



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**

**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DA UNESP**

**TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**

**GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA-BIOQUÍMICA**

**Obtenção de forma farmacêutica sólida de extrato  
etanólico de *Casearia sylvestris* Swartz.**

**AUTOR: ALEXANDRE GIORDANO CRISPIM**

**ARARAQUARA  
SET./2012**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DA UNESP**

**LABORATÓRIO DE TECNOLOGIA FARMACÊUTICA**

**Obtenção de forma farmacêutica sólida de extrato etanólico  
de *Casearia sylvestris* Swartz.**

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado ao Curso de Graduação em  
Farmácia-Bioquímica da Faculdade de  
Ciências Farmacêuticas de Araraquara, da  
Universidade Estadual Paulista como parte  
dos requisitos para a obtenção do grau de  
Farmacêutico-Bioquímico.

**AUTOR: ALEXANDRE GIORDANO CRISPIM**

**ORIENTADORA: PROFA. DRA. ANA DÓRIS DE CASTRO**

**CO-ORIENTADOR: PROF. DR. ANDRÉ GONZAGA DOS SANTOS**

## **AGRADECIMENTOS**

À minha querida amiga e orientadora, Profa. Dra. Ana Dóris de Castro, pelo apoio para elaboração deste trabalho e todos ensinamentos que carregarei ao longo de minha vida.

À minha família, por sempre estar onipresente.

Ao meu coorientador, André Gonzaga dos Santos por fornecer todo suporte farmacobotânico neste trabalho.

## SUMÁRIO

Resumo .....	5
Lista de figuras .....	6
Lista de tabelas e quadros .....	6
Lista de equações .....	7
Lista de abreviaturas e siglas .....	7
1. Introdução .....	8
1.1. <i>Casearia sylvestris</i> .....	11
1.2. Granulados .....	15
3. Objetivo .....	16
3. Metodologia .....	17
3.1. Extração .....	17
3.2. Análise do extrato .....	18
3.2.1. Secagem do extrato .....	18
3.2.2. Análise de extrato etanólico por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) .....	19
3.3. Obtenção dos granulados .....	20
3.4. Avaliação das características micromeríticas dos granulados .....	21
3.4.1. Teor de umidade .....	21
3.4.2. Características de escoamento .....	22

3.4.3. Determinação das densidades aparentes bruta e compactada, Índice de Carr e Fator de Hausner .....	23
3.4.4. Avaliação do perfil químico de forma farmacêutica sólida .....	24
4. Resultados e Discussão.....	25
4.1. Análise do extrato.....	25
4.1.1. Secagem do extrato .....	25
4.2. Análise de extrato etanólico por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) .....	25
4.3. Avaliação do perfil químico dos granulados .....	31
4.4. Extrato concentrado em rotaevaporador .....	32
4.5. Características micromeríticas dos granulados.....	33
5. Conclusão .....	36
6. Referências Bibliográficas.....	37

## RESUMO

A espécie vegetal *Casearia sylvestris* é uma planta nativa do Brasil e de uso tradicional, sendo utilizada popularmente para combate de doenças do trato digestório. Seus extratos e mesmo substâncias purificadas apresentaram diversas atividades farmacológicas, sendo a mais eficaz a ação antiulcerogênica. Neste trabalho, desenvolveram-se granulados a partir do extrato etanólico de folhas de *C. sylvestris*. A metodologia envolve métodos de extração de droga vegetais, granulação via úmida e ensaios de caracterização do perfil micromerítico dos granulados.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura geral da casearina A.....	26
Figura 2. Cromatograma do extrato etanólico obtido por ultrassom.....	27
Figura 3. Cromatograma do extrato etanólico obtido por maceração.....	27
Figura 4. Cromatograma do padrão de caseargrewiina F e seu espectro na região do UV.....	27
Figura 5. Curva de calibração do padrão de caseargrewiina F em metanol.....	27
Figura 6. Cromatograma da solução extrativa proveniente de granulados obtidos a base de extrato etanólico de <i>C. sylvestris</i> .....	31
Figura 7. Cromatograma do extrato concentrado em rotaevaporador.....	32

## LISTA DE TABELAS E QUADROS

Quadro 1. Etapas principais na produção de fitoterápicos.....	9
Tabela 1. Composição dos granulados.....	21
Tabela 2. Massa de extrato seco presente em 1mL de extrato etanólico de <i>C. sylvestris</i> .....	25
Tabela 3. Dados das análises em CLAE-DAD da caseargrewiina F para a construção da curva analítica.....	29
Tabela 4. Análise quantitativa de diterpenos do tipo casearinas em relação à caseargrewiina F no extrato etanólico obtido por maceração e com aplicação ultrassom.....	30
Tabela 5. Características micromeríticas dos granulados.....	33

## LISTA DE EQUAÇÕES

(1).....	22
(2).....	22
(3).....	23
(4).....	23
(5).....	24
(6).....	29

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$\alpha$ : ângulo formado entre o granulado escoado e superfície plana

CLAE: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

DAD: Detector de arranjo de diodos

$d_b$ : densidade aparente bruta

$d_c$ : densidade aparente compactada

FH: Fator de Hausner

h: altura do cone

IC: Índice de Carr

HPMC: hidroxipropilmetilcelulose

IGDE: éter 3,5-dimetil-isobutil-galato

MGDE: éter 3,5-dimetil-metil-galato

PVP: polivinilpirrolidona

r: raio da base do cone

RENAME: Relação de medicamentos essenciais

v/v: volume/volume

$V_b$ : volume aparente bruto (mililitros)

$V_c$ : volume aparente compactado (mililitros).

## 1. INTRODUÇÃO

O consumo de plantas medicinais e de produtos fitoterápicos vem sendo algo surpreendente nos últimos anos, constituindo, assim, segmento farmacêutico bastante promissor. Este fato é denotado principalmente pela consequência da facilidade ao acesso, baixo custo de aquisição e a disseminação de seu uso popular (SOUZA ARAÚJO et al., 2006).

No Brasil, tem-se observado a cada ano a atualização da lista RENAME, o número crescente de fitoterápicos que passam a ser inseridos; com isso, foram instituídas diversas políticas e legislações que estimulam o desenvolvimento tecnológico de medicamentos oriundos de plantas medicinais. Segundo a ANVISA, medicamentos fitoterápicos são aqueles obtidos com emprego exclusivo de matérias-primas ativas vegetais, cuja eficácia e segurança são validadas por meio de levantamentos etnofarmacológicos, de utilização, documentações tecnocientíficas ou evidências clínicas. Não se considera medicamento fitoterápico aquele que possui em sua composição substâncias ativas isoladas, sintéticas ou naturais, nem as associações dessas com extratos vegetais (ANVISA, 2004).

O conceito de medicamentos fitoterápicos estabelecido pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária na Resolução RDC n. 14/2010 determina que estes devem atender a mesma trilogia exigida para outros medicamentos: EFICÁCIA, SEGURANÇA e QUALIDADE. A produção de um medicamento fitoterápico deve considerar todos os critérios adotados na produção de medicamentos, obedecendo as Boas Práticas de Fabricação e de Controle de Qualidade, além de outros critérios próprios dos fitoterápicos, que serão abordados adiante. A produção de medicamentos

fitoterápicos envolve, entre outras, as etapas descritas e apresentadas no Quadro 1 relacionadas à extração de drogas vegetais.

**Quadro 1:** Etapas principais da produção de extratos de drogas vegetais.

1. Cultivo, extrativismo ou manejo sustentável de populações nativas.
2. Coleta ou colheita.
3. Estabilização e secagem do material vegetal.
4. Fragmentação/moagem.
5. Armazenamento da droga vegetal.
6. Extração; alternativamente, obtenção de fração padronizada.

Dentre as etapas de produção do extrato vegetal de *C. sylvestris*, vale ressaltar que cada uma tem suma importância na produção de um extrato com concentração de diterpenos ideais que proporcionam a atividade antiulcerogênica. Na etapa de cultivo, o meio ambiente no qual a planta foi cultivada interfere diretamente na produção dos metabólitos secundários, pois as alterações no meio ambiente como frio, falta de água acarretam na maior produção de metabólitos secundários. Posteriormente, há a etapa de extração, que deve ser eficaz para possibilitar a extração dos diterpenos contidos nas folhas de *C. sylvestris*. O sistema solvente utilizado deve possibilitar a solubilização dos marcadores, e o método extrativo deve condicionar sua máxima extração, devendo considerar a temperatura, agitação e tempo de extração. Neste estudo, foram realizados dois tipos de extração por maceração: maceração comum e maceração com aplicação de ultrassom. O armazenamento ideal para o extrato etanólico de *C. sylvestris* é em geladeira e frasco vidro âmbar, pois a luz e temperaturas acima de 40 °C degradam as casearinas.

