

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
FARMÁCIA-BIOQUÍMICA

POLYANNA PEREIRA AGUILAR

ANÁLISE FITOQUÍMICA COMPARATIVA DE FLORES E FOLHAS DE
***Casearia sylvestris* SWARTZ**

Araraquara
2013

POLYANNA PEREIRA AGUILAR

**ANÁLISE FITOQUÍMICA COMPARATIVA DE FLORES E FOLHAS DE
Casearia sylvestris SWARTZ**

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

Orientador: Prof. Dr. André Gonzaga dos Santos

Araraquara
2013

DEDICATÓRIA

*Àqueles que sempre estiveram ao meu
lado, que me deram apoio e foram
verdadeiros.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à minha amada família, principalmente meus pais Maria do Rosário e Edmilson, meus “avós” Marcy e Aryovaldo, meus “tios” Karina, Cris, Márcio, Edu e Artur, e “prima” Carol, pelo amor, confiança e apoio depositados em mim ao longo de toda a minha vida.

Ao meu orientador André Gonzaga dos Santos, agradeço imensamente pelos ensinamentos, paciência, dedicação, experiência, conselhos e amizade que me proporcionou durante a realização deste trabalho ou sobre qualquer assunto que precisei.

À Camila, amiga que encontrei durante minha graduação e que agora considero parte de minha família, pela amizade, apoio, conhecimento, preocupação e carinho. E à sua família que me ajudou muito e sempre terá um lugar especial em minha vida.

Ao André, amigo de faculdade, amigo de trabalho, amigo da vida e irmão de alma.

Aos amigos que conquistei durante a graduação e aos que não perdi o contato mesmo estando distante, principalmente Hermano, Renata e Lucas que são muito importantes para mim.

Ao pessoal do laboratório de farmacognosia da UNESP pela ajuda e paciência com os meus experimentos e minhas dúvidas, principalmente Elaise, Josi, Ana Carolina e Natália.

Aos técnicos Caio, Rodrigo, Mateus e Eduardo pela ajuda essencial para a realização dos meus experimentos e elaboração deste trabalho.

Ao pessoal do laboratório de Química Farmacêutica da UNESP pela utilização dos equipamentos para realizar meus experimentos e ajuda com os mesmos.

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” pela minha excelente formação e por proporcionar aulas com ótimos docentes, como o professor André Gonzaga (Farmacognosia) e professora Marcia Silva (Química Farmacêutica).

RESUMO

Casearia sylvestris Swartz (*Salicaceae*), conhecida como guaçatonga, é uma espécie vegetal distribuída amplamente pela América do Sul, ocorrendo em 22 estados brasileiros. Na medicina popular é utilizada no tratamento de picadas de cobra, úlceras gástricas, como cicatrizante, anti-inflamatório e antisséptico tópico. Extratos de suas folhas demonstraram atividade antiulcerogênica, anti-inflamatória e citotóxica em células tumorais, dentre outras. Diversos metabólitos secundários foram isolados e/ou identificados principalmente de suas folhas, incluindo monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, compostos fenólicos, etc. Apesar do extenso conhecimento sobre ações farmacológicas e sobre a fitoquímica das folhas, há apenas um trabalho publicado sobre metabólitos secundários de suas flores. Portanto, foi proposto neste trabalho realizar análises cromatográficas e espectrométricas de extratos de folhas e flores de *C. sylvestris* Swartz com o objetivo de comparar os perfis químicos destes órgãos com ênfase em terpenos. Os extratos produzidos com diferentes solventes (hexano: acetato de etila: isopropanol; hexano e etanol 70 %) de folhas e flores foram obtidos por sonicação com rendimentos variando entre 0,03 e 23,39% (m/m), sendo os maiores rendimentos obtidos com etanol 70 %. Os óleos essenciais de folhas e flores foram obtidos por extração por arraste a vapor d'água e foram analisados por cromatografia em fase gasosa e o componente majoritário apresentado foi o biciclogermacreno, tanto em folhas como em flores; o óleo essencial de flores demonstrou ser mais complexo. Os extratos foram analisados por cromatografia em camada delgada e cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos. Os dados de cromatografia em camada delgada sugerem um perfil químico praticamente idêntico para folhas e flores, o que não foi confirmado pelas análises por cromatografia líquida de alta eficiência que apontam para predomínio de diterpenos clerodânicos do tipo das casearinas em folhas e diterpenos clerodânicos com distinto padrão diênico na cadeia lateral em flores. Também foi determinado por espectrofotometria o teor de fenólicos totais nos extratos etanol 70 % de folhas e flores, sendo os resultados obtidos semelhantes (14 e 15 %, respectivamente). De

modo geral, o perfil fitoquímico de flores de *Casearia sylvestris* Swartz demonstra a predominância de diterpenos clerodânicos distintos dos de folhas, sendo que este órgão também pode ser fonte de substâncias bioativas, já que estudos demonstraram que extratos de folhas de *C. sylvestris* e diterpenos clerodânicos isolados possuem várias atividades biológicas. De outro lado, com relação à produção de um medicamento fitoterápico a partir de folhas secas e moídas (droga vegetal) de *C. sylvestris* Sw. deve-se considerar que as flores tem composição química distinta, especialmente em termos de diterpenos clerodânicos.

Palavras-chave: *Casearia sylvestris*. Terpenos. Fitoquímica. Óleo essencial.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
1.1 Plantas Medicinais.....	15
1.2 Medicamento Fitoterápico.....	16
1.3 Revisão da literatura sobre <i>Casearia sylvestris</i>	19
1.3.1 Aspectos fitoquímicos e farmacológicos sobre <i>Casearia sylvestris</i>	21
2 OBJETIVO.....	26
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	27
3.1 Especificações dos materiais e equipamentos.....	27
3.2 Coleta de <i>Casearia sylvestris</i> Swartz.....	28
3.3 Preparo da droga vegetal (pó).....	28
3.4 Extração.....	29
3.4.1 Extratos Acetato de etila: Hexano: Isopropanol (EAFO e EAFL).....	29
3.4.3 Extratos Etanol 70% (EEFO e EEFL).....	30
3.5 Extração dos óleos essenciais de <i>C. sylvestris</i> Sw.....	31
3.5.1 Análise dos óleos essenciais de <i>C. sylvestris</i> Sw.....	32
3.6 Doseamento de compostos fenólicos totais nos extratos hidroalcoólicos.....	33
3.7 Perfil cromatográfico de diterpenos clerodânicos em CCD.....	34
3.8 Perfil cromatográfico de diterpenos clerodânicos por CLAE-DAD.....	34
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	35
4.1 Rendimento das Extrações.....	35
4.2 Óleos essenciais.....	36
4.2.1 Identificação e quantificação de substâncias do óleo essencial das folhas e das flores de <i>Casearia sylvestris</i> Sw. por CG-EM.....	37
4.3 Doseamento de compostos fenólicos totais.....	42
4.4 Perfil cromatográfico de diterpenos clerodânicos em CCD.....	45
4.5 Perfil cromatográfico de diterpenos clerodânicos por CLAE-DAD.....	48
4.5.1 Quantificação de diterpenos totais do tipo das casearinas ($\lambda_{\text{máx}} = 232\text{-}$ 235 nm) em relação à caseargrewiina F.....	57
5 CONCLUSÃO.....	61
REFERÊNCIAS.....	63

