

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
INSTITUTO DE QUÍMICA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÂNICA

Naira Buzzo Anhesine

**Documentação química de espécies do gênero *Casearia* (Salicaceae) de
importância ecológica, econômica e medicinal**

Araraquara
2015

NAIRA BUZZO ANHESINE

Documentação química de espécies do gênero *Casearia* (Salicaceae) de importância ecológica, econômica e medicinal

Monografia apresentada ao Instituto de Química
Universidade Estadual Paulista “Júlio de
Mesquita Filho”, como parte dos requisitos para
obtenção do grau de Bacharel em Química.

Orientador: Prof. Dr. Alberto José Cavaleiro

Araraquara
2015

"It matters not what someone is born, but what they grow to be."

-J.K. Rowling

Agradecimentos

Primeiramente, eu gostaria de agradecer a Deus por ter me dado forças para superar as dificuldades.

À toda a minha família, em especial meu pai, Marcelo e minha mãe, Silvia, por todo o amor incondicional, apoio e incentivo durante as etapas da minha vida, por sempre estarem presentes me aconselhando e me guiando e por serem os exemplos que eu sigo com tanto carinho.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Alberto José Cavalheiro, pela atenciosa orientação, pela oportunidade de trabalho, por sempre estar disponível quando precisei e por todo o ensinamento fornecido.

À minha co-orientadora, Dr^a Paula Bueno, por todo carinho, atenção, paciência, por todo o conhecimento profissional e pessoal e por ser essa amiga incrível.

À todos os membros do NuBBE, em especial, Gabriel Mazzi, Vinicius Ferreira, Lilian Cherubin e Alene Cortes pela amizade e parceria e por toda a ajuda e apoio durante a execução do trabalho.

Ao meu namorado, Renan Zanetti, pessoa que admiro muito, por todo o amor, carinho, atenção, por me apoiar e me encorajar nas tomadas de decisões e por me tranquilizar quando algo me atormentava.

Aos meus amigos, Weslei Botero, Gabriel Martins, Luís Bricks Bim, Douglas Saraiva, Samir Tayar, Flávia Farinelli e Rodrigo César por serem pessoas sensacionais que sempre estiveram comigo, proporcionando horas e horas de risada e descontração. Amigos que levo pra vida.

Ao NPPNS pelas análises de CG-EM realizadas.

À FAPESP pela bolsa concedida (#2014/02738-0).

Ao Instituto de Química da UNESP Araraquara.

À todos que fizeram parte da minha formação e que tornaram este trabalho possível.

Resumo

O gênero *Casearia* (Salicaceae) é muito conhecido pelo uso medicinal de suas espécies. Dentre elas, pode-se citar a espécie *C. sylvestris* a qual já possui estudos acerca de sua atividade antiproliferativa e/ou citotóxica em células tumorais, além de ser muito utilizada popularmente como anti-inflamatório, contra picadas de cobras e no tratamento de úlceras gástricas. Assim como esta, outras espécies desse mesmo gênero, ainda muito pouco estudadas, apresentam relatos de diversas atividades biológicas como, por exemplo, as espécies *C. decandra*, *C. grandiflora*, *C. javitensis*, *C. arborea*, *C. lasiophylla* e *C. ulmifolia*. Neste contexto, o intuito deste trabalho, além de contribuir com o estudo do gênero *Casearia*, é explorar essas seis espécies citadas, através da análise e documentação da composição química dos extratos aquosos, etanólicos e hexânicos de suas folhas utilizando técnicas analíticas de separação hifenadas com técnicas espectroscópicas, tais como UHPLC-DAD, GC-MS, RMN ^1H , as quais auxiliarão a identificação de novos metabólitos secundários no gênero. Além disso, outra finalidade do presente trabalho é buscar substâncias com potencial medicinal e econômico e, finalmente, promover o estudo sistematizado de algumas atividades biológicas, tais como ensaios antimicrobianos e citotóxicos. Uma grande variedade de metabólitos foi identificada nos três tipos de extratos das seis espécies em estudo, sendo a maioria detectada pela primeira vez no gênero *Casearia*, merecendo destaque as espécies *C. lasiophylla* e *C. decandra* por apresentarem atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*.

Palavras-chave: *Casearia*. Cromatografia Gasosa. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. Atividade Antimicrobiana.

Abstract

The *Casearia* genus (Salicaceae) is well known because of the medicinal use of its species. Among them, a noteworthy one is the *C. sylvestris* specie because it already has studies concerning its antiproliferative and/or cytotoxic activity in tumor cells. Furthermore, this specie is popularly used against snake bites, in gastric ulcers treatment and as anti-inflammatory. As well as this, there are other species from this same genus which have been poorly studied, such as the following species: *C. decandra*, *C. grandiflora*, *C. javitensis*, *C. arborea*, *C. lasiophylla* and *C. ulmifolia*. However, several biological activities have been reported for them. In this context, the aim of this project, besides of contributing to the *Casearia* genus studies, is to study those six species through the analysis and documentation of their leaves' chemical composition (aqueous, ethanolic and hexanic extracts), using analytical separation techniques coupled with spectroscopic techniques, such as UHPLC-DAD, GC-MS and NMR ^1H , which will assist the identification of new secondary metabolites in this genus. Moreover, another goal of this present work is aiming the bioprospection of substances with medicinal and economical potential and finally promote the systematic study of some biological activities, such as antimicrobial and cytotoxicity bioassays. A wide variety of metabolites was identified in those three types of extracts, being most of them detected for the first time in *Casearia* genus, highlighting *C. lasiophylla* and *C. decandra* for featuring antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus*.

Key words: *Casearia*. Gas Chromatography. High Performance Liquid Chromatography. Antimicrobial Activity.

Lista de figuras

Figura 1 – Esqueleto básico de um diterpeno clerodânico.

Figura 2 – Estrutura de um fenilpropanoide (β -hidroxipropiovanilona) identificado no gênero *Casearia*.

Figura 3 – Estrutura de um flavonoide ((+)-catequina) identificado no gênero *Casearia*.

Figura 4 – Distribuição geográfica da espécie *C. sylvestris*.

Figura 5 – Distribuição geográfica da espécie *C. grandiflora*.

Figura 6 – Distribuição geográfica da espécie *C. javitensis*.

Figura 7 – Distribuição geográfica da espécie *C. arborea*.

Figura 8 – Distribuição geográfica da espécie *C. lasiophylla*.

Figura 9 – Distribuição geográfica da espécie *C. decandra*.

Figura 10 – Distribuição geográfica da espécie *C. ulmifolia*.

Figura 11 – Representação da degenerescência do estado de spin na presença e ausência de campo aplicado para o próton.

Figura 12 – Representação esquemática da inversão de spin através da absorção de energia quando aplicado um campo magnético.

Figura 13 – Esquema dos extratos obtidos e suas referentes análises.

Figura 14 – Nomograma de força eluotrópica em modo normal de eluição.

Figura 15 – Placas cromatográficas do extrato hexânico de *C. arborea*, representado como exemplo, em hexano/IPA 97:03.

Figura 16 – Cromatogramas dos extratos aquosos de folhas de *Casearia*, registrados em 254 nm.

Figura 17 – Cromatogramas dos extratos etanólicos de folhas de *Casearia*, registrados em 254 nm.

Figura 18 – Mecanismo proposto de metoximação do ácido glicérico.

Figura 19 – Mecanismo proposto da primeira sililação do ácido glicérico formando o derivado 1TMS.

Figura 20 – Exemplo de cálculo do IR do ácido glicérico (1MEOX 3TMS) utilizando a equação de Van Den Dool e Kratz.

Figura 21 – Estrutura molecular e espectros de massas do fitol (1TMS).

Figura 22 – Segmentação α : formação do pico base em $m/z = 143$.

Figura 23 – Segmentação indutiva: formação do pico $m/z = 73$.

Figura 24 – Cromatogramas referentes às análises por CG-EM dos extratos aquosos sililados de *Casearia* spp.

Figura 25 – Teor relativo das classes de substâncias identificadas nos extratos aquosos sililados de *Casearia* spp.

Figura 26 – Estrutura molecular das principais substâncias identificadas nos extratos aquosos de *Casearia* spp como derivados trimetilsililados.

Figura 27 – Cromatogramas referentes às análises por CG-EM dos extratos hexânicos não sililados de *Casearia* spp.

Figura 28 – Estrutura molecular das substâncias identificadas em comum nos extratos hexânicos não sililados de *Casearia* spp.

Figura 29 – Teor relativo das classes de substâncias identificadas nos extratos hexânicos não sililados de *Casearia* spp.

Figura 30 – Cromatogramas referentes às análises por CG-EM dos extratos hexânicos sililados de *Casearia* spp.

Figura 31 – Estrutura molecular das substâncias majoritárias identificadas nos extratos hexânicos sililados de *Casearia* spp.

Figura 32 – Teor relativo das classes de substâncias identificadas nos extratos hexânicos sililados de *Casearia* spp.

Figura 33 – Cromatograma do extrato etanólico da espécie *C. lasiophylla* destacando duas regiões referentes à presença de flavonoides e diterpenos clerodânicos as quais também puderam ser identificadas por RMN ^1H .

Figura 34 – Espectros de RMN ^1H (CD_3OD) referentes aos extratos aquosos das seis espécies em estudo e de duas variedades de *C. sylvestris*.

Figura 35 – Espectros de RMN ^1H (CD_3OD) referentes aos extratos etanólicos das seis espécies em estudo e de duas variedades de *C. sylvestris*.

Figura 36 – Cromatogramas registrados a 254 nm referentes às 8 frações (0 a 7) do extrato aquoso de *C. lasiophylla*.

Figura 37 – CAD correspondente aos cromatogramas descritos na Figura 36.

Figura 38 – Espectros de RMN ^1H referentes às frações de 0 a 7 da espécie *C. lasiophylla*.

Lista de tabelas

Tabela 1 – Proporções de hexano e AcOEt utilizadas como fases móveis.

Tabela 2 – Fases móveis correspondentes às oito frações coletadas.

Tabela 3 – Rendimento obtido de massa seca por cada grama vegetal.

Tabela 4 – Fases móveis testadas nas análises de CCD e respectivas forças de eluição.

Tabela 5 – Espectros no UV/Vis obtidos com a análise por UHPLC-DAD das possíveis classes presentes.

Tabela 6 – Substâncias tentativamente identificadas no extrato aquoso sililado de cada espécie através do Índice de Similaridade (SI) e do Índice de Retenção (IR).

Tabela 7 – Substâncias tentativamente identificadas no extrato hexânico não sililado de cada espécie através do Índice de Similaridade (SI) e do Índice de Retenção (IR).

Tabela 8 – Substâncias tentativamente identificadas no extrato hexânico sililado de cada espécie através do Índice de Similaridade (SI) e do Índice de Retenção (IR).

Tabela 9 – Classe de compostos identificados por detecção UV nas frações 5, 6 e 7.

Sumário

1	INTRODUÇÃO	9
1.1	O gênero Casearia	9
1.1.1	<i>Casearia grandiflora</i>	12
1.1.2	<i>Casearia javitensis</i>	13
1.1.3	<i>Casearia arborea</i>	14
1.1.4	<i>Casearia lasiophylla</i>	15
1.1.5	<i>Casearia decandra</i>	16
1.1.6	<i>Casearia ulmifolia</i>	17
1.2	Técnicas analíticas de separação aplicadas em metabolômica	18
1.2.1	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	19
1.2.2	Cromatografia Gasosa (CG)	20
1.2.3	Ressonância Magnética Nuclear.....	21
2	OBJETIVO	23
3	JUSTIFICATIVA.....	24
4	DESENVOLVIMENTO	25
4.1	Materiais	25
4.1.1	Equipamentos.....	25
4.1.2	Reagentes, solventes e adsorventes.....	26
4.1.3	Material vegetal.....	26
4.2	Métodos	27
4.2.1	Processamento do material vegetal e preparo dos extratos	27
4.2.2	Cromatografia em Camada Delgada (CCD).....	28
4.2.3	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	29
4.2.4	Cromatografia Gasosa (CG)	29
4.2.5	Forma de análise dos resultados obtidos por GC-MS.....	30
4.2.6	Ressonância Magnética Nuclear (RMN ¹ H) dos extratos aquosos e etanólicos	31
4.2.7	Fracionamento do extrato aquoso da espécie <i>C. lasiophylla</i>	31
4.3	Resultados e Discussão	34
4.3.1	Processamento do material vegetal e preparo dos extratos	34
4.3.2	Cromatografia em Camada Delgada (CCD).....	34
4.3.3	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	36

4.3.4	Cromatografia Gasosa (CG)	39
4.3.5	Ressonância Magnética Nuclear (RMN ¹ H) dos extratos aquosos e etanólicos	54
4.3.6	Análise das frações da <i>C. lasiophylla</i> por CLAE-DAD-CAD	58
4.3.7	Análise das frações da <i>C. lasiophylla</i> por RMN ¹ H	60
5	CONCLUSÃO	62
6	REFERÊNCIAS	63

1 INTRODUÇÃO

1.1 O gênero *Casearia*

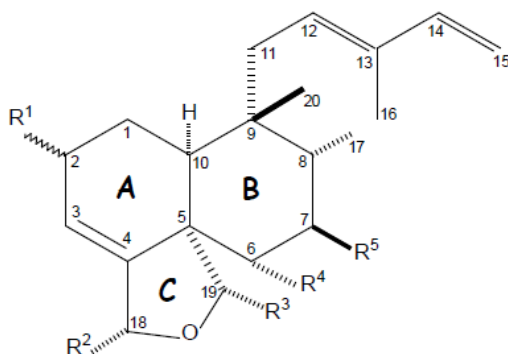
O gênero *Casearia* Jacq. compreende cerca de 180 espécies de distribuição pantropical (SLEUMER, 1980) e com 70 delas largamente distribuídas no Brasil (MAISTRO et al., 2004). Espécies de tal gênero podem ser utilizadas em espaços públicos, por apresentarem porte médio e raiz profunda, o que não afeta as calçadas. Além disso, sua madeira pode ser utilizada comercialmente como lenha, na construção civil e também na marcenaria. Provavelmente, a sua grande dispersão pelo neotrópico é o fato de essas espécies serem dispersas por aves que comem suas sementes. Além disso, suas flores apresentam néctar aromático aproximando uma grande quantidade de visitantes, principalmente insetos (MARQUETE & VAZ, 2007).

Espécies desse gênero destacam-se por sua importância econômica e medicinal, sendo relatadas atividades biológicas como, anti-inflamatória, antiúlcera, antiofídica, citotóxica entre outras. Não somente o gênero *Casearia*, mas plantas em geral acumulam substâncias responsáveis por tais atividades, os metabólitos secundários. Eles têm sido um tema atrativo na pesquisa de produtos naturais devido a sua diversidade estrutural e farmacológica. Devido a isso, representam uma fonte abundante de substâncias desconhecidas com potencial para serem utilizadas como fármacos (XIA et al., 2014).

Estudos realizados até Maio/2013 relatam a presença de 287 compostos identificados no gênero *Casearia* e pode-se dizer que terpenoides é a classe de metabólitos predominante, dando destaque para os diterpenos clerodânicos. Além destes, também há relatos de fenilpropanoides, esteroides, flavonoides e outros fenólicos (XIA et al., 2014).

No gênero, já foram isolados cerca de 152 diterpenos clerodânicos sendo esta, a classe de metabólito secundário considerada de grande importância, já que é responsável por uma série de atividades biológicas tais como antiviral e antitumoral (XIA et al., 2014).

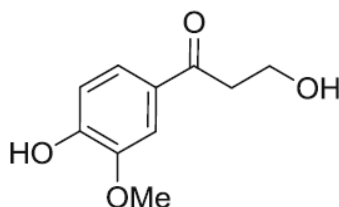
Figura 1 - Esqueleto básico de um diterpeno clerodânico.



(Fonte: SANTOS, 2008)

Além dos terpenoides, outra classe presente em quantidade significativa no gênero são os fenilpropanoides também responsáveis pela atividade antitumoral (CHANG et al., 2003; XIA et al., 2014).

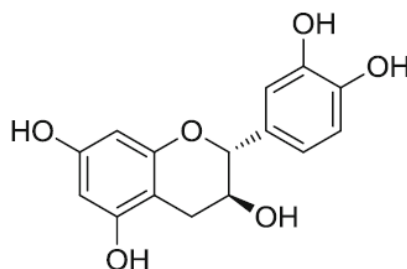
Figura 2 - Estrutura de um fenilpropanoide (β -hidroxipropiovanilona) identificado no gênero *Casearia*.



(Fonte: XIA et al., 2014)

No caso dos flavonoides, somente onze foram identificados até agora tornando esta classe minoritária no gênero (XIA et al., 2014). Contudo, é de grande interesse na comunidade científica devido ao seu potencial antioxidante (KUMAR & PANDEY, 2013). Juntamente com os flavonoides e fenilpropanoides, outros dezoito fenólicos também já foram detectados em *Casearia* (XIA et al., 2014).

Figura 3 - Estrutura de um flavonoide ((+)-catequina) identificado no gênero *Casearia*.



(Fonte: BUENO, 2015)

Uma das espécies mais estudadas no gênero é a *C. sylvestris*. Ela é facilmente encontrada no território brasileiro, como pode ser observado no mapa de distribuição geográfica abaixo:

Figura 4 - Distribuição geográfica da espécie *C. sylvestris*.



(Fonte: MARQUETE, 2010)

Esta espécie é amplamente conhecida pelo seu uso na medicina popular e pelo seu alto conteúdo de diterpenos clerodânicos e flavonoides (BUENO, 2015). Investigações

farmacológicas verificaram atividades antitumoral, anti-inflamatória, antiofídica e antiulcerogênica em suas folhas mostrando que esta espécie possui grande potencial para se tornar um medicamento fitoterápico (SANTOS, 2008).

Além da *C. sylvestris*, outras espécies tais como *C. rupestris* e *C. obliqua*, também são conhecidas pelas suas composições químicas e atividades biológicas provenientes da presença de diterpenos clerodânicos (VIEIRA JÚNIOR et al., 2009; VIEIRA JÚNIOR et al., 2011).

Contudo, grande parte dos relatos sobre o gênero *Casearia* não envolvem as espécies de estudo do presente trabalho as quais são *C. grandiflora*, *C. javitensis*, *C. arborea*, *C. lasiophylla*, *C. decandra* e *C. ulmifolia*. Todas elas foram muito pouco estudadas quimicamente e, devido a isso, possuem poucos relatos na literatura.

A seguir, encontra-se um breve resumo sobre o que já existe na literatura a respeito de cada espécie envolvida no âmbito do trabalho.

1.1.1 *Casearia grandiflora*

A *C. grandiflora*, como é possível observar na distribuição geográfica abaixo, é distribuída de forma uniforme pelo território brasileiro (MARQUETE, 2010).

Estudos anteriores relatam deposição de sílica nas suas folhas e a presença de íons inorgânicos. Juntamente com as folhas, a casca dessa espécie também é usada contra a mordida de cobras. Além disso, óleos essenciais presentes em suas folhas foram obtidos por destilação a vapor e analisados por técnicas cromatográficas e espectroscópicas, sendo que os componentes majoritários encontrados no óleo essencial foram β -cariofileno (24,6%), γ -muuroleno (22,89%), β -elemeno (14,2%) e biciclogermacreno (14,7%) (DE MORAIS et al., 1997).