Para ser registrado, produzido e comercializado, o fitoterápico deve atender aos padrões de eficácia e segurança aceitáveis, através da comprovação por estudos pré-clínicos e clínicos, juntamente com dados de levantamentos etnofarmacológicos. Este estudo tem como finalidade o atendimento à necessidade de elaborar uma forma farmacêutica que viabilize o estudo clínico do medicamento. A padronização final do fitoterápico e, conseqüentemente, sua qualidade, dependem da padronização e validação das etapas acima citadas (ANVISA, 2010).

O controle de qualidade de medicamentos fitoterápicos pode ser dividido em 3 grupos de ensaios, segundo suas finalidades. Os Ensaios de Autenticidade ou de Identificação têm por objetivo confirmar a identidade da droga vegetal e/ou da planta medicinal. Os Ensaios de Avaliação de Pureza determinam a presença de impurezas ou o grau de pureza da matéria-prima vegetal. As Análises Químicas têm por objetivo principal a identificação e a quantificação de marcadores em matérias-primas vegetais e medicamentos fitoterápicos, metodologia que está explicitada neste trabalho.

Segundo a ANVISA, marcador é o componente ou classe de compostos químicos presente na matéria-prima vegetal, idealmente o próprio princípio ativo e, preferencialmente, que tenha correlação com o efeito terapêutico, que é utilizado como referência no controle de qualidade da matéria-prima vegetal e dos medicamentos fitoterápicos.

No controle de qualidade de medicamentos não fitoterápicos, são realizados ensaios para identificação e quantificação dos princípios ativos ou fármacos. No caso dos medicamentos fitoterápicos, nem sempre as substâncias ativas são conhecidas. Quando as substâncias responsáveis pela atividade farmacológica/efeito terapêutico não são conhecidas, elegem-se marcadores químicos para a espécie vegetal, no caso da *C.*

*sylvestris*, droga vegetal deste estudo, os marcadores são conhecidos: os diterpenos clerodânicos do tipo casearinas.

A determinação dos princípios ativos na espécie vegetal em estudo, responsáveis por sua atividade farmacológica ou o estabelecimento de marcadores químicos é fundamental para o desenvolvimento, a padronização e o controle de qualidade de fitoterápicos. O conhecimento dos princípios ativos contribui para o estabelecimento do mecanismos de ação (farmacológico e toxicológico) e da relação estrutura-atividade. Os estudos farmacológicos com os extratos devem ser desenhados considerando-se a concentração de marcadores. O desenvolvimento das formas farmacêuticas para o fitoterápico também depende do conhecimento sobre o teor de marcadores (LI et al., 2008).

Apesar do grande número de plantas usadas popularmente e do grande número de pesquisas com plantas medicinais no Brasil, ainda há poucos exemplos de medicamentos fitoterápicos a partir de plantas nativas. Com o desenvolvimento de uma formulação, damos o primeiro passo para o desenvolvimento de um medicamento fitoterápico contendo extrato de *C. sylvestris*. Com a criação de uma forma farmacêutica sólida, a posologia poderá ser estabelecida e então, propor-se-á uma terapia medicamentosa com segurança e eficácia à população.

### **1.1. *Casearia Sylvestris***

A espécie vegetal objeto deste estudo possui diversas características que foram determinantes em sua escolha. Primeiramente, é uma planta nativa do Brasil e de uso tradicional confirmado por estudos etnofarmacológicos, sendo utilizada popularmente em doenças do trato digestório (ex. úlceras, gastrites), dentre outras aplicações. É encontrada em diferentes regiões de nosso país e passível de cultivo doméstico, já

havendo produtores agrícolas que a cultivam. Seu extrato e mesmo substâncias purificadas apresentaram baixa toxicidade e diversas atividades farmacológicas, destacando-se a atividade antiulcerogênica (ANVISA, 2010). Vários metabólitos secundários foram isolados e/ou identificados em extratos desta espécie, incluindo sesquiterpenos e diterpenos. A própria ANVISA reconheceu a importância desta planta medicinal ao incluí-la no Anexo I da Resolução n. 10/2010, que trata da notificação de drogas vegetais (isentas de prescrição médica) para o uso na forma de infusão, decocção ou maceração com água (ANVISA, 2010).

*C. sylvestris* Swartz (seção *Crateria* Bentham) está classificada na tribo *Samydeae*, família *Salicaceae* e ordem *Malpighiales* (CHASE et al., 2002). Trata-se de uma espécie vegetal arbórea ou subarbustiva (1,5-15 m de altura) com ampla distribuição no Brasil, apresentando uma série de nomes comuns: guaçatonga, chá-de-bugre, erva-de-bugre, erva-de-lagarto, cafezinho-do-mato, cambroé, paratudo, etc. É encontrada em quase todas as formações florestais e sua ocorrência foi relatada em 22 estados e no Distrito Federal (ABSY e SCAVONE, 1973; HOEHNE, 1939; LORENZI, 1992; MARQUETE, 2001). A família *Salicaceae* possui distribuição cosmopolita, incluindo cerca de 50 gêneros e 1.000 espécies. O gênero *Casearia* Jacquin (tribo *Samydeae*) possui cerca de 180 espécies com distribuição pantropical (SLEUMER, 1980; TORRES, YAMAMOTO, 1986). Segundo Record e Hess (BASILE et al., 1990) 70 espécies do gênero ocorrem no Brasil.

*C. sylvestris* tem uma história rica nos sistemas de medicina tradicional no Brasil, estando até hoje incluída no arsenal da “fitoterapia popular”. Na medicina indígena da Amazônia utilizavam-se suas folhas, cascas e raízes como antitérmico (JUNGES et. al 1985). A espécie está incluída Farmacopéia dos Estados Unidos do Brasil 1ª edição como Herva de Bugre, constando como parte utilizada suas folhas

(SILVA, 1926). As indicações como antiofídico, antitérmico, cicatrizante e no tratamento de úlceras e gastrites são as mais comuns. Na maioria das vezes é citado o uso das folhas na forma de chás ou “garrafadas” - preparações hidroalcoólicas de uso tópico (COIMBRA, 1958; HOEHNE, 1939; LORENZI & MATOS, 2002; PEREIRA et al., 2004).

A grande diversidade de usos populares de *C.sylvestris* no Brasil despertou desde há muitos anos o interesse de grupos de farmacêuticos, pesquisadores, especialmente botânicos, etnobotânicos, farmacologistas e fitoquímicos. Como consequência, há diversos artigos publicados na literatura tratando da avaliação farmacológica de seus extratos. A maior parte das pesquisas verificou as atividades antiofídica (BORGES et al., 2000; CAVALCANTE et al., 2007; RASLAN et al., 2002), antiulcerogênica (BASILE et al., 1990; USP; FAPESP; UNESP, 2009), antiinflamatória (PEREIRA et al., 2004; SILVA et al., 2004) e cicatrizante (CAMARGO et al., 1996; GOMES et al., 2005), todas relacionadas ao uso medicinal popular. O óleo essencial das folhas inibiu o crescimento das bactérias *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Micrococcus*, *Shigella flexnerii*, *Enterobacter*, *Staphylococcus epidermitis*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella*, sendo mais eficaz contra as bactérias gram-positivas (SCHENEIDER et al., 2006). Dois ésteres derivados do ácido gálico (IGDE e MGDE), isolados a partir do extrato etanólico das folhas apresentaram atividade antimicrobiana em *E. coli*, *Salmonella enteritidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, com ação mais pronunciada nas bactérias gram-positivas *Enterococcus faecalis* e *Staphylococcus aureus* (SANTOS, 2008).

Os resultados dos ensaios toxicológicos realizados apresentaram baixa toxicidade via oral dos extratos de *C. sylvestris* (BASILE et al., 1990; FAPESP; UNESP; USP, 2003; SANTOS, 2008).