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - <i>Casearia sylvestris</i> Swartz. (a): detalhe de flores, (b): Aspecto geral do ramo; (c): indivíduo adulto.....	20
Figura 2 - Diterpenos clerodânicos isolados de <i>C. sylvestris</i> : (a) estrutura química geral das casearinas A-X, casearvestrinas A-C e da caseargrewiina F; (b) <i>rel</i> -19S-acetóxi-18 <i>R</i> -butanoiloxi-18,19-epóxi-6 <i>S</i> -hidróxi-2 <i>R</i> -(2-metilbutanoilóxi)-5 <i>S</i> ,8 <i>R</i> ,9 <i>R</i> ,10 <i>S</i> -cleroda-3,13(16),14-trieno; (c) 15-hidróxi-3-cleroden-2-ona; (d) (-)-ácido hardwickiico (CARVALHO et al., 2009).....	24
Figura 3 - Fluxograma que esquematiza o processo de preparação dos extratos EAFO e EAFL.....	31
Figura 4 - Fluxograma que esquematiza o processo de preparação dos extratos EHFO, EHFL, EEFO e EEFL.....	32
Figura 5 - Cromatogramas dos óleos essenciais extraídos de folhas de <i>C. sylvestris</i> Sw. coletadas nos horários 7:00 e 15:00 h (TININIS et al., 2006).....	40
Figura 6 - Cromatograma do óleo essencial de folhas de <i>C. sylvestris</i> Sw. obtido em CG-EM.....	42
Figura 7 - Cromatograma do óleo essencial de flores de <i>C. sylvestris</i> Sw. obtido em CG-EM.....	44
Figura 8 - Curva analítica obtida para o ácido gálico para determinação do teor de fenólicos totais utilizando o reagente de Folin-Ciocalteu.....	45
Figura 9 - Cromatoplaça resultante da análise dos extratos de flores e folhas (<i>C. sylvestris</i>). Sequência das amostras: EHFO, EHFL, EAFO, EAFO, EEFO, EEFL, casearina B, caseargrewiina F e casearina X (com exceção da caseargrewiina F, os padrões apresentaram mais de uma mancha; casearinas B e X correspondem às manchas principais).....	49

Figura 10 - (a) estrutura química geral das casearinas A-X, casearvestrinas A-C e da caseargrewiina F; (b) <i>rel</i> -19 <i>S</i> -acetóxi-18 <i>R</i> -butanoiloxi-18,19-epóxi-6 <i>S</i> -hidróxi-2 <i>R</i> -(2-metilbutanoilóxi)-5 <i>S</i> ,8 <i>R</i> ,9 <i>R</i> ,10 <i>S</i> -cleroda-3,13(16),14-trieno (CARVALHO et al., 2009).....	51
Figura 11 - Esquerda - espectro no UV da casearina B e modelo diênico com ligações duplas em C12Z e C14. Direita - espectro no UV do diterpeno 10b (Figura 10) e modelo diênico com ligações duplas em C13(16) e C14 (CARVALHO et al., 2009).....	51
Figura 12 - Cromatograma obtido em CLAE-DAD ($\lambda = 235$ nm) do extrato acetato de etila:hexano:isopropanol de folhas (EAFO). O símbolo (●) indica picos com espectro no UV semelhante ao das casearinas ($\lambda_{\text{máx}} = 232\text{-}235$ nm).....	52
Figura 13 - Cromatograma obtido em CLAE-DAD ($\lambda = 235$ nm) do extrato acetato de etila:hexano:isopropanol de flores EAFL. O símbolo (●) indica picos com espectro no UV semelhante ao das casearinas ($\lambda_{\text{máx}} = 232\text{-}235$ nm) e o símbolo (▼) picos com espectro no UV semelhante ao de 10b ($\lambda_{\text{máx}} = 223\text{-}229$ nm).....	53
Figura 14 - Cromatograma obtido em CLAE-DAD ($\lambda = 235$ nm) do extrato etanol 70% de folhas (EEFO). O símbolo (●) indica picos com espectro no UV semelhante ao das casearinas ($\lambda_{\text{máx}} = 232\text{-}235$ nm).....	54
Figura 15 - Cromatograma obtido em CLAE-DAD ($\lambda = 235$ nm) do extrato etanol 70% de flores (EEFL). O símbolo (●) indica picos com espectro no UV semelhante ao das casearinas ($\lambda_{\text{máx}} = 232\text{-}235$ nm) e o símbolo (▼) picos com espectro no UV semelhante ao de 10b ($\lambda_{\text{máx}} = 223\text{-}229$ nm).....	55
Figura 16 - Cromatograma obtido em CLAE-DAD ($\lambda = 235$ nm) do extrato hexânico de folhas (EHFO). O símbolo (●) indica picos com espectro no UV semelhante ao das casearinas ($\lambda_{\text{máx}} = 232\text{-}235$ nm) e o símbolo (▼) picos com espectro no UV semelhante ao de 10b ($\lambda_{\text{máx}} = 223\text{-}229$ nm).....	56

Figura 17 - Cromatograma obtido em CLAE-DAD ($\lambda = 235$ nm) do extrato hexânico de flores (EHFL). O símbolo (●) indica picos com espectro no UV semelhante ao das casearinas ($\lambda_{\text{máx}}$ - 232-235 nm) e o símbolo (▼) picos com espectro no UV semelhante ao de 10b ($\lambda_{\text{máx}}$ - 223-229 nm).....	57
Figura 18 - Esquerda - espectro no UV do pico com t_R de 19,81 min relativo a diterpeno do tipo das casearinas com $\lambda_{\text{máx}} = 232-235$ nm do cromatograma de EHFO com modelo diênico com ligações duplas em C12Z e C14. Direita - espectro no UV do pico com t_R de 22,15 min com $\lambda_{\text{máx}} = 223-229$ nm relativo a diterpeno do cromatograma do extrato EAFL com modelo diênico com ligações duplas em C13(16) e C14.....	58
Figura 19 - Curva de calibração para solução padrão de caseargrewiina F em metanol.....	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Atividades farmacológicas das diferentes partes de <i>C. sylvestris</i> . Adaptado de Pierri (2013).....	22
Tabela 2 - Resultados das análises cromatográficas e espectroscópicas realizadas com extratos etanólicos e hexânicos de diferentes órgãos de <i>C. sylvestris</i> (CARVALHO et al., 2009).....	25
Tabela 3 - Códigos para identificação dos extratos de folhas e de flores de <i>C. sylvestris</i> Sw.....	30
Tabela 4 - Rendimento das extrações com diferentes solventes de folhas e de flores de <i>C. sylvestris</i> Sw.....	37
Tabela 5 - Constituintes principais (teor relativo maior que 1%) no óleo de folhas de <i>C. sylvestris</i> Sw. (TININIS et al., 2006).....	39
Tabela 6 - Dados da análise de CG-EM do óleo essencial das folhas de <i>C. sylvestris</i> Sw.....	41
Tabela 7 - Dados da análise de CG-EM do óleo essencial das flores de <i>C. sylvestris</i> Sw.....	43
Tabela 8 - Dados de absorbância relativos às soluções de ácido gálico de diferentes concentrações.....	45
Tabela 9 - Dados de absorbância relativos às soluções dos extratos.....	46
Tabela 10 - Teor de fenólicos totais nos extratos etanol 70% de flores e de folhas de <i>C. sylvestris</i>	47
Tabela 11 - Valores de R_f dos padrões utilizados na análise por CCD.....	48
Tabela 12 - Dados das análises por CLAE-DAD dos extratos de <i>C. sylvestris</i>	59
Tabela 13 - Dados das análises em CLAE-DAD da caseargrewiina F para a construção da curva analítica.....	60

