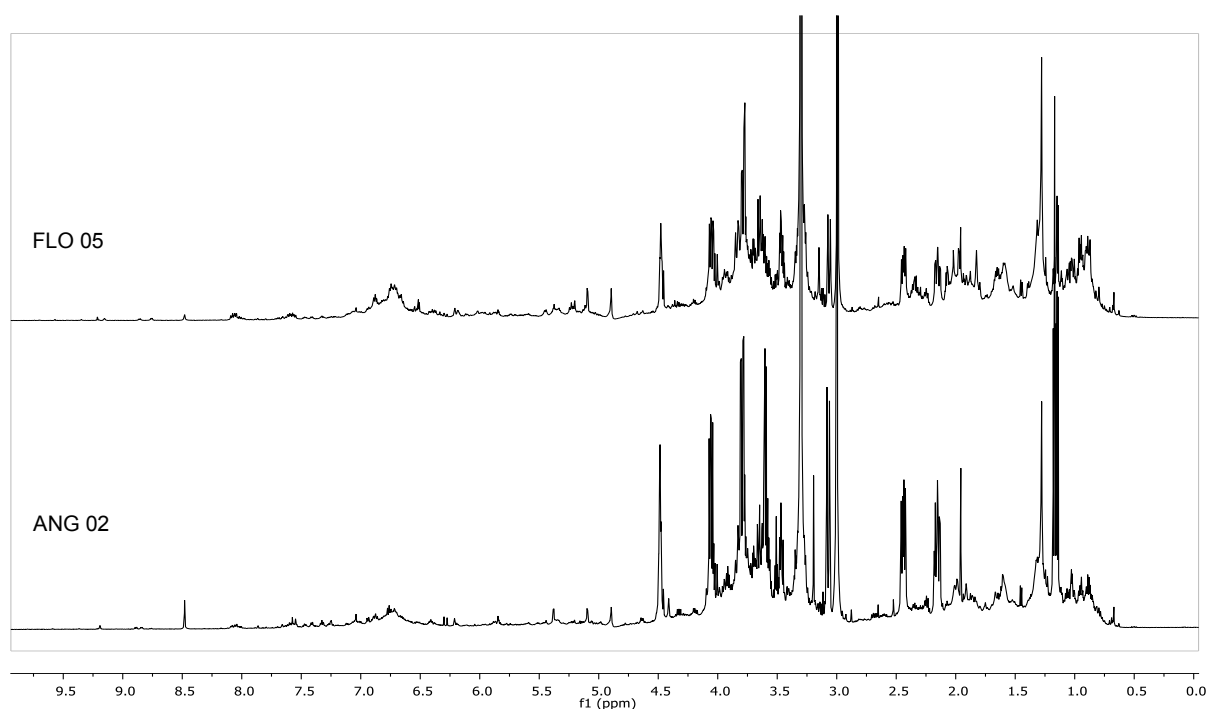


Figura 8: Espectro de RMN de ^1H com pré-saturação (600 MHz, CD_3OD), dos extratos de *C. sylvestris* var. *sylvestris*. Ampliação de 0,5 a 9,5 ppm. Os dados foram normalizados para área total.

O gráfico de *loadings* (Figura 9) da PC3 apresenta as variáveis envolvidas na distinção das duas variedades de *C. sylvestris* pela PC3. Dentre as variáveis mais

significativas, ou seja, aquelas que mais contribuíram para distinguir as duas variedades de *C. sylvestris*, podemos citar os sinais de hidrogênio H2' (δ 6,74) e na posição H6 (δ 5,90) do flavonoide catequina na porção negativa da PC3 (Figura 3) (SHEN et al., 1993).

