



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Curso de Graduação Farmácia-Bioquímica

JANAINA CHAGAS UNGER

**Solventes Eutéticos Naturais Profundos como alternativa aos
solventes orgânicos na extração de terpenos bioativos de *Casearia
sylvestris* Swartz**

Araraquara, SP
2022

JANAINA CHAGAS UNGER

**Solventes Eutéticos Naturais Profundos como alternativa aos
solventes orgânicos na extração de terpenos bioativos de *Casearia
sylvestris* Swartz**

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

Orientador: Prof. Dr. André Gonzaga dos Santos

Coorientador: Dr. Fernando Bombarda Oda

Araraquara, SP

2022

Agradecimentos

Dirijo meus agradecimentos primeiramente à minha mãe, Liberti; e ao meu pai, Geraldo. Sem seu amor, sacrifício e incentivo, eu não teria me graduado como farmacêutica-bioquímica – uma profissão onde a humanidade, a garra e o amor pelo próximo são características essenciais.

Ao meu namorado Paulo, que me apoiou incondicionalmente e sempre me lembrou da importância da minha educação; mesmo nos momentos mais difíceis. Meu muito obrigada, por seu carinho e amor.

Aos meus irmãos, Igor, Juliana e seu namorado Lucas, que se fizeram essenciais para me ensinar os valores da partilha, humildade e carinho fraternal.

Agradeço igualmente ao meu padrasto, Alexandre, que nunca mediu esforços para me auxiliar, e sobretudo, por me iniciar na profissão farmacêutica.

Ao professor orientador André, por me iniciar na ciência de forma saudável, porém sempre me desafiando e instigando para que ciência de qualidade fosse desenvolvida. *“Professores brilhantes ensinam para uma profissão. Professores fascinantes ensinam para a vida”*, Augusto Cury.

Ao professor Cristiano, que mesmo de forma remota, foi extremamente solícito à todas as demandas e dúvidas.

Aos meus colegas do Laboratório de Farmacognosia – sobretudo Winner e Stéfany – que além do conhecimento compartilhado, me tiraram boas gargalhadas e muito me aconselharam, ultrapassando os limites da bancada e tocando minha vida. Agradeço também os técnicos de laboratório Caio e Mateus, que pacientemente guiaram meus passos no decorrer deste trabalho.

Às minhas amigas, verdadeiramente amigas – Maria Carolina, Eduarda, Anna Carolina, Priscila e Andressa – sem a presença de vocês a graduação seria mil vezes mais árdua.

À Margarete, cujo agradecimento é inefável. Serei eternamente grata, pois foi a única que esteve ao meu lado todos os dias ao final da graduação. Não há moeda ou valor que compre o amor de um animal de estimação.

Aos Deuses, que me trouxeram inspiração para encarar a vida da forma que ela deve ser vivida – com bravura, paixão e coragem.

Ao Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica da UNESP (PIBIC) pelo apoio financeiro.

Resumo

Os *Natural Deep Eutetic Solvents* (NADES), ou solventes eutéticos naturais profundos, são solventes alternativos utilizados na extração de metabólitos secundários de drogas vegetais, e atendem a diversos princípios da Química Verde. Considerando o papel já bem estabelecido dos NADES na extração de metabólitos secundários e sua relevância na Química Verde, a importância de *C. sylvestris* como planta medicinal amplamente utilizada como base de fitoterápicos e, ainda, a importante bioatividade apresentada pelos diterpenos típicos das folhas dessa espécie, neste trabalho foi avaliada a eficiência de extração destas substâncias utilizando o NADES lipofílico composto por mentol e cânfora, comparando com o extrato etanólico. A síntese de NADES foi realizada com agitação e aquecimento. A caracterização do NADES foi realizada por FTIR-ATR, e as análises cromatográficas foram realizadas através de CCD, HPLC-UV e HPLC-MS; um método de pré-tratamento para análise cromatográfica do extrato de NADES (extração em fase sólida em modo normal) foi desenvolvido para eliminação do mentol e cânfora e concentração dos analitos de interesse. O NADES mentol:cânfora 1:1 extraiu os diterpenos clerodânicos de *C. sylvestris*, conforme resultados das análises realizadas, sobretudo na análise dos espectros de massas gerado pelo HPLC-MS e CCD. Porém a comparação das áreas dos picos dos cromatogramas obtidos por HPLC-UV assim como a intensidade das bandas observadas em CCD sugerem que a extração com etanol foi mais eficiente.

Palavras-chave: *Natural Deep Eutetic Solvents*. *Casearia sylvestris*. Guaçatonga. Casearina.

Abstract

Natural Deep Eutetic Solvents (NADES), are alternative solvents used in the extraction of secondary metabolites from plant drugs, and meet several principles of Green Chemistry. Considering the well-established role of NADES in the extraction of secondary metabolites and its relevance in Green Chemistry, the importance of *C. sylvestris* as a medicinal plant widely used as a base for herbal medicines and, also, the important bioactivity presented by the diterpenes typical of the leaves of this species, in this work, the extraction efficiency of these substances was evaluated using the lipophilic NADES composed of menthol and camphor, comparing with the ethanolic extract. The synthesis of NADES was carried out with stirring and heating. The characterization of NADES was performed by FTIR-ATR, and the chromatographic analyzes were performed by CCD, HPLC-UV and HPLC-MS; a pretreatment method for chromatographic analysis of NADES extract (solid phase extraction in normal mode) was developed for elimination of menthol and camphor and concentration of the analytes of interest. The NADES menthol:camphor 1:1 extracted the clerodan diterpenes from *C. sylvestris*, according to the results of the performed analyses, especially in the analysis of the mass spectra generated by HPLC-MS and CCD. However, the comparison of the peak areas of the chromatograms obtained by HPLC-UV as well as the intensity of the bands observed in CCD suggest that the extraction with ethanol was more efficient.

Keywords: *Natural Deep Eutetic Solvents. Casearia sylvestris. Guaçatonga. Casearin.*

Lista de ilustrações e figuras

Figura 1. Nuvem eletrônica e estrutura do DL-mentol, doador da ligação de hidrogênio para formação do solvente eutético natural profundo	16
Figura 2. Nuvem eletrônica e estrutura da cânfora, aceptora da ligação de hidrogênio para formação do solvente eutético natural profundo.....	16
Figura 3. <i>Casearia sylvestris</i> Sw. (AGS 102) – Horto de Plantas Medicinais e Tóxicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, Araraquara.....	18
Figura 4. Ramo com folhas e inflorescências de <i>Casearia sylvestris</i> Sw. – Horto didático de plantas medicinais do HU/CCS, UFSC, Florianópolis.....	19
Figura 5. Resumo dos procedimentos em fluxograma	23
Figura 6. Fluxograma representativo da origem das amostras FH ₁ , 1, FH ₂ e 2.....	25
Figura 7. Fluxograma representativo da origem das amostras FH ₃ , 3, FH ₄ e 4.....	26
Figura 8. Fluxograma representativo da origem das amostras 5 e 6.....	27
Figura 9. Diagrama binário de fases do NADES composto por mentol e cânfora.....	29
Figura 10. Espectro de absorção no IV da mistura eutética mentol: cânfora na proporção molar 1:1.....	30
Figura 11. Espectro de absorção no IV do mentol.....	31
Figura 12. Espectro de absorção no IV da cânfora.....	31
Figura 13. Cromatogramas obtidos por HPLC-UV referente à análise da fração acetato de etila do extrato de NADES (amostra 1), fração heptânica do extrato etanólico (amostra FH ₃), fração acetato de etila do extrato etanólico (amostra 3) e fração metanol: água 98:02 do extrato etanólico (amostra 5). Condições de análise: coluna de C18 (250 x 4,6 mm; 5 µm); fase móvel em gradiente linear de metanol:acetonitrila:água 22:44:34 (v/v) para 47:53:00 em 42 min e, 5 min isocraticamente em 47:53:00; vazão de 0,8 mL/min; o volume de injeção de 20 µL; comprimentos de onda em 235 nm e 254 nm (apêndice 9)	34

Figura 14 (A e B): Cromatogramas obtidos por HPLC-MS referente à análise da fração acetato de etila do extrato etanólico (amostra 8) - (A): *Total Ion Chromatogram* (TIC) – scan 350 a 600 Da; (B): SIR. Condições de análise: coluna de C18 (250 x 4,6 mm; 5 µm); fase móvel em gradiente linear de metanol:acetonitrila:água (0,1% ácido fórmico) 22:44:34 (v/v) para 47:53:00 em 42 min e, 5 min isocraticamente em 47:53:00; vazão de 0,8 mL/min; o volume de injeção de 20 µL.....36

Figura 15. Cromatoplaça referente à análise das frações do extrato etanólico. Condições de análise: sílica gel; hexano:acetato de etila:isopropanol 60:37:03 (v/v); revelação com anisaldeído sulfúrico. Amostras: 7 e 9 – Frações heptânicas (replicatas). 8 e 10 – Frações de acetato de etila (replicatas). 11 e 12 – Produtos do pré-tratamento em fase sólida (modo reverso) (replicatas). F - caseargrewiina F. J - casearina J. O – casearina O e X – casearina X.....39

Figura 16. Cromatoplaça referente à análise das frações do extrato de NADES. Condições de análise: sílica gel; hexano:acetato de etila:isopropanol 60:37:03 (v/v); revelação com anisaldeído sulfúrico. Amostras: 1 e 2: Frações acetato de etila (replicatas). FH₁ e FH₂ – Frações heptânicas (replicatas).....40

Lista de Tabelas

Tabela 1: Dados obtidos na análise por HPLC-MS da amostra 3.....36

Tabela 1. Dados obtidos na análise por HPLC-MS da amostra 1.....37

Lista de Abreviaturas e Siglas

CCD: cromatografia em camada delgada

DES: *Deep Eutetic Solvent* (Solvente eutético profundo)

DL₅₀: dose mínima letal 50 %

DNA: *Desoxyribonucleic Acid* (Ácido Desoxirribonucleico)

EFS: Extração em fase sólida

FH₇: Fração heptânica do extrato de NADES (amostra 7)

FH₈: Fração heptânica do extrato de NADES (amostra 8)

FTIR-ATR: Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier no modo de reflexão total atenuada

HBA: *Hydrogen Bond Acceptor* (Aceptor da ligação de hidrogênio)

HBD: *Hydrogen Bond Donor* (Doador da ligação de hidrogênio)

HPLC-MS: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Espectrometria de Massas

HPLC-UV: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a detector de ultravioleta

IUPAC: *International Union of Pure and Applied Chemistry* (União Internacional de Química Pura e Aplicada)

IV: Infravermelho

LC-PDA/UV: Cromatografia Líquida - Detector de Arranjo de Diodos

NADES: *Natural Deep Eutetic Solvents* (Solventes Eutéticos Naturais Profundos)

PVDF: Fluoreto de polivinildieno

R_f: fator de retenção

RNA: *Ribonucleic Acid* (Ácido Ribonucleico)

SIR: *Single Ion Recording*

THEDES: *Therapeutical Deep Eutetic Solvents* (Solventes eutéticos profundos terapêuticos)

TIC: *Total Ion Current*

t_R : tempo de retenção

Sumário

1	Introdução	13
2	Objetivos	21
3	Materiais e métodos.....	21
3.1	Materiais, equipamentos e acessórios	21
3.2	Métodos.....	23
3.2.1	Síntese do NADES	23
3.2.2	Caracterização do NADES por FTIR-ATR	24
3.2.3	Testes de solubilidade dos NADES na fase móvel para análise por HPLC	24
3.2.4	Extração com NADES e com etanol	24
3.2.5	Pré-tratamento para análises cromatográficas por extração de fase sólida em modo normal do extrato de NADES e extrato etanólico.....	24
3.2.6	Pré-tratamento para análises cromatográficas por extração de fase sólida em modo reverso do extrato etanólico.....	26
3.2.7	Análises por HPLC-UV e HPLC-MS	27
3.2.8	Análises por cromatografia em camada delgada.....	27
4	Resultados e discussão	28
4.1	Síntese do NADES.....	28
4.2	Caracterização do NADES por FTIR-ATR	29
4.3	Testes de solubilidade dos NADES em fase móvel	32
4.4	Extração	32
4.5	Pré-tratamento dos extratos para análises cromatográficas	32
4.6	Análises por HPLC-UV.....	33
4.7	Análise por HPLC-MS	35
4.8	Cromatografia em camada delgada	37
5	Conclusão	41
	Referências	43
	Apêndices.....	47

1 Introdução

A química é um dos pilares do desenvolvimento moderno. Por se tratar de uma ciência dedicada a conhecer e manipular elementos, desenvolver substâncias e aplicá-los em situações práticas, é a ferramenta protagonista da humanidade em busca de desenvolvimento, conhecimento e tentativa de controle das leis naturais.

Seu enorme papel no desenvolvimento humano e tecnológico foi refletido também, impreterivelmente, no plano ambiental. O uso e emissão ambiental de substâncias tóxicas, e a exploração de fontes não-renováveis são terríveis inconvenientes que devem ser, no mínimo, reduzidos.

A partir da década de 90, com o crescente avanço das indústrias químicas e farmoquímicas, o volume de ensaios e testes na área acadêmica e a ascendente preocupação com o clima e meio ambiente, autoridades científicas de renome mundial foram obrigadas a tomar medidas para reduzir os danos sem que a produtividade e lucro fossem prejudicados. A única alternativa possível seria então realizar todas as modificações necessárias e tangíveis para tornar os processos químicos amigáveis ao meio ambiente, e essas ações a IUPAC reconhece como “*Green Chemistry*” (PRADO, 2003)

Anastas e Warner (1998) desenvolveram os “12 Princípios da Química Verde”, que devem ser seguidos por indústrias químicas, laboratórios de ensino e pesquisa que desejam ser “verdes”. De forma geral, os produtos utilizados devem ser oriundos de fontes renováveis ou recicláveis; os processos devem possuir eficiência energética alta e otimizada, envolvendo menor gasto de energia para produzir quantidade igual ou superior à anteriormente produzida; e quando se trata de substâncias envolvidas tais como solventes, deve-se evitar aqueles que são tóxicos, mutagênicos, carcinogênicos e permeantes de mucosas, voláteis, inflamáveis e explosivos, poluentes, impactantes da camada de ozônio, pouco biodegradáveis, biocumulativos e que sejam obtidos ou envolvam adjuvantes de fontes não renováveis (BUBALO et al., 2018; CHEMAT et al., 2012).

Dos 12 princípios, a extração de componentes vegetais utilizando NADES atende à 4:

- “Solventes e Auxiliares mais seguros”: Os NADES são biocompatíveis, biodegradáveis e pouco tóxicos;
- “Busca pela Eficiência de Energia”: Mesmo que a extração envolva emprego de energia térmica, seu uso é minimizado e pequeno, gerando baixo impacto econômico e ambiental.
- “Uso de Fontes Renováveis de Matéria-Prima”: Os componentes de partida, mentol e cânfora, são extraídos de plantas e facilmente sintetizados.
- “Química Intrinsecamente Segura para a Prevenção de Acidentes”: Dada a natureza e características físico-químicas dos NADES, e as técnicas empregadas no processo sintético, o risco de acidentes é nulo. (LERNARDÃO, 2003; DURAND, 2016)

Vale ressaltar que os demais princípios não se aplicam pois se referem a rotas sintéticas e formação de subprodutos.

Os *Deep Eutectic Solvents* (DES) ou Solventes Eutéticos Profundos, sugeridos por Abbot et al. (2003), surgem como alternativa verde aos solventes tradicionalmente utilizados. Consistem na união de duas substâncias, sendo uma delas a doadora de ligação de hidrogênio (HBD), e a outra, a aceptora (HBA). Por ocorrerem ligações de hidrogênio e a consequente deslocalização de cargas, os pontos de fusão finais são reduzidos em relação aos pontos de fusão dos componentes isolados, gerando como produtos líquidos à temperatura ambiente. Além das ligações de hidrogênio, estão presentes interações de Van der Waals, que conferem alta viscosidade ao solvente. (SEKHARAN, 2021)

Os *Natural Deep Eutetic Solvents* (NADES) ou Solventes Eutéticos Naturais Profundos são um subgrupo dos DES, neste caso as substâncias de partida são de origem natural, mais usualmente metabólitos primários de plantas. Apresentam características importantes para o atendimento dos princípios da Química Verde: baixa volatilidade em temperatura ambiente; baixa toxicidade; viscosidade ajustável; alta biodegradabilidade; seletividade química ajustável através de alterações nas proporções molares, permitindo a seleção de grupos de substâncias a serem extraídos; além de apresentarem menor custo e se caracterizarem pelo baixo gasto energético para produzir extratos (ZHANG et al., 2012; TANG et al., 2015; ZAINAL-ABIDIN et al., 2017).