Tabela 14 - Dados obtidos na quantificação de diterpenos do tipo casearinas em relação à caseargrewiina F nos extratos de <i>C. sylvestris</i> Sw. ($\lambda_{\text{máx}}$ = 232-235 nm).....	62
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AI	índice de Kovats (aritmético)
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
cas B	casearina B
cas X	casearina X
casg F	caseargrewiina F
CCD	cromatografia de camada delgada
CG	cromatografia gasosa
CG-EM	cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas
CLAE	cromatografia líquida de alta eficiência
CLAE-DAD	cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos
EAFL	extrato acetato de etila:hexano:isopropanol de flores de <i>C. sylvestris</i> Sw.
EAFO	extrato acetato de etila:hexano:isopropanol de folhas de <i>C. sylvestris</i> Sw.
EEFL	extrato etanol 70% de flores de <i>C. sylvestris</i> Sw.
EEFO	extrato etanol 70% de folhas de <i>C. sylvestris</i> Sw.
EHFL	extrato hexano de flores de <i>C. sylvestris</i> Sw.
EHFO	extrato hexano de folhas de <i>C. sylvestris</i> Sw.
ex.	exemplo
FCR	reagente de Folin-Ciocalteu
h	hora
HCs	hidrocarbonetos

Na ₂ SO ₄	sulfato de sódio
min	minuto
MS	Ministério da Saúde
n.	número
OE	óleo essencial
OMS	Organização Mundial de Saúde
RENISUS	Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde
r ²	coeficiente de correlação
R _f	fator de retenção (quociente entre a distância percorrida pela substância e a linha de frente na cromatoplaca do CCD)
SUS	Sistema Único de Saúde
tr	tempo de retenção
UV	ultravioleta
λ _{máx}	comprimento de onda com absorção máxima no ultravioleta
®	marca registrada

1 INTRODUÇÃO

1.1 Plantas Medicinais

A Organização Mundial de Saúde (OMS) define planta medicinal como sendo “todo e qualquer vegetal que possui, em um ou mais órgãos, substâncias que possam ser utilizadas com fins terapêuticos ou que sejam precursores de fármacos semi-sintéticos” (VEIGA JUNIOR et al., 2005).

As plantas são muito utilizadas na medicina popular, principalmente em países em desenvolvimento, sendo também desde o século XIX fonte de vários fármacos (ex. emetina, morfina, vincristina, rutina). Segundo a OMS, no início da década de 1990, 65-80% da população dos países em desenvolvimento utilizavam as plantas medicinais como única forma de acesso aos cuidados básicos de saúde (CECHINEL FILHO et al., 1998; VEIGA JUNIOR et al., 2005).

Nos últimos anos houve um aumento de trabalhos publicados que estudam os aspectos químicos e farmacológicos de diferentes espécies de plantas com o objetivo de obter evidências científicas de suas possíveis propriedades terapêuticas. Embora tenha havido uma grande evolução dos medicamentos à base de fármacos sintéticos a partir da segunda metade do século XX, a população carente enfrenta obstáculos quanto ao seu acesso. O uso tradicional de plantas torna-se uma alternativa a essa população na atenção primária à saúde (CECHINEL FILHO et al, 1998; VEIGA JUNIOR et al., 2005; CALIXTO, 2000; LIMA et al., 1992). As propagandas referentes ao consumo de produtos feitos a partir de fontes naturais aumentam a cada dia, porém as supostas propriedades terapêuticas que envolvem esses produtos, muitas vezes, não foram investigadas, assim não possuem validade

científica (VEIGA JUNIOR et al., 2005). Há muitas situações em que essas plantas são empregadas para fins medicinais diferentes daqueles utilizados pelas populações tradicionais (VEIGA JUNIOR et al., 2005).

Em regiões mais pobres e até mesmo em grandes cidades brasileiras, plantas medicinais são comercializadas em mercados públicos, ervanarias, lojas de produtos naturais e feiras livres. Porém, em geral não ocorre o controle dessa comercialização por órgãos oficiais (MACIEL et al., 2002; VEIGA JUNIOR et al., 2005).

Atualmente vários metabólitos secundários obtidos de plantas, como flavonoides, alcaloides, diterpenos e sesquiterpenos, tem sido interessantes objetos de estudos, pois já foram comprovadas ações farmacológicas através de testes pré-clínicos e/ou clínicos sendo que muitos deles já são utilizados em importantes medicamentos (VANISREE et al., 2004; CECHINEL FILHO et al., 1998).

1.2 Medicamento fitoterápico

O medicamento fitoterápico, de acordo com a legislação brasileira, é o medicamento obtido com emprego exclusivo de matérias-primas ativas vegetais e se caracteriza pelo conhecimento da eficácia e dos riscos de seu uso, assim como pela reprodutibilidade e constância de sua qualidade (CARVALHO et al. 2008; BRASIL, 2010a). Na Europa há mais rigidez no controle de registro e de comercialização de produtos obtidos de plantas (VEIGA JUNIOR et al., 2005). No Brasil, o principal órgão responsável pela regulamentação de plantas medicinais e seus derivados é a ANVISA, autarquia do Ministério da Saúde (MS) (CARVALHO et al., 2008).

A fitoterapia constitui uma forma de terapia medicinal que vem crescendo nos últimos anos. Desde 1978, a OMS incentiva investimentos públicos em plantas

medicinais e observa-se uma crescente aceitação da fitoterapia por profissionais da saúde e o aumento do seu uso pela população (SILVEIRA et al., 2008). Em 2011, o mercado de fitoterápicos movimentou aproximadamente R\$ 1,1 bilhão no Brasil. Nos últimos cinco anos, o segmento do medicamento fitoterápico cresceu 10,5%. Atualmente, a Alemanha é o maior produtor de fitoterápicos no mundo (SCARAMUZZO, 2012).

Alguns grupos farmacêuticos passaram a se aprimorar em medicamentos fitoterápicos, tornando sua produção em escala industrial, diferentemente das formas artesanais que caracterizam as primeiras formas de utilização do fitoterápico (TUROLLA; NASCIMENTO, 2006).

A fim de estimular a padronização e a garantia de segurança, eficácia e qualidade de plantas medicinais e seus derivados, normas importantes foram publicadas nos últimos anos no Brasil:

- a) Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, publicada em 2008 pelo MS, aprovada pelo decreto n. 5.813/2006 (BRASIL, 2006a);
- b) Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS, aprovada pela Portaria MS/GM n. 971/2006 (BRASIL, 2006b);
- c) Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, aprovado pela Portaria MS/GM n. 2.960/2008 e criação do Comitê Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos pela mesma Portaria (BRASIL, 2008);
- d) Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde (RENISUS), publicada pelo MS em 2008 (RENISUS, 2009);
- e) Lista de medicamentos fitoterápicos de registro simplificado, publicada pela ANVISA (ANVISA, 2008);

- f) Resolução RDC ANVISA n. 10/2010, que regulamenta a notificação de drogas vegetais comercializadas em farmácias junto à ANVISA (BRASIL, 2010a);
- g) Resolução RDC ANVISA n. 14/2010 e outras normas complementares: regulamentam o registro de medicamentos fitoterápicos (BRASIL, 2010b);
- h) Portaria MS 886/2010: institui a Farmácia Viva no âmbito do SUS (BRASIL, 2010c);
- i) Formulário Nacional de Fitoterápicos, publicado pela ANVISA em 2011 (BRASIL, 2011).
- j) Resolução RDC ANVISA n. 13/2013 que dispõe sobre as Boas Práticas de Fabricação de Produtos Tradicionais Fitoterápicos (ANVISA, 2013a).
- h) Resolução RDC ANVISA n. 14/2013 Dispõe sobre as Boas Práticas de Fabricação de Insumos Farmacêuticos Ativos de Origem Vegetal (ANVISA, 2013b).