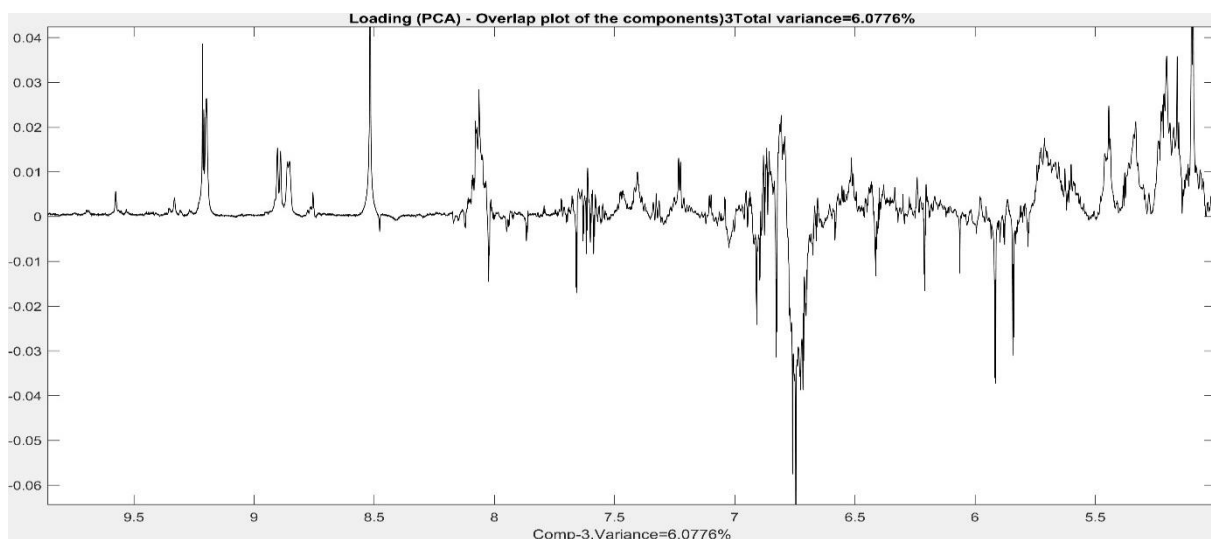


Figura 9: Gráfico de *loading* da PC3 da análise por PCA realizada com as amostras nativas das duas variedades de *C. sylvestris*.

4.3.2 Análise de Agrupamentos Hierárquicos das amostras comerciais – Análise de similaridade

Após estabelecer a modelagem através dos dados químicos das amostras nativas, as amostras comerciais foram submetidas à análise de agrupamento hierárquico, visando verificar a reprodutibilidade das triplicatas, bem como a tendência de agrupamento inter-réplicas.

A Figura 10 mostra o dendograma resultante da análise de HCA, em que é possível observar similaridade entre as triplicatas de todos os fornecedores, indicando a reprodutibilidade da análise. Adicionalmente, esta análise também permitiu a discriminação de quatro grupos distintos entre as amostras, sendo o grupo A (triplicatas de C, D, E e I) e o grupo B (triplicatas de A, F e G) referente à variedade *lingua* e o grupo C (triplicatas de B e J) referente à variedade *sylvestris*. O

grupo D, que abrange as triplicatas da amostra H, encontra-se fora do intervalo de confiança, sendo classificado como outlier.

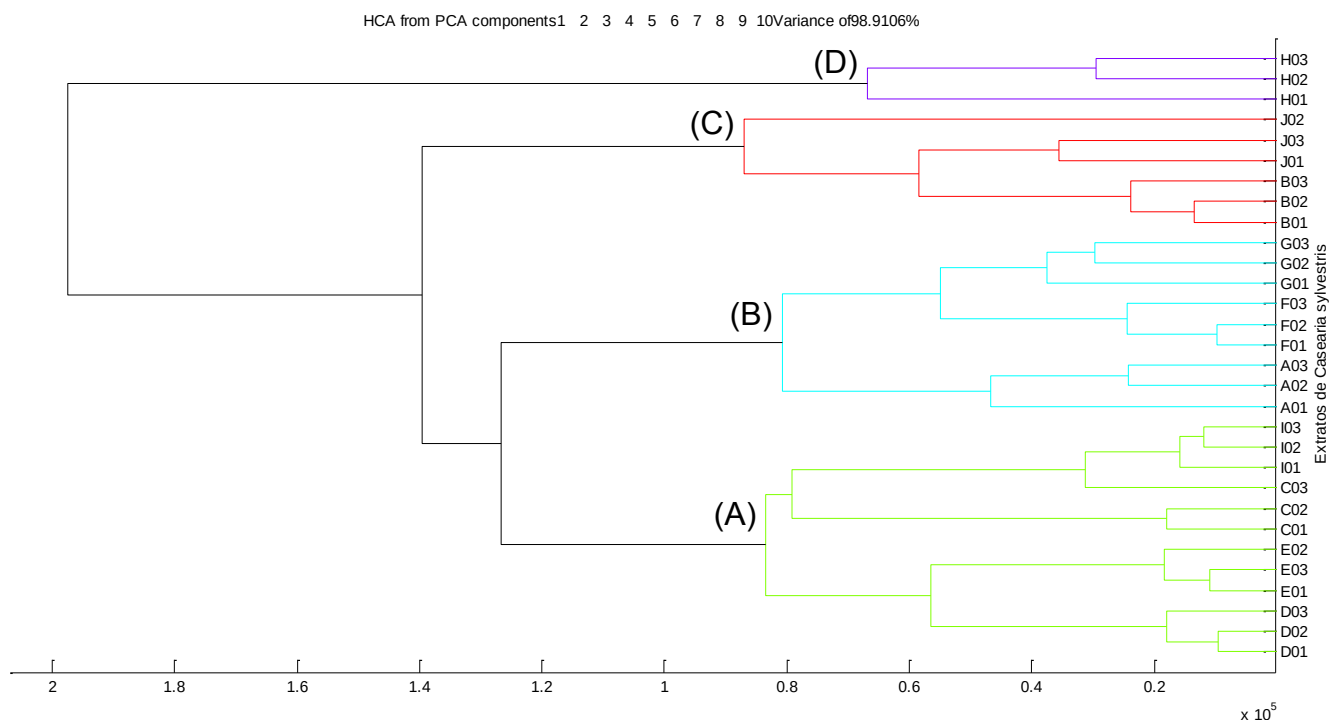


Figura 10: Dendrograma dos dados de RMN de ^1H das amostras comerciais de *C. sylvestris*. var. *lingua* (A), var. *lingua* (B), var. *sylvestris* (C) e amostra outlier (D).