Algumas atividades farmacológicas exibidas por espécies de *Casearia* foram objeto de depósito de patente. Os diterpenos esculentina A e B isolados da *C. esculenta* apresentaram ações citotóxicas em células tumorais e antiinflamatória e a respectiva patente foi depositada na Europa por uma empresa farmacêutica (AVENTIS PHARMA DEUTSCHLAND GmbH, 1998). *C. sylvestris*, uma das espécies mais investigadas, está relacionada em outras 3 patentes. Na primeira, a ação citotóxica das casearinas foi patenteada no Japão (KIRIN BREWERY, 1989). A ação antiulcerogênica apresentada por uma fração rica em casearinas gerou uma segunda patente, depositada pela FAPESP, UNESP E USP, cujos inventores pertencem ao grupo de pesquisa de meu coorientador (Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais (NuBBE) do Instituto de Química de Araraquara-UNESP) e ao Instituto de Ciências Biológicas da USP (FAPESP, UNESP, USP, 2003). Mais recentemente, pesquisadores da Faculdade de Odontologia de Piracicada (UNICAMP) depositaram uma patente de fitoterápicos à base de extratos de *C. sylvestris* para o tratamento de herpes (UNICAMP, 2006).

Diversos diterpenos clerodânicos e ent-cauranos foram isolados da *C. sylvestris*, dentre os quais 28 diterpenos clerodânicos típicos do gênero *Casearia*: casearinas A-X (CARVALHO et al. 1998; ITOKAWA et al. 1990; MORITA et al. 1991; SANTOS et al. 2010; WANG et al. 2010) e caseargrewiina F (SANTOS et al. 2010), isolados de folhas; casearvestrininas A-C, isoladas de folhas e ramos (OBERLIES et al. 2002); rel-19S-acetoxi-18R-butanoiloxi-18,19-epoxi-6S-hidroxi-2R-(2-metilbutanoiloxi)-5S,8R,9R,10S-cleroda-3,13(16),14-trieno, isolado das raízes. Alguns destes diterpenos

exibiram atividade citotóxica em células tumorais, antiulcerogênica, tripanossomicida e antifúngica (ITOKAWA et al., 1990; OBERLIES et al., 2002; SANTOS, 2008; SANTOS et al., 2010).

Num estudo de fracionamento biomonitorado com foco na ação antiulcerogênica, o extrato etanólico, sua fração de diterpenos e as casearinas B, D, O, X e a caseargrewiina F reduziram em até 100% o número de lesões gástricas agudas em úlceras induzidas por etanol em ratos. A administração da casearina X (inicialmente chamada de casearina U em SANTOS, 2008) na dose de 172,0 mg/kg, cerca de 100 vezes maior do que a DE100 para a ação antiulcerogênica (1,68 mg/kg), não produziu nenhum tipo de alteração nos animais nos ensaios de toxicidade aguda via oral, indicando, preliminarmente, bom índice terapêutico. A casearina X e a caseargrewiina F foram quantificadas por CLAE-UV, apresentando teores de 8,6% e 4,0% (m/m), respectivamente, no extrato etanólico de folhas. O teor de diterpenos totais do tipo das casearinas em relação à caseargrewiina F foi determinado como 18,0% (m/m) através de CLAE-DAD (SANTOS, 2008).

## **1.2. Granulados**

Neste estudo, considerou-se que o granulado é uma das formas farmacêuticas sólidas adequadas para administrar por via oral um medicamento a base de *C. sylvestris*, visto que sua ação farmacológica ocorre no trato gastrointestinal.

A droga vegetal (extrato etanólico) é incorporada em diluentes como manitol e lactose no processo de granulação via úmida. Agentes aglutinantes como PVP e HPMC foram incorporados diretamente no extrato líquido, para modificar a qualidade dos granulados finais.

Os granulados, futuramente, poderão ser transformados em comprimidos, um produto final mais conveniente para administração oral e de maior valor agregado.

## **2. OBJETIVO**

O objetivo principal deste trabalho é desenvolver granulados a partir do extrato etanólico de folhas da *C. sylvestris*, um primeiro passo para o desenvolvimento de um produto acabado que emprega exclusivamente matérias-primas ativas vegetais.

### 3. METODOLOGIA

A metodologia incluiu a aplicação de métodos extrativos de plantas medicinais, análise do extrato vegetal por CLAE, obtenção de granulados a úmido e a avaliação de suas características micromeríticas.

#### 3.1. Extração

Os diterpenos encontrados nas partes aéreas de *C. sylvestris* são solúveis em alguns solventes orgânicos como etanol e acetato de etila. Pensando-se em granulação por via úmida como método de obtenção dos granulados, o etanol é conveniente, pois evapora totalmente na etapa de secagem dos granulados. Coleta-se as folhas de *C. sylvestris*, no Horto de Plantas Medicinais e Tóxicas "Profª. Dra. Célia C. A. Reis", após a coleta, realiza-se a etapa de estabilização e secagem das folhas em estufa por 7 dias, em temperatura constante de 40°C. Realiza-se a etapa de moagem das folhas secas em moinho de facas (MARCONI), e por fim foi realizada a extração utilizando etanol absoluto (PA) através de duas maneiras: por maceração comum e por banho de ultrassom.

Para obtenção do extrato etanólico de *C. sylvestris*, em ambos os casos utiliza-se a mesma quantidade de solvente e folhas moídas, o método inclui, em seqüência, três extrações nas quais foram adicionados o total de 500 mL de etanol absoluto em 50g de folhas moídas, secas e estabilizadas. Ao final de cada extração, filtra-se o sobrenadante, reserva-se o filtrado e adiciona-se mais solvente às folhas moídas até que se complete o ciclo de 3 etapas.

Na extração por maceração com aplicação de ultrassom, cada etapa de extração tem duração de 20 minutos e são realizadas em banho de ultrassom (UNIQUE® USC-2800A) a 40°C. Na maceração comum cada etapa de extração tem duração de 24 horas e não é aplicado o banho de ultrassom, apenas armazenada em frasco de vidro âmbar.

### **3.2. Análise do Extrato**

A quantificação dos diterpenos totais no extrato etanólico é de suma importância no trabalho, pois através do doseamento pode-se verificar o teor dos marcadores da droga vegetal produzida.

#### **3.2.1. Secagem do extrato**

Após a obtenção do extrato etanólico, realizou-se a secagem do extrato para fins de análise da quantidade de massa extrato seco para ambos os tipos de extração. Neste ensaio, colocou-se o extrato líquido em recipiente de vidro tarado e deixou-se secar sob fluxo de ar em capela e, após sua secagem total (não visualização de solvente), colocou-se em dessecador com sílica gel sob pressão reduzida. Retirou-se do dessecador quando a massa de extrato permaneceu constante. Com apenas a porção sólida resultante, verificou-se a massa em balança semi-analítica, sendo o resultado equivalente à massa de extrato seco, que valor fornece o rendimento do extrato.

### **3.2.2. Análise de extrato etanólico por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)**

Sabendo a massa de extrato seco em determinado volume de extrato líquido através do ensaio de secagem descrito anteriormente, realiza-se a análise em CLAE para determinação da concentração de diterpenos totais, para então obter-se a quantidade dos diterpenos em determinado volume de extrato etanólico.

A análise em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foi utilizada para avaliar a presença e a concentração dos diterpenos no extrato etanólico obtido após as etapas de extração citadas anteriormente. O pré-tratamento das amostras inclui uma extração em fase sólida com sílica de fase reversa (C18; 20x9 mm d.i.x.) solubilizando-se as amostras em 1,0 mL de metanol/água (98:02, v/v) e utilizando-se como eluente 4,0 mL da mesma mistura. O eluato foi recolhido em frasco tarado onde, após secagem em dessecador com sílica gel e sob vácuo, pesa-se a massa contida no frasco. Em seguida, solubilizam-se as amostras em 2,0 mL de metanol grau CLAE e filtra-se em membrana de acetato de celulose (0,22  $\mu$ m, PVDF Millipore®).