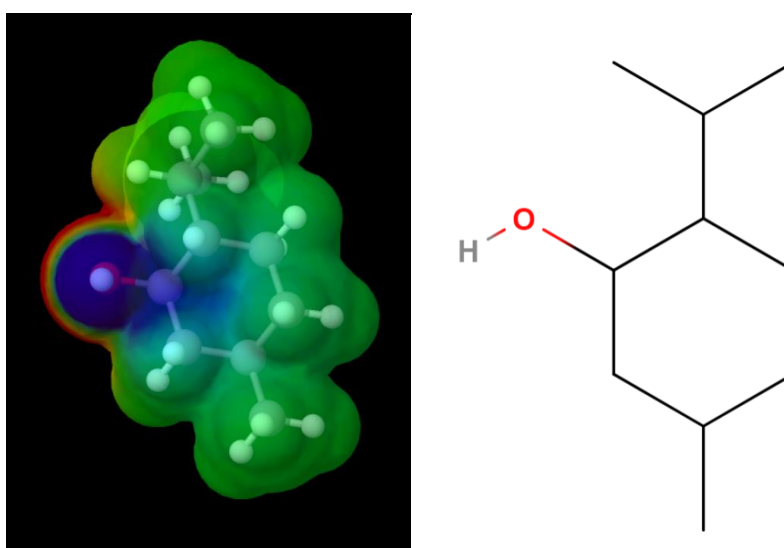
A maioria dos metabólitos primários e secundários das plantas possui baixa solubilidade em água. Quando a água disponível nas estruturas vegetais atinge a quantidade de 50% (como em períodos de estiagem), os metabólitos até então insolúveis são capazes de interagir, tornar-se líquidos e formar NADES nas partes internas da planta, garantindo a integridade estrutural, funcionalidade superior de enzimas, manutenção do balanço osmótico e até mesmo preservação do DNA, RNA e proteínas. Além disso, os NADES têm sido considerados uma terceira fase líquida nas estruturas vegetais, estocando e solubilizando compostos pouco solúveis em água; a maioria metabólitos secundários, tarefa que água e lipídeos são incapazes de realizar. É uma hipótese fantástica a que os NADES sejam, portanto, essenciais para a sobrevivência das plantas em períodos de extremo estresse. O pouco de água disponível restante interage com os NADES, mantendo as enzimas estáveis, porém inativas. Quando a concentração de água no meio aumenta, as enzimas podem se reativar e desempenhar seu papel normalmente (RAMON e GUILLENA, 2019)

Os metabólitos formadores de NADES mais comuns estão presentes em nossa dieta diariamente e são biocompatíveis: colina, aminas, açúcares, poliálcoois, aminoácidos e ácidos carboxílicos (ZAINAL-ABIDIN et al., 2017) e, em geral, apresentam baixa toxicidade. Desta forma, os extratos vegetais produzidos com NADES podem ser incorporados em formas farmacêuticas sem que haja preocupação com contaminação e/ou intoxicação pelo solvente utilizado. A baixa volatilidade se mostra como um empecilho na produção de extratos vegetais, pois não permite a separação soluto-solvente. No entanto, se os NADES empregados forem produto de componentes utilizados como aditivos alimentares, como colina e lisina, a separação não é necessária – sendo até mesmo vantajosa – atribuindo valor nutricional e/ou terapêutico adicional ao extrato (RUESGAS-RAMON et al., 2017). Possuem interessantes características físico-químicas, como baixíssima volatilidade, viscosidade ajustável, alta capacidade de solubilização de diferentes substâncias – onde pode-se ajustar a formulação do NADES para solubilização de grupos moleculares específicos, além de serem menos custosos e se caracterizam pelo baixo gasto energético necessário para produzir o extrato (ZHANG et al., 2012).

O NADES selecionado para este trabalho foi desenvolvido a partir de mentol e cânfora, na proporção molar de 1:1. De caráter hidrofóbico, este NADES têm viscosidade de aproximadamente 13.000 mpa.s e pH de 5,6. A cânfora ($C_{10}H_{16}O$)

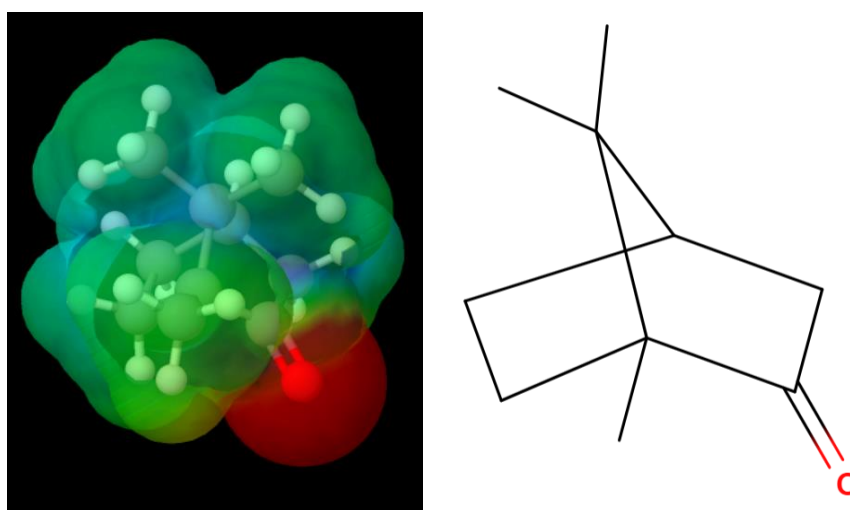
(figura 2) é uma cetona alicíclica de massa molar correspondente a 152,23 g/mol. O oxigênio do grupo cetona atrai para si os elétrons π , conferindo carga parcial negativa ao átomo, e é, portanto, aceitor da ligação de hidrogênio (HBA). O DL-mentol ($C_{10}H_{20}O$) (figura 1) é um álcool secundário alicíclico de massa molar 156,23g/mol, que atua como doador da ligação de hidrogênio (HBD) (SEKHARAN, 2021; HANSEN, 2021).

Figura 1. Nuvem eletrônica e estrutura do DL-mentol, doador da ligação de hidrogênio para formação do solvente eutético natural profundo.



Fonte: MolView, 2022

Figura 2. Nuvem eletrônica e estrutura da cânfora, aceptora da ligação de hidrogênio para formação do solvente eutético natural profundo.



Fonte: MolView, 2022

Casearia sylvestris Swartz foi descrita pelo botânico sueco Olof Peter Swartz em 1797 na obra *Flora Indiae Occidentalis*, fruto de uma expedição exploratória na Jamaica, Cuba e Haiti. À época foi classificada na extinta família *Flacourtiaceae*, e atualmente pertence à família *Salicaceae* (ABSY, 1973). Possui diversos nomes populares, como erva-de-lagarto, chá-de-bugre, cafezeiro-do-mato, língua-de-tiú, apiá-acanoçu, bugre-branco, guaçatunga, petumba, vassitonga, verre-forno; sendo o mais comum em nossa região a denominação guaçatunga. Se trata de uma planta de porte arbustivo-arbóreo, podendo atingir de 1,5 m a 20 m de altura. A casca tem coloração parda acinzentada e textura rugosa. O tronco é de coloração palha medindo de 20-30 cm de diâmetro, e as folhas atingem entre (3)6–14 cm de comprimento por (1)2–3,2(4,2)5,0 cm de largura; são simples e pecioladas, de ápice acuminado, com pecíolo de 0,5 a 0,6 cm de comprimento; as bordas são serrilhadas e por vezes onduladas, dispostas de forma alternada e dística e possuem numerosas cavidades secretoras esquizógenas contendo óleo essencial. As flores são pequenas, actinomorfas e esverdeadas, tendo 3 mm de diâmetro e se condensam em inflorescências que surgem nos meses de junho a março, em grupos de 24-40 flores na região axilar. As flores geram frutos globulosos e ovoides de epicarpo marrom esverdeado e mesocarpo alaranjado a avermelhado, portadores de 1–4(7) sementes de cápsula avermelhada com arilo amarelado e pegajoso (ABSY, 1973; KLEIN; SLEUMER, 1984; TORRES; YAMAMOTO, 1986; IMATOMI, 2009). Está distribuída em pelo menos 22 estados brasileiros (MARQUETE, 2001).

Figura 3. *Casearia sylvestris* Sw. (AGS 102) – Horto de Plantas Medicinais e Tóxicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, Araraquara.



Fonte: Carvalho, 2015

Figura 4. Ramo com folhas e inflorescências de *Casearia sylvestris* Sw. – Horto didático de plantas medicinais do HU/CCS, UFSC, Florianópolis.



Fonte: UFSC, 2020

Seu uso popular é documentado desde 1877 como antiofídico (CAMINHOÁ, 1877). Corrêa (1931) descreveu a ação antitérmica do decocto da casca e das folhas. Em 1939, Hoehne relatou atividade cicatrizante, anestésica e antisséptica de feridas, além de possuir ação estomáquica, auxiliando na digestão, e antitérmica. Em 1958, Coimbra relatou atividade febrífuga, depurativa de diferentes formas farmacêuticas e como benéfica quando usada em feridas sifilíticas, eczemas e úlceras; na forma de decocto. Atualmente é empregada na medicina tradicional como cicatrizante, antitérmica, depurativa, antiulcerosa, antirreumática, antidiarreica, anti-inflamatória, no tratamento de doenças de pele, antiofídica e como anestésico tópico (FERREIRA et al., 2011).

As atividades farmacológicas dos extratos etanólico e hidroetanólico 70% de guaçatonga incluem atividade antiulcerogênica, confirmada por Santos (2008) ao avaliar esta atividade pelas casearinas F, B, D, H e X (diterpenos clerodânicos) em

lesões estomacais induzidas pelo etanol em ratos, antiofídica, cicatrizante e anti-inflamatória, sendo esta última atribuída à caseargrewiina F e casearina B (PIERRI et al., 2017). O óleo essencial das folhas também demonstrou atividade anti-inflamatória e antiulcerogênica (FERREIRA et al., 2011). A infusão das folhas como preparação extemporânea é auxiliar nos sintomas dispépticos e seu uso está descrito desde 2011 no Formulário Nacional de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira (BRASIL, 2011).

Sua ampla distribuição no país acarreta a variabilidade morfológica, anatômica e química. A variedade utilizada nesta pesquisa é a *C. sylvestris* var. *sylvestris*, predominante na Mata-Atlântica, que apresenta maior teor de diterpenos clerodânicos.

As classes de substâncias encontradas em *C. sylvestris* são monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos; *nor*-isoprenoides, triterpenos, ácido cafeico, ácido clorogênico, ácido vanílico, lapachol, flavonoides, neolignanas, ésteres derivados do ácido gálico e derivados do ácido elágico. São encontrados 41 diterpenos clerodânicos em *C. sylvestris*, onde 27 são do tipo casearinas: casearinas A-X, e caseargrewiina F, isolados de folhas; e casearvestrinas A-C, isoladas de folhas e ramos. Além disso, foram identificados em extratos etanólicos e hidroetanólicos das folhas de *C. sylvestris* outros diterpenos clerodânicos menos complexos estruturalmente, como o ácido hardwickiico e a 15-hidróxi-3-cleroden-2-ona, (SANTOS et al., 2007), além de diterpenos *ent*-kauranos. Alguns trabalhos demonstram que essa classe de substâncias é responsável pelas principais atividades farmacológicas dessa espécie (SANTOS, 2008; PIERRI et al., 2017; FERREIRA et al., 2011; 2014; XIA et al., 2015).

Os dados da literatura sugerem que os extratos das folhas de *C. sylvestris* possuem baixa toxicidade. Além de vários outros exemplos, a DL₅₀ do extrato etanólico 75% é 32 vezes maior do que a dose necessária para se atingir o efeito antiulceroso, 57,5 mg/kg por via oral. A DL₅₀ do óleo essencial foi 10 vezes maior do que a dose necessária para que se atinja esta atividade específica, que é 110 mg/kg por via oral (BASILE et al., 1990; ESTEVES et al., 2005). No entanto, não há estudos para extratos com NADES, havendo necessidade de aprofundamento da avaliação toxicológica deste extrato.

Em contraste com o potencial poluente e danoso à saúde dos solventes orgânicos mais comumente utilizados para extrações vegetais, os NADES atendem

aos princípios da Química Verde e são biocompatíveis. Adicionalmente, têm tido êxito na extração de metabólitos secundários bioativos, mostrando até mesmo eficiência superior às extrações de terpenoides com solventes convencionais (KŘÍŽEK et al., 2018). Tendo em vista a importância de *C. sylvestris* como planta medicinal amplamente usada em fitoterápicos, é de suma importância comparar a seletividade e eficiência da extração de casearinas com o NADES lipofílico composto por mentol e cânfora, tendo o extrato etanólico como referência para comparação.

2 Objetivos

Comparar a seletividade na extração de casearinas das folhas de *C. sylvestris* utilizando NADES lipofílicos e a extração etanólica convencional como referência.

2.1 Objetivos Específicos

- a) Sintetizar NADES composto por mentol e cânfora na proporção molar 1:1;
- b) Realizar extração de diterpenos e sesquiterpenos utilizando NADES como solvente;
- c) Avaliar a extração com NADES, empregando planejamento experimental, e comparar a seletividade na extração de diterpenos e sesquiterpenos com a extração convencional com etanol; através de análises cromatográficas.

3 Materiais e métodos

3.1 Materiais, equipamentos e acessórios

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

Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência acoplado a detector UV/Vis - HPLC-UV Shimadzu®: bomba binária LC-6AD, desgaseificador, injetor manual Rheodyne de 6 pórticos com loop de 2.000 µL, detector UV/VIS de comprimento de onda variável SPD-M20A, módulo gerenciador do cromatógrafo CBM-20A e software LC solution® versão 1.25 SP4.

Barra magnética

Coluna cromatográfica para CLAE: Thermo Scientific® C18 (250 x4,6 mm; 5 µm)

Cromatografia em camada delgada: placas em alumínio cobertas com sílica gel (Sigma-Aldrich®, 20 x 20 cm, 15-40 µm, 0,25 mm).

Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência acoplado a espectrômetro de massas - HPLC-MS Alliance Waters®: bomba quaternária, desgaseificador, injetor automático, acoplado com detector quadrupolo através de fonte de ionização do tipo electrospray (QDa, Waters®).

Droga vegetal – Folhas de *C. sylvestris* pulverizadas.