Figura 5 - Distribuição geográfica da espécie *C. grandiflora*.



(Fonte: MARQUETE, 2010)

1.1.2 *Casearia javitensis*

Assim como a *C. grandiflora*, a *C. javitensis* também é distribuída de forma homogênea pelo território brasileiro, principalmente nas regiões norte e nordeste (MARQUETE, 2010).

Há relatos na literatura de certa atividade antioxidante dos extratos diclorometânico, metanólico e aquoso de suas folhas e galhos (SANTOS et al., 2009).

Figura 6 - Distribuição geográfica da espécie *C. javitensis*.



(Fonte: MARQUETE, 2010)

1.1.3 *Casearia arborea*

Esta espécie apresenta alta concentração nas regiões sul e sudeste do Brasil, sendo facilmente encontrada nestas localidades, como pode ser visto na Figura 7 (MARQUETE, 2010).

Através de um fracionamento guiado por citotoxicidade do extrato diclorometano-metanol das raízes da *C. arborea*, determinou-se 5 novos diterpenos clerodânicos, casearborinas A-E, bem como cucurbitacina B e, também, foi detectada a presença de cucurbitacinas glicosiladas (BEUTLER et al., 2000).

Figura 7 - Distribuição geográfica da espécie *C. arborea*.



(Fonte: MARQUETE, 2010)

1.1.4 *Casearia lasiophylla*

Em comparação com as outras espécies, a *C. lasiophylla* é um pouco mais rara e mais difícil de ser encontrada estando presente, principalmente, na região sudeste e em parte da região sul do Brasil, como pode ser visto na Figura 8 (MARQUETE, 2010).

A *C. lasiophylla* já foi usada na medicina popular para limpar e cicatrizar feridas (PEDROSO et al., 2007). Estudos recentes obtiveram a composição química e a atividade citotóxica do óleo essencial a partir das folhas desta espécie, o qual foi obtido a partir de hidrodestilação e analisado por técnicas cromatográficas, sendo caracterizado por um alto conteúdo de sesquiterpenos cíclicos (86,4%), principalmente hidrocarbonetos (59,9%). Monoterpenos, compostos aromáticos e alifáticos também foram encontrados, mas em menor quantidade. Ao todo, 64 componentes foram detectados, dos quais os 52 identificados representaram 87,1% do total do óleo. Os constituintes majoritários foram germacreno D (18,6%), E-cariofileno (14,7%), δ -cadineno (6,2%) e α -cadinol (5,4%) (SALVADOR et al., 2011).

A citotoxicidade desse óleo foi testado *in vitro* contra algumas células humanas cancerosas se mostrando antiproliferativo, principalmente, contra UACC-62 (melanoma) e K562 (leucemia). A presença de compostos não identificados no óleo pode estar

contribuindo com essa bioatividade de modo que o isolamento e a identificação dos seus metabólitos secundários sejam necessários em estudos futuros (SALVADOR et al., 2011).

Figura 8 - Distribuição geográfica da espécie *C. lasiophylla*.



(Fonte: MARQUETE, 2010)

1.1.5 *Casearia decandra*

A *C. decandra* também é amplamente distribuída pelo território brasileiro (Figura 9) merecendo destaque as regiões sudeste e nordeste pela alta concentração desta espécie (MARQUETE, 2010).

É utilizada na medicina popular como antiofídica, cicatrizante e anti-inflamatória (GONÇALVES et al., 2009) e, também, apresenta relatos de atividade antimicrobiana de suas folhas (MARINS et al., 2011).

A composição do óleo essencial de suas folhas também foi estudada por (STEFANELLO et al., 2010) na qual 46 compostos, principalmente sesquiterpenos, foram identificados, sendo o β -cariofileno e o germacreno-D, os constituintes majoritários.

Também foi isolada a hidroquinona a partir das fases hexânica, acetato de etila e hidroalcoólica obtidas do extrato etanólico de suas folhas. Este composto isolado apresentou uma significativa atividade antifúngica e antioxidante, entretanto, inferior a dos

padrões. Além disso, a sua presença em material vegetal é de grande relevância, pois vem sendo utilizada na indústria de cosméticos bem como no tratamento de melasma, sardas, lentigines e outros problemas de hiperpigmentação da pele já que estudos demonstraram que esse composto possui benefício terapêutico (VIEIRA JÚNIOR, 2010).

Figura 9 - Distribuição geográfica da espécie *C. decandra*.



(Fonte: MARQUETE, 2010)

1.1.6 *Casearia ulmifolia*

Esta espécie é a única das seis estudadas que não apresenta relatos de sua composição química, mas sim, de seus dados fisiológicos e sua distribuição geográfica.

Ela é uma árvore/arbusto que apresenta comprimento de 4 a 26 metros de altura, a casca de seu tronco é lisa e marrom e suas folhas são opacas e variam de tamanho. Nos meses de dezembro a setembro, a planta apresenta botão e flor e seus frutos imaturos e maduros podem ser vistos, principalmente, nos meses de janeiro a julho. Além disso, ela pode ser encontrada nas regiões norte, nordeste e sudeste do Brasil (MARQUETE, 2010).

Figura 10 - Distribuição geográfica da espécie *C. ulmifolia*.



(Fonte: MARQUETE, 2010)

1.2 Técnicas analíticas de separação aplicadas em metabolômica

Na pesquisa de produtos naturais, o termo metabólito é largamente utilizado e se refere tanto aos compostos essenciais à vida do indivíduo, os metabólitos primários (aminoácidos, lipídios, carboidratos), quanto aos compostos que não são essenciais, mas que exercem um papel importante na defesa do organismo, os metabólitos secundários (alcaloides, terpenoides, polifenóis) (WOLFENDER et al., 2015).

Devido aos seus potenciais farmacológicos, os metabólitos secundários merecem destaque, já que podem ser utilizados na busca por novos fármacos e, então, na produção de fitoterápicos (WOLFENDER et al., 2015).

Em metabolômica de produtos naturais, o principal objetivo é obter informação precisa da composição química de extratos naturais, mais precisamente os metabólitos secundários presentes, os quais são normalmente obtidos a partir de plantas ou microorganismos. Devido a isso, métodos analíticos de separação hifenados com técnicas espectrométricas são uma grande ferramenta para se obter o perfil químico de tais sistemas

bem como detectar, identificar e isolar as substâncias de interesse farmacológico (WOLFENDER et al., 2015).

A seguir, estão descritas as três técnicas, Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, Cromatografia Gasosa e Ressonância Magnética Nuclear, utilizadas na identificação dos metabólitos das seis espécies de *Casearia* estudadas.

1.2.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

A capacidade de separar substâncias similares presente em uma mistura torna a cromatografia líquida de alta eficiência um importante integrante de um grande conjunto de técnicas de separação (COLLINS et al., 2006).

Há vários mecanismos que governam as separações em cromatografia líquida. Entretanto, neste trabalho foi utilizada a cromatografia por adsorção em fase reversa com eluição em gradiente e será dado um enfoque maior para tal.

Nesse mecanismo de separação, há uma competição entre as moléculas da amostra e as da fase móvel polar, para ocupar os sítios ativos da fase estacionária apolar. Dessa forma, moléculas polares têm maior afinidade pela fase móvel sendo, então, eluídas primeiramente com menor tempo de retenção e as moléculas mais apolares têm maior afinidade pela fase estacionária sendo, portanto, mais retidas e eluídas com maior tempo de retenção (COLLINS et al., 2006).

Em amostras contendo misturas de compostos com características químicas variadas, como extratos vegetais, é mais viável utilizar a eluição por gradiente, ou seja, a composição da fase móvel varia durante a análise de forma que a sua força de eluição aumenta gradualmente diminuindo o tempo de análise e melhorando a simetria, resolução e detectabilidade dos picos (COLLINS et al., 2006).

Normalmente, a CLAE é hifenada a uma técnica espectrométrica como a espectrometria de massas, a qual fornecerá informações mais precisas, tais como sua quantificação, pureza e massa molar e estrutural do analito presente em cada pico através do espectro de massas gerado. A CLAE também pode ser acoplada a detectores universais ou seletivos a um determinado tipo de substância, como o detector de arranjo de diodos (COLLINS et al., 2006). Este detector foi utilizado no presente trabalho e, tem como função, detectar substâncias com grupos cromóforos, ou seja, aquelas que absorvem radiação ultravioleta (PAVIA et al., 2010).

Assim como toda técnica analítica, a CLAE apresenta suas vantagens e desvantagens. O alto custo da instrumentação e operação assim como a falta de um detector universal são grandes limitações da técnica. Contudo, ela apresenta uma série de vantagens tais como tempo reduzido de análise, alta resolução, boa detectabilidade, versatilidade, boa análise qualitativa e quantitativa (COLLINS et al., 2006). Estas características classificam a CLAE em uma das técnicas mais versáteis e, portanto, mais utilizadas em pesquisas de produtos naturais (WOLFENDER, 2009).

1.2.2 Cromatografia Gasosa (CG)

A cromatografia gasosa possui várias vantagens em relação à cromatografia líquida, tais como maior capacidade de picos, maior reprodutibilidade e, quando acoplada a espectrômetro de massas (CG-EM), fornece espectros de massas por ionização eletrônica (IE) altamente reprodutíveis, que podem ser comparados a espectros depositados em bancos de dados, fornecendo indicações mais robustas a cerca da identificação dos compostos presentes em misturas complexas. Além disso, pode fornecer, também, dados de índice de retenção os quais contribuem na identificação das substâncias juntamente com o índice de similaridade fornecido pela comparação entre os espectros massas da literatura e obtidos experimentalmente. No entanto, apresenta algumas desvantagens importantes que incluem a necessidade dos analitos serem relativamente voláteis e termo estáveis. Compostos apolares com $MM < 400$ Da geralmente atendem a essas condições (BRAITHWAITE & SMITH, 1996; COLLINS et al., 2006).

Devido a isso, várias substâncias não podem ser analisadas prontamente por cromatografia gasosa (CG), seja por possuírem forte interação com a fase estacionária, seja porque não são voláteis ou termoestáveis o suficiente para serem detectadas (BRAITHWAITE & SMITH, 1996).

Por isso, a derivação antes de realizar a análise é de grande importância, pois além de aumentar a volatilidade da amostra, ela aumenta sua estabilidade térmica. Ainda, ela trás consigo outros benefícios, tais como, aumentar a resposta do detector através da incorporação dos grupos funcionais derivados produzindo picos com intensidades maiores e aperfeiçoar a separação e reduzir o encaudamento dos picos (BRAITHWAITE & SMITH, 1996).

Esta transformação dos compostos em derivados torna possível a análise de algumas substâncias que seriam impossíveis de serem analisadas em CG. Aminoácidos e açúcares são

exemplos de compostos que podem ser identificados por CG com o auxílio da derivação. Ainda, as substâncias mais polares são as que apresentam maior dificuldade de serem estudadas via CG devido às ligações de hidrogênio que são formadas e, por sua vez, dificultam a volatilidade das mesmas. Contudo, não somente as substâncias polares mostram tal dificuldade, moléculas com massa molecular elevada também apresentam baixa volatilidade (DROZD, 1981).

Frequentemente, estes compostos polares de baixa volatilidade se adsorvem no suporte cromatográfico e o resultado disto é o encaudamento do pico cromatográfico o que dificulta a quantificação do mesmo. Além disso, compostos que são termicamente instáveis não podem ser analisados por CG, pois podem se decompor no injetor e gerar uma série de picos no cromatograma referentes aos produtos formados na degradação (DROZD, 1981).

Então, pode-se concluir que este preparo de amostra permite que muitos compostos sejam analisados, tanto os apolares quanto os polares, os termicamente instáveis e os que possuem baixa volatilidade.

1.2.3 Ressonância Magnética Nuclear

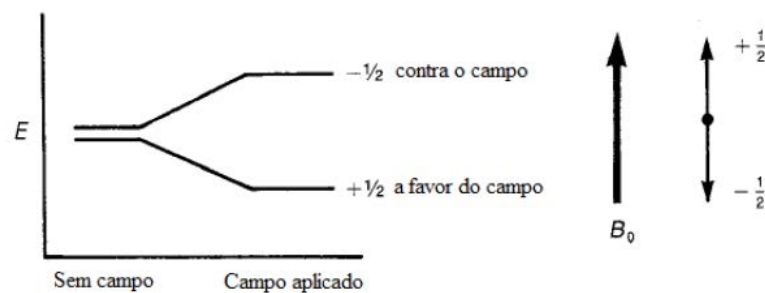
Assim como a espectrometria no infravermelho (IV) e no ultravioleta (UV), a Ressonância Magnética Nuclear (RMN) é uma outra forma de espectroscopia de absorção. Em um campo magnético e sob condições favoráveis, uma amostra pode absorver radiação eletromagnética em uma frequência rígida, na região de radiofrequências, devido às características estruturais da amostra. Como a absorção é função de somente alguns núcleos da molécula, um espectro de RMN representa as frequências dos picos de absorção em função de suas intensidades (SILVERSTEIN et al., 2007).

O princípio envolvido na técnica é a propriedade de spin que, assim como os elétrons, os núcleos também a apresentam. Qualquer núcleo atômico que contenha uma massa ou um número atômico ímpar ou então ambos, possuem um momento angular de spin e um momento magnético. Os mais frequentes são ^1_1H e $^{13}_6\text{C}$, bem como outros núcleos que também exibem o fenômeno de ressonância magnética (PAVIA et al., 2010). Neste trabalho, foi realizada a RMN ^1_1H e, portanto, será dado um enfoque maior para tal.

Os estados de spin de um núcleo têm energia degenerada. Esta degenerescência é quebrada quando um campo magnético é aplicado sobre ele, já que o núcleo é uma partícula carregada e pode gerar um campo magnético próprio. Dessa forma, há um

momento magnético μ atrelado ao núcleo que é originado através de sua carga e spin. No caso do hidrogênio, há dois estados de spin possíveis: $+\frac{1}{2}$ no sentido horário e de energia menor, pois está alinhado com o campo e $-\frac{1}{2}$ no sentido anti-horário e de energia maior, pois está oposto ao campo aplicado (PAVIA et al., 2010).

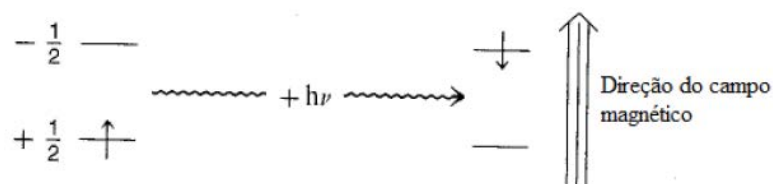
Figura 11 - Representação da degenerescência do estado de *spin* na presença e ausência de campo aplicado para o próton.



(Fonte: PAVIA et al., 2010)

Assim sendo, no momento em que os núcleos alinhados com o campo aplicado são incentivados a absorver energia e mudar a orientação de seu spin em relação ao campo aplicado, ocorre o fenômeno de ressonância magnética nuclear (PAVIA et al., 2010).

Figura 12 - Representação esquemática da inversão de spin através da absorção de energia quando aplicado um campo magnético.



(Fonte: PAVIA et al., 2010)

Em geral, a análise por RMN apresenta uma grande vantagem quando comparada com outras técnicas, pois além do preparo de amostra ser simples, o tempo de análise é curto e não é uma técnica destrutiva (ALI et al., 2011). Dessa forma, esta técnica analítica é amplamente utilizada no estudo metabolômico de plantas permitindo, inclusive, a obtenção de informações tais como a interação do organismo com outros e com o ambiente em que se encontra (KIM et al., 2011).

2 OBJETIVO

O objetivo principal deste projeto é promover a documentação química de seis espécies do gênero *Casearia*, aplicando técnicas analíticas de separação, detecção e identificação dos metabólitos secundários presentes ao mesmo tempo em que se promoverá um treinamento intensivo à aluna de iniciação científica na utilização de tais técnicas e análise dos resultados. Sendo assim, os objetivos específicos são:

- Contribuir para o conhecimento de espécies do gênero *Casearia*, nativas do Brasil;
- Avaliar a composição química de extratos das folhas de cada uma destas espécies através do emprego de técnicas analíticas cromatográficas e espectrométricas;
- Fornecer subsídios para o isolamento e caracterização de novas substâncias naturais bioativas de uma amostra selecionada, em etapa posterior;
- Fornecer para a candidata à bolsa de IC treinamento qualificado em técnicas avançadas de análise qualitativa de compostos orgânicos em extratos vegetais (desreplicação), que incluem métodos de separação de alta eficiência (GC e LC) hifenados ou não a métodos espectrométricos (UV/Vis, EM e RMN).

3 JUSTIFICATIVA

Visando contribuir com o estudo de espécies nativas da flora brasileira, que apresentam considerável importância ecológica, econômica e social, esta última devido à disseminação do uso popular por conta de propriedades medicinais, este trabalho propõe o estudo fitoquímico de seis espécies do gênero *Casearia*, utilizando técnicas modernas de desreplicação de baixíssimo impacto ambiental. Essas análises qualitativas em pequena escala, associadas à avaliação de atividade em testes biológicos selecionados, indicarão a amostra mais promissora, isto é, aquela que apresentar ação biológica mais potente e ocorrência de metabólito ainda não descrito, que será submetida, em etapa posterior, a fracionamento dirigido para o isolamento e caracterização química do metabólito(s) secundário(s) supostamente novo. Além disso, o projeto pauta-se no âmbito da rede temática CECAA - "Prospecção de moléculas bioativas e estudo de variabilidade infra-específica em plantas e microrganismos endofíticos do Cerrado e Caatinga. Contribuição para o conhecimento e uso sustentável da biodiversidade brasileira." (CNPq 563311/2010-0 e FAPESP 2010/52327-5) e do CIBFar - Centro de Inovação em Biodiversidade e Fármacos (CEPID / FAPESP 2013/07600-3), que visam o estudo da biodiversidade brasileira do ponto de vista químico, com o objetivo de descobrir novas moléculas naturais com potencial uso terapêutico.