4.4.3 Classificação das amostras comerciais

Após determinar a modelagem das amostras nativas pelo PCA, as amostras comerciais foram analisadas pelo método SIMCA, visando prever a classificação segundo variedade.

O modelo utilizado levou em consideração a região entre 5 e 11 ppm, sendo R^2 de 0,99, garantindo a precisão do método. Todo o processo foi realizado pelo software MATLAB, permitindo classificação das triplicatas das amostras comerciais B e J como pertencente a var. *sylvestris*, e todas as outras pertencentes a var. *lingua*.

Tabela 4: Classificação de amostras comerciais de *C. sylvestris* de origem desconhecida através do modelo SIMCA.

Amostra	Classificação	Amostra	Classificação
A01	<i>lingua</i>	F01	<i>lingua</i>
A02	<i>lingua</i>	F02	<i>lingua</i>
A03	<i>lingua</i>	F03	<i>lingua</i>
B01	<i>sylvestris</i>	G01	<i>lingua</i>
B02	<i>sylvestris</i>	G02	<i>lingua</i>
B03	<i>sylvestris</i>	G03	<i>lingua</i>
C01	<i>lingua</i>	H01	<i>lingua</i>
C02	<i>lingua</i>	H02	<i>lingua</i>
C03	<i>lingua</i>	H03	<i>lingua</i>
D01	<i>lingua</i>	I01	<i>lingua</i>
D02	<i>lingua</i>	I02	<i>lingua</i>
D03	<i>lingua</i>	I03	<i>lingua</i>
E01	<i>lingua</i>	J01	<i>sylvestris</i>
E02	<i>lingua</i>	J02	<i>sylvestris</i>
E03	<i>lingua</i>	J03	<i>sylvestris</i>

4.5 Ensaio de atividade anti-inflamatória e citotoxicidade

Para este estudo foram avaliadas 11 amostras nativas de *C. sylvestris*, sendo 5 da var. *sylvestris* e 6 da var. *lingua*, e também, 10 amostras comerciais. Para comparar a atividade anti-inflamatória, o ideal seria ter utilizado um fármaco disponível no mercado como controle positivo. Contudo, como referência podemos citar o ácido gálico (100 µg/mL) que inibi a produção de NO em 42,5% (Maia et al., 2010). Desta forma, foi considerado promissor as concentrações dos extratos que inibiram mais de 40%. As concentrações dos extratos que apresentaram viabilidade celular inferior a 95% não foram plotadas nos gráficos.

A avaliação da inibição de NO por tratamento com extratos de *C. sylvestris* var. *lingua* foram plotadas na Figura 11. Todas as amostras não apresentaram citotoxicidade, adicionalmente, estas amostras se apresentaram capacidade em inibir a produção de NO em células previamente tratadas com LPS em baixas concentrações de extrato, entretanto, para uso humano as concentrações mais indicados de extrato seria acima de 12,5 µg/mL, pois inibi mais de 40% a produção

de NO. A atividade anti-inflamatória apresentada por esta variedade pode estar relacionada com os flavonoides quercetina, rutina e luteolina, já relatado no trabalho de Ameni e colaboradores (2015) por possuir atividades anti-inflamatória e anti-ulcerogênica ao agir no sistema gastrointestinal.