Espectrofotômetro no IV: Bruker®, modelo IV-FT, modelo Tensor 27 – Platinum ATR. Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier no modo de reflexão total atenuada

Estufa de secagem: Fanem®, modelo 315 SE

Fase estacionária utilizada em EFS: Sílica gel Fluka Sigma-Aldrich®, 63-200 µm; 60 Å e algodão, filtro de membrana 0,22 µm

Filtro de membrana: 0,22 µm, PVDF Millipore®

Papel alumínio

Papel de filtro

Pipetadora automática: Rontgai®, e ponteiras

Placa Aquecedora com agitação magnética: Tecnal®, modelo TE-0851

Solventes e reagentes

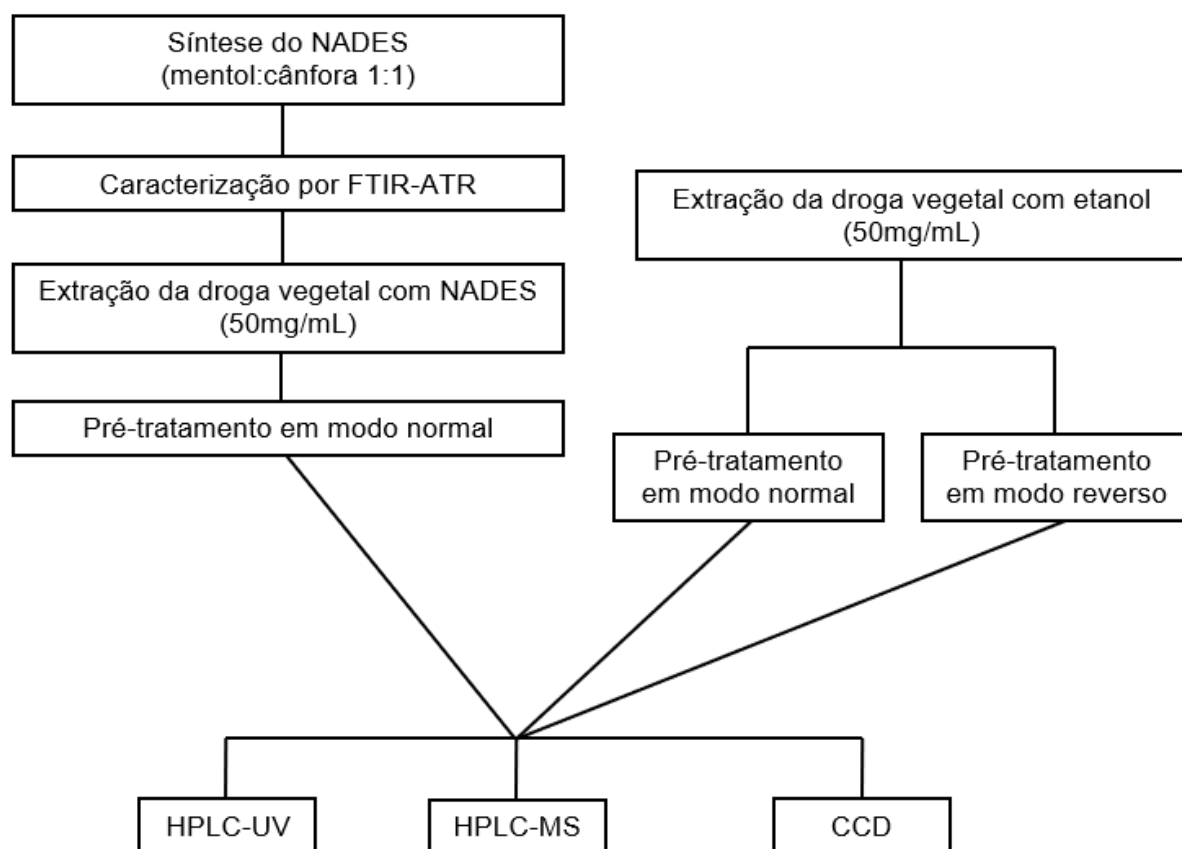
- a) **Água deionizada:** obtida em sistema purificador de água Gehaka® modelo DG300.
- b) **Água ultrapura:** Merck Millipore®, obtida em modelo Direct® – Q 3 UV.
- c) **Solventes grau cromatográfico:** Acetato de etila, acetonitrila, ácido acético glacial, ácido fórmico, ácido sulfúrico, álcool etílico, álcool metílico, anisaldeído, heptano, isopropanol ACS LS Chemicals®, J.T. Baker®
- d) **Sólidos para formar NADES:** Cânfora PA (teor > 96%) Êxodo Científica® e mentol PA (teor 99%) Dinâmica®

Ultrassom: Unique®, modelo USC – 2800, frequência 40 KHz.

Vidrarias: Cuba cromatográfica e tampa, funil, béqueres, gral e pistilo, borrifador de vidro, pipeta de Pasteur, seringa, seringa injetora de 20 µL, bagueta, vials, tubos de ensaio, termômetro.

3.2 Métodos

Figura 5. Resumo dos procedimentos em fluxograma



3.2.1 Síntese do NADES

Para síntese do solvente eutético natural profundo, foi pesada massa equivalente a 0,07 mol de mentol (10,9389g) e 0,07 mol de cânfora (10,6561g). Os sólidos foram transferidos para gral e foram triturados com pistilo. O líquido resultante foi transferido para um béquer de 100 mL, juntamente a barra magnética e o recipiente foi fechado com papel alumínio. O béquer foi posicionado no agitador magnético, e o equipamento foi acionado para atingir nível 03 de agitação e 30% de aquecimento. Durante a agitação, a temperatura foi aferida eventualmente com termômetro de mercúrio para evitar aquecimento acima dos 80°C, mantendo-se esta configuração por 10 minutos. Procedimento realizado em duplicata (ORTEGA-ZAMORA, 2020; RIBEIRO, 2015; DE LOS ÁNGELES FERNÁNDEZ, 2018; ŞAHIN, 2020; SANTANA, 2019).

3.2.2 Caracterização do NADES por FTIR-ATR

A formação de ligação de hidrogênio, comprovando a execução correta da metodologia de síntese do NADES foi investigada utilizando o método de Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier no modo de reflexão total atenuada (FTIR-ATR). Foram aplicadas quantidades suficientes para análise, do mentol e cânfora no estado sólido e do NADES em estado líquido. Os espectros de IV-FT foram obtidos no modo de reflexão atenuada (ATR), na faixa de 4000-500 cm^{-1} , com 64 varreduras e resolução de 4 cm^{-1} em espectrofotômetro Alpha Platinum ATR Brucker®, utilizando o programa OriginPro 9 SR2 para o tratamento dos dados.

3.2.3 Testes de solubilidade dos NADES na fase móvel para análise por HPLC

Antes de seguir com análise em HPLC, a solubilidade do NADES em fase móvel proposta para a análise de casearinas em HPLC-UV e HPLC-MS foi testada. Para isso, foram adicionados álcool metílico, acetonitrila e água ultrapurificada nas proporções 22:44:34 (v/v) em um béquer. Em tubos de ensaio, foi adicionado volume de NADES e fase móvel que respeessem as proporções 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7 e 1:8.

3.2.4 Extração com NADES e com etanol

Para extrair os componentes da droga vegetal, foi pesada uma massa de 500 mg da droga vegetal pulverizada e, em béquer, a droga vegetal entrou em contato com 10 mL do solvente, NADES e etanol absoluto separados, respeitando a concentração de 50 mg/mL. As misturas foram agitadas brevemente, e sonicadas por 10 min em banho ultrassônico com água aquecida a 40°C, constantemente aferida por termômetro. Depois, foi realizada a filtração em papel de filtro convencional. Processo realizado em duplicata (adaptação de KŘÍŽEK et al., 2018).

3.2.5 Pré-tratamento para análises cromatográficas por extração de fase sólida em modo normal do extrato de NADES e extrato etanólico

O pré-tratamento da amostra foi realizado adicionando-se camada fina de algodão, cartucho de 1,5 cm de sílica gel 60 e outra camada fina de algodão, como fase estacionária. A coluna foi ativada e condicionada com 2 mL de heptano, e 1 mL

do extrato de NADES “1” foi eluído através da coluna. Foram eluídos então 4 mL de heptano, e com o sistema adaptado de pressurização, a fração heptânica foi coletada em béquer, gerando a amostra “FH₁”. Posteriormente, adicionou-se 4 mL de acetato de etila, que foi eluído através da coluna, gerando a fase acetato de etila, amostra “1”. O mesmo procedimento foi realizado com o extrato de NADES “2” (duplicata), gerando a fase heptânica “amostra FH₂” e a fase de acetato de etila “amostra 2”. Todas as amostras secaram em capela de exaustão e foram reservadas.

Procedimento idêntico foi realizado com o extrato etanólico (EtOH), onde o extrato “1” foi eluído através da coluna, gerando as amostras “FH₃” (fração heptânica) e “3” (fração acetato de etila). Na replicata extrato “2”, foram coletadas as frações FH₄ e 4, heptânica e de acetato de etila, respectivamente.

Figura 6. Fluxograma representativo da origem das amostras FH₁, 1, FH₂ e 2.

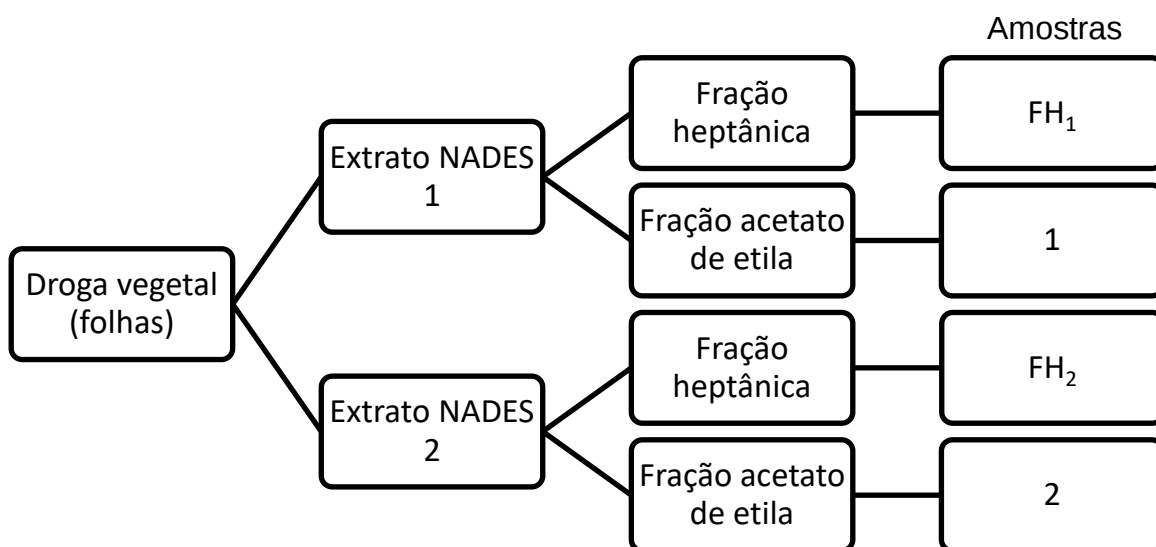
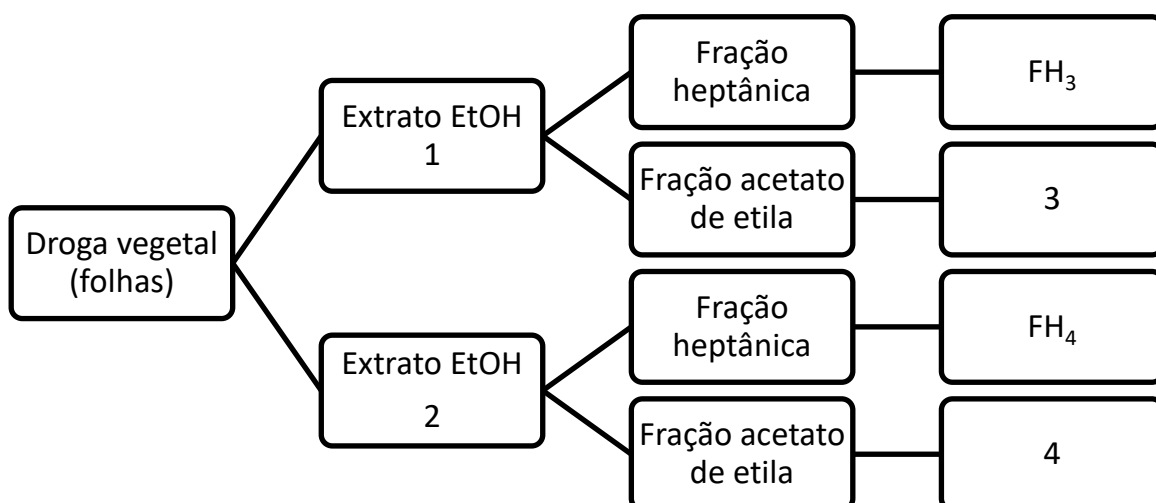


Figura 7. Fluxograma representativo da origem das amostras FH₃, 3, FH₄ e 4.

Amostras

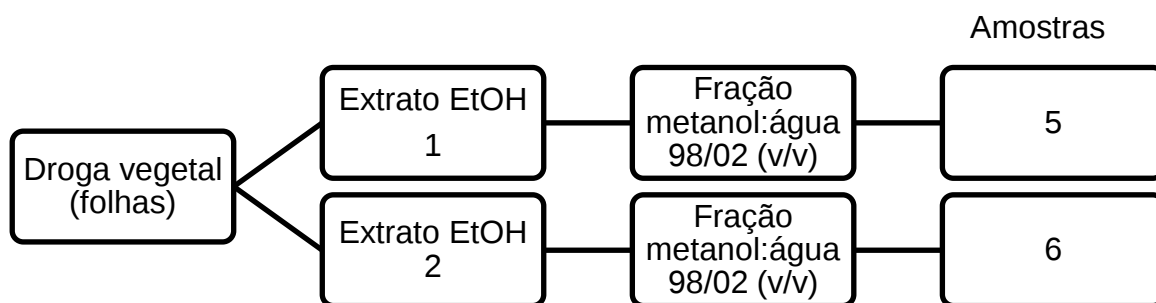


As frações resultantes das extrações em fase sólida, após eliminação dos solventes, foram solubilizadas em 0,5 mL de metanol 80%, filtradas em membrana PVDF de 0,22 μm e armazenadas em *vials* numerados como 1, 2, 7, 8, 9, 10, 11 e 12. As massas dos extratos secos foram de aproximadamente 9 mg, gerando concentração de 18 mg/mL.

3.2.6 Pré-tratamento para análises cromatográficas por extração de fase sólida em modo reverso do extrato etanólico

O pré-tratamento foi realizado utilizando-se seringa e cartucho de sílica C18 com 500 mg. O cartucho foi ativado com 5,0 mL de metanol e condicionado com o eluente metanol:água 98:02 (v/v). O extrato seco foi solubilizado em 1 mL do eluente, que foi eluído através da coluna. Mais 4,0 mL de eluente foi adicionado à coluna, gerando a amostra “5”. O procedimento foi repetido, gerando a amostra “6” (duplicata). As amostras foram secas em capela de exaustão (SANTOS, 2008).

Figura 8. Fluxograma representativo da origem das amostras 5 e 6



O conteúdo seco dos béqueres resultantes dos pré-tratamentos foi solubilizado em 0,5 mL de metanol 80%, filtrado em membrana PVDF 0,22 µm e armazenado em vials.

3.2.7 Análises por HPLC-UV e HPLC-MS

A análise em HPLC-UV foi realizada segundo PIERRI et al. (2017). As condições cromatográficas foram as seguintes: coluna de C18 (250 x 4,6 mm; 5 µm), e fase móvel em gradiente linear de metanol:acetonitrila:água 22:44:34 (v/v) para 47:53:00 em 42 min e, nos últimos 5 min isocraticamente em 47:53:00. A vazão foi de 0,8 mL/min, o volume de injeção foi de 20 µL e a leitura ocorreu a 235 e 254 nm.

Para as análises por HPLC-MS do extrato etanólico, foi adicionado 0,1% de ácido fórmico na fase móvel acima descrita para a ionização das substâncias. No caso da análise do extrato de NADES a condição de fase móvel empregada foi gradiente linear de acetonitrila: água 55:45 (v/v) para acetonitrila em 42 min e, nos últimos 5 min isocraticamente com acetonitrila; também foi adicionado 0,1% de ácido fórmico na fase móvel. Os parâmetros de operação utilizados na fonte de ionização ESI foram: voltagem do capilar: 1,5 kV, voltagem do cone: 5 V, temperatura da fonte ESI (modo positivo): 150 °C, temperatura de dessolvatação do gás N₂: 350 °C, vazão do gás de dessolvatação: 600 L/h. A faixa de massas usada no modo de análise full-scan foi de 300 a 700 unidades de massa; foram selecionadas massas específicas relatadas na literatura para casearinas de [M+H]⁺, [M+Na]⁺ e [M+K]⁺ (Danuello et al., 2020). O equipamento foi controlado pelo programa Empower 3 (Waters® Corporation) no qual foram feitas a aquisição e análise de dados.