Realiza-se as análises em equipamento do tipo CLAE-UV utilizando coluna de fase reversa (C18, 250x4,6 mm; 5 $\mu$ m), gradiente linear com metanol:acetonitrila:água variando da proporção de 22:44:34 a 47:53:00 (v/v/v) em 42 minutos, mantendo as condição final até 47 minutos; vazão de 0,8 mL/minuto; detecção do tipo UV: 100-400 nm;  $\lambda$ = 235 nm (Método desenvolvido no laboratório Nubbe do Instituto de Química da Unesp Araraquara sob orientação do Prof. Dr. Alberto José Cavalheiro, 2008).

### 3.3. Obtenção dos granulados

A granulação por via úmida é um método freqüentemente empregado para obtenção de comprimidos (LISTER et al., 2002; SIMONS et al., 2003) porque os granulados formados apresentam boas características de fluxo e compressibilidade (TAKANO et al., 2003), resultando assim, em comprimidos com características físicas (peso, resistência mecânica e desintegração) adequadas e constantes (CURY, B.S.F. et al., 2007).

Como forma farmacêutica é muito interessante a aplicabilidade dos granulados, pois os pós apresentam baixo escoamento e alto grau de compactação, o que dificulta o uniformidade de massa do produto final.

Para preparar os granulados, o extrato etanólico foi incorporado diretamente em lactose e manitol (diluentes) em gral de porcelana, em seguida, a massa úmida resultante foi granulada pela passagem em tamis de abertura de 1 mm (nº 18 ABNT); então, os grânulos foram levados para secagem em estufa de circulação forçada de ar (MARCONI® MAO35).

Foram adicionados também aos granulados: PVP (agente aglutinante) e HPMC (polímero de liberação controlada), os dois adjuvantes foram inseridos previamente ao extrato etanólico, deixando-se por 15 minutos e, em seguida adicionou-se a solução final (solução extrativa com adjuvantes) aos excipientes.

Na Tabela 1 está apresentada a composição de cada granulado produzido neste estudo.

Tabela 1. Composição dos granulados

<b>Amostra</b>	<b>Extrato etanólico (mL)</b>	<b>Manitol (g)</b>	<b>Lactose (g)</b>	<b>PVP (g)</b>	<b>HPMC (g)</b>
<b>1</b>	40	-	100	-	-
<b>2</b>	166	376	-	44	-
<b>3</b>	110	-	200	11	-
<b>4</b>	70	-	80	-	5

Após a obtenção dos grânulos, os mesmos foram avaliados em relação ao teor de umidade, as densidades aparentes bruta e compactada e às características de escoamento.

### **3.4. Avaliação das características micromeríticas dos granulados**

#### **3.4.1. Teor de umidade**

O teor de umidade foi avaliado em balança para determinação de umidade de infravermelho (IV-2000 GEHAKA®), na qual coloca-se 1 g do granulado por 15 minutos, ao final a percentagem de umidade é fornecida. A taxa de umidade aceitável de acordo com a Farmacopéia Brasileira 4<sup>o</sup> Edição para produtos fitoterápicos é abaixo de 3%, pois dentro desta faixa a contaminação microbiológica é desfavorecida e o escoamento é facilitado.

### 3.4.2. Características de escoamento.

O ângulo de repouso é um parâmetro que tem como finalidade avaliar a dificuldade que um pó tem para fluir livremente através de um orifício para uma superfície livre. Deixando um pó fluir livremente através de um orifício sobre uma superfície plana será formado um cone, onde o ângulo da base desse cone é chamado de ângulo de repouso, ou seja, é a relação entre a altura (h) e o raio (r) do cone formado.

$$tg \alpha = \frac{h}{r} \quad (1)$$

O escoamento foi avaliado através do equipamento de escoamento ERWEKA® GWFD-63150: colocou-se 30g dos granulados no funil acoplado com anéis de diâmetro de 6mm, 9mm e 12mm; o sistema fornece o ângulo de escoamento e a velocidade de escoamento. O ângulo de repouso não foi obtido.

Para o cálculo da velocidade de escoamento, considera-se a equação 2:

$$v_{escoamento} = \frac{m}{t} \quad (2)$$

### 3.4.3. Determinação das densidades aparentes bruta e compactada, Índice de Carr e Fator de Hausner.

Uma amostra de 10g, exatamente pesada, de granulados de *C. sylvestris* foi transferida para uma proveta de 25 mL. O volume ocupado pelo granulado escoado livremente é o volume bruto ( $V_b$ ). Para avaliação da densidade compactada dos granulados, este mesmo volume foi submetido a várias séries de 1250 compactações. O experimento foi considerado terminado quando, após as compactações, as diferenças entre a leitura de volume inicial ( $V_b$ ) e a de volume final ( $V_c$ ) não ultrapassaram 2%.

Os cálculos de densidades foram determinados através das relações:

$$d_b = \frac{m_b}{V_b} \qquad d_c = \frac{m_c}{V_c} \qquad (3)$$

O Índice de Carr (IC) e Fator de Hausner (FH) exprimem a capacidade de compactabilidade e compressibilidade de um pó ou granulado. O IC foi calculado como mostrado na Equação 4:

$$IC = \left( \frac{d_c - d_b}{d_c} \right) \cdot 100 \qquad (4)$$

O Fator de Hausner (FH) foi obtido através do quociente entre a densidade compactada e a densidade bruta:

$$FH = \frac{d_c}{d_b} \quad (5)$$

#### **3.4.4. Avaliação do perfil químico de forma farmacêutica sólida.**

O método cromatográfico proposto foi utilizado para avaliar a presença e a concentração dos diterpenos (marcadores) na forma farmacêutica sólida. Este método analítico foi o mesmo utilizado para avaliação do perfil químico do extrato etanólico anteriormente obtido (item 3.2.2.): 1,650g de granulados de manitol com PVP foram triturados em gral de porcelana e submetidos a uma sequência de 3 etapas de extração. Cada etapa consistiu na adição de 10 mL de acetato de etila em tubo de ensaio no qual os granulados estavam moídos, extração em 20 minutos no banho de ultrassom e, em seguida, 5 minutos de centrifugação, tendo-se reservado o sobrenadante, pois os diterpenos são solúveis neste solvente. O líquido sobrenadante foi evaporado em capela até a seccagem total (não visualização de líquido) e em dessecador com sílica até secagem completa. Posteriormente, realizou-se a pesagem das amostras. As análises em CLAE-UV foram realizadas sob as mesmas condições descritas no item 3.2.2.. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Análise do Extrato

#### 4.1.1. Secagem do extrato

Neste ensaio, colocou-se 2mL do extrato líquido em recipiente de vidro tarado e realizou-se a secagem conforme descrito do item 3.2.1. Então mediu-se a massa de extrato seco restante em balança analítica (SHIMADZU AY220). Os resultados estão expostos na Tabela 2:

**Tabela 2.** Massa de extrato seco presente em 1mL de extrato etanólico de *C. sylvestris*.

Maceração Comum	Maceração com aplicação de Ultrassom
21,5 mg± 0,8888	20,36 mg± 0,7371

(n=3, média ± DP)

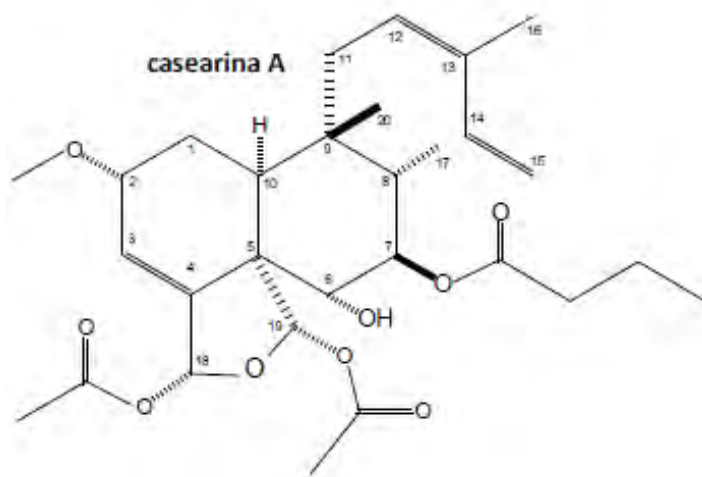
A percentagem de extrato seco encontrada no extrato etanólico de *C. sylvestris* foi em torno de 20%. O método de extração realizado por maceração comum levou a um rendimento um pouco maior, porém demanda muito mais tempo para ser realizado (4 dias) que o método em que se aplicou banho de ultrassom (1 hora). Por esta razão em termos de otimização do processo, a maceração com aplicação de ultrassom é a opção de escolha.