4 DESENVOLVIMENTO

4.1 Materiais

4.1.1 Equipamentos

- Balança analítica Mettler Toledo, modelo AG204 (máx. 210 g; d = 0,1 mg);
- Banho de ultrassom Elmasonic, modelo S 60H;
- Banho para aquecimento IKA HB 05.06 CN;
- Cartucho Chromabond® C18ec;
- Cromatógrafo a gás Shimadzu QP-2010 equipado com injetor automático Shimadzu AOC-5000 e acoplado a um espectrômetro de massa Shimadzu (CG-EM), com coluna Agilent DB-5MS (30 m x 0,25 cm x 0,25 mm), controlado por software *GCMS solutions Ver. 2.5*;
- Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência Dionex, modelo Ultimate 3000 RS acoplado a detector de arranjo de diodos, compartimento para coluna com aquecimento, bomba quaternária e amostrador automático, todos modelo 3000RS. Também foi utilizado o detector Corona CAD Charged Aerosol Detector;
- Estufa de secagem de material de laboratório Marconi, modelo MA 033/3;
- Estufa para Esterilização e Secagem GEHAKA G4023D 12;
- Liofilizador Savant modulyo;
- Microfiltro de 0,22 µm Milipore;
- Mini-centrífuga GmCLab - Gilson, modelo CAPSULEFUGE PMC – 880, 6200 rpm;
- Moinho analítico Ika Labortechnik, modelo A11 Basic;
- Pipetas automáticas de 10, 100, 200 e 1000 µL, LabMate;
- RMN 600 MHz Bruker Avance III HD 600 equipado com as probes BBO 600 MHz S3 5mm com Z-gradiente (utilizada neste estudo) e uma Crioprobe com 4 canais com controle de temperatura. O equipamento possui trocador automático de amostras, automação quanto aos procedimentos de lock, sintonia dos núcleos e shimming; Software TopSpin 3.2 (Bruker);
- Sistema de purificação de água Millipore Mili-Q®;
- Speed Vac Thermo, modelo SPD SpeedVac.

4.1.2 Reagentes, solventes e adsorventes

- Acetato de etila Synth;
- Acetonitrila HPLC Analisis Real 99,995%, J. T. Baker;
- Água Mili Q®;
- Álcool etílico absoluto HPLC Analisis Real, J. T. Baker;
- Anisaldeído (feito em laboratório);
- Cloridrato de Metoxiamina Sigma-Aldrich 98%;
- Éter etílico QHE017-1L QHEMIS;
- Hexano Synth;
- Isopropanol HPLC, J. T. Baker;
- Metanol d4 99,8% + 0,05 v/v TMS (Aldrich, São Paulo, Brasil);
- MSTFA [N-metil-N(trimetilsilil)trifluoroacetamida] Sigma-Aldrich, bio reagente para sililação;
- Piridina TEDIA ACS 99%;
- Placas cromatográficas pré-fabricadas e revestidas com sílica.

4.1.3 Material vegetal

Folhas de *C. decandra* foram coletas na Estação Ecológica e Floresta Estadual de Angatuba, Angatuba-SP, uma área de cerrado e mata estacional semidecídua, em 7 de março de 2014 pela Dr^a. Roseli B. Torres; *C. grandiflora*, *C. javitensis* e *C. arborea* foram coletadas na Floresta Nacional do Araripe, Crato-CE, em área de carrasco (transição cerrado/caatinga), em 22 de julho de 2014, pelas Dr^a. Roseli B. Torres e Prof^a. Dr^a. Maria Goretti V. Silva; *C. lasiophylla* foi coletada na UNESP – Campus de Assis, pelo Prof. Dr. Alberto J. Cavalheiro. Todas estas amostras foram identificadas pela Dr^a. Roseli B. Torres (IAC). Finalmente, folhas de *C. ulmifolia* foram coletadas pela Prof^a. Dr^a. Mariana H. Chaves em Jatoba-PI e identificadas pela Ms. Ruth Raquel. Para este estudo, apenas as folhas foram utilizadas e tratadas devidamente como será descrito a seguir.

4.2 Métodos

4.2.1 Processamento do material vegetal e preparo dos extratos

Após realizada a coleta, as folhas dessas seis espécies foram desidratadas em estufa à 40°C durante 24 horas e em seguida trituradas em moinho, peneiradas e armazenadas em tubos Falcon de 50 mL.

Nas extrações foram utilizados 3 solventes com diferentes polaridades (água, etanol e hexano, em sequência) com a finalidade de se extrair a maior variabilidade de substâncias.

Partiu-se de 7 g de material vegetal e, para cada solvente extrator citado acima, foram realizadas três extrações sucessivas com os seguintes volumes: 60 mL, 30 mL e 30 mL. Entre cada extração, as amostras foram submetidas a um banho de ultrassom por 10 minutos e, então, filtradas em papel de filtro direto para tubos Falcon.

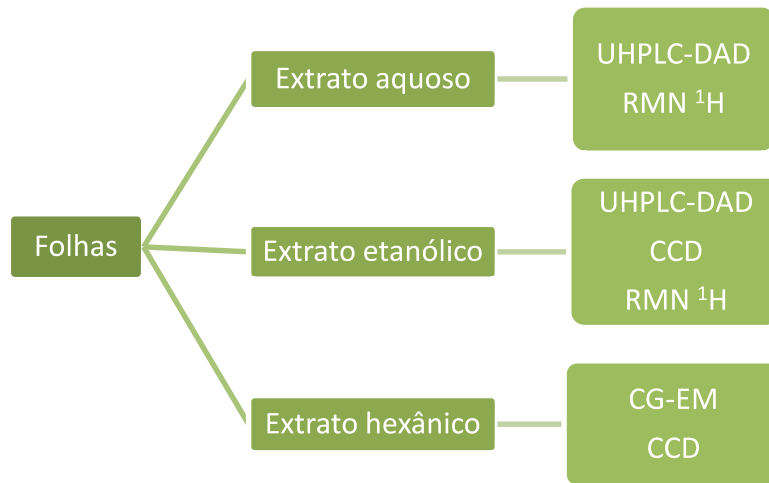
Os extratos aquosos obtidos foram congelados em nitrogênio líquido para liofilização, os etanólicos foram secos em Speed Vac e os hexânicos, secos a pressão ambiente na capela.

Durante os processos de extração, alíquotas de 1 mL, tanto para os extratos aquosos quanto para os etanólicos e hexânicos das seis espécies, foram reservados para uso posterior em análises. Também, uma certa quantidade de massa foi reservada para os ensaios biológicos.

No decorrer das extrações foi possível observar um baixo rendimento dos extratos hexânicos. Então, a fim de se realizar uma análise prévia, deu-se início à Cromatografia em Camada Delgada (CCD) tanto para os extratos etanólicos quanto para os hexânicos.

Além da CCD, foi realizada uma série de análises cromatográficas e espectroscópicas para cada tipo de extrato como se pode observar no esquema abaixo:

Figura 13 - Esquema dos extratos obtidos e suas referentes análises.



(Fonte: obra do autor)

4.2.2 Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

Nesta análise, utilizaram-se placas cromatográficas preparativas pré-fabricadas de alumínio recobertas com sílica como fase estacionária e, como fase móvel, diferentes proporções de acetato de etila (AcOEt) e hexano foram testadas a fim de se analisar qual seria a melhor composição para todas as amostras:

Tabela 1 - Proporções de hexano e AcOEt utilizadas como fases móveis.

Proporção
100% de hexano
75% de hexano + 25% de acetato de etila
50% de hexano + 50% de acetato de etila
25% de hexano + 75% de acetato de etila
100% de acetato de etila

(Fonte: obra do autor)

Após eluição a placa foi seca e então borrifada com solução de anisaldeído e colocada na estufa para revelação. Essa última etapa consiste em tornar visível as substâncias incolores presentes na amostra (COLLINS et al., 2006).

Finalizado o experimento, observou-se que duas fases móveis apresentaram força de eluição adequada e complementares, uma em 0,45 e outra em 0,37. A seguir testou-se outros solventes, mantendo-se as forças de eluição, visando melhorar a seletividade e, conseqüentemente, a resolução.

4.2.3 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Os extratos aquosos e etanólicos foram analisados por cromatografia líquida acoplada à detecção no UV/Vis com arranjo de diodos (UHPLC-DAD) utilizando como eluentes água ultrapura (A) e acetonitrila (B). Um volume de 2 μ L de amostra foi injetado numa coluna C18 de núcleo sólido (Phenomenex Kinetex C18, 150 x 2,1 mm, 2,6 μ m, 100 Å) utilizando o seguinte gradiente: 10 a 25% de B em 15 minutos e 25 a 90% de B em 20 minutos, permanecendo nesta condição por 5 minutos. Um método para recondicionamento foi incorporado de forma que se voltasse à condição inicial em 2 minutos e permanecesse nesta por 3 minutos, perfazendo um tempo total de 45 minutos. A vazão utilizada foi de 400 μ L/min, temperatura da coluna de 35°C, faixa de detecção de 200-800 nm e plotagem dos cromatogramas em 254 nm. Lembrando que as amostras cujos cromatogramas não resultaram em uma boa qualidade, injetou-se um volume de 5 μ L.

Em eppendorfs foram pesados 5 mg de extrato aquoso liofilizado de cada espécie. Em seguida, adicionou-se 500 μ L de água para solubilização. Então, 500 μ L de acetonitrila para UHPLC foram adicionados. Posteriormente, eles foram submetidos à filtração em filtros de 0,22 μ m direto para um frasco de vidro de 2 mL e, então, submetidos à análise.

Extratos etanólicos: 50 mg de cada extrato foi solubilizado em 1 mL de etanol. A seguir, tomou-se 100 μ L dessa solução e adicionou-se 400 μ L de acetonitrila e 500 μ L de água chegando-se a uma concentração de 5 mg/mL. Para análise no UHPLC foram injetados 2 μ L.

4.2.4 Cromatografia Gasosa (CG)

Preparação dos extratos para análise direta. Para um frasco de vidro de 2 mL, transferiu-se cerca de 10 mg de extrato hexânico seco que foram solubilizados em 1 mL deste mesmo solvente para análise.

Preparação dos extratos para análise com derivação. Para os extratos hexânicos realizou-se somente a sililação. Já para os extratos aquosos fez-se a metoximação primeiramente e, então, a sililação. Tais procedimentos estão descritos a seguir.

Metoximação (extrato aquoso) e sililação (extratos aquoso e hexânico). Para ambos os extratos pesou-se, diretamente em frascos de vidro de 4 mL, 5 mg de massa.

Assim sendo, preparou-se uma solução de 20,5 mg/mL de cloridrato de metoxiamina. Posteriormente, 80 µL desta solução preparada foram adicionados em cada frasco contendo 5 mg de extrato aquoso. Então, aqueceu-se a 30°C por 90 minutos.

Após a metoximação, deu-se início a sililação. Nesta etapa, adicionou-se 100 µL de piridina nos frascos contendo tanto extrato aquoso quanto hexânico para dissolução da amostra. Adicionou-se 200 µL de MSTFA [N-metil- N(trimetilsilil)trifluoroacetamida] e homogeneizou. Logo, aqueceu-se a 37°C por 30 minutos. Após aquecimento, realizou-se a filtração com microfiltro de 0,22 µm e a transferência para um frasco de vidro de 2 mL com *insert* de 350 µL. Seguidamente, as amostras foram deixadas em repouso por 24 horas a 5°C na geladeira.

Antes de serem injetados, os extratos aquosos foram particionados em hexano da seguinte forma: 350 µL deste solvente foram adicionados aos frascos, os quais foram agitados e, então, a porção superior (hexânica) foi tomada para efetuar a análise. Esse procedimento visou minimizar a injeção de piridina e reagentes, usados em excesso na etapa de sililação das amostras.

CG-EM. Os extratos hexânicos sililados e não sililados foram analisados em cromatógrafo a gás Shimadzu QP-2010 equipado com injetor automático *Shimadzu AOC-5000* e interfaceado com um espectrômetro de massa Shimadzu (CG-EM), com coluna Agilent DB-5MS (30 m x 0,25 cm x 0,25 mm), controlado por software *GCMS solutions Ver. 2.5*. A temperatura do forno foi programada como segue:

100 °C (3 min) $\xrightarrow{3^{\circ}\text{C/min}}$ 310 °C (20 min) - tempo de análise (90 minutos)

A temperatura do injetor foi de 260 °C e o modo de injeção foi *split*: 1/20, gás de arraste hélio (99,999%) a um fluxo constante de 1,3 mL/min, o volume de amostra injetado foi de 1 µL. Condições EM: temperatura da fonte de íons de 250 °C e interface de 290 °C, modo de impacto de elétrons a 70 eV, faixa das massas de aquisição de *m/z* 40-550 Daltons.

4.2.5 Forma de análise dos resultados obtidos por GC-MS

Os dados obtidos por cromatografia gasosa foram analisados em função do cálculo dos índices de retenção lineares (IR) através da equação de (VAN DEN DOOL & KRATZ, 1963) (Equação 1) e comparação com os dados da literatura e, também, por comparação dos

espectros de massas de substâncias da amostra com espectros dos bancos de dados Wiley, GMD e NIST. Foram considerados candidatos fortes na identificação das substâncias aquelas que apresentaram $IR \pm 10$ e Índice de Similaridade de Espectros de Massas $> 90\%$. As substâncias identificadas nos extratos de cada espécie foram então organizadas em gráficos de colunas, como será visto adiante.

$$IR = 100 * y + 100 * \frac{t_{RA} - t_{Ry}}{t_{Ry+1} - t_{Ry}} \quad \text{Equação 1}$$

Onde:

IR = Índice de Retenção

y = número de carbonos do hidrocarboneto anterior ao pico de interesse

t_{RA} = tempo de retenção do pico de interesse

t_{Ry} = tempo de retenção do hidrocarboneto anterior ao pico de interesse

t_{Ry+1} = tempo de retenção do hidrocarboneto posterior ao pico de interesse

4.2.6 Ressonância Magnética Nuclear (RMN 1H) dos extratos aquosos e etanólicos

Para o preparo das amostras utilizou-se 3 mg dos extratos brutos aquosos e etanólicos de folhas das seis espécies (*C. ulmifolia*, *C. lasiophylla*, *C. javitensis*, *C. decandra*, *C. grandiflora* e *C. arborea*).

Essa massa foi solubilizada em 180 μ L de metanol deuterado e a solução resultante permaneceu por 30 minutos em banho de ultrassom. Seguidamente, fez-se a centrifugação da mesma por 15 minutos e, então, com o auxílio de uma pipeta contendo algodão em sua extremidade inferior, o sobrenadante foi transferido para o tubo de RMN de 3 mm de diâmetro.

4.2.7 Fracionamento do extrato aquoso da espécie *C. lasiophylla*

O extrato aquoso da espécie *C. lasiophylla* apresentou atividade bactericida contra *S. aureus* no bioensaio de determinação da concentração inibitória mínima (CIM).

Este ensaio foi realizado no IFSC-USP, sob responsabilidade da Profa. Dr. Ilana Lopes B. C. Camargo. O extrato foi testado em diluição seriada (1:2) a partir de 512 μ g/mL em caldo Mueller Hinton (MH) segundo o CLSI (2013). A incubação foi a 37°C e a leitura visual dos

resultados foi feita após 24h. A concentração inibitória mínima (CIM) foi definida como a menor concentração que inibe o crescimento microbiano em > 90%.

Devido a este resultado, fez-se o fracionamento destes extratos em busca de uma análise mais detalhada dos mesmos visando determinar as substâncias que poderiam estar relacionadas direta ou indiretamente com tal resultado.

Então, utilizou-se um cartucho de C18 o qual foi ativado com etanol empregando-se, aproximadamente 3x o volume morto, ou seja, 10 mL. Posteriormente, fez-se o condicionamento com água e aplicou-se 1,0 mL de amostra, a uma concentração em torno de 50 mg/mL de água. A seguir foram obtidas 8 frações, eluídas com as fases móveis extratoras indicadas na tabela abaixo.

Tabela 2 - Fases móveis correspondentes às oito frações coletadas.

Fração	Fase móvel
0	Somente amostra
1	H ₂ O (2mL)
2	H ₂ O/EtOH 95:05 (2mL)
3	H ₂ O/EtOH 90:10 (2mL)
4	H ₂ O/EtOH 85:15 (2mL)
5	H ₂ O/EtOH 80:20 (2mL)
6	H ₂ O/EtOH 70:30 (2mL)
7	EtOH (4mL)

(Fonte: obra do autor)

Posteriormente, as frações foram secas em Speed Vac e solubilizadas em ACN/H₂O 1:1 de forma que a concentração final fosse 15 mg/mL.

4.2.7.1 Análise das frações por CLAE-DAD-CAD

As frações aquosas da espécie *C. lasiophylla* foram analisadas por cromatografia líquida acoplada à detecção no UV/Vis com arranjo de diodos (DAD) e à detecção com aerosol de nitrogênio carregado (CAD), utilizando como eluentes água ultrapura (A) e acetonitrila (B). Um volume de 2 µL de amostra foi injetado numa coluna C18 de núcleo sólido (Phenomenex Kinetex C18, 150 x 2,1 mm, 2,6 µm, 100 Å) utilizando o seguinte gradiente: 10 a 25% de B em 15 minutos e 25 a 90% de B em 20 minutos, permanecendo nesta condição por 5 minutos. Um método para condicionamento foi incorporado de forma que se voltasse à condição inicial em 2 minutos e permanecesse nesta por 3 minutos,

perfazendo um tempo total de 45 minutos. A vazão utilizada foi de 400 $\mu\text{L}/\text{min}$, temperatura da coluna de 35°C, faixa de detecção de 200-800 nm e plotagem dos cromatogramas em 254 nm.

4.2.7.2 Análise das frações por RMN ^1H

Terminada a análise por CLAE-CAD-DAD, as frações foram secas para que 3 mg pudessem ser utilizados na análise por RMN e o restante enviado para bioensaio novamente. Primeiramente, as frações foram secas em Speed Vac. Contudo, fez-se necessário o uso do liofilizador, já que elas não estavam completamente secas.

Dessa forma, foi possível pesar os 3 mg das frações em eppendorf. Essa massa foi solubilizada em 180 μL de metanol deuterado e deixada em banho de ultrassom por 30 minutos. Posteriormente, esta foi centrifugada por 15 minutos e, então, com o auxílio de uma pipeta contendo algodão em sua extremidade inferior, o sobrenadante foi transferido para o tubo de RMN de 3 mm de diâmetro.

4.3 Resultados e Discussão

4.3.1 Processamento do material vegetal e preparo dos extratos

Com as extrações, os valores totais obtidos de extrato seco foram tabelados e o rendimento obtido foi calculado:

Tabela 3 - Rendimento obtido de massa seca por cada grama vegetal.