3.2.8 Análises por cromatografia em camada delgada

A cromatografia em camada delgada foi realizada em duas cromatoplas, uma para as amostras pré-tratadas dos extratos de NADES e outra para as amostras pré-

tratadas dos extratos etanólicos e os padrões caseargrewiina F e casearinas J, O e X, também etanólicos obtidos por Oda (2021) e Carvalho (2015). Nas placas foi delimitado com lápis a altura de 1 cm para os pontos de aplicação, com distância de 1,0 cm entre as amostras e padrões. Foram aplicados 40 µL de amostra, e assim que completamente secas, as cromatoplasas foram inseridas em cuba saturada por 60 min, preenchida com 1 cm de fase móvel, composta por hexano:acetato de etila:isopropanol 60:37:03 (v/v) (Muta, 2017). A distância eluída foi de 16, na cromatoplasa para NADES e 17 cm na cromatoplasa para amostras etanólicas. A revelação foi realizada após a eluição da fase móvel através da cromatoplasa e sua completa secagem, borrifando solução de anisaldeído sulfúrico previamente preparada, na proporção de anisaldeído:ácido acético:metanol:ácido sulfúrico 0,5:10:85:5, e após breve secagem, a cromatoplasa foi acondicionada em estufa de revelação por 10 min a 110°C.

4 Resultados e discussão

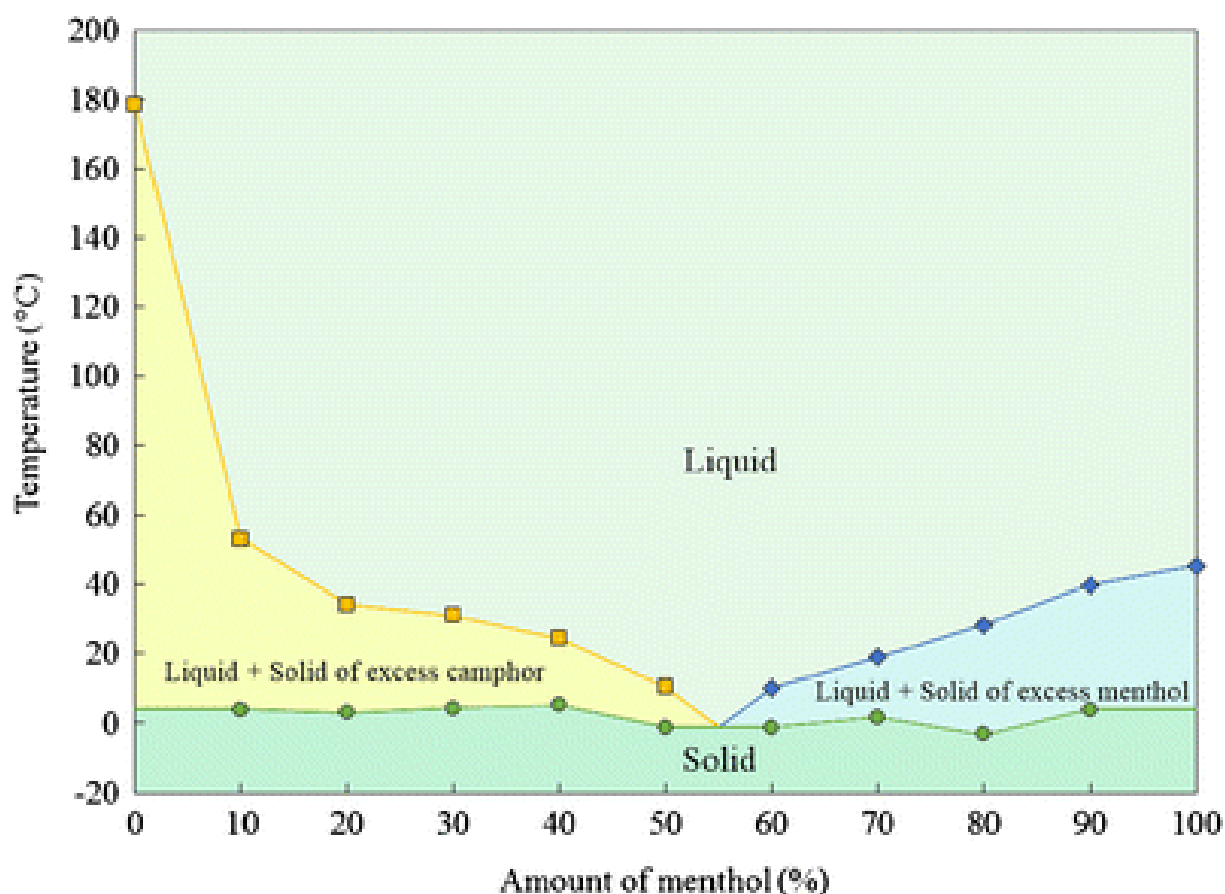
4.1 Síntese do NADES

Para que as substâncias precursoras interajam entre si através de ligações de hidrogênio, interações dipolo-dipolo e interações van der Waals, é necessário que se aplique energia no sistema. Em 2019, Santana e colaboradores (Santana et al., 2019) avaliaram a eficiência de três diferentes métodos de síntese de NADES – aquecimento e agitação, método descrito por Dai et al. (2013), síntese assistida por ultrassom e síntese assistida por micro-ondas, obtendo resultados idênticos nas caracterizações por FT-IR. Dessa forma, foi escolhida a síntese por meio de aquecimento e agitação, por ser mais simples e acessível.

É consolidado na literatura que os NADES são líquidos límpidos estáveis à temperatura ambiente, não sendo possível ou interessante armazenamento sob refrigeração, pois além de ir à contramão dos princípios da química verde pois o ideal é gerar processos com o mínimo gasto energético possível, tal armazenamento é incompatível com a maioria dos solventes eutéticos naturais profundos. Afinal a temperatura eutética ideal para alcançar o ponto eutético da mistura não seria atingida pelo sistema, e a consequência seria precipitação ou retorno ao estado sólido de um dos componentes – a depender da composição do sistema.

À exemplo, pode-se observar na figura 8 que o ponto eutético da mistura mentol:cânfora é de aproximadamente 0°C na proporção de 55% de mentol e 45% de cânfora, proporção de ponto eutético. Acima desta temperatura a mistura estará no estado líquido. Já no NADES desenvolvido neste trabalho, que tem proporção molar 1:1 (50:50), a temperatura mínima para que o sistema se mantenha no estado líquido é de aproximadamente 10°C. Foi observado o efeito da refrigeração a 8°C, corroborando o dado experimental - observou-se formação de cristais grumosos no fundo do recipiente.

Figura 9. Diagrama binário de fases do NADES composto por mentol e cânfora.



Fonte: Phaechamud et al., 2016

4.2 Caracterização do NADES por FTIR-ATR

A ligação de hidrogênio entre um grupamento hidroxila de uma molécula pequena, e a carbonila de outra molécula, é o mais importante fenômeno eutético relatado. Pode-se evidenciar o sucesso na formação de NADES ao observar a deformação axial em 3.415 cm^{-1} da ligação química O-H do mentol como uma banda

mais larga e deslocada para maior valor de número de ondas no sistema eutético, sendo no mentol o valor desta banda de 3.251 cm^{-1} . No caso da deformação axial da ligação C=O da cânfora, não foi observado deslocamento da banda, sendo o valor desta banda igual a 1.741 cm^{-1} , tanto para a cânfora quanto para a mistura eutética. Estas observações estão de acordo com o descrito na literatura para mistura eutética cânfora: mentol (PHAECHAMUD et al., 2016).

Figura 10. Espectro de absorção no IV da mistura eutética mentol: cânfora na proporção molar 1:1.

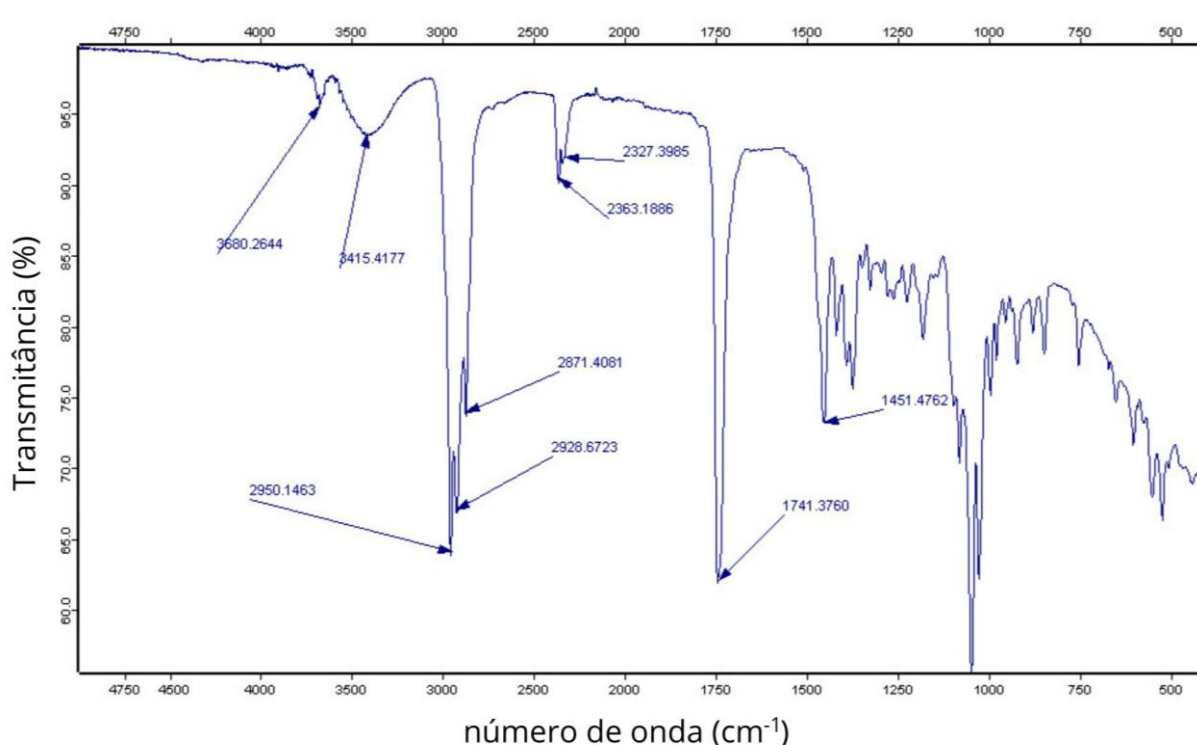


Figura 11. Espectro de absorção no IV do mentol.

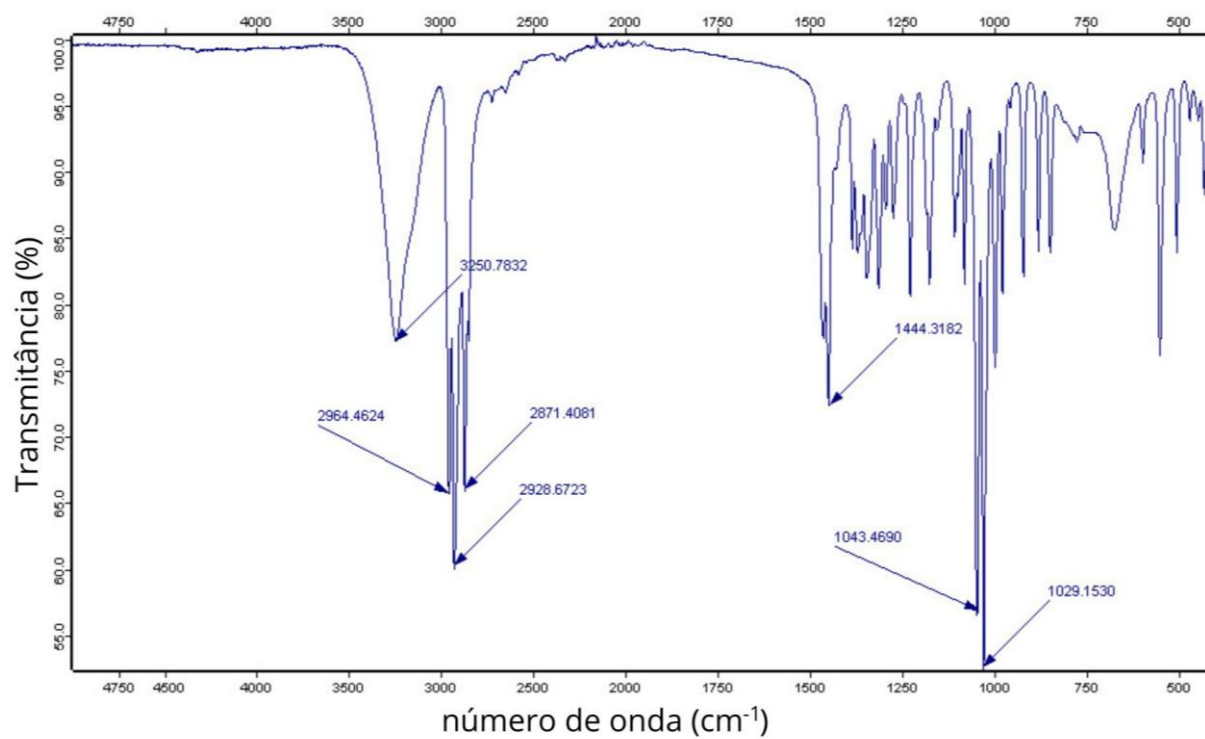
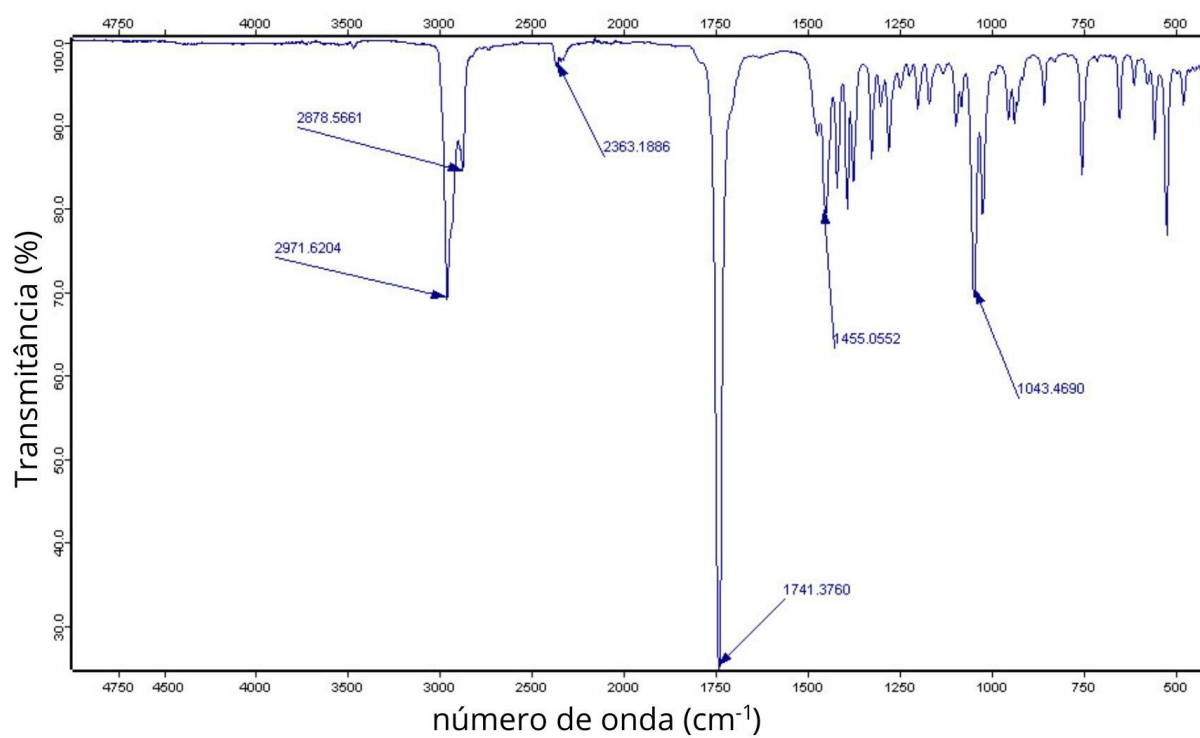


Figura 12. Espectro de absorção no IV da cânfora.



4.3 Testes de solubilidade dos NADES em fase móvel

A solubilidade do NADES, altamente hidrofóbico, foi testada na fase móvel utilizada nas análises cromatográficas para evitar entupimento da coluna, e resultados insatisfatórios por incompatibilidade. A solubilidade foi satisfatória na proporção NADES: fase móvel 1:5 (v/v), onde foi possível observar que a partir desta proporção sistemas monofásicos em repouso ou límpidos sob agitação se formassem, ao invés de sistemas bifásicos em repouso ou turvos sob agitação, conforme foi possível observar em proporções inferiores a 1:4.