O interesse científico frente ao uso da planta *Casearia sylvestris* Swartz, popularmente chamada de guaçatonga, vem sendo despertado devido a trabalhos recentes evidenciando suas propriedades terapêuticas. Substâncias de *C. sylvestris* Sw. apresentaram atividades antiulcerogênica, antiofídica, anti-inflamatória e cicatrizante (PIERRI, 2013).

Segundo a literatura, *Casearia sylvestris* Sw. (*Salicaceae*) é utilizada na medicina popular como cicatrizante, antisséptico, febrífugo, depurativo, anestésico tópico, antiulcerativo, antirreumático, antidiarreico, anti-inflamatório e no tratamento de doenças de pele (ex. sífilis, herpes) (PIERRI, 2013).

1.3 Revisão da literatura sobre *Casearia sylvestris*

Casearia sylvestris Swartz (seção *Crateria* Benthham) está classificada na tribo *Samydeae*, família *Salicaceae* e ordem *Malpighiales* (CHASE et al., 2002; THE ANGIOSPERM PHYLOGENY GROUP, 2003).

Amplamente distribuída no Brasil e no mundo, principalmente em florestas secundárias, *C. sylvestris* Sw. é muito conhecida pela população por seus aspectos medicinais, sendo denominada por vários nomes comuns como guaçatonga, apiá-acanoçu, bugre-branco, café-bravo, café-de-frade, cafezeiro-do-mato, cafezinho-do-mato, cambroé, chá-de-bugre, erva-de-bugre, erva-lagarto, erva-de-pontada, fruta-de-saíra, guaçatunga, pau-de-lagarto, varre-forno, guaçatunga-preta, lingua-de-teju, para-tudo, petumba, para-tudo, vassitonga (LORENZI et al., 2002; LORENZI 1992; SOUZA et al., 2005).

C. sylvestris possui em média 4-6 m de altura com tronco de 20-30 cm de diâmetro. As folhas (6-12 cm de comprimento por 3-5 cm de largura) caracterizam-se por serem glabras ou ásperas, assimétricas, serreadas, pecioladas, alternas, brilhantes, com glândulas visíveis por transparência em todo o limbo. As flores são numerosas, pequenas, actinomorfas, esverdeadas, hipóginas e diclamídeas. *C. sylvestris* floresce a partir de junho a agosto (SCAVONE et al., 1979; LORENZI, 1992; TININIS et al., 2006). A espécie cresce em campos e pastos frequentados por animais de criação (HOEHNE, 1939).

Podem ser encontradas diferentes sinonímias para a *Casearia sylvestris* Swartz como: *C. capitata* (Ruiz et Pavon) Spreng., *C. caudata* Uitt., *C. chlorophoroidea* Rusby, *C. ekmanii* Sleumer, *C. formosa* Urban, *C. herbert-smithii* Rusby, *C. lindeniana* Urban, *C. lingua* Cambessèdes, *C. oblongifolia*, *C. onacaensis*

Rusby, *C. ovoidea* Sleumer, *C. parviflora* Wild., *C. punctata* Spreng., *C. samyda* (Gaert.) D.C., *C. schulziana* Schmidt, *C. subsessiliflora* Lund., *Anavinga samyda* Gaertn., *Chaetocrater capitatum* Ruiz et Pavon, *Crateria capitata* (Ruiz et Pavon) Person, *Guidonia sylvestris* (Swartz) Maza, *Samyda parviflora* L., *Samyda sylvestris* (Swartz) Poiret (CORREA, 1975; LORENZI, 1992; SCAVONE et al., 1979; SLEUMER, 1980; TORRES; YAMAMOTO, 1986).



Figura 1 - *Casearia sylvestris* Swartz. (a): detalhe de flores, (b): Aspecto geral do ramo; (c): indivíduo adulto.

1.3.1 Aspectos farmacológicos e fitoquímicos sobre *Casearia sylvestris*

Na Tabela 1 constam as informações dos principais estudos farmacológicos pré clínicos realizados com extratos, frações ou substâncias isoladas de *C. sylvestris* (PIERRI,2013).

Tabela 1 - Atividades farmacológicas das diferentes partes de *C. sylvestris*. Adaptado de Pierri (2013).

Parte da planta	Atividade farmacológica	Derivado vegetal ou substância	Referência
Folhas	Antitumoral	Casearinas (A-X) Casearvestrinas (A-C) Óleo essencial	Itokawa et al. (1990); Morita et al. (1991) Oberlies et al. (2002), Silva et al. (2008) Santos et al. (2010)
	Antiviral contra <i>Herpes simplex</i>	Extrato etanólico	Camargo et al. (1993).
	Anti-inflamatória	Extrato hidroalcoólico Infusão Decocção Óleo essencial Extrato etanólico, fração de casearinas, casearina B, caseargrewiina F	Albano et al. (2013) Ruppelt et al. (1990) Sassioto et al. (2004) Esteves et al. (2005) Pierri (2013)
	Antifúngica	Casearinas G, S e T Casearvestrinas A, B e C	Carvalho et al. (1998) Oberlies et al. (2002)
	Inibição da fosfolipase A ₂	Extrato aquoso Extrato aquoso	Borges et al. (2000) Cavalcante et al. (2007)
	Antiúlcera	Extrato hidroalcoólico Extrato hidroalcoólico Óleo essencial Casearinas	Basile et al. (1990) Sertié et al. (2000) Esteves et al. (2005) Santos (2008)
	Antioxidante	Extrato aquoso	Menezes et al. (2004)
	Contra <i>Leishmania donovani</i> , <i>Trypanosoma cruzi</i> e <i>Plasmodium falciparum</i>	Extratos hexânico e etanólico	Mesquita et al. (2005); Mesquita et al. (2007)
	Analgésico	Extrato hidroalcoólico	Mattos et al. (2007)
	Hipotrigliceridemiante	Extrato hidroalcoólico	Werle et al. (2009)
Caule	Contra <i>Aedes aegypti</i>	Extrato hexânico	Rodrigues et al. (2006)
	Contra <i>Plasmodium falciparum</i>	Extrato hexânico	Mesquita et al. (2007)
	Analgésica	Infusão (casca e folhas)	Ruppelt et al. (1990)
Raízes	Contra <i>Trypanosoma cruzi</i>	Diterpeno clerodânico	Espíndola et al. (2004)
	Contra <i>Leishmania donovani</i> , <i>Trypanosoma cruzi</i> e <i>Plasmodium falciparum</i>	Extratos hexânico e etanólico	Mesquita et al. (2005); Mesquita et al. (2007)

Os principais metabólitos secundários de interesse encontrados no gênero *Casearia* são: taninos, cumarinas, flavonoides, lignanas, esteroides, amidas, compostos fenólicos e diferentes diterpenos, destacando os clerodânicos (TININIS et al., 2006; VIEIRA JUNIOR, 2010).

Estudos evidenciam que extratos ou substâncias isoladas de *C. sylvestris* Sw. apresentaram ação inibitória de fosfolipase A₂ e de outras toxinas de venenos de cobras (SILVA et al., 2006a; RASLAN et al., 2002), antiulcerogênica (BASILE et al., 1990; ESTEVES et al., 2005; SERTIÉ et al., 2000), anti-inflamatória (RUPPELT et al., 1990; SASSIOTO et al., 2004; ESTEVES et al., 2005), antimutagênica ou mutagênica dependendo da concentração (OLIVEIRA, et al., 2009), antimicrobiana (SILVA, et al., 2008), anticolinesterásica (SILVA, et al., 2006), etc.