	<i>C. lasiophylla</i>	<i>C. ulmifolia</i>	<i>C. javitensis</i>	<i>C. arborea</i>	<i>C. grandiflora</i>	<i>C. decandra</i>
Material vegetal/g	7,03	6,99	6,96	7,29	7,00	7,00
Extrato aquoso/mg	1380	471,9	1334,7	1077,1	968,2	1525,1
Rendimento/%	19,6	6,74	19,2	14,8	13,8	21,8
Extrato etanólico/mg	492,3	115,1	599,8	506,7	390,4	110,7
Rendimento/%	7,00	1,64	8,62	6,95	5,57	1,58
Extrato hexânico/mg	73,9	40,6	22,6	81,0	44,3	78,2
Rendimento/%	1,05	0,58	0,32	1,11	0,63	1,12

(Fonte: obra do autor)

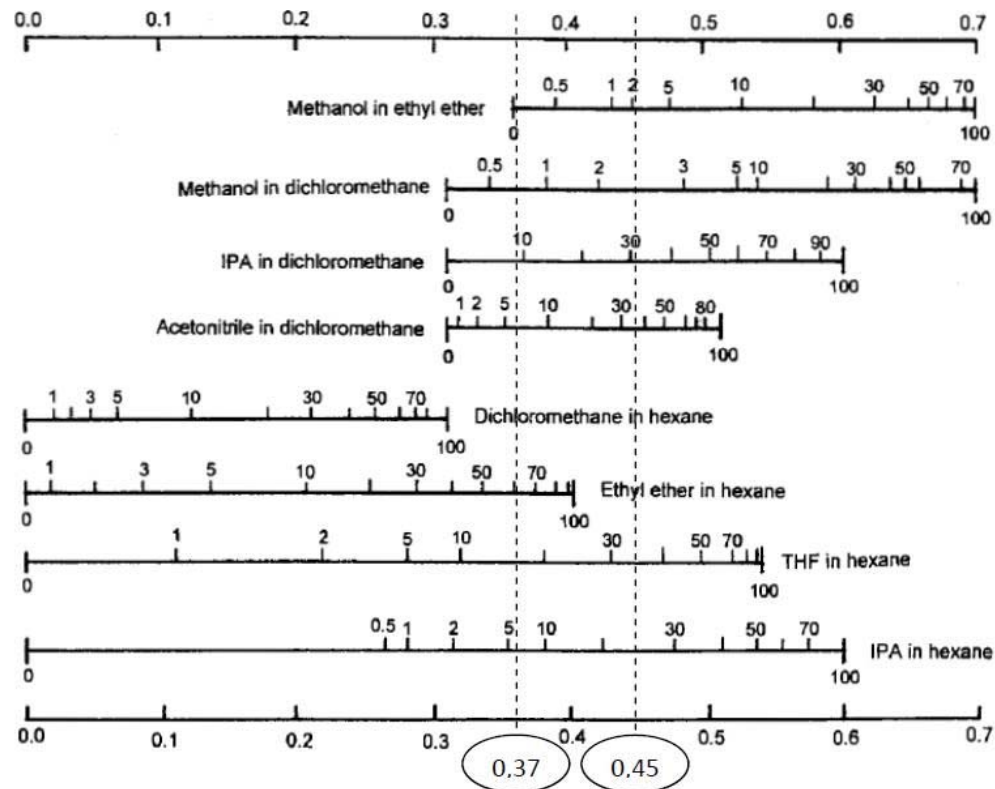
Observa-se um maior rendimento para aos extratos aquosos, seguidos pelos extratos etanólicos. Como esse último solvente tem boa performance na extração de substâncias com ampla faixa de polaridade, a extração final com hexano foi realizada apenas para certificação de que praticamente todos os extratáveis haviam sido obtidos. Os baixos rendimentos obtidos com esse último solvente extrator indicam boa performance do etanol. A análise comparativa prévia por meio de Cromatografia em Camada Delgada, discutida a seguir, foi realizada para comparar os extratos hexânico e etanólico.

4.3.2 Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

Testes iniciais com hexano e AcOEt indicaram duas proporções de solventes adequadas para análise dos extratos hexânicos e etanólicos: Hex/AcOEt 75:25 ($\epsilon_{fm} = 0,37$) e Hex/AcOEt 25:75 ($\epsilon_{fm} = 0,45$), com forças de eluição complementares, de forma a permitir a comparação das porções menos polares e mais polares, respectivamente, desses extratos.

Fazendo-se uso de um nomograma de força eluotrópica foi possível obter novas misturas de solventes que possuem as mesmas forças de eluição de interesse. Então, realizou-se uma nova análise cromatográfica com as proporções citadas na Tabela 4, visando melhorar a seletividade da fase móvel.

Figura 14 - Nomograma de força eluotrópica em modo normal de eluição.



(Fonte: Adaptado de SADEK, 2002)

Tabela 4 - Fases móveis testadas nas análises de CCD e respectivas forças de eluição.

Força de eluição (ϵ)	0,45	0,37
Fase móvel 1	Hexano 25% / AcOEt 75%	Hexano 75% / AcOEt 25%
Fase móvel 2	Hexano 75% / IPA* 25%	Hexano 97% / IPA 3%
Fase móvel 3	Éter etílico 98% / EtOH** 2%	Hexano 40% / Éter etílico 60%

Legenda: *IPA = isopropanol; **EtOH = etanol
(Fonte: obra do autor)

As fases móveis compostas por hexano e IPA proporcionaram melhor resolução na análise dos extratos por CCD (Figura 15) e foram utilizadas para comparação dos extratos hexânicos e etanólicos. Pôde-se observar, principalmente na eluição com Hex/IPA 97:03, que

os extratos hexânicos contêm vários compostos ($0,2 < R_f < 0,7$) que não foram adequadamente extraídos com etanol, indicando complementariedade na capacidade extratora desses solventes.

Figura 15 - Placas cromatográficas do extrato hexânico de *C. arborea*, representado como exemplo, em hexano/IPA 97:03.



(Fonte: obra do autor)

4.3.3 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

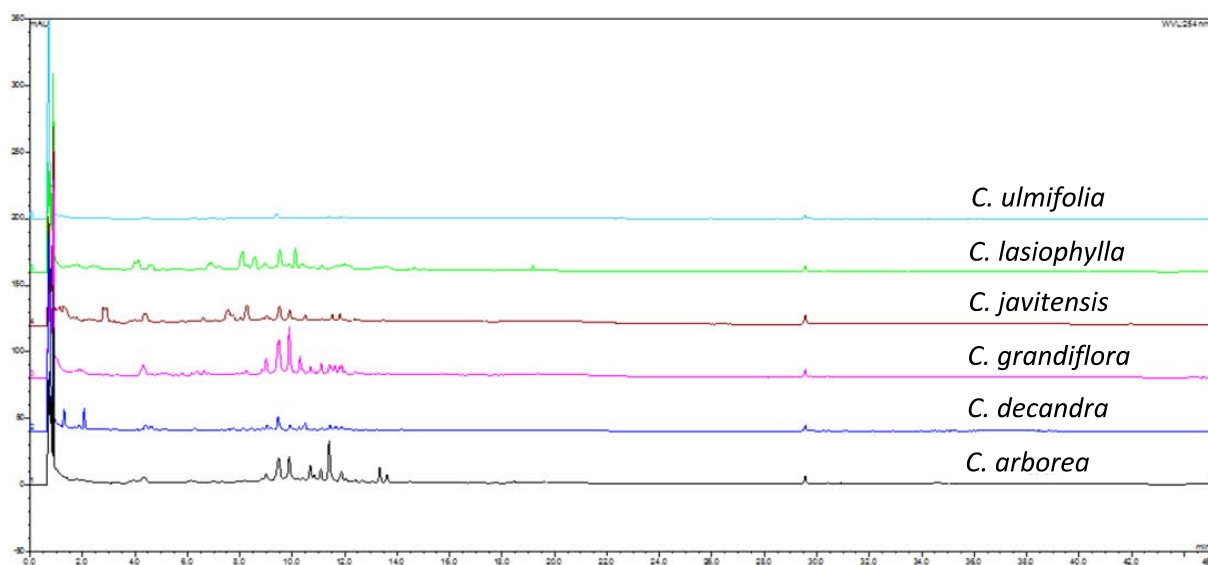
A comparação dos extratos aquosos (Figura 16) e etanólicos (Figura 17) de folhas das seis espécies de *Casearia* em estudo já permite inferir algumas características da composição química dessas amostras. É importante destacar que estes perfis cromatográficos estão restritos a compostos que absorvem no UV/Vis. Mas os espectros no UV raramente possuem informação suficiente para atribuir uma estrutura à substância, ficando sua utilização restrita à proposição de algum grupo cromofórico ou a proposição de classe de metabólito com espectro no UV/Vis bastante característico, principalmente quando essa análise é baseada em relatos consistentes de caracterização química de espécies vegetais do mesmo gênero.

Inicialmente pode-se observar que os extratos aquosos possuem teores maiores de substâncias muito polares, eluídas praticamente sem retenção no modo reverso ($t_R < 2$ min). A seguir observa-se um conjunto de substâncias eluídas até 16 minutos, sendo que a maioria delas possui características espectrais no UV similares a flavonoides, cujos espectros apresentam duas bandas de absorção em 240-285 nm (banda II) e em 300-400 nm (banda I). Esse conjunto de substâncias foi extraído com água, mas principalmente com etanol, e

aparentemente são comuns a todas as espécies. Já em tempos de retenção entre 4,0 e 5,0 minutos dos extratos etanólicos foram identificados fenilpropanoides, mais especificamente, o ácido cafeoilquínico que é um ácido clorogênico.

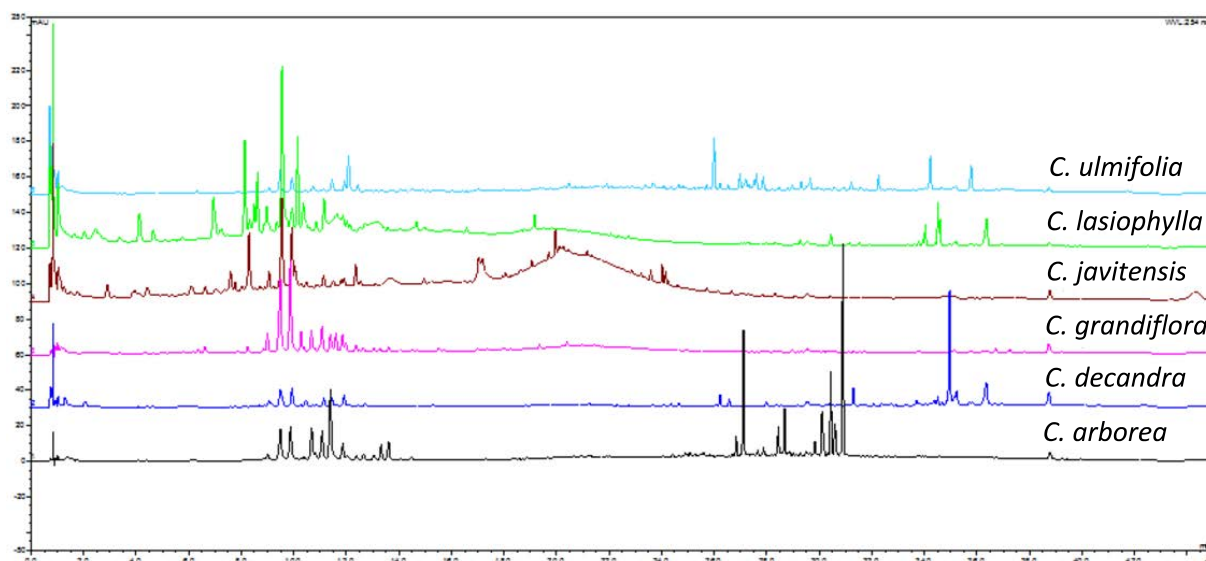
Adicionalmente, outro grupo de substâncias, extraídas apenas com etanol, elui entre 34 e 40 minutos e também indica composição química diferente para cada espécie. Entre estas substâncias, várias apresentam espectro no UV que pode ser atribuído a diterpenos clerodânicos similares às casearinas, já descritos em outras espécies de *Casearia*, assim como outros característicos de taninos. Em todos os extratos etanólicos é observado um composto ($t_R = 39,0$ min) com absorção no UV entre 400 e 500 nm, com um pico principal entorno de 450 nm e dois picos menores de cada lado, que pode ser atribuído a um carotenóide (HARBORNE, 1998).

Figura 16 - Cromatogramas dos extratos aquosos de folhas de *Casearia*, registrados em 254 nm.



(Fonte: obra do autor)

Figura 17 - Cromatogramas dos extratos etanólicos de folhas de *Casearia*, registrados em 254 nm.

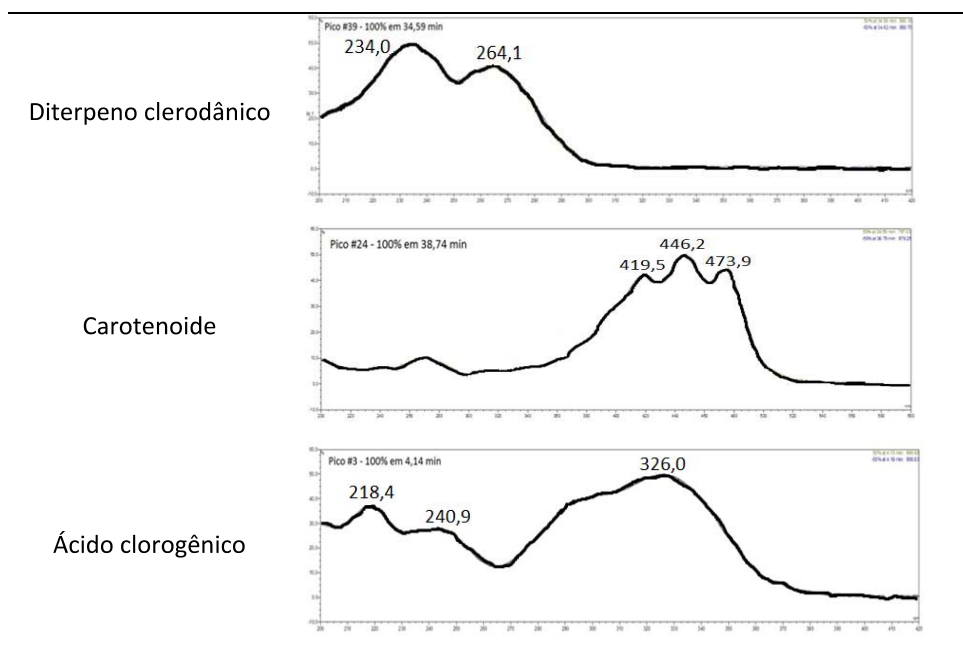


(Fonte: obra do autor)

Os espectros no UV/Vis obtidos para os vários compostos detectados por UHPLC-DAD nos extratos aquosos e etanólicos analisados foram agrupados por semelhança, de forma a indicar preliminarmente quando tipos de compostos ou padrões cromofóricos podem ser encontrados nessas amostras. Essa análise é apresentada na tabela abaixo.

Tabela 5 - Espectros no UV/Vis obtidos com a análise por UHPLC-DAD das possíveis classes presentes.

Classe	UV
Flavonoide	
Tanino	



(Fonte: obra do autor)

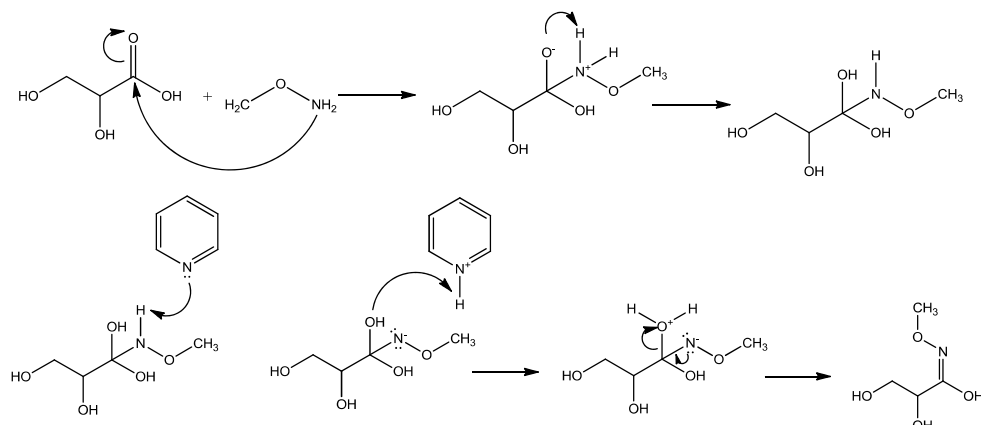
4.3.4 Cromatografia Gasosa (CG)

Como já dito, para auxiliar o tratamento dos dados, utilizou-se bases de dados como NIST e GMD para obtenção de dados de índice de retenção (IR) teóricos de cada substância indicada como candidata a partir da comparação de espectros de massas real e da base de dados NIST/WILEY. Dessa forma, foi possível identificar alguns compostos presentes nos extratos aquosos sililados, hexânicos sililados e não sililados das espécies em estudo.

No preparo de amostras, os extratos aquosos foram submetidos primeiramente ao processo de metoximação e, posteriormente, à derivação com MSTFA. Já os extratos hexânicos foram submetidos diretamente à sililação.

Na primeira etapa, a formação da oxima com metoxiamina protege a carbonila em uma reação de substituição nucleofílica devido à ligação C=N formada evitando a ciclização e descarboxilação dos açúcares (GULLBERG et al., 2004), como pode ser observado na Figura 18 na qual tomou-se o ácido glicérico como exemplo.

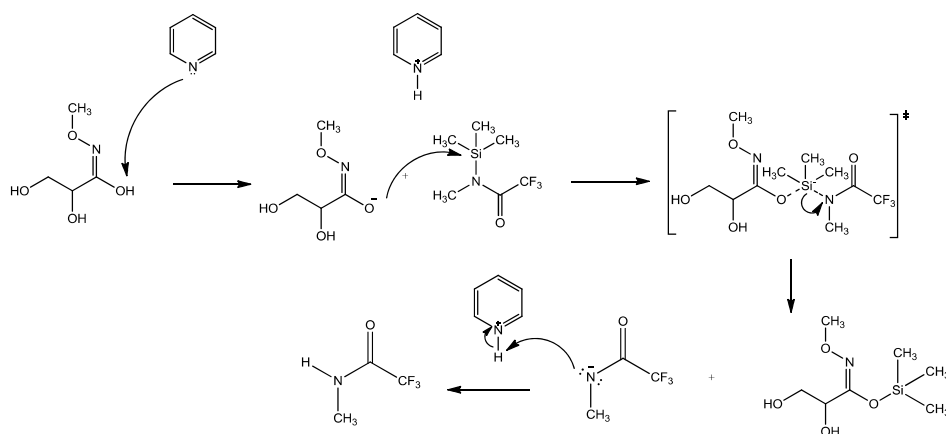
Figura 18 - Mecanismo proposto de metoximação do ácido glicérico.



(Fonte: obra do autor)

Com a carbonila protegida, fez-se a silição formando o ácido glicérico (1MEOX 3TMS) por meio de uma reação S_N2 na qual o nucleófilo aborda por trás o átomo de silício que carrega o grupo retirante, isto é, pelo lado diretamente oposto ao grupo retirante. Ela envolve apenas uma etapa, não havendo intermediários, somente um estado de transição (SOLOMONS & FRYHLE, 2001), como pode ser visto na figura abaixo:

Figura 19 - Mecanismo proposto da primeira silição do ácido glicérico formando o derivado 1TMS.

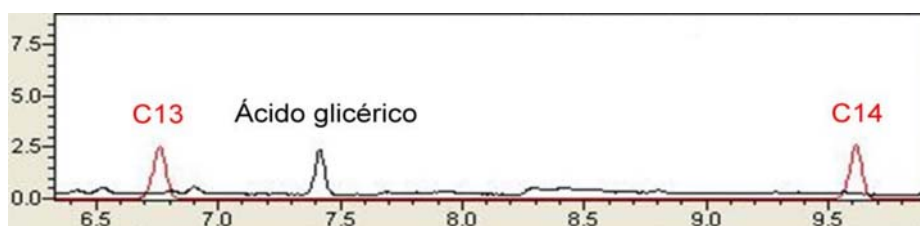


OBS: Este mesmo mecanismo é repetido em mais duas etapas para a formação do derivado 3TMS.
(Fonte: adaptado de Knapp, 1979)

Terminado o preparo das amostras, fez-se a injeção no cromatógrafo a gás obtendo-se os cromatogramas e, para cada pico presente, calculou-se o índice de retenção linear bem como analisou-se os índices de similaridade dos espectros de massas.