4.4 Extração

A extração, realizada conforme KŘÍŽEK et al. (2008), resultou em líquidos viscosos de coloração esverdeada. Como é uma característica intrínseca dos NADES a ausência de volatilização, e os métodos de secagem contrariam alguns princípios da química verde, e considerando também sua biocompatibilidade, optou-se por pular a etapa de secagem dos extratos, que seguiram para o pré-tratamento para análises cromatográficas imediatamente após a extração.

A extração etanólica foi realizada de maneira idêntica à extração realizada com o NADES, para que a comparação qualitativa dos extratos fosse baseada apenas na diferença entre os solventes extratores - NADES e etanol.

4.5 Pré-tratamento dos extratos para análises cromatográficas

Ambas as frações heptânica e de acetato de etila obtidas no pré-tratamento dos extratos de NADES por EFS em modo normal apresentaram coloração esverdeada (clorofila), sendo a primeira de coloração mais intensa. As amostras foram colocadas em capela de exaustão para que secassem, porém, dado o alto teor de NADES na fração heptânica, estas não secaram, resultando em um líquido altamente viscoso de coloração esverdeada, enquanto as amostras de acetato de etila secaram-se completamente, o que sugere que os componentes do NADES foram eluídos, ao menos predominantemente, na fração heptânica.

Os extratos etanólicos foram submetidos ao mesmo processo de pré-tratamento acima para a comparação qualitativa, eliminando a possível dúvida de que o pré-tratamento fosse responsável por eventuais diferenças na composição química entre

os extratos. As frações resultantes, heptânica e de acetato de etila, secaram completamente em capela de exaustão.

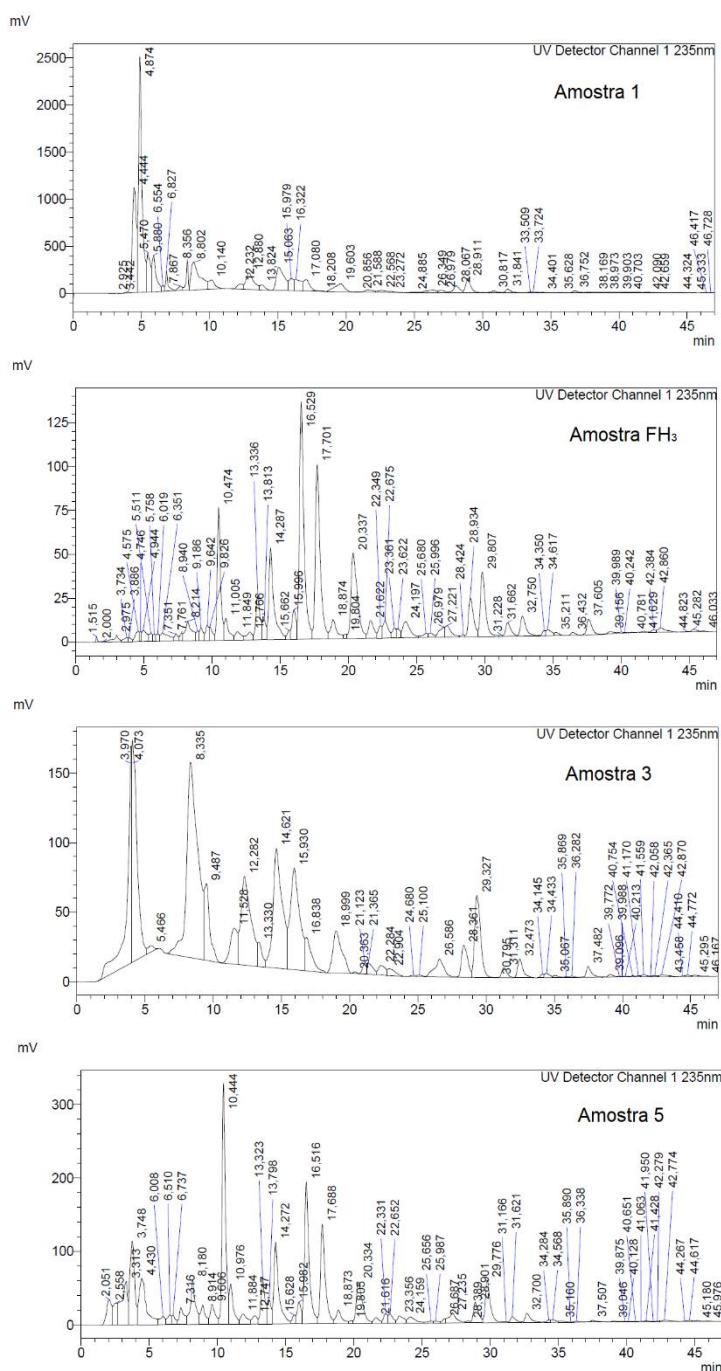
Os extratos etanólicos também foram submetidos à pré-tratamento por extração em fase sólida em modo reverso previamente desenvolvido para análise de casearinas em extrato etanólico de *C. sylvestris* e utilizado em diversos trabalhos (Oda, 2021; Pierri et al., 2017; Santos, 2008), para que fosse possível comparar a seletividade do pré-tratamento empregado em modo normal desenvolvido no presente trabalho. A fração metanol: água 98:02 (v/v) resultante contendo as casearinas secou completamente em capela de exaustão.

4.6 Análises por HPLC-UV

As análises por HPLC-UV dos extratos empregaram método já descrito na literatura (ODA, 2021; CARVALHO, 2015; PIERRI et al, 2017) desenvolvido para a análise de casearinas em extrato etanólico de folhas de *C. sylvestris*. Com base no uso de padrões (casearinas purificadas) e também de espectros no UV e de massas quando foram empregadas as técnicas hífenadas LC-PDA/UV e LC-MS, é possível sugerir que os picos com t_R entre 10-30 min são relativos às casearinas. Como exemplo, Carvalho (2015) observou t_R para a caseargrewiina F e casearinas B e J de 15,5, 18,1 e 19,3 min.

As figuras 12 e 13 apresentam os cromatogramas relativos às análises por HPLC-UV da fração acetato de etila do extrato de NADES (amostra 1, figura 12), fração acetato de etila do extrato etanólico (amostra 8, figura 13), fração heptânica do extrato etanólico (amostra 7, figura 14) e fração metanol: água 98:02 do extrato etanólico (amostra 11, figura 15). O mesmo dado não pôde ser obtido com a fração heptânica do extrato de NADES dada a alta afinidade dos componentes com a coluna cromatográfica que, mesmo com uso de coluna de guarda, ocasionou aumento considerável da pressão do sistema cromatográfico.

Figura 13. Cromatogramas obtidos por HPLC-UV referente à análise da fração acetato de etila do extrato de NADES (amostra 1), fração heptânica do extrato etanólico (amostra FH₃), fração acetato de etila do extrato etanólico (amostra 3) e fração metanol: água 98:02 do extrato etanólico (amostra 5). Condições de análise: coluna de C18 (250 x 4,6 mm; 5 µm); fase móvel em gradiente linear de metanol:acetonitrila:água 22:44:34 (v/v) para 47:53:00 em 42 min e, 5 min isocraticamente em 47:53:00; vazão de 0,8 mL/min; o volume de injeção de 20 µL; comprimentos de onda em 235 nm e 254 nm (apêndice 9)



Todas as amostras avaliadas apresentaram picos com t_R entre 10-30 min, indicativos da presença das casearinas nas amostras. A amostra 1 (fração acetato de etila do extrato de NADES), apresentou picos com menor intensidade dentre as amostras avaliadas. Com relação ao extrato etanólico, a fração acetato de etila (amostra 8) apresentou picos alargados, o que pode ter sido efeito de resíduo de acetato de etila (pré-tratamento em modo normal) na amostra após a secagem. Observa-se que a fração heptânica do extrato etanólico (amostra 7) e a fração metanol: água 98:02 (amostra 11) tem perfil qualitativo muito semelhante, indicando que o pré-tratamento por extração em fase sólida em modo normal não foi seletivo para as casearinas - tanto a fração acetato de etila e quanto a heptânica apresentam picos relativos às casearinas - e que as condições precisam ser otimizadas. Desta forma, possivelmente a fração heptânica do extrato de NADES deve também conter casearinas.

4.7 Análise por HPLC-MS

As análises por HPLC-MS tiveram por objetivo a identificação de casearinas nos extratos etanólico e de NADES. Ainda que chamada de identificação provisória por ser sustentada apenas pelos dados dos espectros de massas, considerando a origem da amostra e os demais dados cromatográficos obtidos, pode-se considerá-la de confiabilidade adequada aos objetivos do trabalho.

O cromatograma no modo *scan* (TIC) da amostra 3 (Figura 16.A) apresentou perfil complexo, com picos majoritários com t_R entre 10-30 min, característicos das casearinas em extratos etanólicos na condição de análise empregada, conforme discutido no item 2.2.5. A Figura 16.B apresenta os cromatogramas de íons selecionados (SIR) sobrepostos. A partir dos dados dos espectros de massas (Apêndice 1 e 2) sistematizados na tabela 1, foi possível identificar casearinas no extrato etanólico.

Os picos entre 450 e 600 Da com maior intensidade foram avaliados segundo Danuello (200X), onde foi possível correlacionar os valores dos adutos cationizados com um próton e os íons de sódio e potássio, permitindo identificar de forma provisória as substâncias identificadas através do método (Tabelas 1 e 2)

Figura 14 (A e B): Cromatogramas obtidos por HPLC-MS referente à análise da fração acetato de etila do extrato etanólico (amostra 3) - (A): *Total Ion Chromatogram* (TIC) – scan 350 a 650 Da; (B): SIR. Condições de análise: coluna de C18 (250 x 4,6 mm; 5 µm); fase móvel em gradiente linear de metanol:acetonitrila:água (0,1% ácido fórmico) 22:44:34 (v/v) para 47:53:00 em 42 min e, 5 min isocraticamente em 47:53:00; vazão de 0,8 mL/min; o volume de injeção de 20 µL.

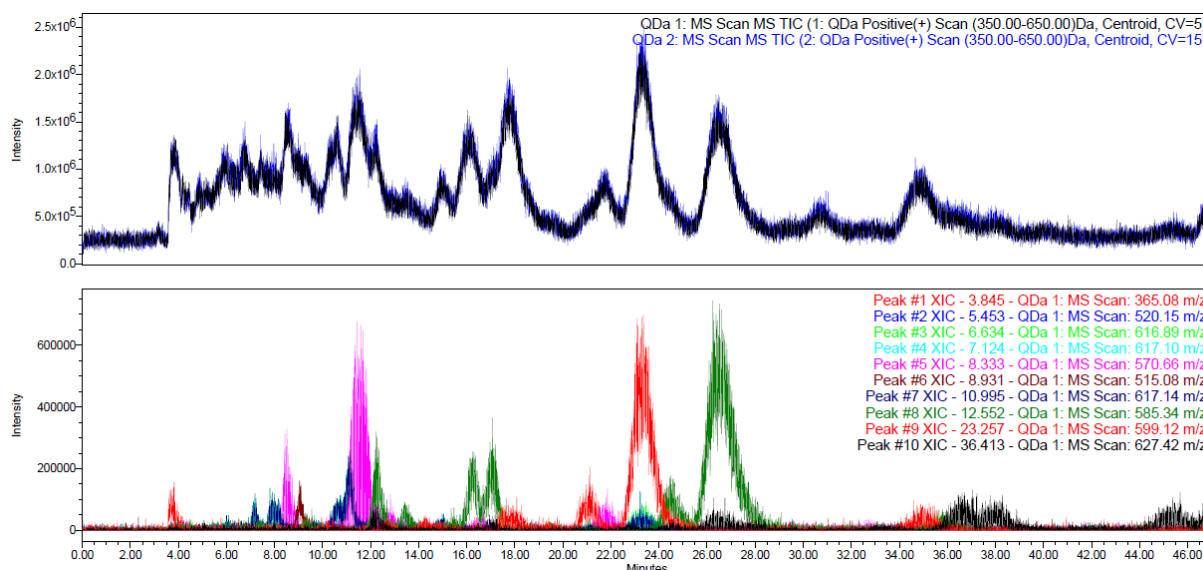


Tabela 1: Dados obtidos na análise por HPLC-MS da amostra 3 (fração acetato de etila do extrato etanólico)

t_R	$[M + H]^+$ (m/z)	$[M + Na]^+$ (m/z)	$[M + K]^+$ (m/z)	Substância Identificada Provisoriamente
8,651	---	A) 571	B) 571	A) casearina D, M ou P B) casearina I, X ou casearvestrina C
9,175	---	B) 515	---	casearina V
10,227	---	A) 557	B) 557	A) casearina A ou L B) casearina G ou casearvestrina B
11,368	---	A) 571	B) 571 C) 587	A) casearina D, M ou P B) casearina I, X ou casearvestrina C C) casearina D, M ou P
12,156	---	A) 571 C) 585	B) 571	A) casearina D, M ou P B) casearina I, X ou casearvestrina C C) casearina J, K ou Q

13,468	---	A) 571 C) 585	B) 571	A) casearina D, M ou P B) casearina I, X ou casearvestrina C C) casearina J, K ou Q
16,010	---	527	---	casearina H, casearvestrina A ou caseargrewiina F
17,764	---	A) 557	B) 557 C) 573	A) caseariasida A ou B B) casearina A ou L C) casearina A ou L
21,621	---	A) 571 C) 555	B) 571	A) casearina D, M ou P B) casearina I, X ou casearvestrina C C) casearina I, X ou casearvestrina C
23,375	---	599	---	casearina B ou T
26,622	---	585	---	casearina J, K ou Q
34,855	---	A) 541 B) 557	C) 557	A) casearina G ou casearvestrina B B) caseariasida A ou B C) casearina A ou L

O cromatograma do extrato com NADES também teve perfil complexo, com picos majoritários com t_R entre 10-30 min (apêndice 3), característicos das casearinas em extratos etanólicos na condição de análise empregada. A partir dos dados dos espectros de massas (Apêndices 4 a 8) sistematizados na tabela 2, foi possível identificar casearinas no extrato de NADES.