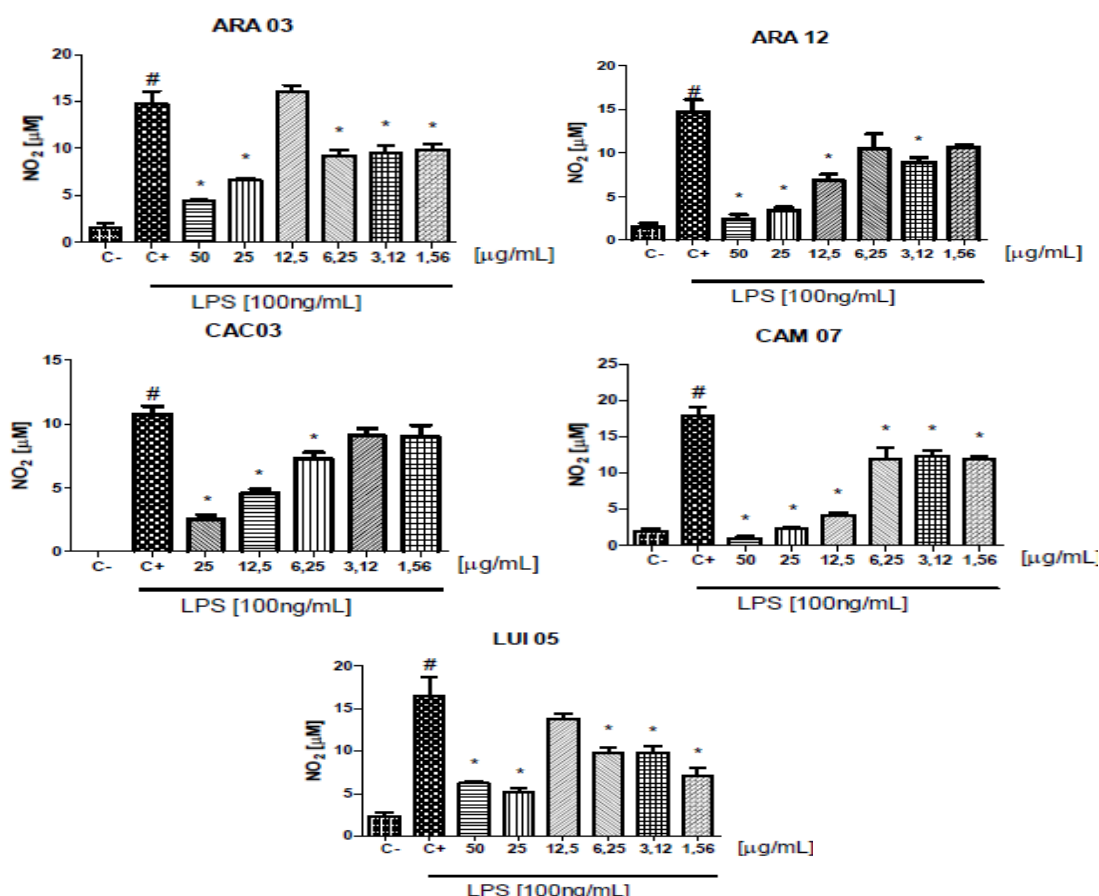


Figura 11: Avaliação da inibição de NO por tratamento com extratos de *C. sylvestris* var. *lingua*. Os resultados correspondem à média de experimento realizado em quadruplicata. * P < 0,05 vs meio (controle). # P < 0,05 vs LPS.

A avaliação da inibição de NO por tratamento com extratos de *C. sylvestris* var. *sylvestris* foi plotada na Figura 12. Dentre os extratos testados de *C. sylvestris* var. *sylvestris*, apenas as amostras ANG 02 e FLO 05 foram consideradas promissoras. Estas se apresentaram com capacidade de inibir a produção de NO em células previamente tratadas com LPS em baixas concentrações de extrato, e ainda, apresentou baixa citotoxicidade em altas concentrações de extrato. Relacionando

estes resultados com o PCA (Figura 7) é possível observar a proximidade das amostras ANG 02 e FLO 05 do perfil químico das amostras da variedade *lingua*, que da mesma forma, não apresentaram citotoxicidade e apresentaram atividade anti-inflamatória através da inibição da produção de NO. Desta maneira, as amostras da variedade *lingua* podem ser consideradas mais indicadas ao consumo humano do que as amostras da variedade *sylvestris* de *C. sylvestris* para este fim terapêutico.