#### 4.1.2. Análise do extrato etanólico por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Os diterpenos do tipo das casearinas apresentam dois padrões diferentes de ligação dupla conjugada na cadeia lateral (C11-C16): C12 (*Z* ou *E*)/C14 ou

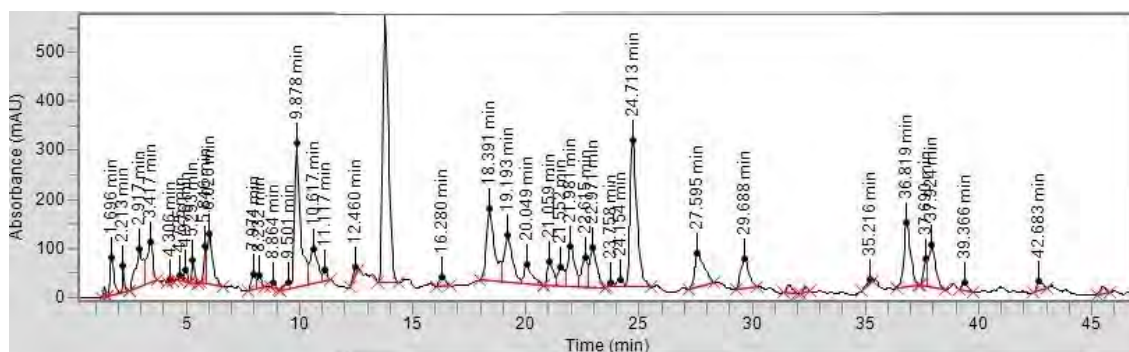
C13(16)/C14 e seus espectros no UV apresentam  $\lambda_{\max}$  = 221-228 ou 231-238 nm, respectivamente (CARVALHO et al., 1998; ITOKAWA et al., 1990). A Figura 1 ilustra a estrutura molecular geral das casearinas, representada pela casearina A.

Figura 1. Estrutura geral da casearina A.

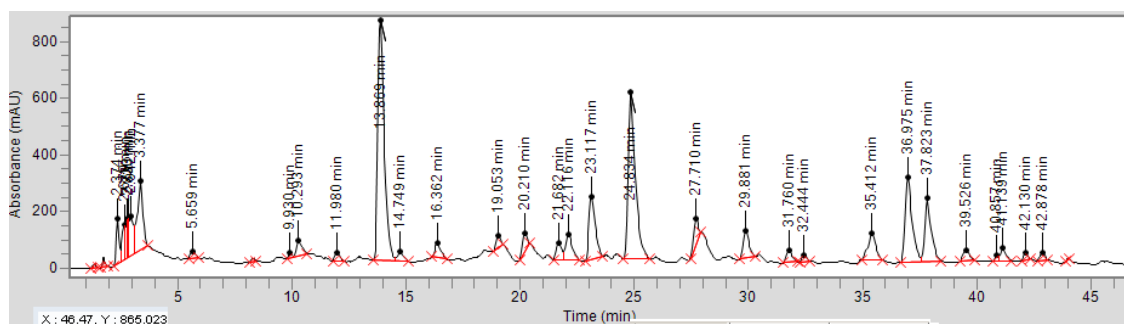


Assim, sugere-se que os picos com espectro no UV com  $\lambda_{\max}$  = 221-228 ou 231-238 nm são diterpenos do tipo das casearinas. Além disso, cinco diterpenos do tipo das casearinas foram isolados e identificados no extrato das folhas de *C. sylvestris* e seus picos apresentaram tempo de retenção  $t_R$  na faixa de 10-40 min, nas mesmas condições de CLAE (SANTOS, 2008), porém, neste trabalho apresenta-se a curva analítica padrão de um único diterpeno, a caseargrewiina F. Nas Figuras 2 e 3 encontram-se os cromatogramas dos extratos obtidos por ultrassom e maceração, respectivamente. A Figura 4 mostra o cromatograma do padrão de caseargrewiina F, análise realizada no Laboratório de Farmacognosia da FCFAr-Unesp.

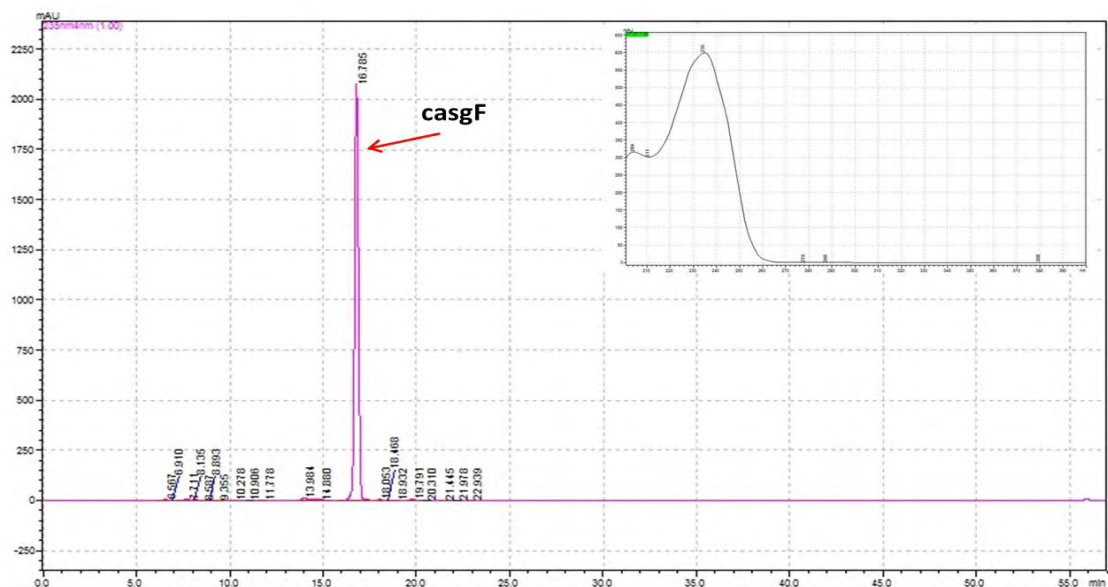
**Figura 2.** Cromatograma do extrato etanólico obtido por ultrassom. Condições de análise descritas no item 2.2.2..



**Figura 3.** Cromatograma do extrato etanólico obtido por maceração. Condições de análise descritas acima no item 2.2.2..

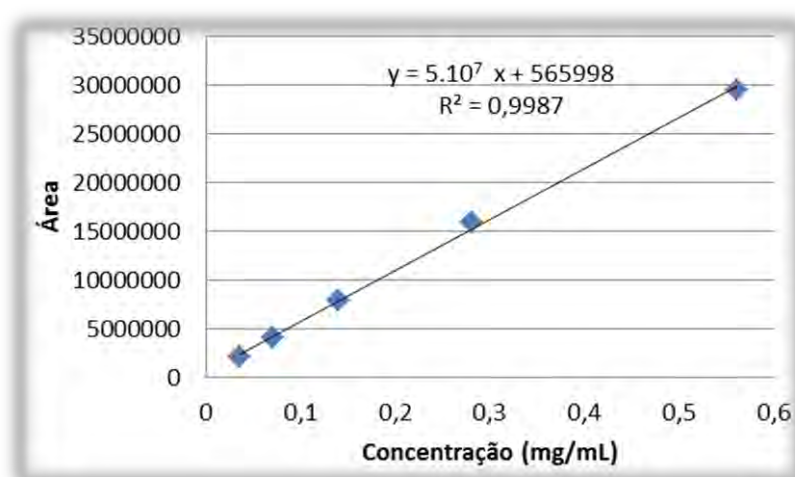


**Figura 4.** Cromatograma do padrão de caseargreina F e seu espectro no UV. Condições de análise descritas no item 2.2.2.



A curva analítica da caseargreina F (Figura 4) foi obtida através de injeções em triplicata de concentrações conhecidas do padrão (Tabela 3). As concentrações das soluções padrões de caseargreina F foram corrigidas considerando-se sua pureza média cromatográfica (97,2%).