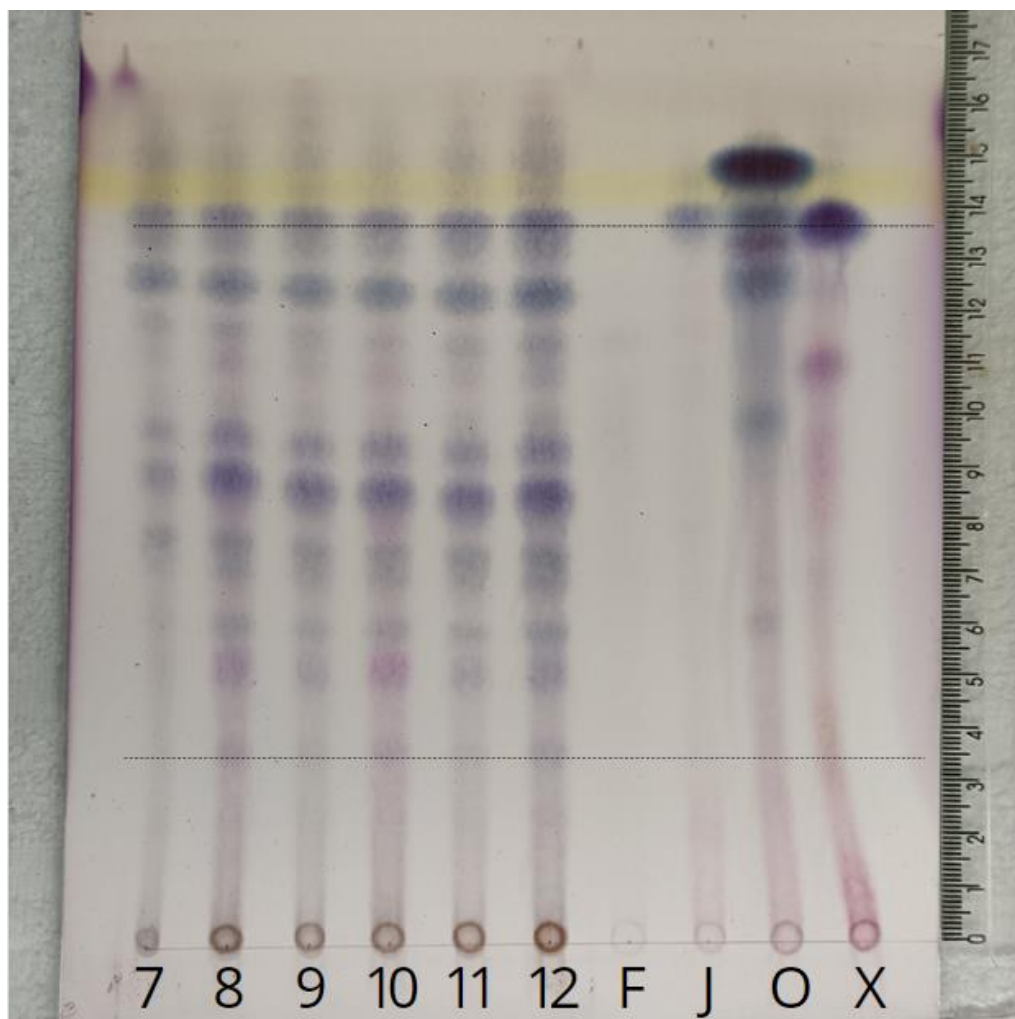
Tabela 2: Dados obtidos na análise por HPLC-MS da amostra 1 (fração acetato de etila do extrato com NADES).

t_R	$[M + H]^+$ (m/z)	$[M + Na]^+$ (m/z)	$[M + K]^+$ (m/z)	Substância Identificada Provisoriamente
14,388	A) 549	---	---	A) casearina D, M ou P
15,819	---	---	531	casearina V
15,976	---	---	571	casearia I, X ou casearvestrina C
26,201	---	555	---	casearina X ou casearvestrina C
28,593	---	---	561	casearina F

4.8 Cromatografia em camada delgada

Na cromatoplaça da figura 17, cuja distância percorrida pela fase móvel foi de 17cm, pode-se dizer que as substâncias de interesse estão entre 3,4 e 13,6 cm, com $R_f = 0,2$ e $0,8$, respectivamente. Embora os padrões utilizados não tenham a pureza adequada, com exceção da casearina J, é possível identificar as casearinas J e X ($R_f = 0,23$ e $0,35$, respectivamente) nas frações do extrato etanólico. Isto já era esperado pois os extratos em questão são etanólicos, e já é de pleno conhecimento o ótimo desempenho deste solvente na extração de diterpenos clerodânicos. Assim como na análise por HPLC-UV, a análise por CCD também mostrou a presença das casearinas na fração heptânica do extrato etanólico.

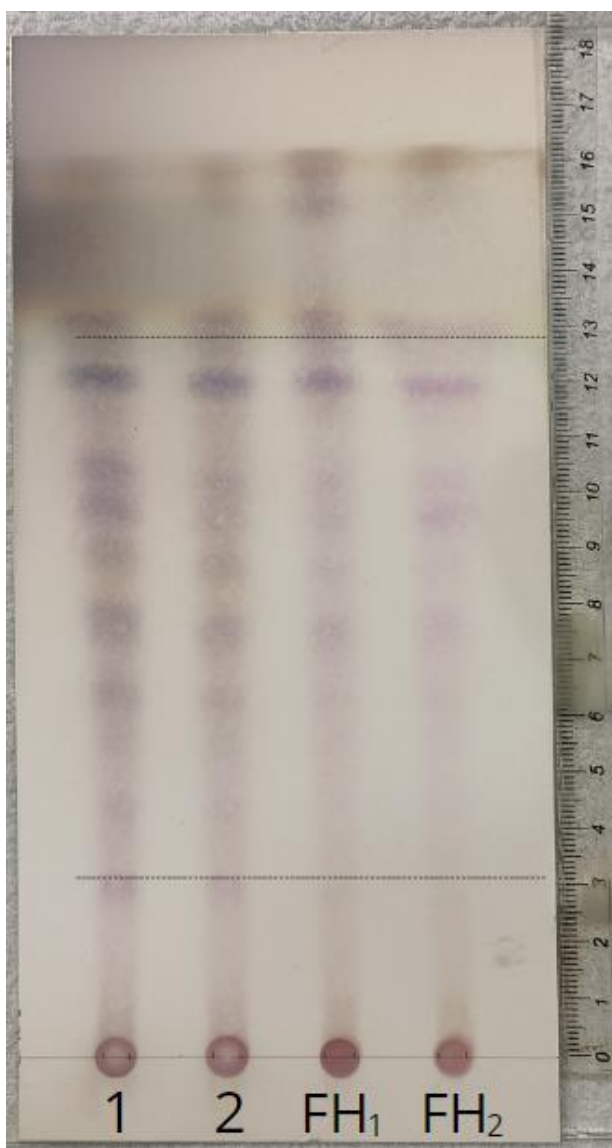
Figura 15. Cromatoplaça referente à análise das frações do extrato etanólico. Condições de análise: sílica gel; hexano:acetato de etila:isopropanol 60:37:03 (v/v); revelação com anisaldeído sulfúrico. Amostras: 7 e 9 – Frações heptânicas (replicatas). 8 e 10 – Frações de acetato de etila (replicatas). 11 e 12 – Produtos do pré-tratamento em fase sólida (modo reverso) (replicatas). F - caseargrewiina F. J - casearina J. O – casearina O e X – casearina X.



O interesse se volta à capacidade do NADES composto por mentol e cânfora em extrair as casearinas. Nesta cromatografia em camada delgada a fase móvel percorreu 16 cm da placa (figura 18), ou seja, a presença de casearinas é esperada entre 3,2 e 12,8cm, com $R_f = 0,2$ e $0,8$, respectivamente – o que é possível observar. Outro fator de interesse é que o pré-tratamento foi benéfico ao extrato, removendo o excesso de NADES. Conforme sugerido na discussão da análise por HPLC-UV, foram realmente observadas bandas relativas às casearinas na fração heptânica do extrato etanólico, embora em menor número e intensidade do que na fração de acetato de

etila. Ou seja, o pré-tratamento em modo normal cumpriu parcialmente seu propósito, removendo interferentes, porém a seletividade para casearinas na fração acetato de etila deve ser ainda otimizada.

Figura 16. Cromatoplaça referente à análise das frações do extrato de NADES. Condições de análise: sílica gel; hexano:acetato de etila:isopropanol 60:37:03 (v/v); revelação com anisaldeído sulfúrico. Amostras: 1 e 2: Frações acetato de etila (replicatas). FH₁ e FH₂ – Frações heptânicas (replicatas)



De acordo com os trabalhos de Muta (2017) e Carvalho (2018), a presença de bandas cromatográficas de coloração roxa com fator de retenção (R_f) de 0,2 a 0,8 na condição de análise empregada é forte indício da presença dos diterpenos

clerodânicos de *C. sylvestris*, afinal é nesta faixa que ficam retidas as casearinas B, D, H, X e a caseargrewiina F.

Os THEDES (*Therapeutical Deep Eutetic Solvents*), ou solventes eutéticos profundos terapêuticos, são outro subgrupo de DES em que ao menos um dos componentes do sistema eutético é um ingrediente farmacêutico ativo, ou até mesmo quando fármacos são solubilizados em DES. À título de exemplo, o ibuprofeno, um anti-inflamatório não esteroide, foi utilizado para formar THEDES com mentol e limoneno, que tem propriedades antitumorais bem estabelecidas. Considerando o potencial de incorporar o extrato vegetal com DES em formas farmacêuticas, a ideia de extrair diterpenos clerodânicos com THEDES, como a mistura mentol: cânfora, é deveras interessante, sobretudo considerando que quando uma molécula pouco solúvel em água é incorporada em um sistema eutético profundo, ocorre o fenômeno de hidrotopia, que é o aumento da solubilidade em água por mecanismo diferente da solubilização micelar, o que aumenta o leque de possibilidades de participação em diferentes formas farmacêuticas de base aquosa, como um produto de uso tópico de propriedades anti-inflamatória e analgésica, com extrato de *C. sylvestris* utilizando THEDES, explorando o potencial anti-inflamatório das casearinas B e F, anestésica e anti-inflamatória do mentol, e anestésica da cânfora.

5 Conclusão

A síntese do NADES lipofílico composto por mentol e cânfora na proporção molar 1:1, com a metodologia adotada, utilizando-se aquecimento e agitação magnética foi bem-sucedida, conforme foi possível avaliar na caracterização por FTIR-ATR.

A extração em fase sólida em modo normal foi pouco seletiva, conforme foi possível observar nas análises por HPLC-UV e CCD das frações heptânicas do extrato etanólico (amostra 7) e na amostra 11, cujo pré-tratamento foi realizado em modo reverso. Como os dados qualitativos dessas amostras foi bastante semelhante, é possível concluir que, nos extratos de NADES, tanto nas frações heptânicas quanto nas frações acetato de etila havia casearinas; indicando necessidade de otimização do método de pré-tratamento em modo normal.

Foram identificadas casearinas nos extratos etanólico e de NADES utilizando a técnica de HPLC-MS, através dos dados dos espectros de massas. Portanto, o

NADES mentol:cânfora 1:1 pode ser utilizado como solvente para extrair diterpenos clerodânicos de *C. sylvestris*, porém os dados de CCD e HPLC indicam que o etanol é mais seletivo para este tipo de extração, sendo que as áreas dos picos do cromatograma da fração de acetato de etila do extrato de NADES foram as menores observadas.

Referências

- ABBOTT, A. P. et al. Novel solvent properties of choline chloride/urea mixtures. **Chemical communications**, n. 1, p. 70-71, 2003.
- ABSY, M. L; SCAVONE, O. Sobre a morfologia e anatomia da *Casearia sylvestris* Swartz. **Boletim de Zoologia e Biologia Marinha**, v. 30, n. 30, p. 641-676, 1973.
- ANASTAS, P. T; WARNER, J. C. **Green Chemistry: Theory and Practice**. New York: Oxford University Press, p. 30, 1998.
- BASILE, A. C. et al. 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.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira**. Brasília: Anvisa, 126 p., 2011
- BUBALO, M. C. et al. New perspective in extraction of plant biologically active compounds by green solvents. **Food and Bioproducts Processing**, v. 109, p. 52-73, 2018.
- CAMINHOÁ, J. M. **Elementos de botânica geral e médica**. Rio de Janeiro: Tipographia Nacional, 1877. v. 3, p. 2600.
- CARVALHO, Flavio Alexandre. **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**. Tese (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, 2015.
- CHEMAT, F.; et al. Green extraction of natural products: concept and principles. **International journal of molecular sciences**, v. 13, n. 7, p. 8615-8627, 2012.
- COIMBRA, R. **Notas de fitoterapia**. 2ª ed. Rio de Janeiro: Lab. Clínico Silva Araújo, 1958. p. 169-170.

CORREA, M. P. Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. In: **Dicionario das plantas uteis do Brasil e das exoticas cultivadas**. p. XXII, 707-XXII, 707, 1931.

DAI, Y. et al. Ionic liquids and deep eutectic solvents in natural products research: mixtures of solids as extraction solvents. **Journal of natural products**, v. 76, n. 11, p. 2162-2173, 2013.

DANUELLO, A. et al. Fragmentation study of clerodane diterpenes from *Casearia* species by tandem mass spectrometry (quadrupole time-of-flight and ion trap). **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 34, e8781, 2020.

DE LOS ÁNGELES FERNÁNDEZ, M. et al. Natural deep eutectic solvents-mediated extractions: The way forward for sustainable analytical developments. **Analytica chimica acta**, v. 1038, p. 1-10, 2018.

DURAND, E.; et al. From green chemistry to nature: the versatile role of low transition temperature mixtures. **Biochimie**, v. 120, p. 119-123, 2016.

ESTEVEZ, I. et al. Gastric antiulcer and anti-inflammatory activities of the essential oil from *Casearia sylvestris* Sw. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 101, p. 191-196, 2005.

FERREIRA, P. M. P. et al. 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. et al. Morphological and biochemical alterations activated by antitumor clerodane diterpenes. **Chemico-Biological Interactions**, v. 222, p. 112-125, 2014.

HANSEN, F. A. et al. Electromembrane extraction using deep eutectic solvents as the liquid membrane. **Analytica chimica acta**, v. 1143, p. 109-116, 2021.

HOEHNE, F. C. Plantas e substâncias vegetais tóxicas e medicinais. In: **Plantas e substâncias vegetais tóxicas e medicinais**. São Paulo: Instituto de Botânica de São Paulo, 355 p., 1939.

IMATOMI, M. et al. Caracterização e comportamento germinativo de sementes de *Casearia sylvestris* Swartz (Salicaceae). **Revista Brasileira de Sementes**, v. 31, p. 36-47, 2009.

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

KŘÍŽEK, T. et al. Menthol-based hydrophobic deep eutectic solvents: Towards greener and efficient extraction of phytocannabinoids. **Journal of Cleaner Production**, v. 193, p. 391-396, 2018.

LENARDÃO, E.J. et al. " Green chemistry": os 12 princípios da química verde e sua inserção nas atividades de ensino e pesquisa. **Química Nova**, v. 26, p. 123-129, 2003.

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

MUTA, T. M. **Avaliação da variabilidade química e botânica em espécimens de *Casearia sylvestris* Sw. do campus da UNESP de Araraquara**. Trabalho de Conclusão de Curso – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, 2017.

ODA, F. B. **Disposição cinética e atividade anti-inflamatória in vitro de diterpenos clerodânicos de *Casearia sylvestris* Swartz e de seus produtos de degradação**. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, 2021.

ORTEGA-ZAMORA, C. et al. Menthol-Based Deep Eutectic Solvent Dispersive Liquid–Liquid Microextraction: A Simple and Quick Approach for the Analysis of Phthalic Acid Esters from Water and Beverage Samples. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, v. 8, n. 23, p. 8783-8794, 2020.

PHAECHAMUD, T. et al. Evaporation behavior and characterization of eutectic solvent and ibuprofen eutectic solution. **AAPS PharmSciTech**, v. 17, n. 5, p. 1213-1220, 2016.

PIERRI, E. G. et al. Anti-inflammatory action of ethanolic extract and clerodane diterpenes from *Casearia sylvestris*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 27, p. 495-501, 2017.

PRADO, D. E. As caatingas da América do Sul. **Ecologia e conservação da Caatinga**, v. 2, p. 3-74, 2003.

RAMON, D. j.; GUILLENA, G. **Deep Eutectic Solvents: Synthesis, Properties, and Applications**. Chapter 4, p. 61-81, 2019.

RIBEIRO, B. D. et al. Menthol-based eutectic mixtures: hydrophobic low viscosity solvents. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, v. 3, n. 10, p. 2469-2477, 2015.

RUESGAS-RAMÓN, M. et al. Application of deep eutectic solvents (DES) for phenolic compounds extraction: Overview, challenges, and opportunities. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 65, n. 18, p. 3591-3601, 2017.

ŞAHIN, S.; KURTULBAŞ, E. An advanced approach for the recovery of acetic acid from its aqueous media: deep eutectic liquids versus ionic liquids. **Biomass Conversion and Biorefinery**, p. 1-9, 2020.

SANTANA, A. P et al. Sustainable synthesis of natural deep eutectic solvents (NADES) by different methods. **Journal of Molecular Liquids**, v. 293, p. 111452, 2019.

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

SEKHARAN, T. R. et al. pH, Viscosity of Hydrophobic Based Natural Deep Eutectic Solvents and the Effect of Curcumin Solubility in it. **Biointerface Res. Appl. Chem.**, v. 11, p. 14620-14633, 2021.

TANG, B. et al. Application of deep eutectic solvents in the extraction and separation of target compounds from various samples. **Journal of separation science**, v. 38, n. 6, p. 1053-1064, 2015.

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.

UFSC, **Horto didático de plantas medicinais do HU/CCS**, 2020. Disponível em: <<https://hortodidatico.ufsc.br/guacatonga/>>. Acesso em: 17/03/2022.