Primeiramente, o cálculo do índice de retenção nada mais é do que a relação entre o pico da substância de interesse e os picos dos hidrocarbonetos eluídos anteriormente e posteriormente a este pico. A seguir, encontra-se um exemplo de cálculo do índice de retenção linear que foi aplicado a todos os picos dos cromatogramas.

Figura 20 – Exemplo de cálculo do IR do ácido glicérico (1MEOX 3TMS) utilizando a equação de Van Den Dool e Kratz.



(Fonte: obra do autor)

Ácido glicérico (1MEOX 3TMS) – $t_R = 7,417$ min

C13 – $t_R = 6,762$ min

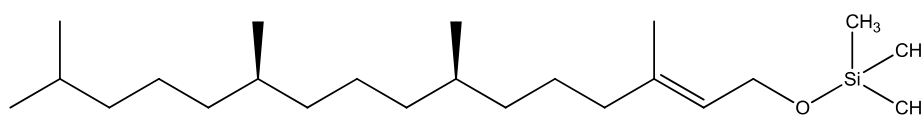
C14 – $t_R = 9,614$ min

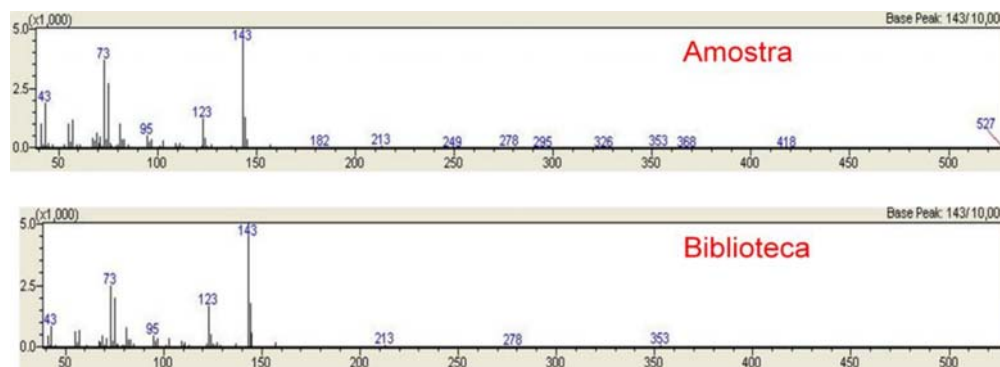
$$IR = 100 * 13 + 100 * \frac{7,417 - 6,762}{9,614 - 6,762}$$

$$IR = 1322$$

Seguidamente, analisaram-se os espectros de massas obtidos experimentalmente com os fornecidos pelas bases de dados. Como exemplo, segue abaixo os espectros de massas do fitol (1TMS).

Figura 21 – Estrutura molecular e espectros de massas do fitol (1TMS).



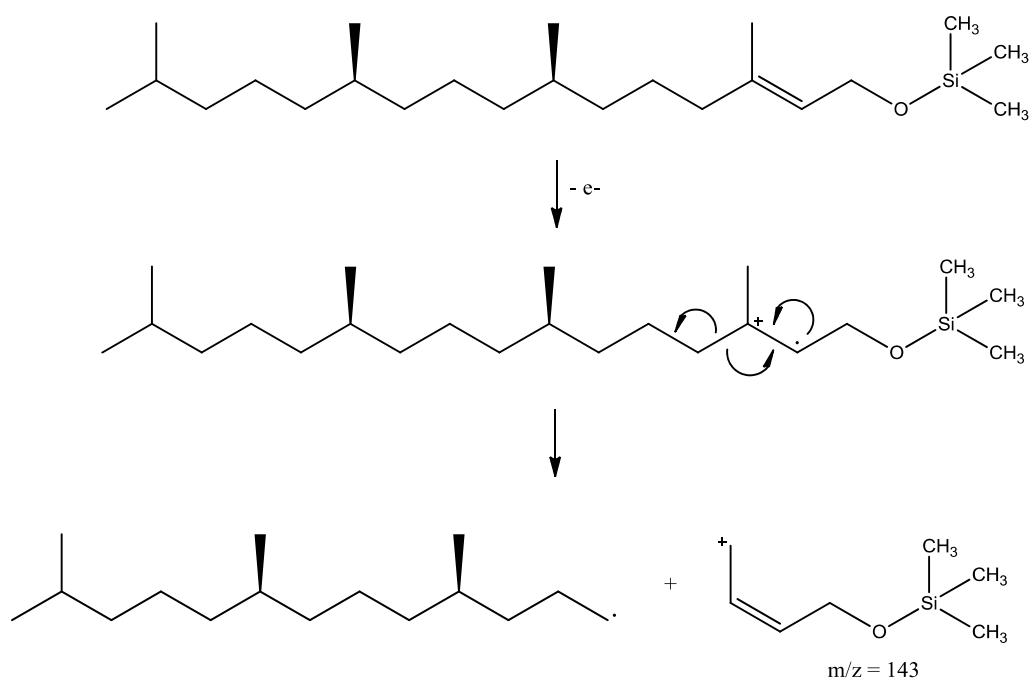


(Fonte: obra do autor)

Neste caso, o fitol (1TMS) sofre dois tipos de segmentação: a α , com perda de um elétron de um orbital π , e a indutiva, com perda de um elétron de um orbital não ligante.

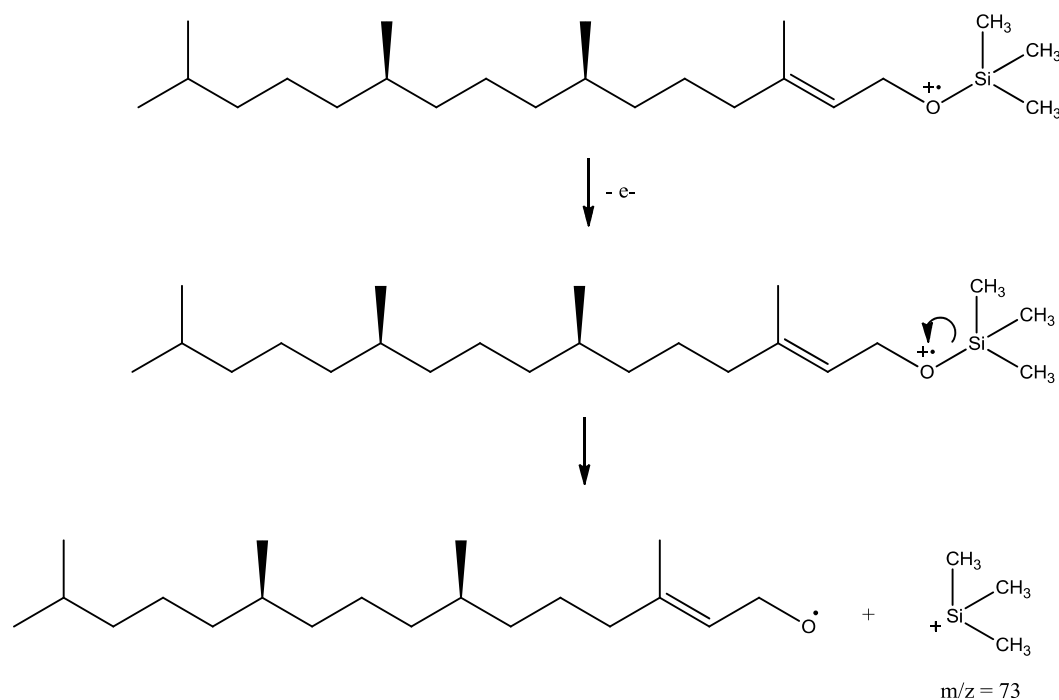
Como pode ser observado na figura abaixo, a segmentação α é responsável pela formação do pico base, referente ao íon com razão massa carga (m/z) igual a 143 e a segmentação indutiva é responsável pela formação do pico com m/z igual a 73.

Figura 22 – Segmentação α : formação do pico base em $m/z = 143$.



(Fonte: obra do autor)

Figura 23 - Segmentação indutiva: formação do pico $m/z = 73$.

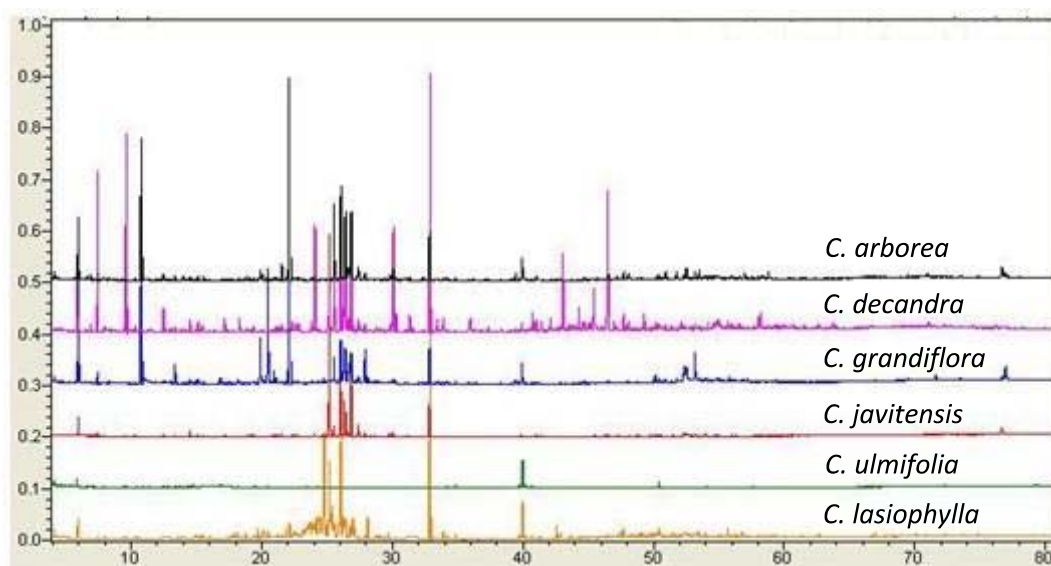


(Fonte: obra do autor)

4.3.4.1 Análise dos extratos aquosos de folhas por Cromatografia Gasosa (CG)

Os extratos aquosos sililados foram encaminhados para o Núcleo de Pesquisas em Produtos Naturais e Sintéticos (NPPNS) localizado na USP em Ribeirão Preto para serem analisados. Espera-se identificar vários compostos polares de baixa massa molecular que, após sililados, possam ser analisados e identificados por CG-EM.

Figura 24 - Cromatogramas referentes às análises por CG-EM dos extratos aquosos sililados de *Casearia* spp..



(Fonte: obra do autor)

Através desta análise por CG-EM e com o auxílio das bases de dados NIST e GMD foi possível determinar alguns compostos polares dentre os quais se encontram principalmente ácidos carboxílicos, açúcares e compostos fenólicos, entre outros constituintes minoritários. Estas substâncias estão organizadas na tabela a seguir.

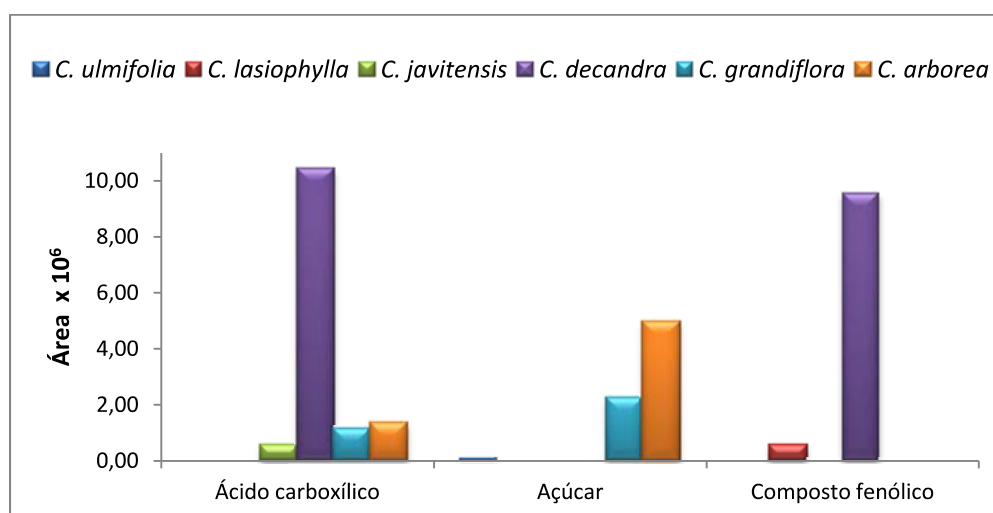
Tabela 6 - Substâncias tentativamente identificadas no extrato aquoso sililado de cada espécie através do Índice de Similaridade (SI) e do Índice de Retenção (IR).

Substância	<i>C. ulmifolia</i>	<i>C. lasiophylla</i>	<i>C. javitensis</i>	<i>C. decandra</i>	<i>C. grandiflora</i>	<i>C. arborea</i>	tR	IR _c	IR _t	Base de dados	SI	Classe
Ácido maleico (2TMS)						0,14	6,645	1295	1301	GMD	92	Ácido carboxílico
Ácido succínico (2TMS)*				0,30		0,24	6,913	1305	1311	GMD	94	Ácido carboxílico
Ácido glicérico (3TMS)*			0,16	8,60	0,59	0,37	7,420	1323	1320	GMD	95	Ácido carboxílico
Ácido fumárico (2TMS)						0,13	7,936	1341	1347	GMD	95	Ácido carboxílico
Hidroquinona (2TMS)				8,51			9,608	1400	1402	GMD	95	Composto fenólico
Levoglucozan	0,08						12,449	1486	1491	NIST	91	Açúcar
Ácido eritrônico (4TMS)*			0,40	1,51	0,57	0,46	14,810	1555	1545	GMD	91	Ácido carboxílico
1E-D-Glicose (1MEOX 5TMS)*					2,26	4,96	26,845	1908	1901	NIST	93	Açúcar
trans-Ácido cafeico (3TMS)*		0,56		1,02			33,901	2135	2136	GMD	93	Composto fenólico

Legenda: Para as substâncias marcadas com asterisco (*) realizou-se a média dos tR, IR calculado e SI, já que se encontravam em mais de uma espécie. Para melhor interpretação, os valores da área do pico estão na mesma escala ($\times 10^6$). IR_c: Índice de retenção calculado; IR_t: Índice de retenção tabelado.
(Fonte: obra do autor)

Para facilitar a análise comparativa da constituição química desses extratos aquosos de folhas é apresentado na Figura 25 um gráfico de barras que permite comparar as classes identificadas nestes extratos.

Figura 25 - Teor relativo das classes de substâncias identificadas nos extratos aquosos sililados de *Casearia* spp.

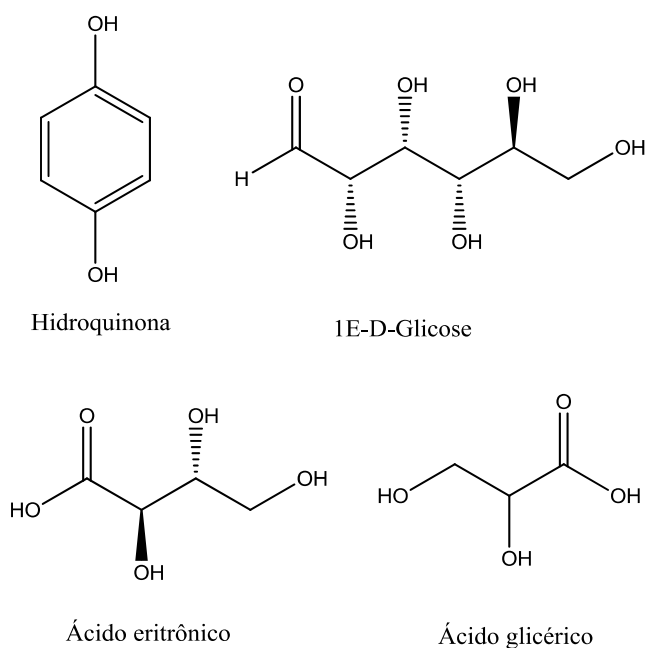


(Fonte: obra do autor)

Analisando a tabela e gráfico acima, é possível detectar algumas semelhanças e diferenças entre os extratos aquosos das espécies, bem como destacar as classes majoritárias.

- Ácido glicérico (3TMS) e ácido eritrônico (4TMS) foram detectados na maioria dos extratos com exceção das espécies *C. ulmifolia* e *C. lasiophylla*. Além disso, dentre elas, a *C. decandra* foi a que apresentou maior quantidade de ácido carboxílico, como pode ser observado no gráfico.
- A *C. decandra* foi a espécie que apresentou os dois picos majoritários referentes ao ácido glicérico (3TMS) e a hidroquinona (2TMS) sendo esta última já identificada em estudo anterior (VIEIRA JÚNIOR, 2010) e, também, a responsável pelo alto teor de composto fenólico nesta espécie;
- *C. arborea* e *C. grandiflora* merecem destaque para a presença de 1E-D-glicose. No gráfico é visível que a maior quantidade de açúcar é proveniente de ambas as espécies.

Figura 26 - Estrutura molecular das principais substâncias identificadas nos extratos aquosos de *Casearia* spp.



(Fonte: obra do autor)

Até agora, foram relatados a ocorrência de onze flavonoides glicosilados no gênero *Casearia* (XIA et al., 2014). A análise por UHPLC-DAD realizada anteriormente nos extratos aquosos forneceu espectros UV característicos da classe. Sabe-se que os derivados trimetilsililados de flavonoides monoglicosilados podem ser analisados por CG. Contudo, como a faixa de aquisição do EM foi inadvertidamente selecionada entre m/z 40-550 Daltons, esta classe não pôde ser identificada por CG-EM.