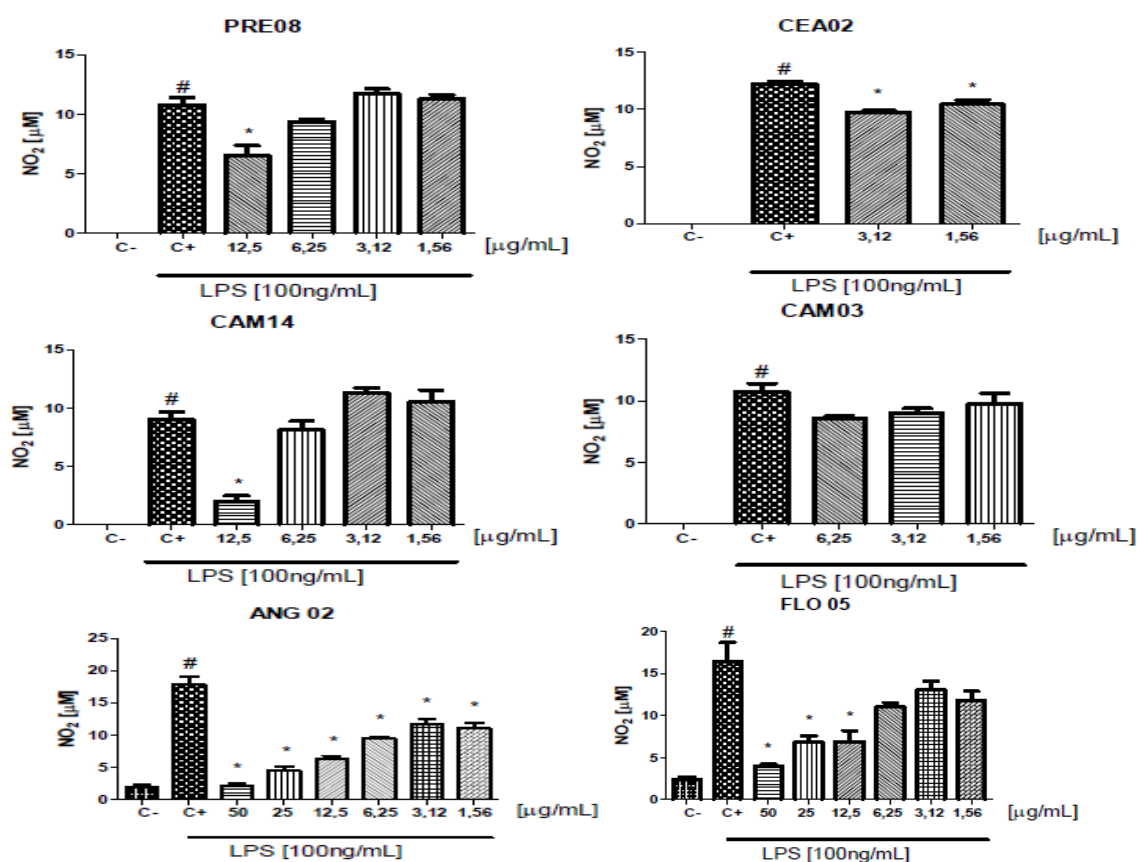
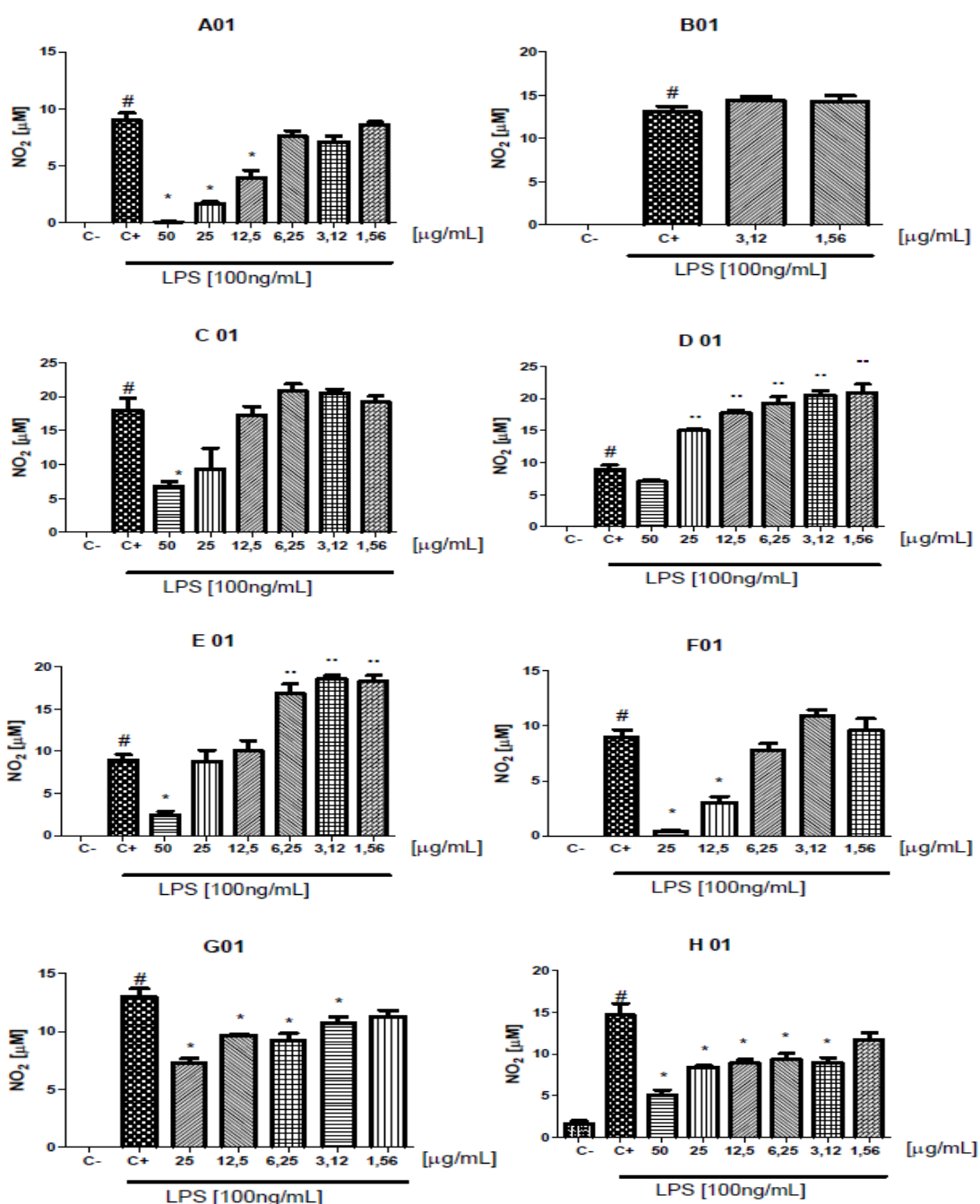


Figura 12: Avaliação da inibição de NO por tratamento com extratos de *C. sylvestris* var. *sylvestris*. Os resultados correspondem à média de experimento realizados em quadruplicatas. * P < 0,05 vs meio (controle). # P < 0,05 vs LPS.