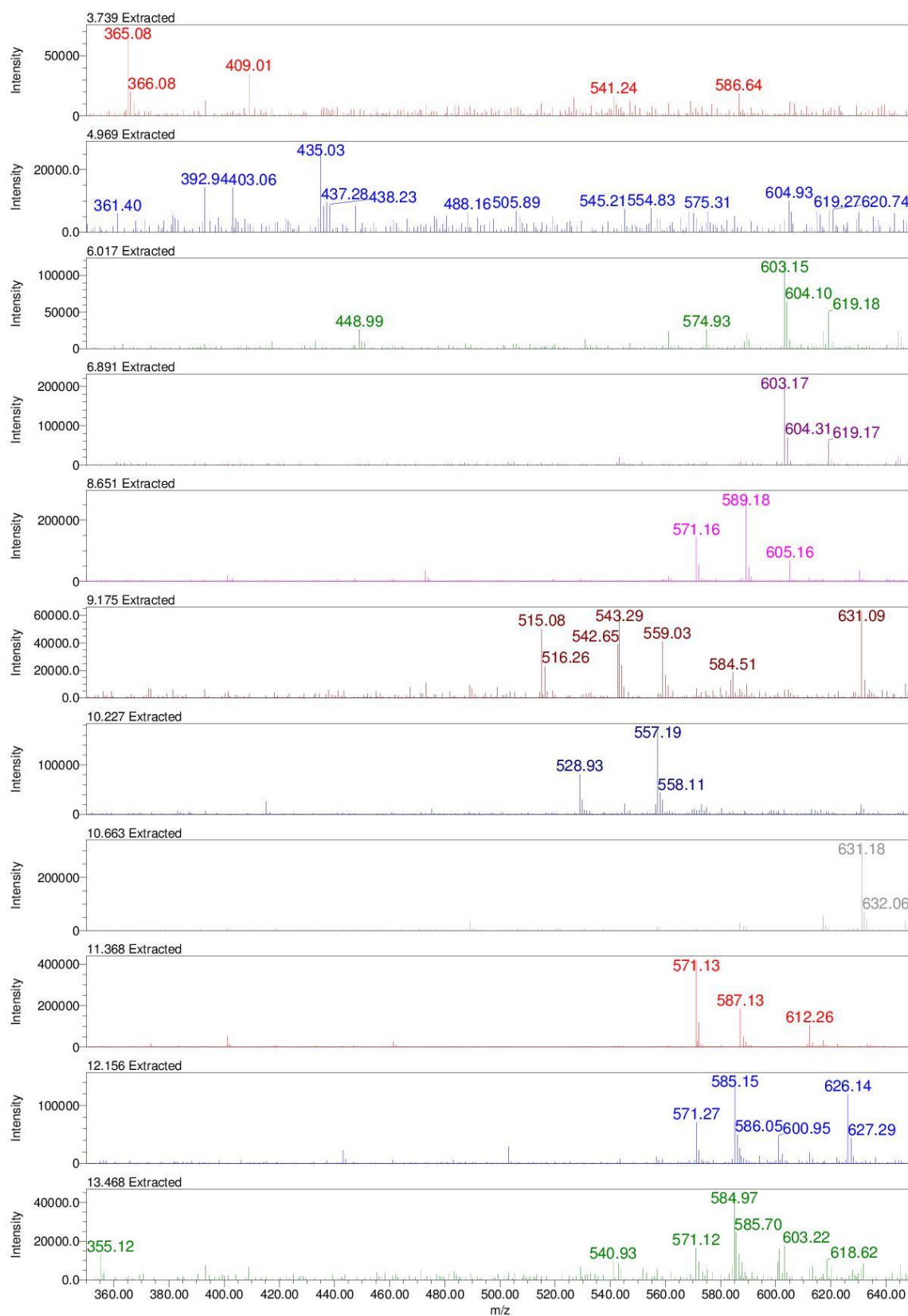
XIA, L. et al. The genus Casearia: a phytochemical and pharmacological overview. **Phytochemistry Reviews**, v. 14, n. 1, p. 99-135, 2015.

ZAINAL-ABIDIN, M.H. et al. New horizons in the extraction of bioactive compounds using deep eutectic solvents: A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 979, p. 1-23, 2017.

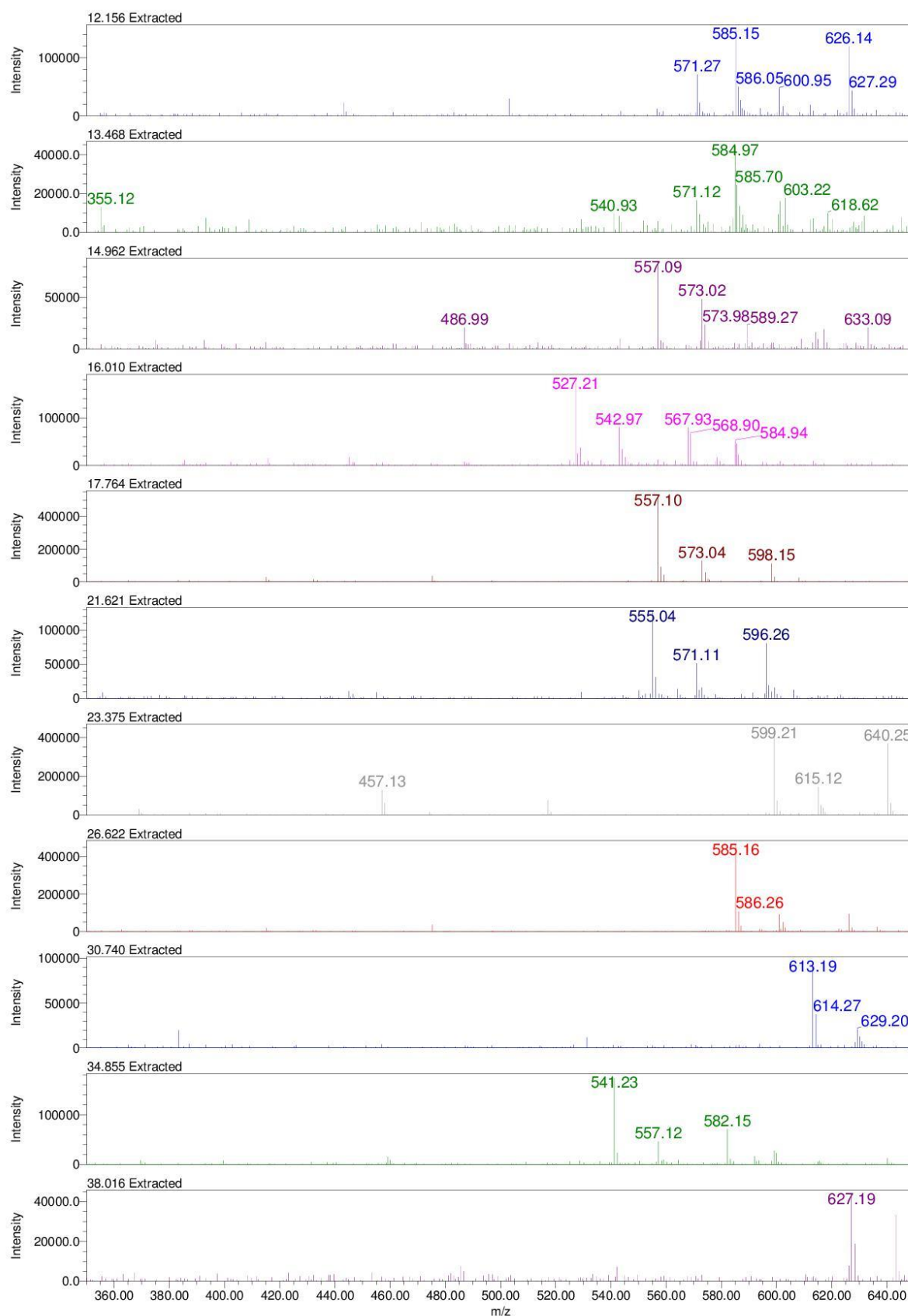
ZHANG, Q. et al. Deep eutectic solvents: syntheses, properties and applications. **Chemical Society Reviews**, v. 41, n. 21, p. 7108-7146, 2012.

Apêndices

Apêndice 1. Espectros de massas da amostra 3

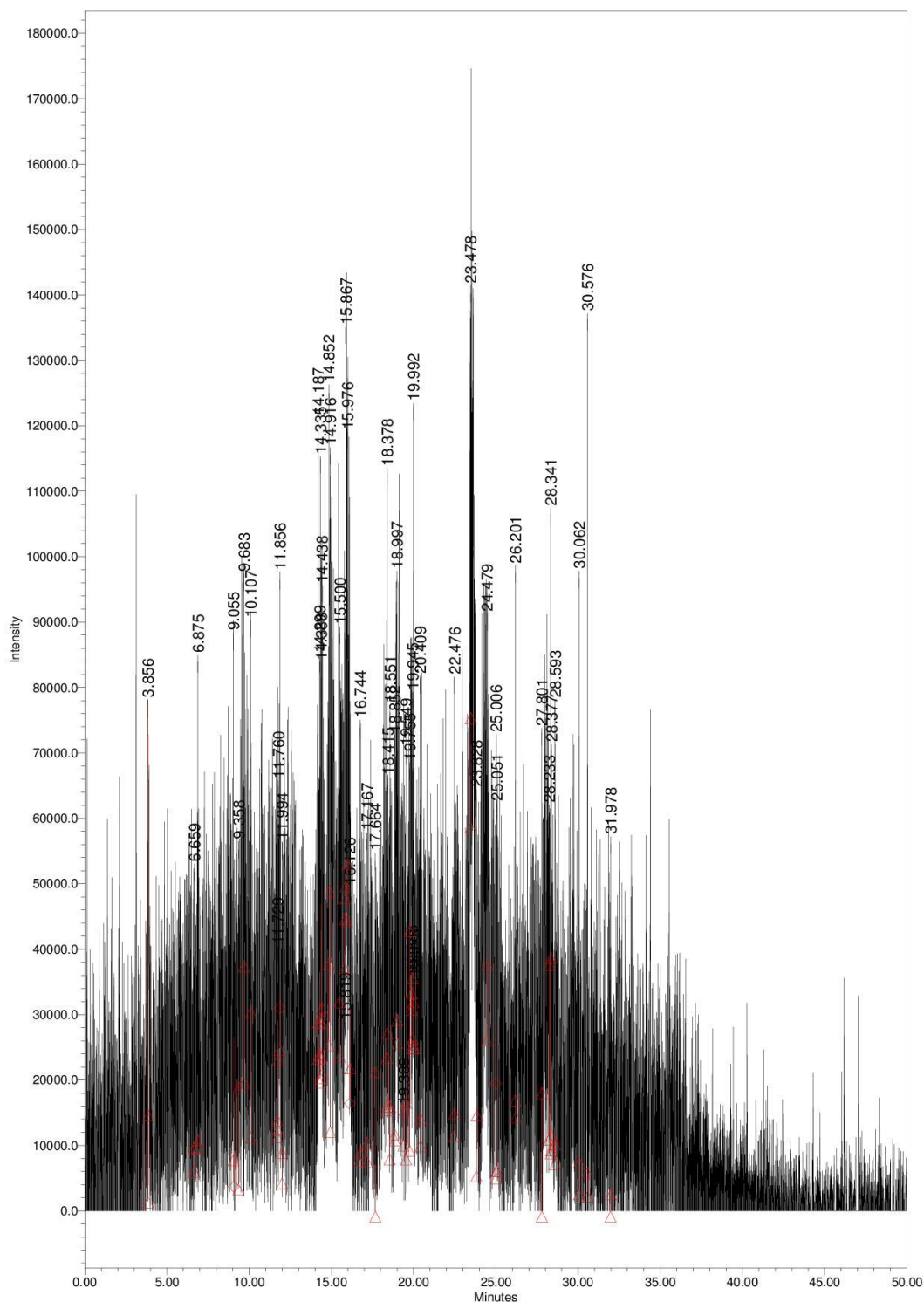


Apêndice 2. Espectros de massas da amostra 3

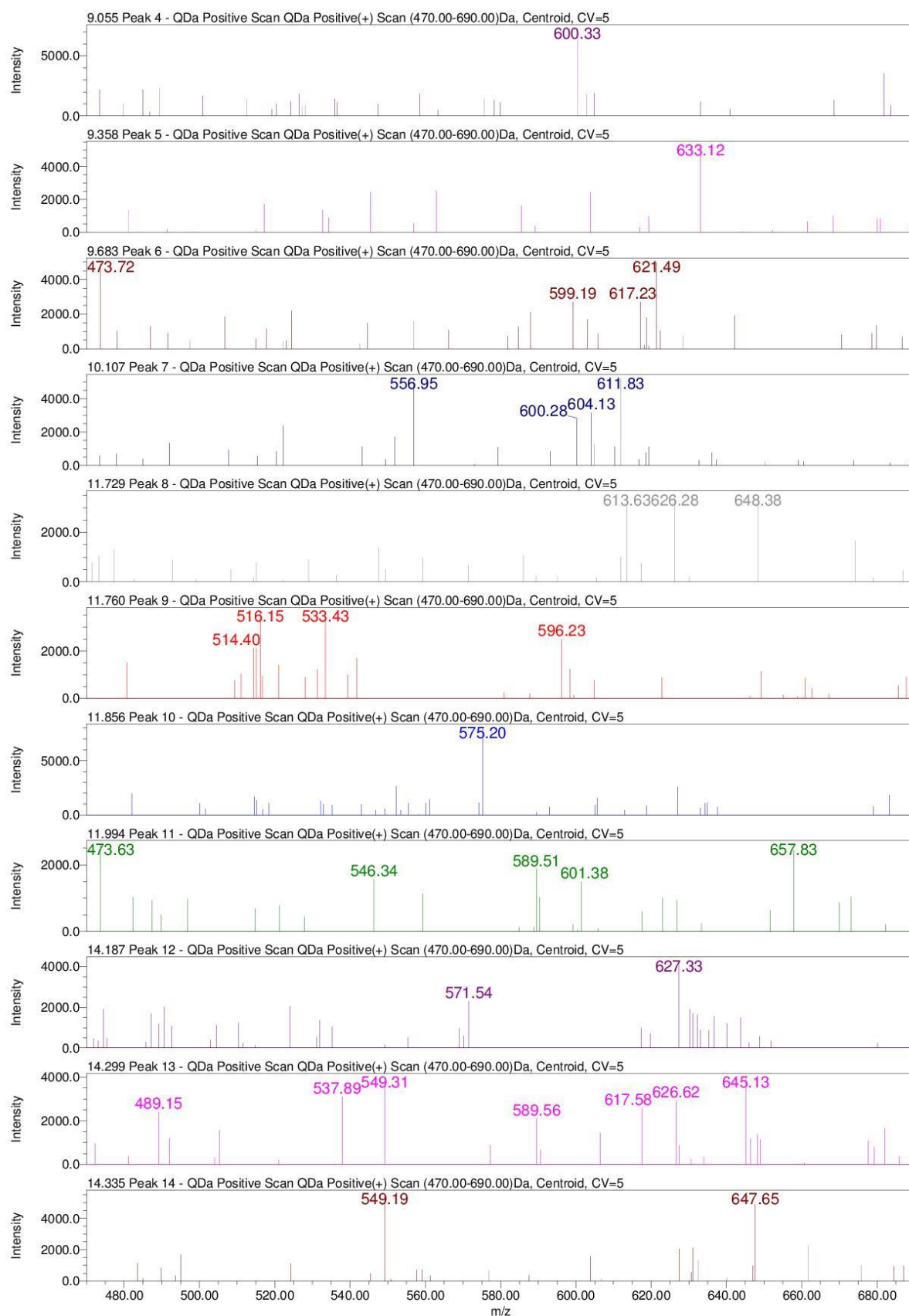


Apêndice 3. Cromatogramas obtidos por HPLC-MS referente à análise da fração acetato de etila do extrato de NADES (amostra 1); Total Ion Chromatogram (TIC) –