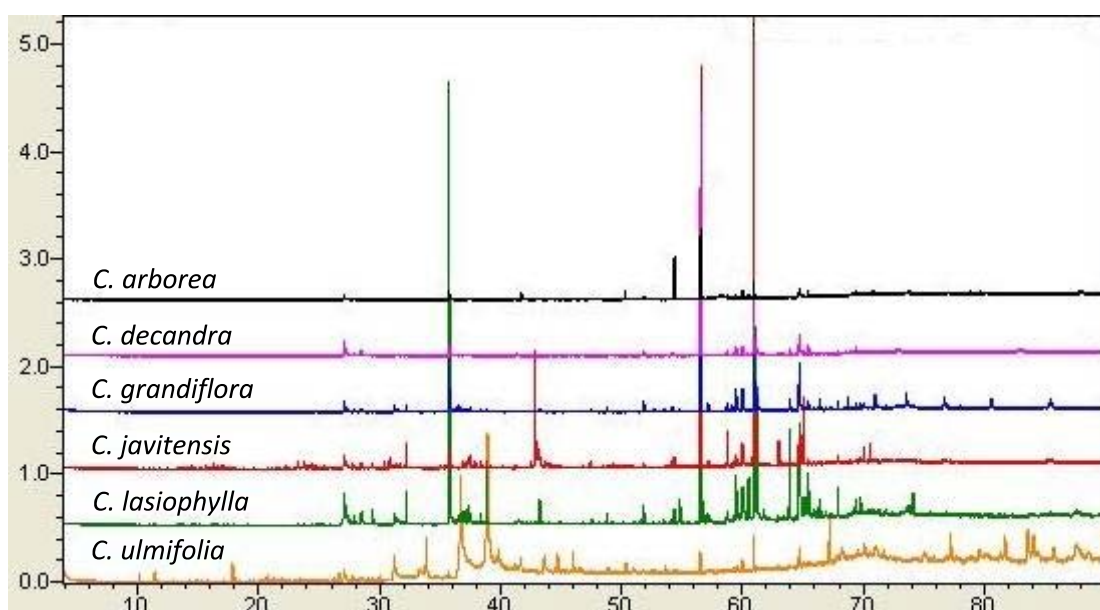
4.3.4.2 Análise dos extratos hexânicos de folhas por Cromatografia Gasosa (CG)

A análise dos extratos hexânicos tem a intenção de obter informações quanto à composição química apolar presente nas espécies em estudo. Com a sililação do extrato hexânico bruto e sua subsequente análise por CG-EM também pôde-se obter dados de retenção e EM de compostos presentes nesses extratos apolares, mas que contêm grupos polares que inviabilizam a análise direta, como ácidos e alcoóis graxos, por exemplo.

Dois tipos de extratos hexânicos também foram enviados para análise por CG-EM na Universidade de São Paulo (USP) em Ribeirão Preto: extrato hexânico tal e qual (10 mg) e extrato hexânico sililado (5 mg).

4.3.4.2.1 Extrato hexânico não sililado

Figura 27 - Cromatogramas referentes às análises por CG-EM dos extratos hexânicos não sililados de *Casearia* spp.



(Fonte: obra do autor)

Os extratos hexânicos não sililados apresentaram uma grande variedade de substâncias apolares tais como terpenoides e hidrocarbonetos, dentre outras classes como visto na tabela e gráfico a seguir:

Tabela 7 - Substâncias tentativamente identificadas no extrato hexânico não sililado de cada espécie através do Índice de Similaridade (SI) e do Índice de Retenção (IR).

Substância	<i>C. ulmifolia</i>	<i>C. lasiophylla</i>	<i>C. javitensis</i>	<i>C. decandra</i>	<i>C. grandiflora</i>	<i>C. arborea</i>	tR	IR _c	IR _t	Base de dados	SI	Classe
α-Cubebeno	1,83	-	-	-	-	-	10,097	1349	1352	NIST	91	Terpenoide (Sesquiterpeno)
(-)-Espatulenol	4,76	-	-	-	-	-	17,860	1575	1582	NIST	94	Terpenoide (Sesquiterpeno)
Neofitadieno*	4,68	16,5	6,50	8,33	5,51	1,97	27,063	1837	1836	NIST	91	Terpenoide (Sesquiterpeno)
Farnesilacetona	-	5,15	-	-	-	-	29,429	1907	1915	NIST	90	Cetona
Ácido palmítico*	24,1	5,33	-	-	5,75	-	31,210	1962	1960	NIST	94	Ácido graxo
Etil palmitato*	-	10,2	7,29	-	1,66	-	32,209	1992	1994	NIST	95	Éster graxo
Ácido palmítico (1TMS)**	20,4	-	-	-	-	-	33,863	2045	2045	GMD	95	Ácido graxo
Fitol*	-	178,5	9,89	5,62	25,3	4,42	35,760	2106	2112	NIST	94	Terpenoide (Diterpeno)
Ácido Oleico (1TMS)**	125,1	-	-	-	-	-	38,945	2214	2218	NIST	94	Ácido graxo
Heptacosano*	-	5,59	-	1,53	3,56	1,33	51,867	2700	2699	GMD	95	Hidrocarboneto
Octacosano*	-	2,24	2,49	0,55	1,34	0,56	54,250	2800	2800	GMD	94	Hidrocarboneto
Nonacosano*	6,84	108,6	157,3	92,4	102,8	25,3	56,563	2900	2894	GMD	96	Hidrocarboneto
α-Tocoferol*	-	74,3	19,9	4,62	12,4	1,85	61,159	3111	3112	NIST	90	Terpenoide (Tocoferol)
β-Sitosterol*	7,09	39,8	10,2	8,56	24,6	2,18	64,709	3284	3296	NIST	90	Esteróide

Legenda: Para as substâncias marcadas com asterisco (*) realizou-se a média dos tR, IR calculado e SI, já que se encontravam em mais de uma espécie. Para melhor interpretação, os valores da área do pico estão na mesma escala ($\times 10^5$). IR_c: Índice de retenção calculado; IR_t: Índice de retenção tabelado.

**Substâncias detectadas na forma de derivados sililados.

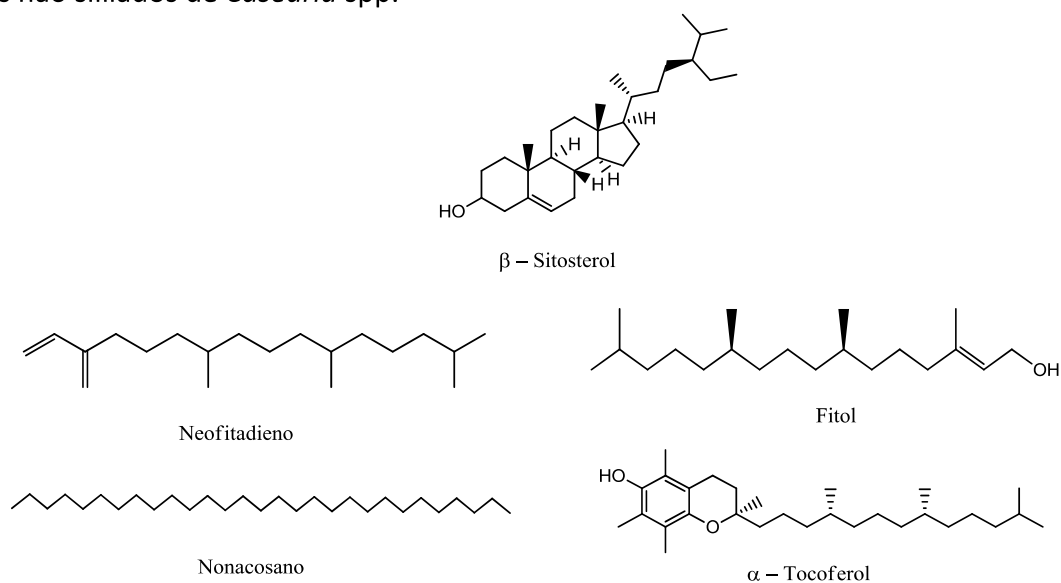
(Fonte: obra do autor)

A análise geral indica a ocorrência em todas as amostras de neofitadieno, nonacosano, fitol e α-tocoferol (ambas com teor destacado em *C. lasiophylla*), e β-sitosterol. Como a identificação ainda demanda revisão cuidadosa segue análise comparativa considerando apenas as classes das substâncias:

- *C. ulmifolia*: apresenta teores maiores de ácidos graxos;
- *C. lasiophylla*: é a que apresenta teores maiores de terpenoides;

- *C. javitensis*: teor destacado de hidrocarbonetos (alcanos);
- *C. decandra*, *C. grandiflora* e *C. arborea*: não se destacam em relação às demais amostras em nenhuma classe de compostos identificada nos extratos hexânicos;
- Algumas substâncias em comum nos seis extratos foram identificadas (Figura 28), mas também foi possível observar algumas características de cada espécie, como será discutido na análise comparativa dos extratos aquosos e hexânicos.

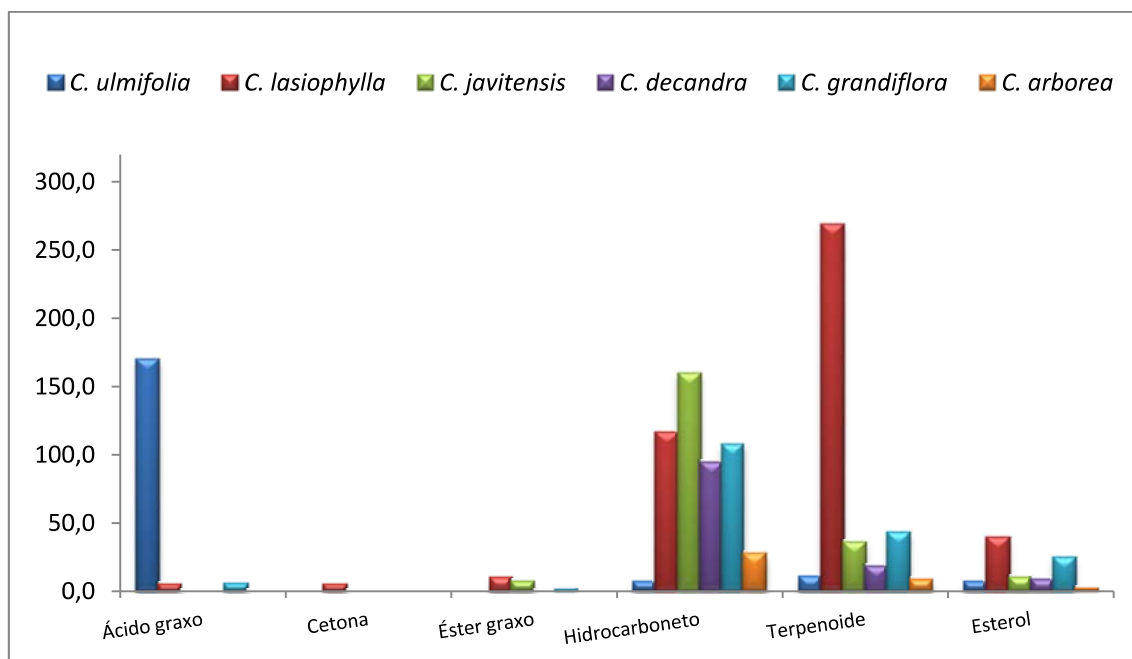
Figura 28 - Estrutura molecular das substâncias identificadas em comum nos extratos hexânicos não sililados de *Casearia* spp.



(Fonte: obra do autor)

Assim como anteriormente, para melhor visualização e entendimento, um gráfico baseado nas classes dessas substâncias foi plotado em função da área do pico de cada uma nos extratos hexânicos não sililados das seis espécies estudadas. Tal gráfico se encontra a seguir:

Figura 29 - Teor relativo das classes de substâncias identificadas nos extratos hexânicos não sililados de *Casearia* spp.



(Fonte: obra do autor)

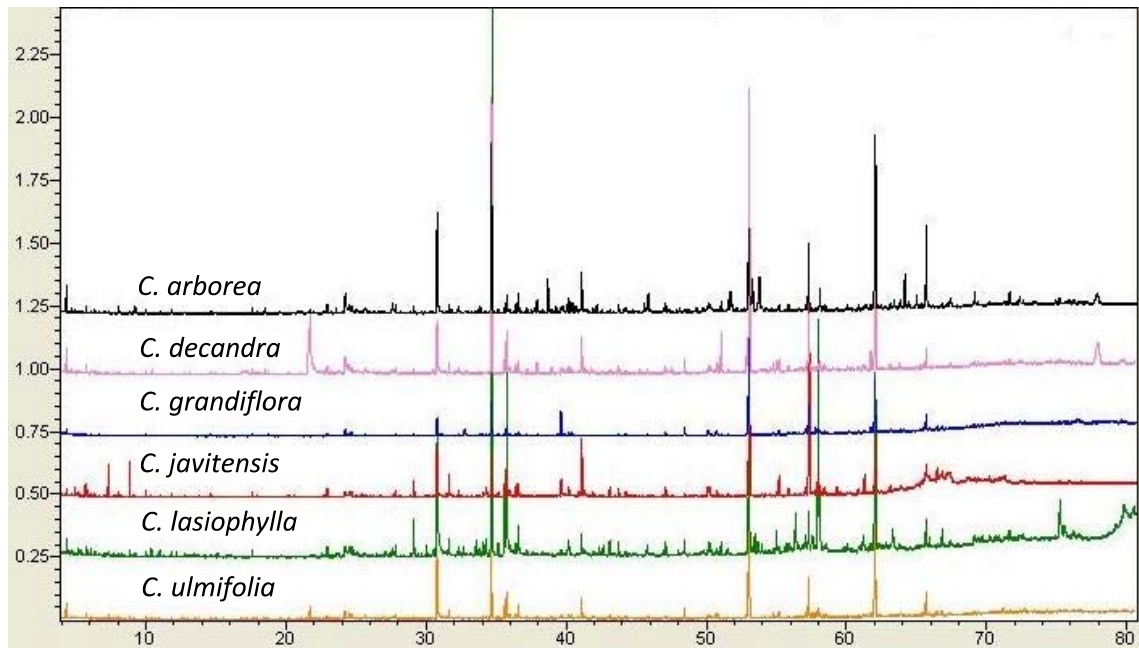
A presença de terpenoides em todas as espécies já era esperada visto que existem vários relatos sobre ocorrência de substâncias desse tipo no gênero *Casearia*. Segundo (XIA et al., 2014), substâncias como β -sitosterol e espatulenol já foram identificadas nas folhas da espécie *C. sylvestris* Sw.

De modo geral, diversos metabólitos secundários já foram identificados no gênero *Casearia*, sejam eles, terpenoides, esteroides, fenilpropanoides, flavonoides e outros fenólicos (XIA et al., 2014), como citado na introdução.

4.3.4.2.2 Extrato hexânico sililado

Os cromatogramas obtidos das seis espécies em estudo se encontram na figura abaixo.

Figura 30 - Cromatogramas referentes às análises por CG-EM dos extratos hexânicos sililados de *Casearia* spp.



(Fonte: obra do autor)

A tabela abaixo contém as substâncias identificadas nos extratos das seis espécies:

Tabela 8 - Substâncias tentativamente identificadas no extrato hexânico sililado de cada espécie através do Índice de Similaridade (SI) e do Índice de Retenção (IR).

Substância	<i>C. ulmifolia</i>	<i>C. lasiophylla</i>	<i>C. javitensis</i>	<i>C. decandra</i>	<i>C. grandiflora</i>	<i>C. arborea</i>	tR	IR _c	IR _t	Base de dados	SI	Classe
β-Cubebeno	-	-	-	-	-	0,85	9,225	1396	1388	NIST	94	Terpeno (Sesquiterpeno)
Neofitadieno*	-	3,98	-	5,95	-	4,94	24,218	1839	1836	NIST	90	Hidrocarboneto
Ácido mirístico (1TMS)*	0,58	1,00	-	0,43	-	0,53	24,485	1847	1843	NIST	90	Ácido graxo
Etil palmitato*	0,36	5,66	2,17	-	-	0,86	29,115	1990	1993	NIST	95	Éster graxo
Ácido palmítico (1TMS)*	11,7	32,3	8,42	9,98	3,20	17,4	30,775	2043	2040	NIST	97	Ácido graxo
Fitol (1TMS)*	13,3	128,7	6,19	46,0	5,63	27,5	34,66	2173	2181	NIST	91	Terpeno (Diterpeno)
Ácido linoleico (1TMS)*	2,05	12,9	-	2,22	1,23	-	35,604	2205	2209	NIST	90	Ácido graxo
Ácido docosanóico	-	-	-	-	-	0,81	46,918	2635	2632	NIST	90	Ácido graxo
Heptacosano*	1,54	2,20	-	1,98	1,21	-	48,439	2698	2699	GMD	96	Hidrocarboneto
Octacosano*	0,69	0,79	0,77	1,57	0,51	-	50,762	2798	2800	GMD	96	Hidrocarboneto
Esqualeno*	-	1,99	-	6,62	-	-	51,05	2811	2815	NIST	95	Terpeno (Triterpeno)
Nonacosano*	36,4	39,3	46,9	53,5	27,1	20,7	53,049	2899	2894	GMD	96	Hidrocarboneto

Triacotano*	0,83	-	3,32	1,67	0,60	-	55,179	2998	2995	GMD	95	Hidrocarboneto
Estigmast-4-en-3-ona	-	-	-	-	-	6,43	64,168	3451	3458	NIST	92	Esterol

Legenda: Para as substâncias marcadas com asterisco (*) realizou-se a média dos tR, IR calculado e SI, já que se encontravam em mais de uma espécie. Para melhor interpretação, os valores da área do pico estão na mesma escala ($\times 10^6$). IR_c: Índice de retenção calculado; IR_t: Índice de retenção tabelado.

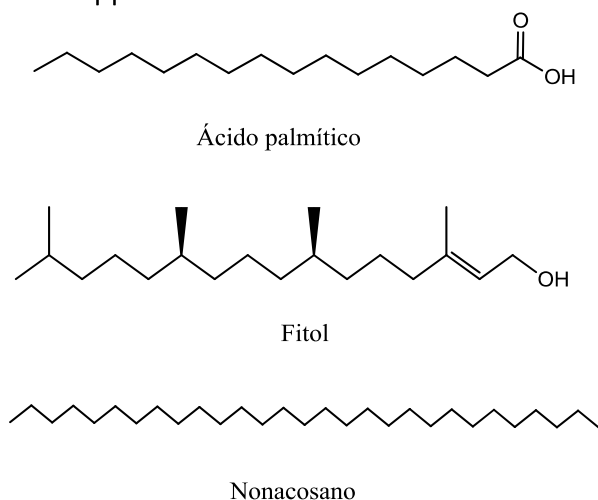
(Fonte: obra do autor)

Como pode ser observado na tabela acima, há uma grande variedade de substâncias identificadas nestes extratos, sendo ácidos graxos, terpenos e hidrocarbonetos as classes majoritárias.

Comparando-se a tabela representada acima com o cromatograma presente na Figura 30, é possível determinar os picos mais intensos sendo referentes aos constituintes majoritários. Estes são:

- **Pico 12:** Ácido palmítico (1TMS) – destaque para a espécie *C. lasiophylla*.
- **Pico 19:** Fitol (1TMS) – destaque para a espécie *C. lasiophylla*.
- **Pico 32:** Nonacosano – destaque para a espécie *C. decandra*.

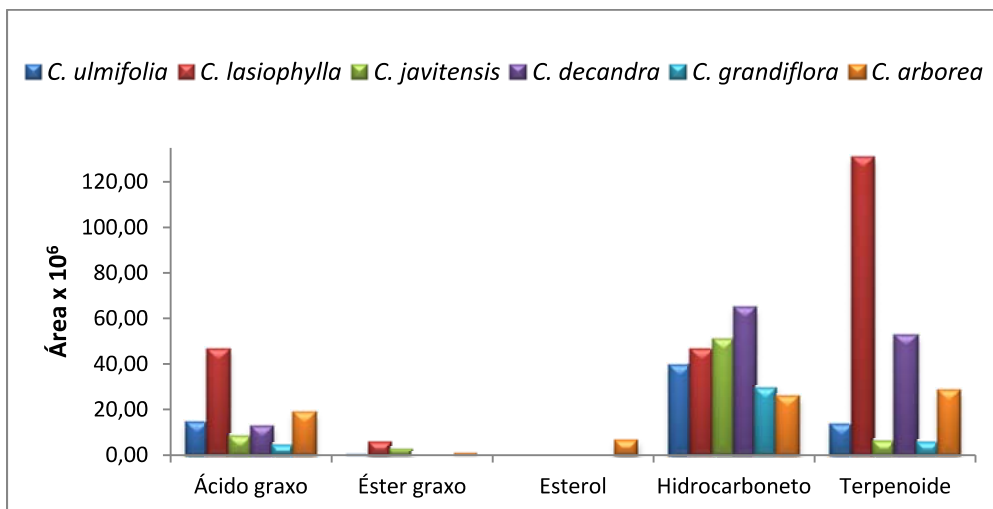
Figura 31 - Estrutura molecular das substâncias majoritárias identificadas nos extratos hexânicos sililados de *Casearia* spp.