Metabólitos secundários isolados e/ou identificados em *C. sylvestris* incluem monoterpenos e sesquiterpenos componentes do óleo essencial das folhas (SANTOS, 2008; SCHNEIDER et al., 2006), *nor*-isoprenoides (SANTOS, 2008; WANG et al., 2009a), triterpenos, ácido cafeico, ácido clorogênico, ácido vanílico, lapachol (RASLAN et al., 2002), flavonoides (RASLAN et al., 2002; JUNGES; SCHENKEL; SIMÕES, 1985), neolignanas (WANG et al., 2010) e ésteres derivados do ácido gálico (IGDE e MGDE). Diferentes diterpenos clerodânicos e *ent*-kauranos foram isolados de *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; SANTOS et al., 2007; WANG et al., 2009b) e caseargrewiina F (SANTOS et al. 2010), isolados de folhas; casearvestrinas A-C (Figura 2a), isoladas de folhas e ramos (OBERLIES et al. 2002); *rel*-19S-acetoxi-18*R*-butanoiloxi-18,19-epoxi-6*S*-hidroxi-2*R*-(2-metilbutanoiloxi)-5*S*,8*R*,9*R*,10*S*-cleroda-3,13(16),14-trieno (Figura 2b), isolado das raízes (ESPÍNDOLA et al. 2004). Os diterpenos clerodânicos 15-hidróxi-3-cleroden-2-ona (Figura 2c) e (-)-ácido hardwickiico (Figura 2d) também foram isolados de folhas de *C. sylvestris* (SANTOS et al., 2007).

Alguns destes diterpenos exibiram atividade citotóxica em células tumorais, antiulcerogênica, anti-inflamatória, tripanocida e antifúngica (ITOKAWA et al., 1990; OBERLIES et al., 2002; PIERRI, 2013; SANTOS et al., 2008; SANTOS et al., 2010).

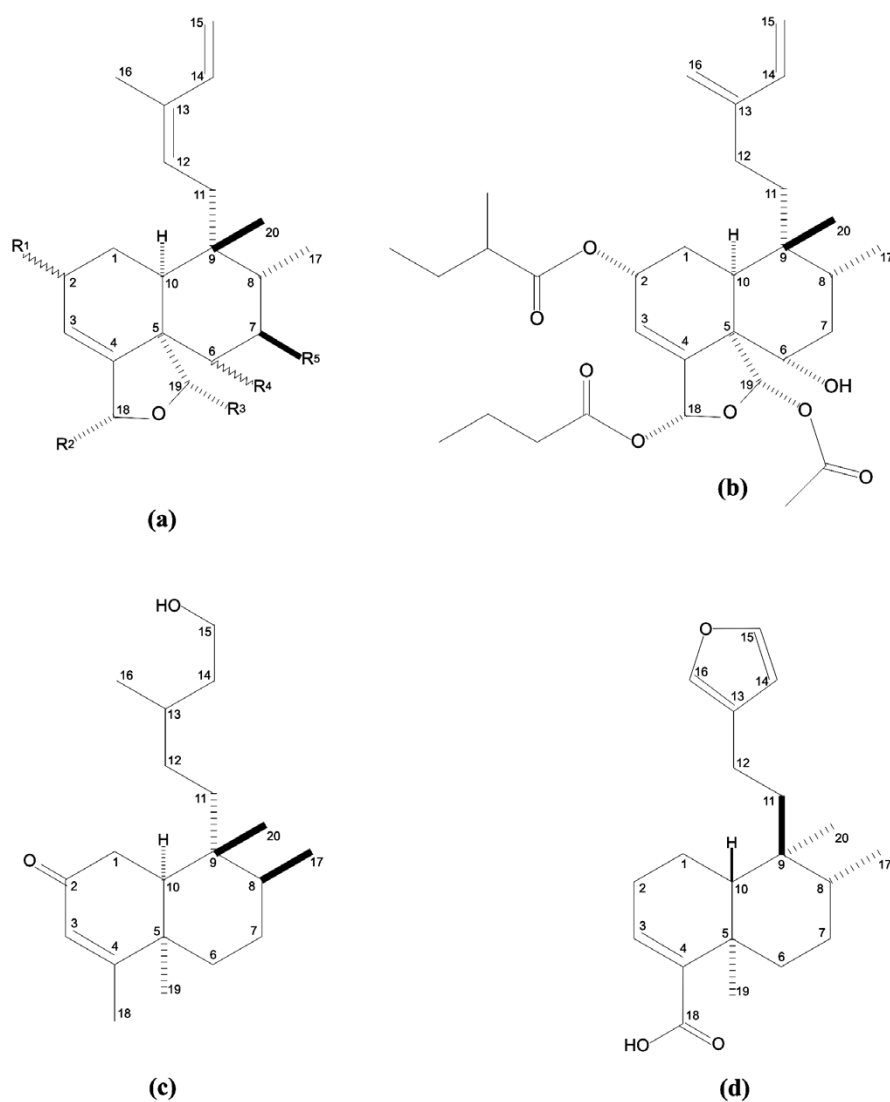


Figura 2 - Diterpenos clerodânicos isolados de *C. sylvestris*: **(a)** estrutura química geral das casearinas A-X, casearvestrinas A-C e da caseargrewiina F; **(b)** *rel*-19*S*-acetóxi-18*R*-butanoiloxi-18,19-epóxi-6*S*-hidróxi-2*R*-(2-metilbutanoilóxi)-5*S*,8*R*,9*R*,10*S*-cleroda-3,13(16),14-trieno; **(c)** 15-hidróxi-3-cleroden-2-ona; **(d)** (-)-ácido hardwickiico (CARVALHO et al., 2009).

Apesar dos inúmeros trabalhos publicados na literatura sobre a espécie há apenas um estudo comparativo entre a composição química de diferentes órgãos da planta, com foco nos diterpenos clerodânicos (CARVALHO et al., 2009). Foram obtidos perfis fitoquímicos dos órgãos avaliados e os resultados indicaram a presença de diterpenos clerodânicos em toda planta, prevalecendo em maior número nas folhas (Tabela 2).

Tabela 2 - Resultados das análises cromatográficas e espectroscópicas realizadas com extratos etanólicos e hexânicos de diferentes órgãos de *C. sylvestris* (CARVALHO et al., 2009).

Extratos	Rendimento (m/m, %)	CCD ¹ (n.o de manchas)	RMN ¹ H ² (sinais dos diterpenos)	CLAE-DAD ³ (232-235 nm)	CLAE-DAD ⁴ (223-229 nm)	Diterpenos identificados (CLAE-DAD)
etanólicos						
folhas	6,8	4	presença	20	3	casearinas B, O, X e caseargreina F
flores	5,3	5	presença	0	2	----
raízes	2,7	2	presença	0	6	diterpeno 1b
madeira de caule	1,2	2	presença	3	4	casearina B, caseargreina F e diterpeno 1b
casca do caule	8,3	4	presença	0	6	diterpeno 1b
hexânicos						
folhas	0,6	2	presença	9	8	casearina B
flores	1,3	3	presença	5	8	casearina B
raízes	0,5	2	presença	0	1	----
madeira do caule	1,2	1	presença	0	1	----
casca do caule	0,2	3	presença	0	8	----

¹número de manchas dos extratos com R_f semelhante ao das casearinas (EFS2 e casearina X)

²presença de sinais no espectro de RMN de ¹H dos extratos semelhantes aos das casearinas

³número de picos nos cromatogramas dos extratos com espectro no UV semelhante ao das casearinas ($\lambda_{\text{máx}}$ - 232-235 nm)

⁴número de picos nos cromatogramas dos extratos com espectro no UV semelhante ao do diterpeno 1b ($\lambda_{\text{máx}}$ - 223-229 nm)

Além disso, os resultados também indicam que em caules, flores e raízes há predomínio de diterpenos clerodânicos com padrão diênico diferente daqueles obtidos de folhas de *C. sylvestris*. Diterpenos clerodânicos isolados *C. sylvestris* possuem um dieno na cadeia lateral com uma ligação dupla terminal em C14 e outra que pode diferir quanto a posição e a estereoquímica: em C12 *E* ou *Z* ou, ainda, em C13(16) formando uma segunda ligação dupla terminal, neste caso. Observou-se a partir da literatura valores de $\lambda_{\text{máx}}$ de 232-235 nm para o primeiro tipo de dieno e de 223-229 nm para o segundo. Considerando esta diferença, Carvalho et al. (2009)

utilizaram CLAE-DAD para sugerir o tipo de diterpeno predominante nos diferentes órgãos analisados.