A avaliação da inibição de NO por tratamento com extratos de amostras comerciais de *C. sylvestris* foram plotadas na Figura 13. Em relação as amostras comerciais, é possível notar congruência com os resultados das amostras nativas. As amostras B01 e J01 consideradas pelo modelo de classificação como

pertencente à variedade *sylvestris* se apresentaram como citotóxica, e ainda, não apresentaram capacidade de inibir a produção de NO em células previamente tratadas com LPS. AS amostras da var. *lingua* não apresentaram citotoxicidade. As amostras G01, H01 e I01 apresentaram atividade anti-inflamatória em baixas concentrações de extrato, enquanto que as amostras A01, C01 e F01 só apresentaram atividade em concentrações mais altas. E ainda, as amostras D01 e E01 apresentaram comportamento anômalo, gerando potencial imunoestimulador, pois aumentaram a produção de NO.



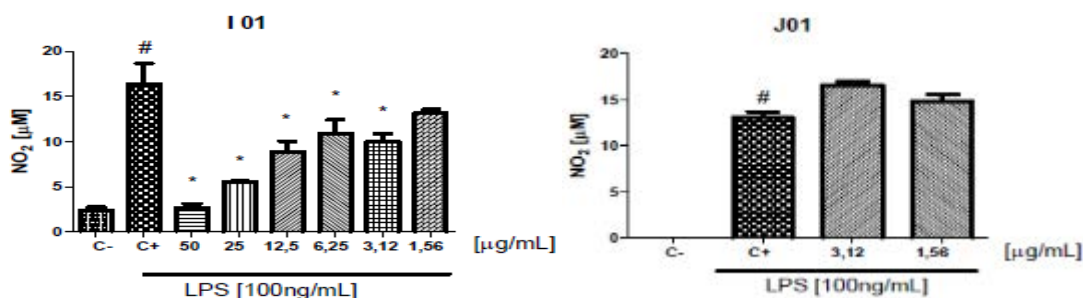


Figura 13: Avaliação da inibição de NO por tratamento com extratos de amostras comerciais de *C. sylvestris*. Os resultados correspondem à média de experimento realizado em quadruplicata. * P < 0,05 vs meio (controle). # P < 0,05 vs LPS.

5. CONCLUSÃO

A metodologia desenvolvida utilizando RMN ¹H mostrou-se uma ferramenta analítica simples, rápida, robusta e eficaz para análise de amostras de *C. sylvestris*.

Similarmente, a utilização de ferramentas quimiométricas para verificar a reprodutibilidade (HCA), modelagem (PCA) e classificação (SIMCA) auxiliou de forma crucial na identificação e comparação dos perfis químicos das duas variedades.

Através do modelo obtido pelo PCA, foi possível discriminar as amostras nativas de *C. sylvestris* segundo seus morfotipos, e em um segundo momento, permitiu classificar as amostras comerciais de origem desconhecida desta espécie através do modelo SIMCA. Com isto, foi possível avaliar o perfil químico dessas amostras utilizadas pela população, podendo esta estratégia ser usado como uma ferramenta confiável no controle de autenticidade de fitoterápicos a base desta planta medicinal.

Através do ensaio de inibição de NO foi possível constatar que as amostras da var. *lingua* possuem atividade anti-inflamatória, e ainda que não possuem citotoxicidade nas concentrações testadas. O mesmo não foi observado para as amostras da var. *sylvestris*. Dessa forma, as amostras da var. *lingua* são mais indicadas para consumo humano do que as amostras da var. *sylvestris*. Contudo,

para as amostras comerciais de *C. sylvestris* var. *lingua* foi observado que algumas amostras só apresentaram atividade anti-inflamatória em altas concentrações, podendo ser um indicativo que as condições de secagem ou armazenagem do material vegetal não foram ideais, bem como a pureza do material vegetal.