(Fonte: obra do autor)

De forma simplificada, o gráfico de colunas abaixo representa as principais classes de compostos presentes nos extratos hexânicos sililados estudados:

Figura 32 - Teor relativo das classes de substâncias identificadas nos extratos hexânicos sililados de *Casearia* spp.



(Fonte: obra do autor)

Dessa forma, pode-se observar que a *C. lasiophylla* se destaca em relação às outras espécies pelo alto teor de terpenos assim como de ácidos graxos. Já a *C. javitensis* e *C. decandra* merecem destaque para as suas grandes quantidades de hidrocarbonetos e a *C. arborea* para a de esteroides.

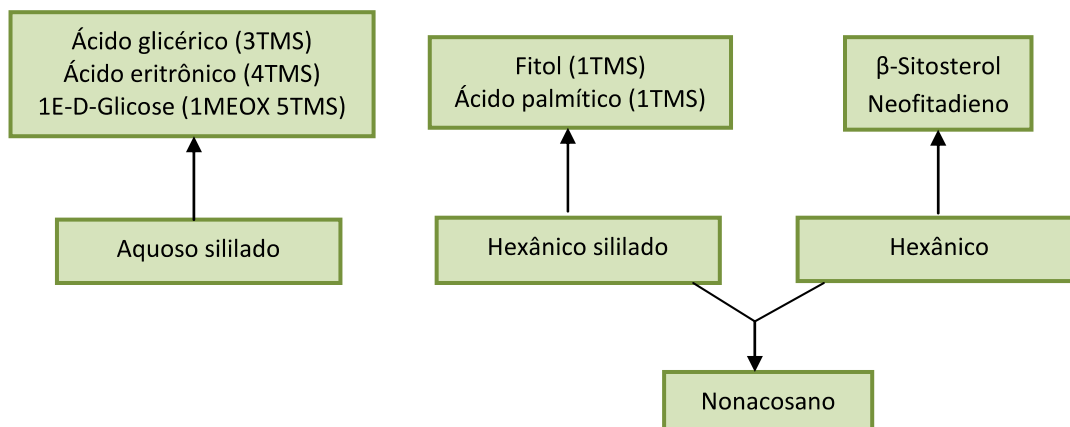
4.3.4.3 Análise comparativa dos extratos hexânicos e aquosos por CG-EM

É possível, agora, comparar os três extratos analisados por CG-EM. O esquema abaixo contendo as substâncias que se destacam em cada extrato das seis espécies de *Casearia* facilita a comparação de suas composições químicas.

Como se pode observar, os extratos aquosos destas espécies são muito semelhantes já que suas composições se destacam principalmente pela presença de ácidos carboxílicos como ácido glicérico e ácido eritrônico. Outras substâncias como, por exemplo, os compostos fenólicos hidroquinona e trans-ácido cafeico, e o açúcar levoglucosan são características exclusivas das espécies *C. decandra*, *C. lasiophylla* e *C. ulmifolia*, respectivamente.

Já ambos os extratos hexânicos se destacam pela presença do nonacosano. No caso do extrato hexânico não sililado, algumas espécies como *C. ulmifolia* e *C. lasiophylla* apresentam substâncias características como o ácido oleico e α -tocoferol, respectivamente.

Por fim, os extratos hexânicos sililados também se destacam pela presença comum do hidrocarboneto nonacosano. Ainda, substâncias tais como β -cubebeno e estigmast-4-en-3-ona são características da espécie *C. arborea*. Já a *C. lasiophylla* merece destaque pelo seu alto conteúdo de fitol.



(Fonte: obra do autor)

4.3.5 Ressonância Magnética Nuclear (RMN ^1H) dos extratos aquosos e etanólicos

A Ressonância magnética nuclear é considerada uma ferramenta essencial na caracterização, identificação e elucidação de estruturas moleculares. Neste sentido, a obtenção dos espectros de RMN de ^1H dos extratos brutos alcoólicos e aquosos das seis espécies do gênero *Casearia* em estudo objetivou documentar, através de uma técnica bastante reprodutível, seus respectivos perfis químicos e posteriormente compará-las visando uma análise sistemática.

Uma vez que, para estas espécies, pouca ou nenhuma informação está disponível, incluiu-se nesta análise a espécie *C. sylvestris*, a qual tem sido bastante estudada em nosso grupo de pesquisas (atualmente processos FAPESP #2011/21440-3 e 2013/01680-5). Portanto, foram incluídos nesta análise os espectros de RMN de ^1H dos extratos hidroalcoólicos de duas variedades de *C. sylvestris*, as quais possuem perfis químicos bastante característicos: a variedade *sylvestris*, que apresenta principalmente diterpenos do tipo clerodânico e a variedade *língua*, caracterizada pela presença de compostos fenólicos, dentre eles, flavonoides glicosilados.

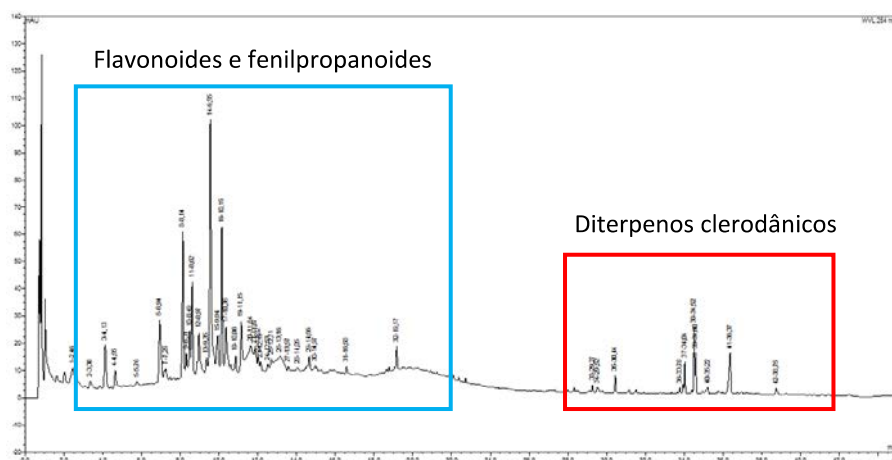
De forma geral e, como já observado nas análises por UHPLC-DAD, verifica-se a presença massiva de flavonóides em todas as espécies, tanto nos extratos etanólicos,

quanto nos aquosos. É possível observar os sinais característicos dos hidrogênios aromáticos (anéis A e B) entre 6,0 e 8,0 ppm, principalmente nos extratos etanólicos, exceto para os extratos etanólico de *C. javitensis* e aquoso de *C. ulmifolia*, cujos referidos sinais em seu espectro estão presentes, porém pouco intensos. Ao se comparar visualmente tais espectros com os espectros das duas variedades de *C. sylvestris*, nota-se que, nesta região onde ocorrem os hidrogênios aromáticos, o espectro da variedade *língua* é o que mais se assemelha com as espécies em estudo, conforme esperado (HARBORNE, 1994).

Ainda, na região entre 3,0 e 4,0 ppm, é possível observar inúmeros sinais que foram atribuídos à presença de açúcares, sugerindo a ocorrência de flavonóides glicosilados em todas as espécies, principalmente nos extratos aquosos. A presença de hidrogênios anoméricos foi sugerida devido à ocorrência de pequenos sinais entre 5,0 e 5,5 ppm (HARBORNE, 1994).

Sobre a ocorrência de diterpenos do tipo clerodânico, os quais já foram relatados em diversas espécies do gênero *Casearia* (XIA et al., 2014), foi interessante notar sinais característicos somente no extrato etanólico da espécie *C. lasiophylla*, corroborando com o que foi observado nas análises por UHPLC-DAD (Figura 33). Além disso, por comparação, o espectro do extrato etanólico de *C. lasiophylla* foi o que mais se assemelhou com o espectro de *C. sylvestris* variedade *sylvestris*. Os sinais entre 1,8 e 2,1 ppm e entre 3,4 e 3,9, foram atribuídos à presença de grupos metóxido (OMe) e acetato (OAc), respectivamente, e são característicos das cadeias laterais que ocorrem em casearinas. Entre 2,2 e 2,5 são observados os duplo dubletos referentes à H-10, do esqueleto básico das casearinas, enquanto que entre 5,1 e 5,4 foi observado um dubleto atribuído à H-12, também do esqueleto básico (SANTOS, 2008).

Figura 33 – Cromatograma do extrato etanólico da espécie *C. lasiophylla* destacando duas regiões referentes à presença de flavonoides e diterpenos clerodânicos as quais também puderam ser identificadas por RMN ^1H .



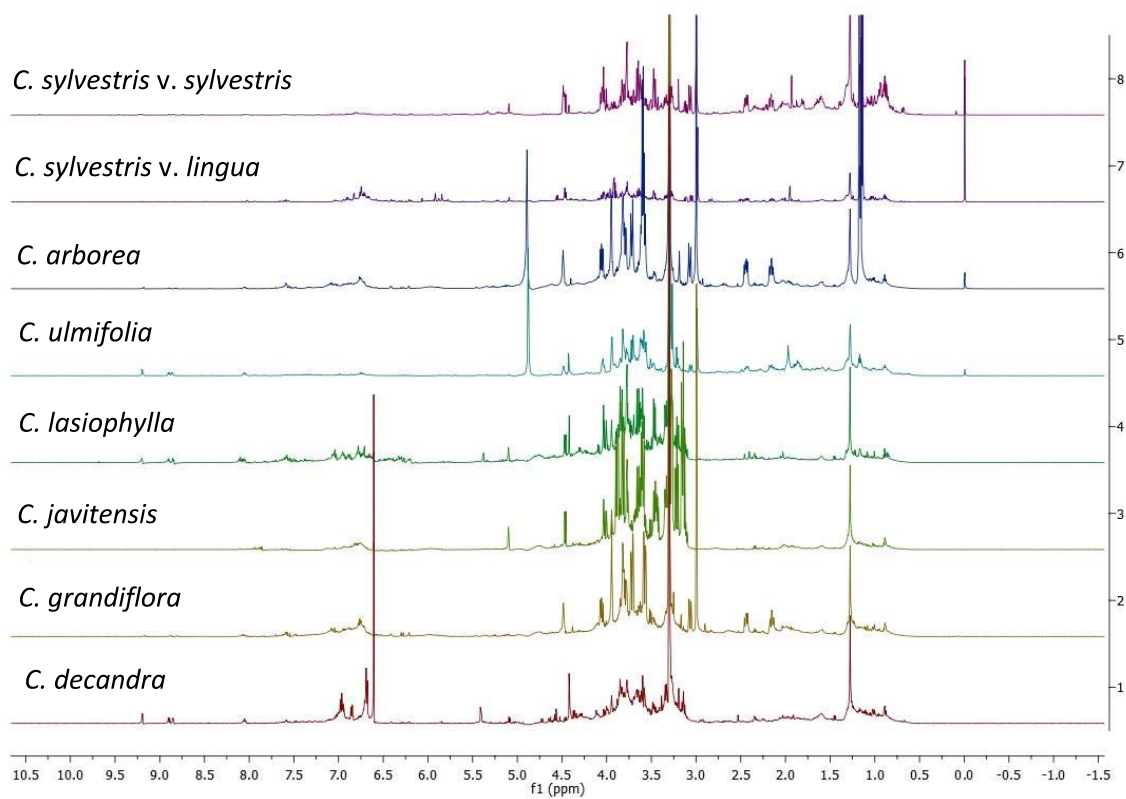
(Fonte: obra do autor)

A presença de fenilpropanóides em *C. lasiophylla*, conforme já sinalizada pela presença de ácido cafeoilquínico através das análises cromatográficas (Figura 33), pode ser relacionada com a ocorrência típica dos sinais de hidrogênios *trans*-olefínicos com constante de acoplamento (J) entre 15 e 16 Hz, na região de δ 6,1 – 6,5 (H-8') e principalmente na região de δ 7,6 – 7,7 (H-7'), tanto no extrato etanólico quanto no aquoso desta espécie (CHOI et al., 2005).

Além disso, sinais entre 1,0 e 1,5 ppm podem indicar hidrogênios de cadeia alifática (PAVIA et al., 2010) corroborando com a identificação dos carotenoides nos extratos etanólicos por UHPLC-DAD e, no caso dos extratos aquosos, com a presença de uma cadeia alifática em algum substituinte.

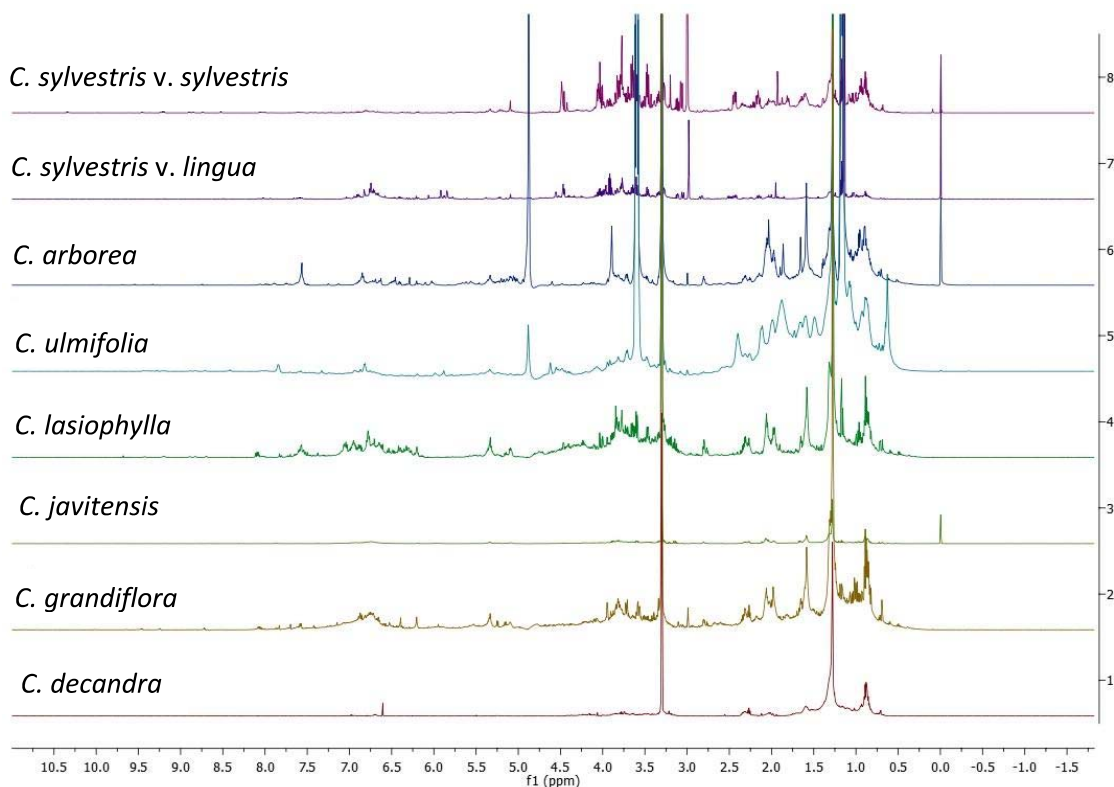
Finalmente, o singlete intenso observado em cerca de δ 6,7 no espectro do extrato aquoso de *C. decandra* confirma a presença de hidroquinona em quantidade significativa nessa amostra (VIEIRA JÚNIOR, 2010).

Figura 34 - Espectros de RMN ^1H (CD_3OD) referentes aos extratos aquosos das seis espécies em estudo e de duas variedades de *C. sylvestris*.



(Fonte: obra do autor)

Figura 35 - Espectros de RMN ^1H (CD_3OD) referentes aos extratos etanólicos das seis espécies em estudo e de duas variedades de *C. sylvestris*.



(Fonte: obra do autor)

4.3.6 Análise das frações da *C. lasiophylla* por CLAE-DAD-CAD

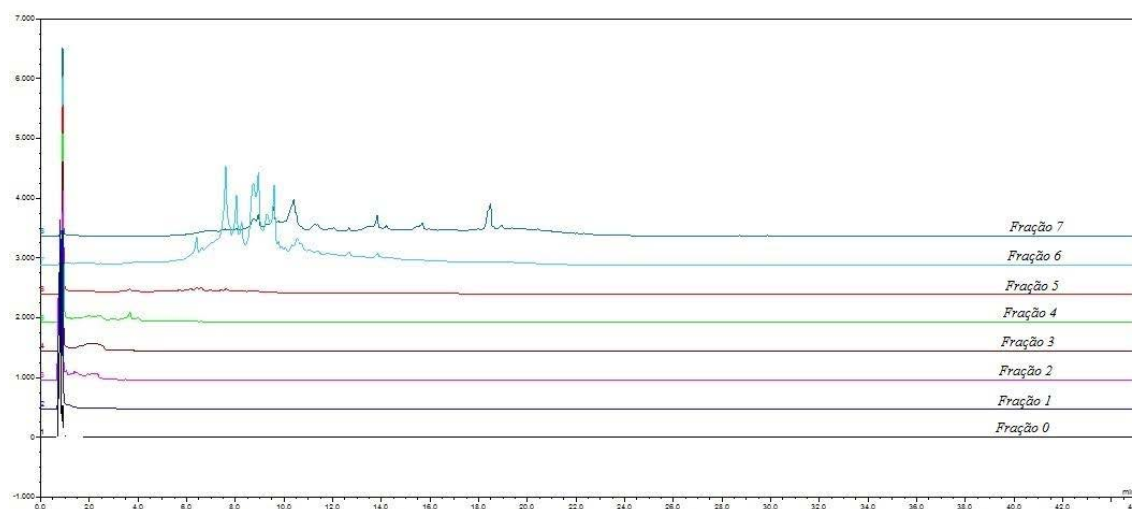
A análise por CLAE-DAD-CAD possibilitou algumas conclusões. Como pode ser observado na Figura 36, grande parte das substâncias presentes nas frações eluíram juntamente com o volume morto, já que se tratam de compostos muito polares e, portanto, não ficam retidos na coluna. Devido a isso, nada se pode afirmar sobre a constituição das frações 0, 1, 2, 3 e 4 (Figuras 36 e 37).

Apenas três frações apresentaram picos em tempos de retenção maiores que o tempo morto, os quais representam as substâncias mais retidas, sendo estas as frações 5, 6 e 7.