O estudo fitoquímico das flores de *C. sylvestris* Sw. justifica-se devido às várias atividades biológicas já demonstradas para extratos de suas folhas e pela diversidade do seu metabolismo secundário, incluindo substâncias com importantes atividades como os diterpenos e sesquiterpenos e, por outro lado, pela ausência de informações na literatura a respeito das flores. Além de contribuir para o conhecimento da fitoquímica e metabolismo da espécie, metabólitos identificados nas flores podem servir como modelos para desenvolvimento de novos fármacos. Outro aspecto relevante neste estudo relacionado ao uso das folhas em fitoterápicos é a aplicação de métodos que poderão futuramente ser aplicados em ensaios de identidade ou pureza da droga vegetal folhas secas e moídas, determinando-se a presença de flores como adulterantes.

2 OBJETIVO

Realizar análises cromatográficas e espectrométricas de extratos de folhas e flores de *C. sylvestris* Swartz com o objetivo de comparar os perfis químicos destes órgãos com ênfase em terpenos.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Especificações dos materiais e equipamentos

Balança semi-analítica: GEHAKA[®] modelo BG 200 (máx 200g; min 0,025g; d = 0,001g).

Balança analítica: MARTE[®] modelo AY220 (Max 220g; min 0,01; d=0,001).

Aparelho tipo Clevenger para hidrodestilação.

Coluna cromatográfica CLAE: Hypersil Gold[®] C18 (250 x 4,6 mm; 5 µm).

Coluna cromatográfica CG: DB-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm).

Cartucho para *clean-up*: Phenomenex[®] modelo StrataTM C18 - E (15 x 10 mm; 55 µm).

Cromatografia em camada delgada: Sílica Gel aplicada em placa de alumínio de 20 X 20 cm (Sigma-Aldrich[®]), com 0,25 mm de espessura. Após preparo, as placas foram ativadas por 30 min em estufa a 110° C.

Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (Shimadzu[®] Prominence[®], modo analítico), constituído dos seguintes módulos: bomba modelo LC-20AT, injetor automático modelo SIL-20, forno de coluna modelo CTO-20A, detector de arranjo de diodos modelo SPD-M20A, módulo de comunicação modelo CBM-20A, degaseificador modelo DGU-20A5. *Software* para controle do sistema e aquisição e tratamento de dados LCSolution[®].

Cromatógrafo à Gás: Shimadzu[®] modelo QP2010, utilizando coluna DB-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm).

Rota evaporador: IKA-DEST[®] modelo KV 05S3, com banho de aquecimento QUIMIS[®], banho ultratermostatizado (refrigeração) QUIMIS[®] modelo Q214M3;

Solventes:

CCD: Qhemis[®] P.A;

CLAE: Solventes grau cromatográfico J.T. Baker[®];

Água ultrapura: obtida a partir de purificador Milli Q modelo Synergy[®];

Ultrassom: UNIQUE[®], modelo USC-2800; frequência: 40KHz .

Folin-Ciocalteu – Reagente analítico IMBRALAB[®].

SpeedVac Concentrator: THERMO SCIENTIFIC[®] modelo Savant SPD131DDA.

3.2 Coleta de *Casearia sylvestris* Swartz

O material vegetal foi coletado pela manhã (9 horas) no Horto de Plantas Medicinais e Tóxicas "Profa. Dra. Célia Cebrian de Araujo Reis" da FCF-UNESP: as flores de *C. sylvestris* Sw. foram coletadas nos dias 24 de agosto e 03 de setembro de 2012 e as folhas foram coletadas no dia 03 de setembro de 2012. Uma exsiccata do indivíduo coletado foi depositada no herbário "Maria Eneida P. Kaufmann" do Instituto Botânico do Estado de São Paulo, sob o código AGS 102.

3.3 Preparo da droga vegetal (pó)

O material coletado (flores e folhas) foi submetido ao processo de secagem separadamente em estufa com circulação de ar à 40° C por sete dias. Em seguida, o material seco foi moído em turboextrator. Ao decorrer dos experimentos, a droga vegetal permaneceu armazenada em freezer. A droga vegetal das flores foi

composta pelo material vegetal das duas coletas (dias 24 de agosto e 03 de setembro de 2012).

3.4 Extração

Como solventes extratores foram utilizados: a) acetato de etila: hexano: isopropanol 91:08:01 (v/v), b) hexano e c) etanol 70%.

A fim de facilitar a denominação dos extratos ao longo do texto deste trabalho, foram adotados os códigos mostrados na Tabela 3.

Tabela 3 - Códigos para identificação dos extratos de folhas e de flores de *C. sylvestris* Sw.

ÓRGÃO DA PLANTA	EXTRATO		
	acetato de etila: hexano: isopropanol 91:08:01	hexano	etanol 70%.
Folhas	EAFO	EHFO	EEFO
Flores	EAFL	EHFL	EEFL

3.4.1 Extratos Acetato de etila: Hexano: Isopropanol (EAFO e EAFL)

Flores (20,00g) de *C. sylvestris* secas e pulverizadas foram extraídas três vezes com 200 mL de acetato de etila: hexano: isopropanol 91:08:01 (v/v) em aparelho de ultrassom por 1 h. A solução extrativa foi filtrada, seca em capela e em dessecador com sílica gel sob pressão reduzida. Folhas (20,00g) de *C. sylvestris* também foram submetidas a esse mesmo procedimento.

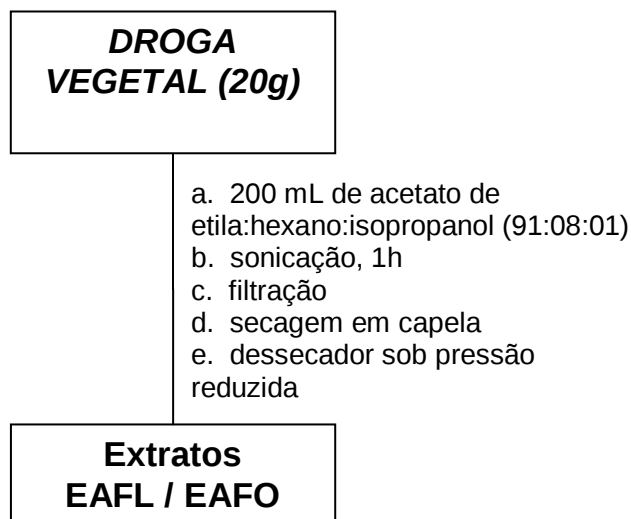


Figura 3 - Fluxograma que esquematiza o processo de preparação dos extratos EAFO e EAFL.