REFERÊNCIAS

- ALI, K.; MALTESE, F.; FORTES, A. M.; PAISB, M. S.; VERPOORTE, R. Pre-analytical method for NMR-based grape metabolic fingerprinting and chemometrics. **Analytica Chimica Acta**. 703 (2), 179-186, 2011.
- 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). **J. of Ethnopharmacology**. 175, 9–13, 2015.
- ALHAMD, A. K.; SUMOOM, F. ZUEIN, K. H.; HASSIN, A. M.; RASOOL, A. A. new technique for extraction and characterization of bioactive compounds from iraqi vitis-vinifera leaves. **World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**. 4 (12), 135-147, 2015.
- BAHRAMSOLTANI, R.; FARZAEI, M.; RAHIMI, R. Medicinal plants and their natural components as future drugs for the treatment of burn wounds: an integrative review. **Arch. Dermatol. Res**. 306, 601–617, 2014.
- BASILE, A.C.; SERTIÉ, J. A. A.; PANIZZA, 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**. 30, 185-197, 1990.
- BHATIA, A.; BHARTI, S. K.; TEWARI, S. K.; SIDHU, O. P.; ROY, R. Metabolic profiling for studying chemotype variations in *Withania somnifera* (L.) Dunal fruits using GC–MS and NMR spectroscopy. **Phytochemistry**. 93, 105–115, 2013.
- BOFFO, E. F.; TAVARES, L. A.; FERREIRA, M. M. C.; FERREIRA, A. G. Classification of Brazilian vinegars according to their ^1H NMR spectra by pattern recognition analysis. **Food Science and Technology**. 42, 1455–1460, 2009.
- BORGES, M. h.; Soares, A. M.; Rodrigues, V. m.; Escarso, S. H. A.; Diniz, H.; Hamaguchi, A.; Quintero, A.; Lizano, S.; Gutiérrez, J. M.; Giglio, J. R.; Homs-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**. 127, 21–30, 2000.
- BRASIL, 2009. Ministério da Saúde. Direção de Administração e Finanças. Secretária de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. RENISUS – Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS.
- BRESCIA, M. A.; DI MARTINO, G.; FARES, C.; DI FONZO, N.; PLATANI, C.; CHELLI, S.; RENIERO, F.; SACCO, A. Characterization of italian durum wheat semolina by means of chemical analytical and spectroscopy determinations. **Cereal Chemistry**. 79 (2), 238-242, 2002.
- BUENO, P. C. P.; PEREIRA, F. M. V.; TORRES, R. B.; CAVALHEIRO, A. J. Development of a comprehensive method for analyzing clerodane-type diterpenes and phenolic compounds from *Casearia sylvestris* Swartz (Salicaceae) based on ultra high performance liquid chromatography combined with chemometric tools. **J. Sep. Sci.**, 38, 1649–1656, 2015.

BUENO, P. C. P.; PASSARELI, F.; ANHESINE, N. B.; TORRES, R. B.; CAVALHEIRO, A. J. Flavonoids from *Casearia sylvestris* Swartz variety língua (Salicaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**. 68, 23-26, 2016.

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

CAVALLARI, M. M. **Variabilidade genética e química entre e dentro de populações de *Casearia sylvestris* Sw. (Salicaceae) no estado de São Paulo** [Tese de doutorado]. Botucatu: 2008.

CLARIDGE, T. D.W. **High-Resolution NMR techniques in organic chemistry**. Second Edition. University of Oxford: Elsevier. 2009.

DHAMIJA, H. K.; PARASHAR, B.; SINGH, J. Anti-depression potential of herbal drugs: An overview. **J. Chem. Pharm. Res.** 3(5), 725-735, 2011.

FARAG, M. A.; MAHROUS, E. A.; BKEN, T. L.; PORZEL, A.; WESSJOHANN, L. Classification of commercial cultivars of *Humulus lupulus* L. (hop) by chemometric pixel analysis of two dimensional nuclear magnetic resonance spectra. **Metabolomics**. 10, 21-32, 2014.

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. **Chem-Biol Interact.** 222, 112-125, 2014.

FLAUSINO, O.; ABISSI, B. M.; VIEIRA, G. M.; SANTOS, A. G.; SILVA, D. H.; CAVALHEIRO, J. A.; BOLZANI, V. S. Protease inhibition activity of extracts from Salicaceae species from Brazilian Cerrado and Atlantic Rain Forest and of an enriched fraction of clerodane diterpenes (casearins). **Brazilian Journal of Pharmacognosy**. 19(3), 755-758, 2009.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Quim. Nova**. 30, (2), 374-381, 2007

ITOKAWA, H.; TOTSUKA, N.; MORITA, H.; TAKEYA, K.; IITAKA, Y.; SCHENKEL, E. P.; MOTIDOME, M. New antitumor principles, casearins A-F, for *Casearia sylvestris* Sw. (Flacourtiaceae). **Chem. Pharm. Bull.** 38(12), 3384-3388, 1990.

KIM, H. K.; VERPOORTE, R. Sample Preparation for Plant Metabolomics. **Phytochem. Anal.** 21 (1), 4-13, 2010.

KIM, H. K.; CHOI, Y. H.; VERPOORTE, V. NMR-based plant metabolomics: where do we stand, where do we go? **Trends in Biotechnology**. 29 (6), 267-275, 2011.

LANE, T. E.; WU-HSIEH, B. A.; HOWARD, D. H. Gamma interferon cooperates with lipopolysaccharide to activate mouse splenic macrophages to an antihistoplasma state. **Infect Immun.** 61, 1468-1473, 1993.

LAWAL, U.; MEDIANI, A.; MAULIDIANI, H.; SHAARI, K.; ISMAIL, I. S.; KHATIB, A.; ABAS, A. F. Metabolite profiling of *Ipomoea aquatica* at different growth stages in correlation to the antioxidant and glucosidase inhibitory activities elucidated by ^1H NMR-based metabolomics. **Scientia Horticulturae**. 192, 400–408, 2015.