**Figura 5.** Curva de calibração da solução padrão de caseargreina F em metanol.



A partir da equação 6 obtêm-se a concentração total de diterpenos do tipo caseargreina F.

$$[\textit{caseargrewiina F}] = \frac{\text{Área}-565998}{50000000}, \text{ onde } r^2 = 0,9987. \quad (6)$$

**Tabela 3.** Dados das análises em CLAE-DAD da caseargrewiina F para a construção da curva analítica.

Concentração inicial (mg/mL)	$t_R^1$ (min)	Área dos picos <sup>1</sup>	Pureza <sup>1,2</sup> (%)	Concentração corrigida <sup>3</sup> (mg/mL)
0,035	16,8	2090560	97,1	0,034
0,070	17,4	4161704,5	97,3	0,068
0,140	17,0	7910669	97,3	0,136
0,280	16,7	15882679	97,3	0,272
0,560	16,8	29559941	97,4	0,545

<sup>1</sup>média de 2 análises (desvio padrão)

<sup>2</sup>pureza cromatográfica calculada a partir da porcentagem relativa da área do pico da caseargrewiina F em relação à área total dos picos, para cada análise.

<sup>3</sup>concentração de caseargrewiina F calculada considerando-se o valor médio de sua pureza cromatográfica (97,2%).

Neste ensaio, a quantificação de diterpenos do tipo das casearinas é semi-quantitativa, pois ainda há algumas dificuldades em relação ao método analítico para se obter padrões cromatográficos para cada diterpenoclerodânico em folhas de *C. sylvestris* (cerca de 30); então, um deles foi selecionado como marcador para quantificar os diterpenos do tipo das casearinas, a caseargrewiina F (Equação 6). Portanto, utilizou-se a soma das áreas de todos os picos com uma banda com  $\lambda_{\text{máx}} = 231\text{-}235$  nm para o cálculo da concentração no extrato de diterpenos do tipo das casearinas (SANTOS, 2008). Outra questão é que não se pode afirmar que nas Figuras 1 e 2, entre os tempos de retenção 10-40 minutos, todos os picos são de casearinas. Considera-se este fato, pois se conhece o perfil do extrato através de outros estudos (SANTOS, 2008). Sendo

assim, o próximo passo seria fracionar os extratos e identificar cada tipo de casearina com o respectivo tempo de retenção.

A partir da equação da reta (Figura 4) da curva analítica e dos dados obtidos da análise do extrato etanólico em duplicata (Tabela 2), calculou-se as concentrações de caseargrewiina F e de diterpenos do tipo das casearinas expressos como caseargrewiina F no extrato etanólico obtido por ultrassom e maceração, cujos valores foram 12,47% e 9,707%, respectivamente.

**Tabela 4.** Quantidade de diterpenos declarados como caseargrewiina F presente nos extratos etanólicos obtidos por ultrassom e por maceração.

<b>Amostra</b>	<b>Área total<sup>1</sup></b>	<b>Concentração de diterpenos (mg/mL)</b>	<b>Concentração inicial da amostra (mg/ml)</b>	<b>%diterpenos(m/m)</b>
<b>Ultrassom</b>	57907680,42	1,16	9,3	12,47
<b>Maceração</b>	41869293,48	0,83	8,55	9,707

<sup>1</sup>média de 3 análises (desvio padrão); área total de picos de diterpenos do tipo das casearinas.

Considerou-se que, de acordo com as percentagens de diterpenos apresentadas na Tabela 4, o método de ultrassom foi mais vantajoso, pois a concentração de diterpenos foi maior em relação ao método de maceração.

É muito comum observar variações na concentração do marcador em determinado extrato, pois o clima e tipo de solo em que a planta foi cultivada podem interferir em sua produção, por sua vez, o método de extração pode interferir na concentração final destes no extrato etanólico. Por isso, estas variáveis têm grande importância na preparação de uma solução extrativa padrão, de modo à sempre

preconizar uma concentração constante de marcador em todas as etapas do desenvolvimento da formulação farmacêutica.

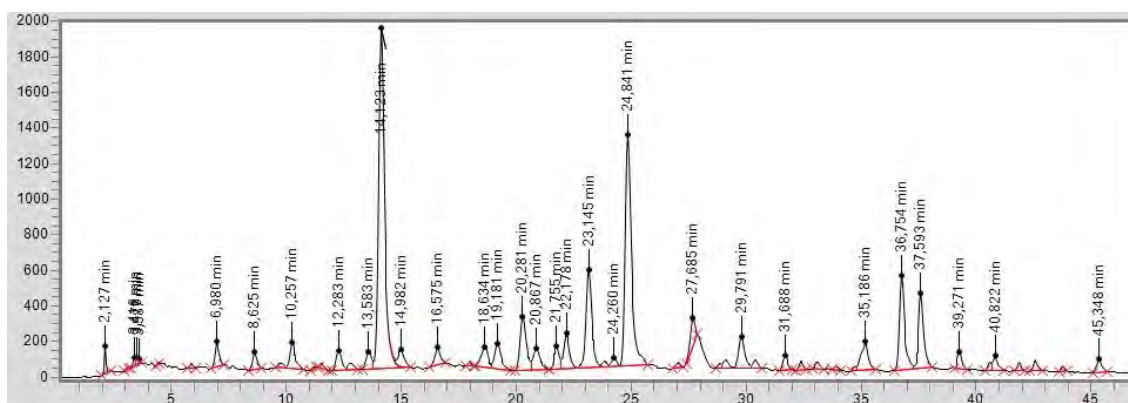
Como ressaltado anteriormente, ainda foram encontradas algumas dificuldades quanto à metodologia analítica com o extrato de *C. sylvestris*, pois apenas a caseargrewiina F foi eleita neste trabalho como marcador, sendo que os outros tipos de caserarina não foram contabilizados.

#### 4.2. Avaliação do perfil químico dos granulados.

Foi realizada uma granulação com 75 g de lactose e 35 mL de extrato líquido para a análise dos granulados em CLAE. No total foram produzidos 64,24 g de granulados, coleta-se 2 g para triturar em gral e então realizar o método de extração como citado em 3.4.4. Na secagem do extrato, este apresentou uma massa de extrato seco de 36,17 mg, após a extração nos granulados e extração em fase sólida, obteve-se uma massa de 8,9 mg de extrato seco, ou seja o método de extração ainda não é eficaz, podendo-se alterar alguns parâmetros como: sistema solvente, realizar aquecimento concomitantemente ao processo de extração, o tempo de permanência no ultrassom e agitação.

Na Figura 6 encontra-se o cromatograma da solução extrativa obtida a partir dos granulados de *C. sylvestris*, como explicitado no item 3.4.4.

**Figura 6.** Cromatograma da solução extrativa proveniente de granulados obtidos a base de extrato etanólico de *C. sylvestris*.

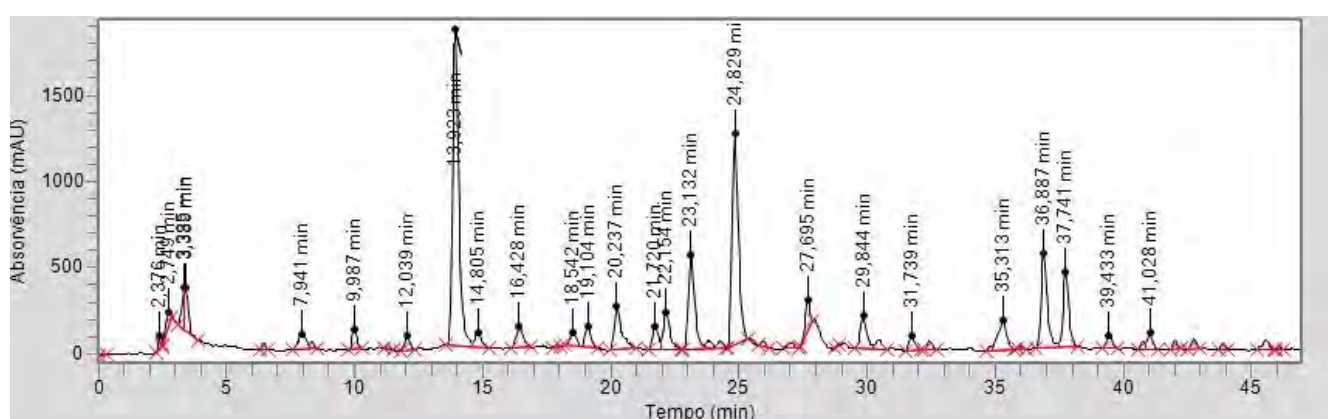


Em análise do cromatograma, soma-se as áreas entre os tempos de retenção de 10 a 40 minutos e, pela equação 6, chega-se a uma concentração de diterpenos finais de 6,904 mg, uma percentagem de 29,06% em relação à concentração inicial injetada em CLAE de 8,9 mg.