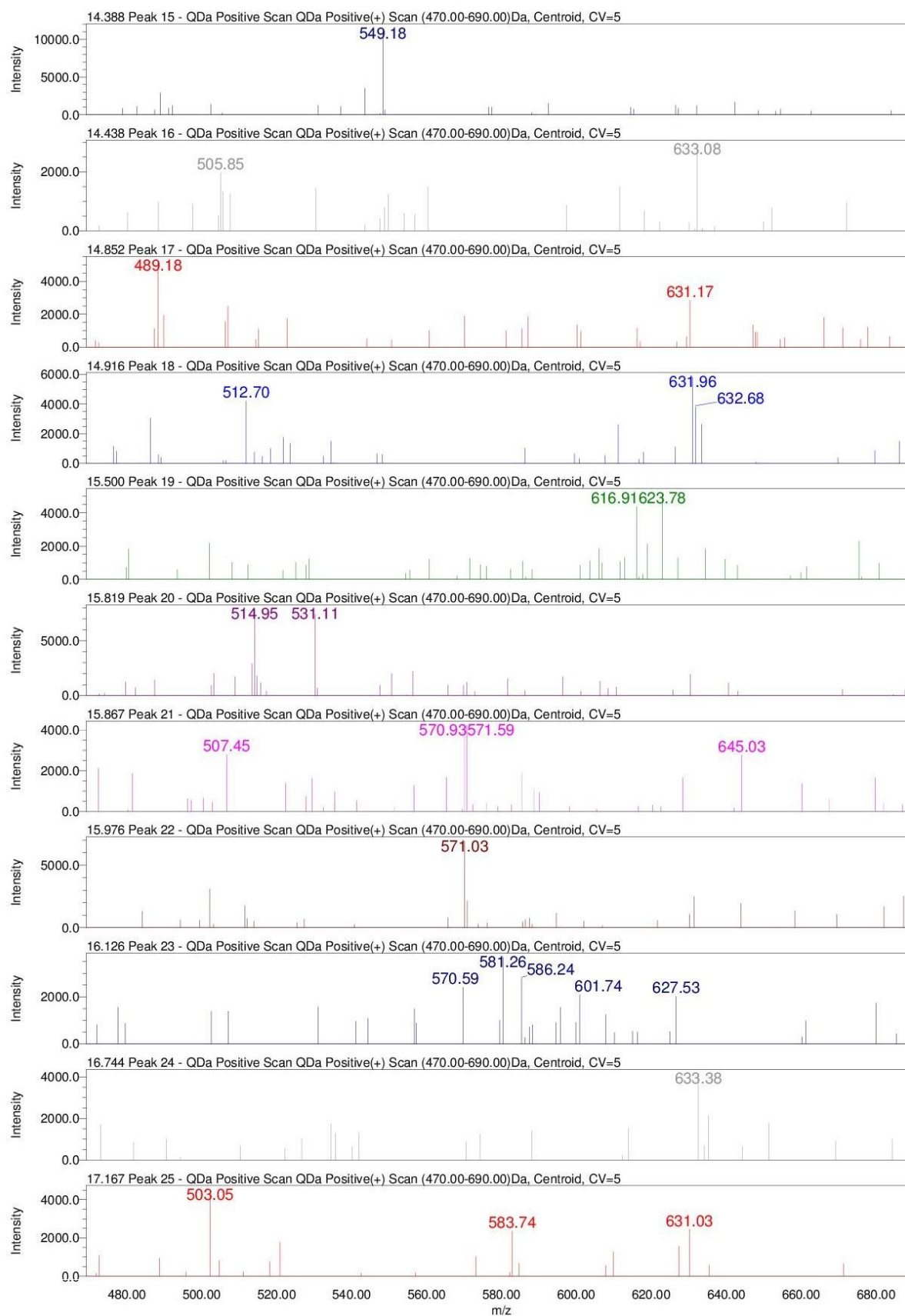
scan 350 a 600. Condições de análise: coluna de C18 (250 x 4,6 mm; 5 µm); fase móvel em gradiente linear de metanol:acetonitrila:água (0,1% ácido fórmico) 22:44:34 (v/v) para 47:53:00 em 42 min e, 5 min isocraticamente em 47:53:00; vazão de 0,8 mL/min; o volume de injeção de 20 µL.



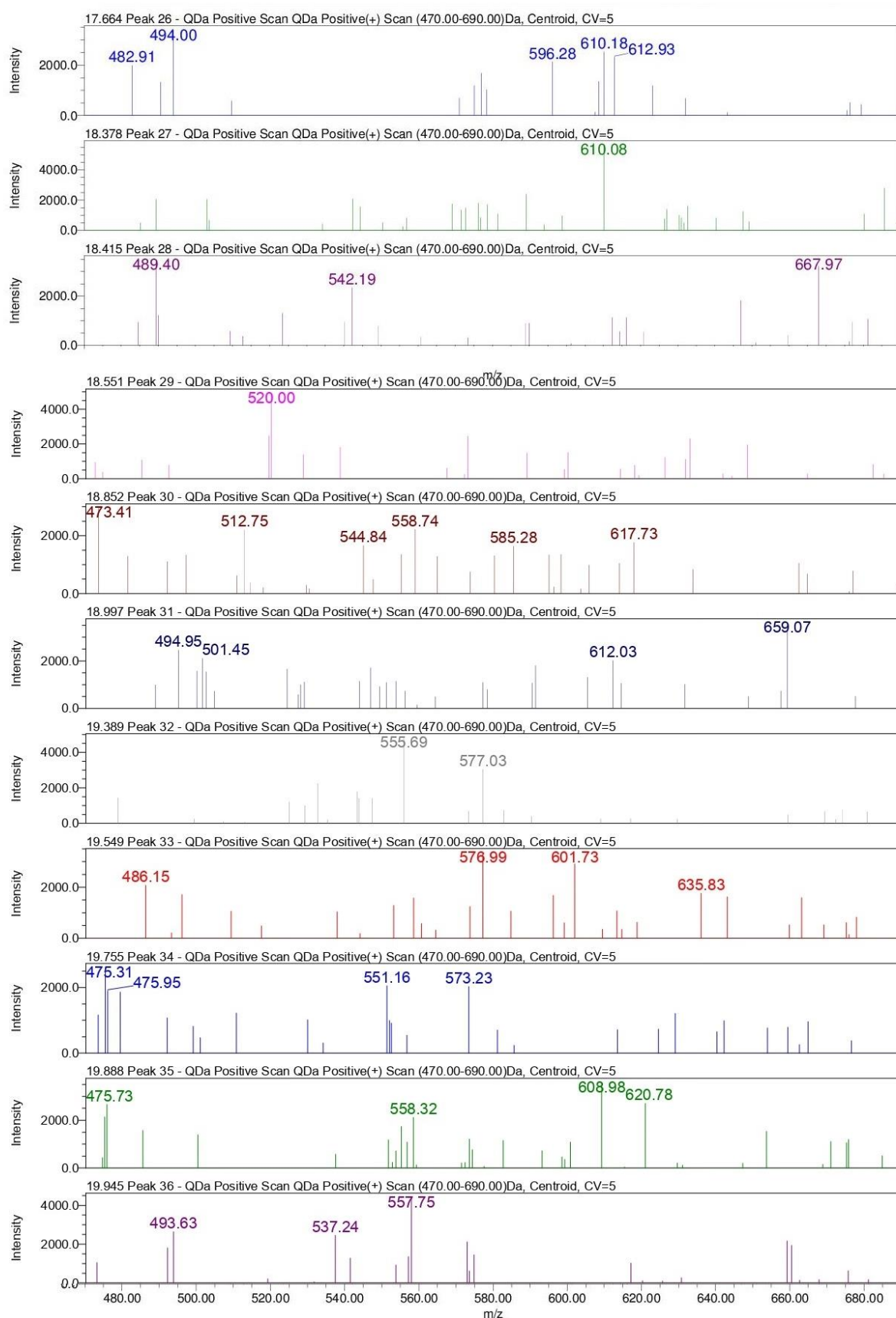
Apêndice 4. Espectros de massas da amostra 1 (picos 4 a 14)



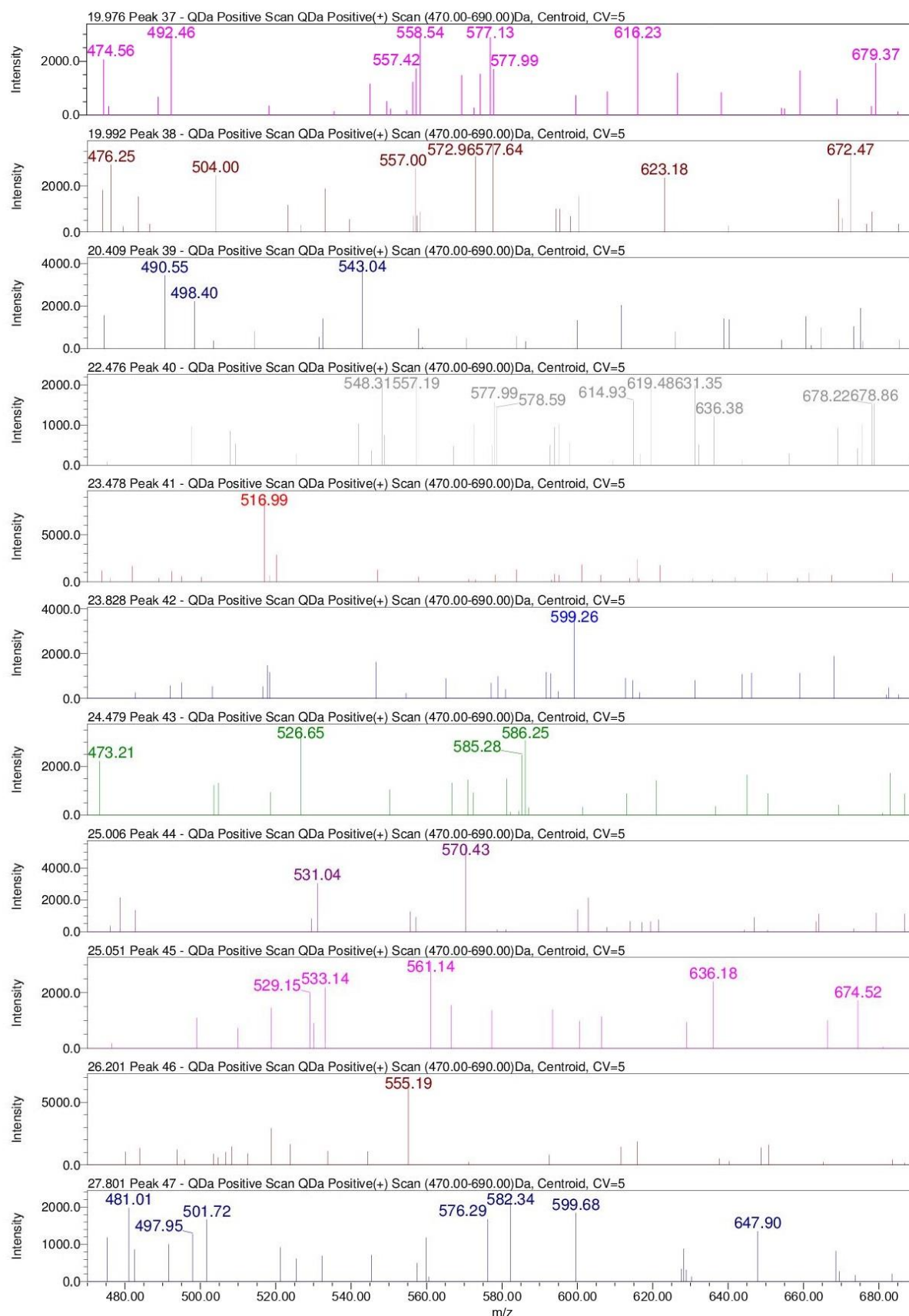
Apêndice 5. Espectros de massas da amostra 1 (picos 15 a 25)



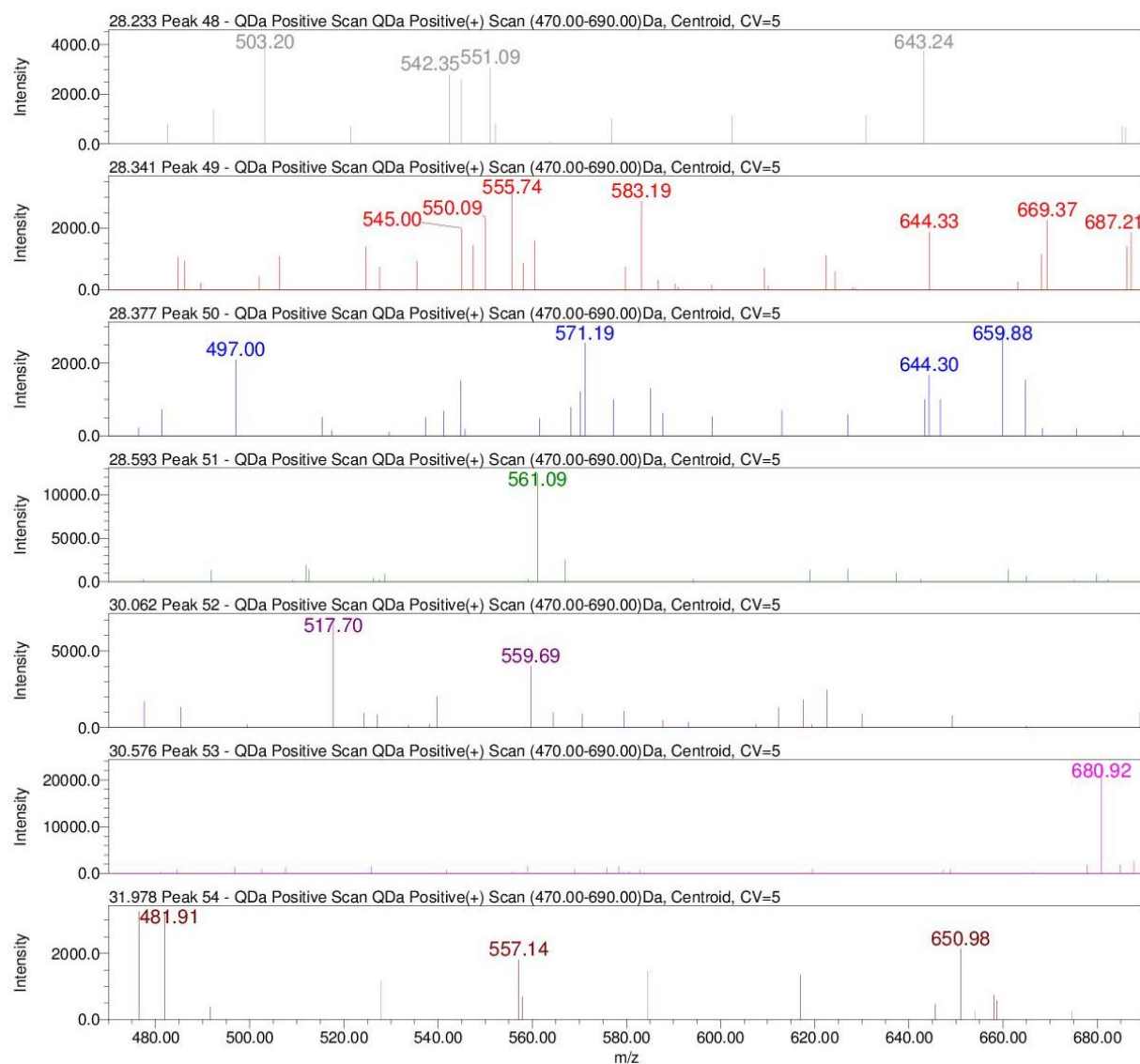
Apêndice 6. Espectros de massas da amostra 1 (picos 26 a 36)



Apêndice 7. Espectros de massas da amostra 1 (picos 37 a 47)



Apêndice 8. Espectros de massas da amostra 1 (picos 48 a 54)



Apêndice 9. Cromatogramas obtidos por HPLC-UV referente à análise da fração acetato de etila do extrato de NADES (amostra 1), fração heptânica do extrato

etanólico (amostra FH₃), fração acetato de etila do extrato etanólico (amostra 3) e fração metanol: água 98:02 do extrato etanólico (amostra 5). Condições de análise: coluna de C18 (250 x 4,6 mm; 5 µm); fase móvel em gradiente linear de metanol:acetonitrila:água 22:44:34 (v/v) para 47:53:00 em 42 min e, 5 min isocraticamente em 47:53:00; vazão de 0,8 mL/min; o volume de injeção de 20 µL; comprimentos de onda em 254 nm