MAIA, R. M.; MOURA, C. W. N.; BISPO, V. S.; SANTOS, J. L. A.; SANTANA, R. S.; MATOS, H. R. Avaliação do sequestro do óxido nítrico (NO) pelo extrato metanólico da alga *Bryothamnion triquetrum* (Gmelin) Howe. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**. 20 (4), 489-493, 2010.

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. **Chem. Pharm. Bull.** 39(3), 693-697, 1991.

MOSMANN, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. **Journal of Immunological Methods**, 65, 55-63, 1983.

OSHIMA-FRANCO, Y.; ALVES, C. M. V.; ANDRÉO, 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). **J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis.** 11(4), 465-478, 2005.

PANERO, F. S.; VIEIRA, M. F. P.; CRUZ, Â. M. F.; MOURA, M. F. V.; SILVA, H. E. B. Aplicação da análise exploratória de dados na discriminação geográfica do quiabo do Rio Grande do Norte e Pernambuco. **Ecl. Quím.** 34(3), 33-40, 2009.

PATRA, B.; SCHLUTTENHOFER, C.; WU, Y.; PATTANAIK, S.; YUAN, L. Transcriptional regulation of secondary metabolite biosynthesis in plants. **Biochimica et Biophysica Acta**. 1829, 1236–1247, 2013.

RAJA, R.; SREENIVASULU, M. Medicinal plants secondary metabolites used in pharmaceutical importance-an overview. **World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**. 4, 437-447, 2015a.

RAJA, S.; ANUSHA, M. A review on phytoconstituent analysis by different analytical techniques. **Am. J. PharmTech Res.** 5(3), 12-56, 2015b.

SANTOS, A. G. A. **Identificação dos princípios ativos antiulcerogênicos das folhas de *Casearia sylvestris*: Contribuição para o desenvolvimento de um fitoterápico** [Tese de doutorado]. Araraquara: Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química, Departamento de Química Orgânica; 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. 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 Diversity**, 7, 205-215, 2010.

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

SILVA, S.L., Chaar, J., Damico, D.C.S., Figueiredo, P.M.S., Yano, T. Chemotherapeutic potential of two gallic acid derivative compounds from leaves of *Casearia sylvestris* Sw. (Flacourtiaceae). **European Journal of Pharmacology**. 608, 76-83, 2009.

SHEN, C.; CHANG, Y.; HOTS, L. Nuclear magnetic resonance studies of 5,7 – dihydroxyflavonoids. **Phytochemistry**. 37 (3), 843-845, 1993.

SLEUMER, H.O. Flacourtiaceae: flora neotropica; [monografia n° 22]. **New York: The New York Botanic Garden**. 499, 1980.

SOUZA, A. M.; POPPI, R. J. Experimento didático de quimiometria para análise exploratória de óleos vegetais comestíveis por espectroscopia no infravermelho médio e análise de componentes principais: um tutorial, parte I. **Quim. Nova**, 35(1), 223-229, 2012.

VERISSIMO, L. F.; BACCHI, A. D.; ZAMINELLI, T.; PAULA, G. H. O. E.; MOREIRA, E. G. Herbs of interest to the brazilian federal government: female reproductive and developmental toxicity studies. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**. 21(6), 1163-1171, 2011.

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

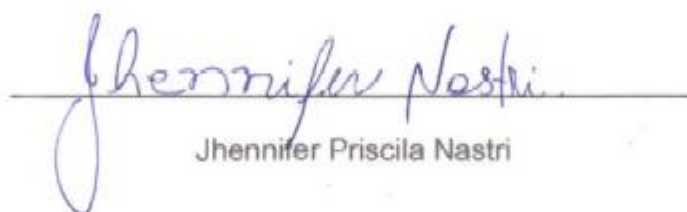
WANG, W.; ZHAO, J.; WANG, Y.; SMILLIE, T. A.; LI, X.; KHAN, I. A. Diterpenoids from *Casearia sylvestris*. **Planta Med**. 75, 1436-1441, 2009.

WINK, M. Medicinal plants: a source of anti-parasitic secondary metabolites. **Molecules**. 17, 12771-12791, 2012.

ZAIMA, K.; KOGA, I.; IWASAWA, N.; HOSOYA, T.; HIRASAWA, Y.; KANEDA, T.; ISMAIL, I. S.; LAJIS, N. J.; MORITA, H. Vasorelaxant activity of indole alkaloids from *Tabernaemontana Dichotoma*. **J Nat Med**. 67, 9–16, 2013.

ZHOU, M.; MCDONALD, J. F.; FERNÁNDEZ, F. M. Optimization of a Direct Analysis in Real Time/Time-of-Flight Mass Spectrometry Method for Rapid Serum Metabolomic Fingerprinting. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**. 21, 68, 2010.

Araraquara, 21 de Dezembro de 2016.


Jhennifer Priscila Nasti

De acordo com este trabalho de conclusão de curso,


Prof. Dr. Alberto José Cavaleiro
(Orientador)