### 4.3. Extrato concentrado em rotaevaporador.

Devido à baixa concentração de diterpenos observados na Tabela 4, realizou-se a evaporação do etanol presente no extrato em rotaevaporador, com isso tem-se um extrato com maior percentagem de extrato seco, maior rendimento, consequentemente maior percentagem de diterpenos. A Figura 7 apresenta o cromatograma do extrato líquido concentrado.

**Figura 7.** Cromatograma do extrato concentrado em rotaevaporador.



Houve uma redução de 62,5% do volume de etanol e a concentração final de diterpenos foi de 2,235 mg/mL, uma percentagem de 19,6% em relação à concentração inicial de 11,4 mg/mL que foi injetada em CLAE.

#### 4.4. Características micromeríticas dos granulados

No decorrer dessas análises procurou-se selecionar os grânulos mais promissores para compressão, então observou-se seu comportamento desde sua granulação até os ensaios farmacotécnicos. A Tabela 5 apresenta as características micromeríticas dos granulados.

**Tabela 5.** Características micromeríticas dos granulados.

	<b>lactose* (1)</b>	<b>manitol (2)</b>	<b>lactose (3)</b>	<b>lactose/HPMC* (4)</b>
<b>d<sub>b</sub> (g/ml)</b>	0,555±0,0008	0,378±0,0014	0,427±0,0083	0,508±0,00961
<b>d<sub>c</sub> (g/ml)</b>	0,633±0,008	0,428±0,00105	0,493±0,0165	0,569±0,00981
<b>IC (%)</b>	13,343	11,465	14,325	10,793
<b>FH</b>	1,154	1,130	1,168	1,121
<b>umidade (%)</b>	0,40±0,050	2,83±0,100	1,6±0,0780	1,73±0,709
<b>v<sub>escoamento</sub>(g/s)</b>	13,621±0,8434	10,958±1,1401	11,785±0,7895	11,537±1,058
<b>ângulo de escoamento(°)</b>	85	84	86	82

d<sub>b</sub>: densidade bruta, d<sub>c</sub>: densidade compactada, IC: Índice de Carr, FH: Fator de Hausner. (n=3, média ± DP) \*Sem PVP.

O índice de compressibilidade ou de Carr expressa as características de consolidação de pós e granulados, sendo que índices entre 5 e 15% são considerados com excelente fluxo. Este índice está ligado diretamente ao ângulo de escoamento (WELLS, J. I., 1998).

Um índice similar, foi proposto por Hausner, o Fator de Hausner, onde valores menores que 1,25 indicam bom fluxo; valores maiores que 1,5 indicam fluxo ruim; valores entre 1,25 e 1,5 exigem a adição de lubrificantes para melhorar o escoamento (WELLS, J. I., 1998).

Estes índices são determinações pontuais, exprimindo apenas o potencial de compactação/compressão, e não a facilidade ou velocidade com que estas ocorrem. Para este tipo de avaliação utiliza-se os testes complementares como a determinação do ângulo de escoamento e o tempo de escoamento.

Considera-se que um pó tem boas propriedades de escoamento quando possui ângulo de repouso igual ou inferior a 30°. Ângulos superiores a 40° sugerem difícil fluxo<sup>9</sup>. Esse ângulo foi determinado pelo cone resultante do escoamento de 100 g de pó em um funil normatizado, cuja abertura de saída encontrava-se a 20 cm de altura, sobre uma folha de papel milimetrado. Foi calculado o valor médio de três determinações. Paralelamente ao ângulo de repouso, foi determinado o tempo de escoamento, onde resultados acima de 10 s são considerados com tempo de escoamento infinito (PRISTA, L. N. et al., 1995)

Na produção de granulados de *C. sylvestris*, todas as etapas de sua produção foram fundamentais para o delineamento de um granulado com características adequadas de compressão. Por exemplo, na secagem em estufa, se esta foi exacerbada, ou seja, passar de dois dias ou a temperatura ser mais elevada de 40°C, os granulados ficarão muito secos e abrasivos.

Em relação às propriedades de fluxo do material, estas são influenciadas pela tamisação, mistura e granulação enquanto a densidade influencia a compressibilidade, a porosidade e a dissolução do comprimido.

O conjunto de resultados indica que os granulados, embora sendo forma farmacêutica definitiva, são promissores para sua transformação em comprimidos, pois, pelo menos no que diz respeito às características de escoamento, o enchimento da câmara de compressão, provavelmente, será regular e sem momentos de bloqueio, fato que pode garantir a uniformidade de peso.

Ainda foram encontradas algumas barreiras no que tange ao método analítico para *C. sylvestris*, pois há grande variação na composição química das casearinas, o que dificulta a quantificação de diterpenos totais, apenas os expressos como caseargrewiina F puderam ser quantificados, este é único método desenvolvido até o presente momento. Também vale a ressalva que, como o estudo aborda espécies vegetais, há grande quantidade de compostos presentes além dos marcadores, o que dificulta ainda mais a confirmação da identidade de cada substância química detectada.

Mesmo com as dificuldades inerentes à pesquisa com produtos naturais, neste trabalho, a parte tecnológica foi desenvolvida a contento, chegando-se à obtenção de granulados contendo extrato de *Casearia sylvestris* Swartz, uma planta nativa popular brasileira utilizada no tratamento de distúrbios gástricos como úlcera e gastrite, o primeiro passo para o delineamento de um produto farmacêutico.

## 5. CONCLUSÃO

Desde colheita das partes aéreas do material vegetal, sua secagem e estabilização, a produção do extrato etanólico (droga vegetal) e sua incorporação em diluentes através de granulação via úmida, chegou-se em granulados de boa qualidade de *C. sylvestris*.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABSY, M. L.; SCAVONE, O. Sobre a morfologia e anatomia da *Casearia sylvestris* Swartz. **Boletim de Zoologia e Biologia Marinha**, n. 30, p. 641-676, 1973.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução n. 10, de 9 de março de 2010. Dispõe sobre a notificação de drogas vegetais junto à Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, 11 mar. 2010.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução RDC n. 48, de 16 de março de 2004. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 17 mar. 2004.

AVENTIS PHARMA DEUTSCHLAND GmbH (Germany). S. Bal-Tembe; K. E. K. S. Vijaya; D. V. Bhagwan; J. K. Sanjay, Isolation of 18b, 19b-diacetoxy-18b,19b-epoxy-3,13(16),14-clerodatrien-2-one (esculetin A) and 18a,19a-diacetoxy-18a,19a-epoxy-3,12, 14-clerodatrien. **EP 0916663A1**, Nov. 1998.

BASILE, A. C.; SERTIE, J. A. A.; PANNIZZA, S.; OSHIRO, T. T.; AZZOLINI, C. A. Pharmacological assay of *Caseariasylvestris*. I: Preventive anti-ulcer activity and toxicity of the leaf crude extract. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 30, p.185-197, 1990.

BORGES, M. H.; SOARES, A. M.; RODRIGUES, V. M.; ANDRIÃO-ESCARSO, S. H.; DINIZ, H.; HAMAGUCHI, A.; QUINTERO, A.; LIZANO, S.; GUTIÉRREZ, J. M.; GIGLIO, J. R.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I. Effects of aqueous extract of *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae) on actions of snake and bee venoms and on activity of phospholipases A<sub>2</sub>. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 127B, p. 21-30, 2000.

CAMARGO, F. G.; PEREIRA, J. A.; BUENO, V. S.; GOMES, E.; ANDO, T. Ação do extrato alcoólico de guaçatonga diluído e tamponado em subcutâneo de camundongo – Parte II – Estudo histológico. **LECTA**, v. 14, n. 1, p. 61-86, 1996.

CAMINHOÁ, J. M. **Elementos de botânica geral e médica**. Rio de Janeiro: Tipographia Nacional, 1877. v. 3, p. 2600 e 2926.