3.4.2 Extratos Etanol 70% (EEFO e EEFL)

Primeiramente realizou-se uma extração com 200 mL de hexano em aparelho de ultração por 1 h a partir de 20,00g de droga vegetal (flores ou folhas de *C. sylvestris*). O líquido extrativo foi seco em capela e em dessecador com sílica sob pressão reduzida, formando assim os extratos hexânicos EHFO e EHFL.

A extração com o hexano teve a função de retirar os interferentes lipofílicos (“desengorduramento”) antes da extração com o etanol 70%. Então os resíduos formados pela extração com hexano foram secos em capela e, em seguida, houve a extração (três vezes) com etanol 70% por sonicação por 1 h.

Os extratos permaneceram em freezer e foram submetidos à secagem parcial do solvente em rotaevaporador. Após armazenamento em freezer, a secagem total foi realizada em *speedvac*. O material seco foi solubilizado nos tubos tipo *Falcon* com etanol, transferidos para frascos menores e secos em capela; a secagem final foi realizada em dessecador com sílica gel sob pressão reduzida.

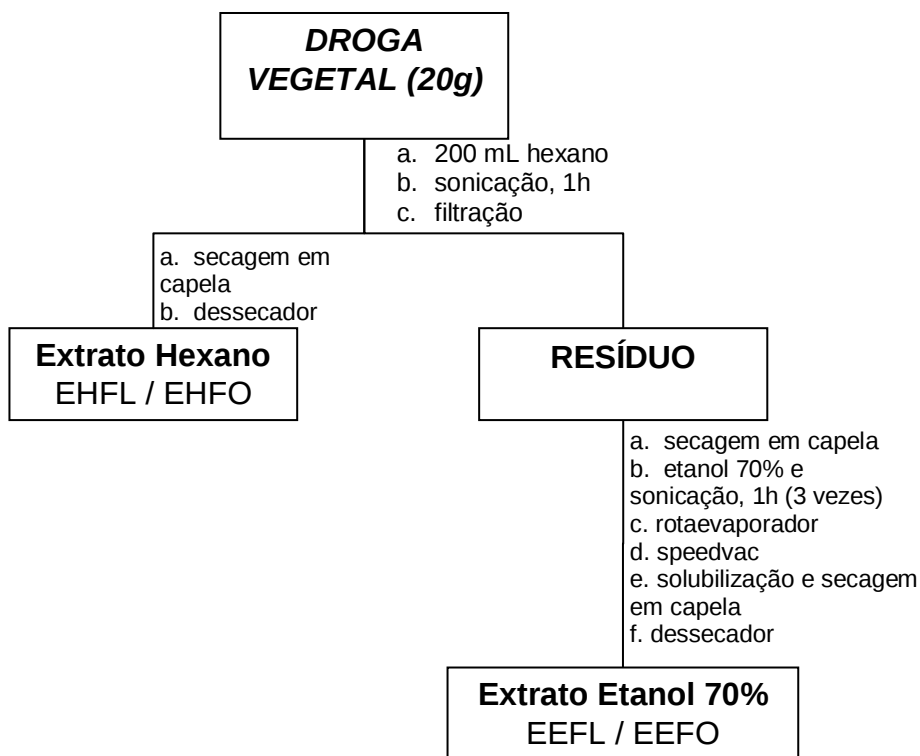


Figura 4 - Fluxograma que esquematiza o processo de preparação dos extratos EHFO, EHFL, EEFO e EEFL.

3.5 Extração dos óleos essenciais de *C. sylvestris* Sw.

Os óleos essenciais de folhas e de flores de *C. sylvestris* Sw., ambas frescas, foram obtidos separadamente através de extração por arraste a vapor d'água em aparelho do tipo Clevenger. Após a extração, tanto das folhas quanto das flores, foi recolhido do aparelho uma mistura de OE e água e lavado com éter a fim de retirar toda mistura aderida ao aparelho. Para a separação do OE da água foram realizadas três partições com éter. À fase etérea se adicionou Na₂SO₄ anidro para retirar o restante da água. Filtrou-se a fase etérea para remover o Na₂SO₄, lavando-se com éter. O éter foi removido do óleo por secagem em capela.

3.5.1 Análise dos óleos essenciais de *C. sylvestris* Sw.

As análises por cromatografia em fase gasosa foram desenvolvidas no CG Shimadzu® modelo QP2010 utilizando coluna DB-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm). A programação de temperatura foi de 60 a 240° C a 3° C/min, a razão de split 1:20, a temperatura do injetor de 240° C e do detector de 250° C. Como gás de arraste foi usado He a uma pressão de 81,5 kPa e velocidade linear de 1,33 mL/min. O detector utilizado nas análises foi um espectrômetro de massas, com modo de ionização por impacto eletrônico, com energia de ionização de 70 eV. Os espectros de massas obtidos foram comparados com os espectros da biblioteca NIST 08 e os índices de similaridade entre os espectros foram calculados pelo software GCSolution.

Para identificação das substâncias do óleo essencial de *Casearia sylvestris* foi calculado o índice de Kovats a partir dos tempos de retenção (t_R) dos analitos e dos padrões de hidrocarbonetos (C9 a C20), que foram comparados com a literatura (ADAMS, 2007). Os padrões de hidrocarbonetos foram analisados sob as mesmas condições da amostra.

Fórmula do índice de Kovats (aritmético):

$$AI(x) = 100P_z + 100[(RT(x) - RT(P_z)) / (RT(P_{z+1}) - RT(P_z))]$$

Onde:

P_z = número de carbonos do hidrocarboneto com menor número de carbonos mais próximo do analito

$RT(x)$ = tempo de retenção do analito

$RT(P_z)$ = tempo de retenção do hidrocarboneto com menor número de carbonos mais próximo do analito

$RT(P_{z+1})$ = tempo de retenção do hidrocarboneto com maior número de carbonos mais próximo do analito

As análises por cromatografia em fase gasosa foram realizadas em parceria com o Prof. Dr. Antônio Eduardo Miller Crotti do Laboratório de Produtos Naturais da UNIFRAN (Franca-SP).

3.6 Doseamento de compostos fenólicos totais nos extratos hidroalcoólicos

A determinação do teor de compostos fenólicos totais nos extratos etanol 70% (EEFO e EEFL) por espectrofotometria no UV/Vis foi realizada utilizando a metodologia de Singleton et al. (1999) baseada na metodologia original de Otton Folin e Vintila Ciocalteu (FOLIN; CIOCALTEU, 1927).

Foi realizado um procedimento para a construção de uma curva analítica para o ácido gálico. Baseado nessa curva analítica, o teor de fenólicos totais equivalentes ao ácido gálico foi quantificado nos extratos hidroalcoólicos de flores e de folhas da *C. sylvestris*. As análises foram realizadas em triplicata.

Uma alíquota de 5,0 mg de cada extrato foram solubilizados em 1,0 mL de água: etanol 1:1 (v/v). A 0,1 mL da solução das amostras foram adicionados 6,0 mL de água deionizada e 0,5 mL de FCR; a mistura foi homogeneizada. Após 1 min e antes de se completarem 8 min, foram adicionados 1,5 mL de uma solução de carbonato de sódio 20% e o volume foi ajustado com água deionizada até 10,0 mL em balão volumétrico. Após 2 h, foram feitas as leituras em espectrofotômetro a 760 nm, a 23° C em cubeta de 1 cm. A concentração final das amostras foi de 50 µg/mL.

O branco foi preparado seguindo a mesma metodologia das amostras, porém, ao invés de adicionar inicialmente 0,1 mL de amostra, foi adicionado 0,1 mL de água:etanol 1:1 (v/v).