O CAD (do inglês *Charged Aerosol Detector*) é categorizado como um detector universal para HPLC devido à sua resposta a maioria dos analitos. O efluente é nebulizado e a fase móvel é evaporada. Então, os analitos na fase gasosa são misturados com uma corrente de gás nitrogênio a qual foi positivamente carregada por um dispositivo Corona. Dessa forma, a carga é transferida para as partículas do analito e espécies carregadas de alta

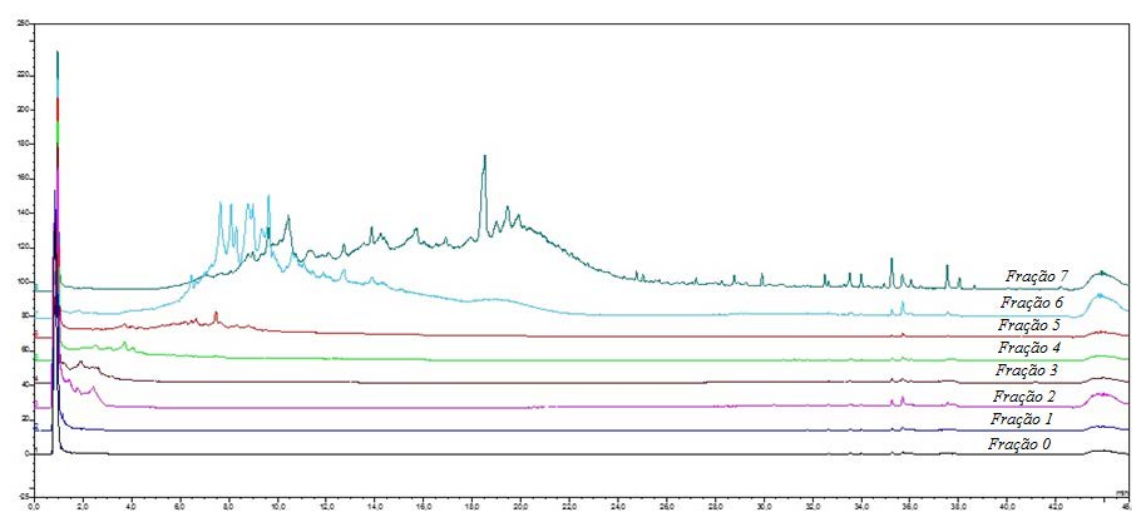
mobilidade são removidas para melhorar a qualidade do sinal. Os analitos carregados remanescentes geram um sinal que é lido por um eletrômetro (SNYDER et al., 2010). Nos cromatogramas registrados pelo CAD são observados praticamente as mesmas bandas vistas na detecção por UV, exceto para a fração 7, onde foram detectadas várias substâncias eluindo entre 20-40 minutos, não detectados por UV.

Figura 36 - Cromatogramas registrados a 254 nm referentes às 8 frações (0 a 7) do extrato aquoso de *C. lasiophylla*.



(Fonte: obra do autor)

Figura 37 - CAD correspondente aos cromatogramas descritos na Figura 36.

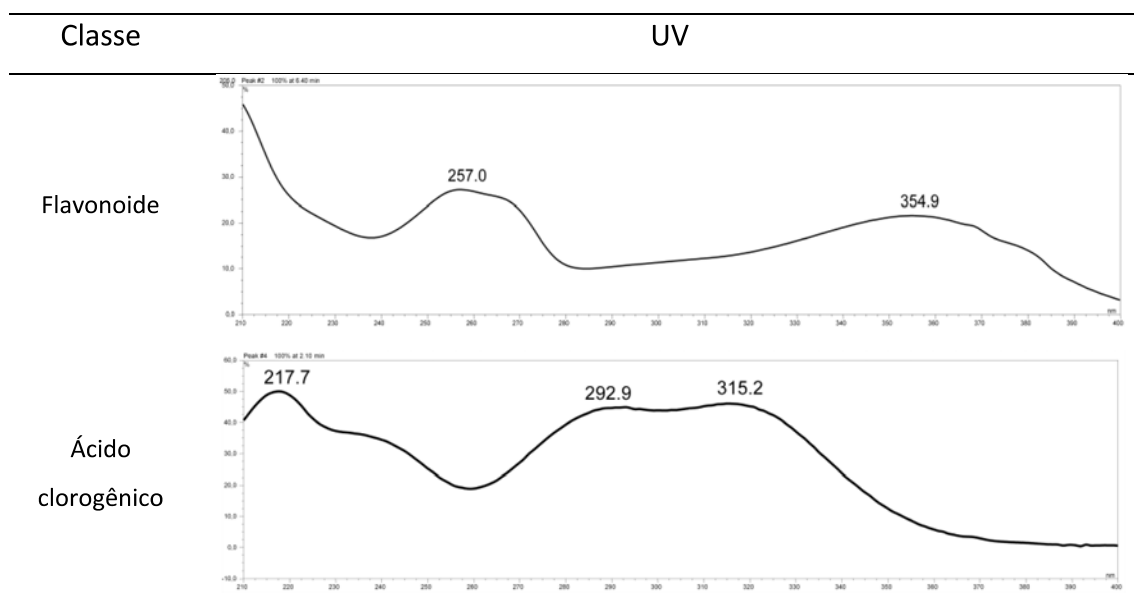


(Fonte: obra do autor)

Analisando os espectros no ultravioleta (UV) referentes a cada pico presente nestes cromatogramas, pôde-se concluir que tais frações contêm ácido clorogênico, um

fenilpropanoide, mas, majoritariamente, flavonoides, como está representado na tabela abaixo. Ambos já foram detectados previamente por UHPLC-DAD no extrato aquoso desta espécie.

Tabela 9 - Classe de compostos identificados por detecção UV nas frações 5, 6 e 7.



(Fonte: obra do autor)

4.3.7 Análise das frações da *C. lasiophylla* por RMN ^1H

Muito semelhante à discussão envolvendo o extrato aquoso de tal espécie, a análise por RMN ^1H das frações aquosas apresentaram sinais característicos de fenilpropanoides, mas principalmente de flavonoides.

Como discutido anteriormente, a análise por CLAE-DAD possibilitou a verificação de ocorrência de flavonoides nas frações 5, 6 e 7 corroborando com os espectros de RMN ^1H os quais apresentam sinais característicos de hidrogênios aromáticos dos anéis A e B (entre 6,0 e 8,0 ppm) (HARBORNE, 1994).

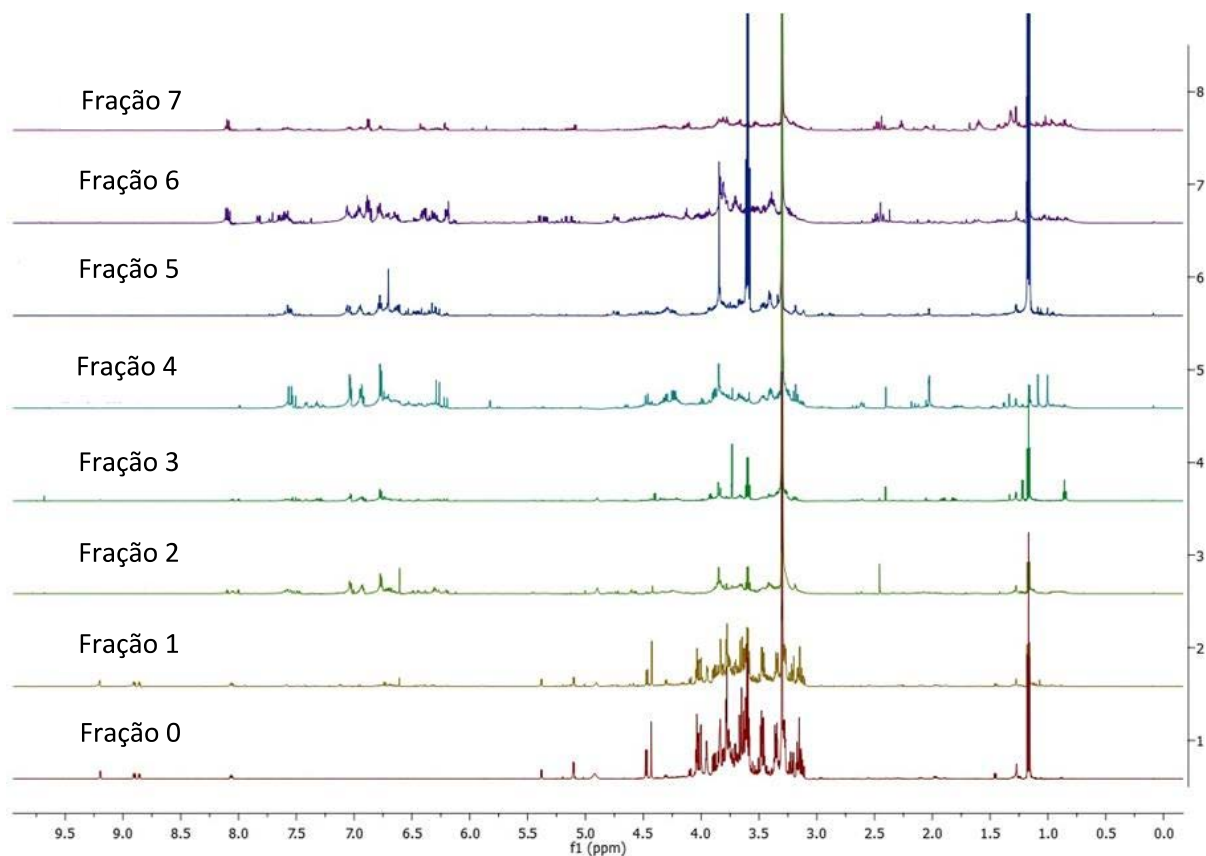
Já a região que compreende de 3,0 a 4,0 ppm se refere à açúcares propondo a existência de flavonoides glicosilados. Nota-se que todas as frações são ricas nesta faixa, contudo, as duas primeiras (0 e 1), que possuem maior proporção de água em sua composição, merecem destaque já que apresentam vários sinais nesta região. Para os pequenos sinais na faixa entre 5,0 e 5,5 ppm supõe-se a presença de prótons anoméricos de açúcares (HARBORNE, 1994).

As regiões 6,1 – 6,5 ppm e 7,6 – 7,7 ppm nas frações de 1 a 7 são atribuídas à presença de fenilpropanoides, o que é consistente com a identificação de ácido clorogênico por UHPLC-DAD, e se referem à dois prótons trans olefínicos, H-8' e H-7', respectivamente, com acoplamento entre 15 e 16 Hz (CHOI et al., 2005).

Além disso, sinais entre 1,0 e 1,5 ppm podem indicar hidrogênios de cadeia alifática (PAVIA et al., 2010) presentes em algum substituinte.

Essas frações foram encaminhadas para realização de bioensaios, e a fração ativa terá sua constituição química descrita em detalhes, visando identificação de eventuais princípios ativos.

Figura 38 - Espectros de RMN ^1H referentes às frações de 0 a 7 da espécie *C. lasiophylla*.



(Fonte: obra do autor)

5 CONCLUSÃO

Diante de todos esses resultados gerados com as análises cromatográficas e espectroscópicas, pode-se concluir que elas são complementares uma vez que forneceram dados acerca das composições dos três extratos analisados.

As seis espécies estudadas apresentaram composições químicas ricas visto que uma vasta gama de compostos foi identificada.

Os dados fornecidos pelas técnicas de UHPLC-DAD e RMN ^1H possibilitou uma visão geral da composição dos extratos mais polares, aquosos e etanólicos, os quais são constituídos majoritariamente por açúcares, ácidos carboxílicos, flavonoides, fenilpropanoides e, para a *C. lasiophylla*, também notou-se a forte presença de diterpenos clerodânicos.

Já os dados fornecidos para os extratos mais apolares, hexânicos, através da cromatografia gasosa acoplada com a espectrometria de massas, proporcionou a identificação de uma série de compostos dentre os quais merecem destaque os terpenoides, ácidos graxos e hidrocarbonetos.

Alguns dos compostos identificados em tal trabalho já possuem relatos no gênero *Casearia* como visto anteriormente. Contudo, grande parte deles está sendo identificada pela primeira vez.

Através das análises realizadas foi possível um contato maior com técnicas avançadas de análise qualitativa de compostos orgânicos em extratos vegetais proporcionando um treinamento qualificado tanto nos equipamentos quanto nos softwares utilizados.

De todas as espécies estudadas no presente trabalho, a que mais se sobressaiu do ponto de vista químico e farmacológico foi a *C. lasiophylla* devido à sua atividade antimicrobiana contra a bactéria *Staphylococcus aureus* apresentando um potencial bactericida que, futuramente, por meio de estudos mais aprofundados, pode ser explorado e se tornar um fitoterápico.

6 REFERÊNCIAS

- ALI, K. et al. Pre-analytical method for NMR-based grape metabolic fingerprinting and chemometrics. **Analytica Chimica Acta**, v. 703, p. 179-186, 2011.
- BEUTLER, J. A. et al. Novel Cytotoxic Diterpenes from *Casearia arborea*. **Journal of Natural Products**, v. 63, n. 5, p. 657-661, 2000.
- BRAITHWAITE, A.; SMITH, F. J. **Chromatographic Methods**. 5. ed. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1996. 559 p.
- BUENO, P. C. P. **Variabilidade química infraespecífica e dinâmica de metabólitos secundários fenólicos e diterpênicos em *Casearia sylvestris* Sw. (Salicaceae): correlação metabolômica e proteômica utilizando cromatografia, espectrometria de massas, ressonância magnética nuclear e quimiometria**. 2015. 255 p. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara, 2015.
- CHANG, K. C., et al. A cytotoxic butenolide, two new dolabellane diterpenoids, a chroman and a benzoquinol derivative from Formosan *Casearia membranacea*. **Planta Medica**, v. 69, n. 7, p. 667–672, 2003.
- CHOI, Y. H. et al. Classification of Ilex Species Based on Metabolomic Fingerprinting Using Nuclear Magnetic Resonance and Multivariate Data Analysis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 1237-1245, 2005.
- Clinical And Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. In: **23th Informational Supplement**. CLSI document M100-S23. Wayne: 2013.
- COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de Cromatografia**. 4. ed. Campinas: Editora da Unicamp, 2006. 456 p.
- DROZD, J. **Chemical Derivatization in Gas Chromatography**. 1. ed. Amsterdam: Elsevier Science Publishers B. V., 1981. 232p.
- DE MORAIS, S. M. et al. Essential Oil of *Casearia grandiflora* Camb. **Journal of Essential Oil Research**, v. 9, n. 6, p. 697-698, 1997.
- GONÇALVES, T. O. et al. Hidroquinona – princípio antioxidante e tóxico de *Casearia decandra* (Salicaceae). In: 32ª REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 2009, Fortaleza. **CD de resumos**. v. 1.
- GULLBERG, J. et al. Design of experiments: an efficient strategy to identify factors influencing extraction and derivatization of *Arabidopsis thaliana* samples in metabolomic studies with gas chromatography/mass spectrometry. **Analytical Biochemistry**, v. 331, p. 283-295, 2004.
- HARBORNE, J. B. **The Flavonoids: advances in research since 1986**. 1. ed. London: Chapman & Hall, 1994. 676p.

HARBORNE, J. B. **Phytochemical Methods**: A guide to modern techniques of plant analysis. 3. ed. London: Chapman & Hall, 1998. 302 p.

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

KNAPP, D. R. **Handbook of Analytical Derivatization Reactions**. 1. ed. New York: John Wiley & Sons, 1979. 741p.

KUMAR, S.; PANDEY, A. K. Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. **The Scientific World Journal**, v. 2013, 2013.

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

MARINS, K. et al. Atividade antimicrobiana das folhas de *Casearia decandra* Jacq. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 92, n. 4, p. 295-298, 2011.

MARQUETE, R. **O gênero Casearia Jacq. no Brasil**. 2010. Tese (Doutorado em Botânica) – Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Escola Nacional de Botânica Tropical, Rio de Janeiro, 2010.

MARQUETE, R.; VAZ, A. M. S. F. O gênero *Casearia* no estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Rodriguésia**, n.58, v.4, p.705-738, 2007.

PAVIA, D. L. et al. **Introdução à Espectroscopia**. 4. ed. São Paulo: Cengage Learning, 2010. 700p.

PEDROSO, K. et al. Levantamento de plantas medicinais arbóreas e ocorrência em Floresta Ombrófila Mista. **Ambiência-Revista do Setor de Ciências Agrárias e Ambientais**, v. 3, n. 1, p. 39-50, 2007.

SADEK, P. C. **The HPLC Solvent Guide**. 2. ed. New York: John Wiley & Sons, 2002. 643 p.

SALVADOR, M. J. et al. Chemical composition and cytotoxic activity of the essential oil from the leaves of *Casearia lasiophylla*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 21, n. 5, p. 864-868, 2011.

SANTOS, A. G. A. **Identificação dos princípios ativos antiulcerogênicos das folhas de Casearia sylvestris: Contribuição para o desenvolvimento de um fitoterápico**. 2008. 361p. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara, 2008.

SANTOS, P. A. et al. Atividade antioxidante dos extratos diclorometânico, metanólico e aquoso de folhas e galhos de *Casearia javitensis* Kunth. In: 32ª REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 2009, Fortaleza. **CD de resumos**. v. 1.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X; KIEMLE, D. J. **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos**. 7. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2007. 490p.

SLEUMER, H. O. **Flora neotropica monograph number 22 - Flacourtiaceae**. New York: The New York Botanical Garden Press, 1980. 499p.

SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; DOLAN, J. W. **Introduction to Modern Liquid Chromatography**. 3. ed. New Jersey: John Wiley & Sons, 2010. 912 p.

SOLOMONS, T. W. G.; FRYHLE, C. B. **Química Orgânica I**. 7. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2001. 645p.

STEFANELLO, M. E. A.; WISNIEWSKI, A.; SIMIONATTO, E. L.; CERVI, A. C. Essential Oil Composition of *Casearia decandra* Jacq. **Journal of Essential Oil Research**, v. 22, p. 157-158, 2010.

VAN DEN DOOL, H.; KRATZ, P. D. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. **Journal of Chromatography**, v. 11, p. 463-471, 1963.

VIEIRA JÚNIOR, G. M. et al., Cytotoxic Clerodane Diterpenoids from *Casearia obliqua*. **Journal of Natural Products**, v. 72, n. 10, p. 1847-1850, 2009.

VIEIRA JÚNIOR, G. M. **Contribuição ao estudo dos metabólitos secundários do gênero Casearia e de algumas de suas atividades biológicas**. 2010. 364 p. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara, 2010.

VIEIRA JÚNIOR, G. M. Cytotoxic Clerodane Diterpenes from *Casearia rupestris*. **Journal of Natural Products**, v. 74, p. 776-781, 2011.

WOLFENDER, J. HPLC in natural product analysis: the detection issue. **Planta Medica**, v. 75, p. 719-734, 2009.

WOLFENDER, J. et al. Current approaches and challenges for the metabolite profiling of complex natural extracts. **Journal of Chromatography A**, v. 1382, p. 136-164, 2015.

XIA, L. et al. The genus *Casearia*: a phytochemical and pharmacological overview. **Phytochemistry Reviews**, v. 14, n. 1, p. 99-135, 2014.