CARVALHO, P. R. F.; FURLAN, M.; YOUNG, M. C. M.; KINGSTON, D. G. I.; BOLZANI, Acetylated DNA-damageclerodanediterpene from *Casearia sylvestris*. **Phytochemistry**, v. 49, n. 6, p. 1659-1662, 1998.

CAVALCANTE, W. L. G.; CAMPOS, T. O.; PAI-SILVA, M. D.; PEREIRA, P. S.; OLIVEIRA, C. Z.; SOARES, A. M.; GALLACCI, M. Neutralization of snake venom phospholipase A<sub>2</sub> toxins by aqueous extract of *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae) in mouse neuromuscular preparation. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 112, p. 490-497, 2007.

CHASE, M. W.; ZMARTZTY, S.; LLEDÓ, M. D.; WURDACK, K. J.; SWENSEN, S. M.; FAY, M. F. When in doubt, put it in Flacourtiaceae: a molecular phylogenetic analysis based on plastid *rbcL*DNA sequences. **Kew Bulletin**, n. 57, p. 141-181, 2002.

COIMBRA, R. **Notas de fitoterapia**. 2. ed. Rio de Janeiro: Laboratório Clínico Silva Araújo, 1958. p. 169-170.

CURY, B.S.F.; SILVA Júnior, N.P.; CASTRO, A. D. Influência das propriedades de granulados de lactose nas características físicas dos comprimidos. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica Aplicada**, v. 28, n.1, p.85-92, 2007.

FAPESP; UNESP, USP (Brasil). SERTIÉ, J. A. A.; WOISKY, R. G.; CAVALHEIRO, A. J.; BOLZANI, V. S.; SANTOS, A. G.; TININIS, A. G. Processo de obtenção de extratos de *Casearia sylvestris*, processos de obtenção de frações ativas, extratos, frações ativas, uso de extratos e frações ativas, composição, unidade de dosagem, método para prevenir, tratar, combater ou suspender distúrbios gastrointestinais, medicamento e princípio ativo. PI 0306167-1, 18 dez. 2003.

GOMES, C. L. N.; MACIEL, M. C. G.; GUERRA, R. N. M.; ABREU-SILVA, A. L.; NASCIMENTO, F. R. F. Avaliação do efeito cicatrizante da *Casearia sylvestris* Swartz (guaçatonga) em camundongos. **Jornal Brasileiro de Fitomedicina**, v. 3, n. 2, p. 48-55, 2005.

HOEHNE, F. C. **Plantas e substâncias vegetais tóxicas e medicinais**. São Paulo: Graphicars, 1939.

ITOKAWA, H.; TOTSUKA, N.; MORITA, H.; TAKEYA, K.; IITAKA, Y.; SCHENKEL, E. P.; MOTIDOME, M. Antitumor principles from *Casearia sylvestris* Sw. (*Flacourtiaceae*), structure elucidation of new clerodanediterpenes by 2-D NMR spectroscopy. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, v. 38, n. 12, p. 3384-3388, 1990.

JUNGES, M. J.; SCHENKEL, E. P.; SIMÕES, C. M. O. Flavonóides da *Caseariasylvestris* Sw. (erva de bugre). **Caderno de Farmácia**, v. 1, n. 2, p. 95-101, 1985.

KIRIN BREWERI (Japan). H. Itokawa. **Novo composto diterpênico e suas aplicações**. JP 01.149.779, 05 Dec. 1987, 12 Junho 1989.

LI, S.; HAN, Q.; QIAO, C.; SONG, J.; CHENG, C. L.; XU, H. Chemical markers for the quality control of herbal medicines: an overview. **Chinese Medicine**, v. 3, n. 7, 2008.

LITSTER J. D, HAPGOOD, K. P., MICHAELIS J. N., SIMS A., ROBERTS M., KAMENENI S. K. Scale-up of mixer granulators for effective liquid distribution. **Powder Tech** 2002; 124:272-80.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras**. Nova Odessa: Plantarum, 1992. p. 115.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil nativas e exóticas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002. p. 142-143 e 220-221.

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

MORITA, H.; NAKAYAMA, M.; KOJIMA, H.; TAKEYA, K.; ITOKAWA, H.; SCHENKEL, E. P.; MOTIDOME, M. Structures and cytotoxic activity relationship of casearins, new clerodanediterpenes from *Casearia sylvestris* Sw. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, v. 39, n. 3, p. 693-697, 1991.

OBERLIES, N. H.; BURGESS, J. P.; NAVARRO, H. A.; PINOS, R. E.; FAIRCHILD, C. R.; PETERSON, R. W.; SOEJARTO, D. D.; FARNSWORTH, N. R.; KINGHORN, A. D.; WANI, M. C.; WALL, M. E. Novel bioactive clerodanediterpenoids from the leaves and twigs of *Casearia sylvestris*. **Journal of Natural Products**, v. 65, n. 2, p. 95-99, 2002.

PEREIRA, R.C.; OLIVEIRA, M.T.R.; LEMOS, G.C.S. Plantas utilizadas como medicinais no município de Campos de Goytacazes – RJ. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 14, supl. 1, p. 37-40, 2004.

PRISTA, L. N.; ALVES, A. C.; MORGADO, R.; **Tecnologia Farmacêutica**, 5<sup>a</sup> ed.; Calouste Gulbenkian: Porto, vol. 1, 1995.

RASLAN, D. S.; JAMAL, C. M.; DUARTE, D. S.; BORGES, M. H.; DE LIMA, M. E. Anti-PLA action test of *Casearia sylvestris* Swartz. **Bolletín Chimie et Farmacie**, v. 141, n. 6, p. 457-460, 2002.

SIMONS SJR, PEPIN X., ROSSETTI D. Predicting granule behavior through micro mechanistic investigations. **Int J Miner Process**, 72:263-75, 2003.

SLEUMER, H. O. **Flacourtiaceae**: flora neotropica; monograph number 22. New York: The New York Botanic Garden, 1980. p. 4, 281, 392-393, 400-401.

SOUZA ARAÚJO, A. A.; MERCURI, L. P.; SEIXAS, S. R. S.; STORPITIS, S.; MATOS, J. R. Determinação dos teores de umidade e cinzas de amostras comerciais de guaraná utilizando métodos convencionais e análise térmica. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 2, 2006.

TAKANO K, NISHII K, MUKOYAMA A, IWADATE Y, KAMIYA H, HORIO M. BINDERLESS. Granulation of pharmaceutical lactose powders. **Powder Tech**, 122:212-21, 2002

TORRES, R. B.; YAMAMOTO, K. Taxonomia das espécies de *Casearia* Jacq. (*Flacourtiaceae*) do estado de São Paulo. **Revista Brasileira de Botânica**, n. 9, p. 239-258, 1986.

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

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

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

SILVA, R. A. D. **Pharmacopeia dos Estados Unidos do Brasil.** São Paulo: Ed. Nacional, 1926. p. 429, 503-504.

SILVA, S.L., CALGAROTTO, A.K., CHAAR J.S., MARANGONI S. Isolation and characterization of ellagic acid derivatives isolated from *Casearia sylvestris* Swartz aqueous extract with anti-PLA2 activity. **Toxicon**, v. 52, p. 655-666, 2004.

UNESP (Brasil). BOLZANI, V. da S.; CAVALHEIRO, A. J.; SANTOS, A. G.; MORAES, M. O.; PESSOA, C.; COSTA-LOTUFO, L.; FERREIRA, P. M. P. **Compostos com ação citomoduladora, formulações contendo os mesmos e processo para sua preparação.** Patente depositada no INPI sob o protocolo 018080073489, 28 nov. 2008.

UNICAMP (Brasil). GROPPPO, F.C.; CURY, V. G. C.; SOUZA, R. A. **Composição medicamentosa a base de *Casearia sylvestris* e uso de composição medicamentosa a base de *Casearia sylvestris*.** Patente depositada no INPI sob o protocolo 0602094-1, 25 mai. 2006.

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

WANG, W.; ALI, Z.; LI, X.-C.; KHAN, I. A. Neolignans from the leaves of *Casearia sylvestris* Swartz. **Helvetica Chimica Acta**, v. 93, p. 139-146, 2010.

WELLS, J. I.; *Pharmaceutical Preformulation: The Physicochemical Properties of Drug Substances*, **John Wiley & Sons**, New York, 1988.