A curva analítica padrão do ácido gálico foi elaborada a partir de leituras de absorbância de soluções de ácido gálico (etanol: água 1:1; v/v) nas seguintes concentrações finais (na cubeta): 1,25; 2,50; 4,00; 5,00; 7,50; 9,00; 10,00; 10,50 e 20,00 µg/mL, preparadas de acordo com procedimento descrito para os extratos, ou seja, adicionando-se 0,1 mL da respectiva solução padrão ao invés da solução do extrato.

3.7 Perfil cromatográfico de diterpenos clerodânicos em CCD

Os extratos secos foram dissolvidos em acetato de etila (5 mg/mL) e aplicados em placa de alumínio cobertas com sílica gel (20 x 20 cm x 0,25 mm) (Sigma-Aldrich®) a qual foi ativada por 30 min a 110° C. Como fase móvel foi utilizado hexano: acetato de etila: isopropanol (70:28:02, v/v) e como revelador anisaldeído sulfúrico. A solução reveladora foi preparada a partir de 0,5 mL de anisaldeído com 10,0 mL de ácido acético glacial, seguido de 85,0 mL de metanol e 5,0 mL de ácido sulfúrico concentrado. Como padrões (acetato de etila, 5 mg/mL) foram utilizados diterpenos clerodânicos purificados (casearinas B e X e caseargrewiina F) a partir de *C. sylvestris* (NuBBE, IQ-UNESP). Após a aplicação da solução reveladora, a cromatoplaça foi mantida em estufa a 110° C por 10 min.

3.8 Perfil cromatográfico de diterpenos clerodânicos em CLAE-DAD

O pré-tratamento das amostras incluiu uma extração em fase sólida utilizando cartucho contendo sílica de fase reversa (Phenomenex® Strata™ C18-E; 15 x 10 mm; 55 µm), solubilizando-se as amostras (EAFO: 6,0 mg; EAFL: 7,5 mg; EHFO: 5,4 mg; EHFL: 7,3; EEFO: 9,2 mg; EEFL: 9,5 mg) em 1,0 mL de metanol: água 98:02 (v/v) e usando como eluente metanol/água (98:02, v/v, 4,0 mL), seguido de filtração em membrana (0,22 µm, PVDF Millipore®), secagem (dessecador com sílica gel sob pressão reduzida) e solubilização em 1,0 mL metanol. As análises foram desenvolvidas em equipamento do tipo CLAE-DAD (Shimadzu®) utilizando coluna de fase reversa (Hypersil Gold®, C18, 250 x 4,6 mm, 5µm), gradiente linear com metanol: acetonitrila: água variando da proporção de 22:44:34 para 47:53:00 (v/v) em 42 min e, em seguida, isocraticamente com 47:53:00 (v/v) por 5 min; vazão de 0,8 mL/min; detecção: 190-700 nm; volume de injeção 20 µL (CLAUDINO et al., 2013). A identificação de diterpenos do tipo das casearinas nos extratos baseou-se na comparação dos t_R e na sobreposição dos espectros de absorção no UV com os padrões. Além disso, os espectros no UV obtidos para todos os picos das amostras foram utilizados na identificação de diterpenos do tipo das casearinas (CARVALHO et al., 2009). Para a análise quantitativa de diterpenos do tipo das casearinas expressos como caseargrewiina F foram utilizadas soluções de caseargrewiina F nas concentrações de 0,035; 0,070; 0,140; 0,280 e 0,560 mg/mL para obtenção de uma curva analítica (PIERRI, 2013).

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Rendimento das Extrações

Os rendimentos das extrações (massa de extrato seco/massa de droga vegetal, %) estão expressos na Tabela 4. A massa inicial de droga vegetal foi de 20,00 g.

O objetivo de produzir diferentes tipos de extratos do material vegetal a partir de diferentes solventes foi obter de forma mais completa o perfil químico de partes da planta, já que apenas um solvente não é capaz de extrair todas as classes de metabólitos secundários de uma planta a qual pode fornecer diversas substâncias químicas.

Tabela 4 - Rendimento das extrações com diferentes solventes de folhas e de flores de *C. sylvestris* Sw.

Extrato	Rendimento (%)
EAFO	5,92
EAFL	4,23
EEFO	20,29
EEFL	23,39
EHFO	0,35
EHFL	0,03

4.2 Óleos essenciais

A partir de 84,387g de folhas frescas de *C. sylvestris* Sw., foi obtido 0,249 g de óleo essencial, sendo rendimento de 0,3 %. Segundo Castellani et al. (2006) o teor de óleo essencial de folhas secas e moídas de *C. sylvestris* Sw. coletadas em diferentes regiões do Brasil e épocas do ano variou entre 0,2 a 2,1. As diferenças relatadas na literatura no rendimento do óleo essencial podem ser justificadas pelos efeitos da sazonalidade e edáfico-climáticos que influenciam o metabolismo secundário vegetal (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

A partir de 84,658 g de flores frescas de *C. sylvestris* Sw., obteve-se 0,097 g de óleo essencial com rendimento de 0,1 %. Não há dados na literatura sobre a extração de óleo essencial de flores de *C. sylvestris* Sw.

4.2.1 Identificação e quantificação de substâncias do óleo essencial das folhas e das flores de *C. sylvestris* Sw. por CG-EM.

Os óleos essenciais de flores e de folhas de *C. sylvestris* Sw. foram analisados por CG-EM com o objetivo de investigar a presença de componentes nas amostras e comparar os perfis químicos de voláteis em folhas e flores.

A identificação de constituintes químicos voláteis foi realizada através da comparação dos índices aritméticos de Kovats e dos espectros de massa com dados da literatura. Os índices de retenção (AI) foram calculados a partir do t_r das amostras dos óleos essenciais e dos t_R dos padrões n-alcanos C9 a C20 [5,049 (C9), 7,691 (C10), 11,115 (C11), 14,969 (C12), 18,937 (C13), 22,848 (C14), 26,625

(C15), 30,241 (C16), 33,698 (C17), 36,999 (C18), 40,153 (C19), 43,172 (C20)] e dos t_R obtidos a partir das análises das amostras (Tabelas 6 e 7).

Na análise do óleo essencial das folhas, foram identificados 8 sesquiterpenos, de um total de 15 picos cromatográficos observados (Figura 6). Os picos não identificados apresentaram espectros de massas com similaridade inferior a 80 % em relação aos espectros da biblioteca NIST 08. O óleo essencial das folhas apresentou um componente majoritário, o biciclogermacreno (67,19 %), sendo que todos os outros componentes apresentaram teor relativo inferior a 9,0 %. Outros trabalhos realizados com óleo essencial de folhas de *C. sylvestris* Sw. também demonstraram que o biciclogermacreno era um dos componentes principais do óleo essencial (MORAES; MACHADO, 1997; SCHNEIDER et al., 2006; SOUSA et al., 2007; ESTEVES et al., 2005; SANTOS, 2008; TININIS et al., 2006). Trabalho desenvolvido por Tininis et al. (2006) demonstrou que ocorre variabilidade na composição do óleo essencial de folhas de *C. sylvestris* Sw. em função do período da amostragem (manhã e tarde) (Figura 5 e Tabela 5).

Tabela 5 - Constituintes principais (teor relativo maior que 1%) no óleo de folhas de *C. sylvestris* Sw. (TININIS et al., 2006).

Substância identificada ¹	Período	
	Manhã	Tarde
longifoleno	1,8%	3,2%
β -selineno	4,2%	5,2%
germacreno-D	79,2%	66,2%
germacreno-B	14,8%	13,7%
β -gurjuneno	-	1,1%
γ -gurjuneno	-	2,2%
biciclogermacreno	-	3,6%

¹constituintes principais (teor relativo maior que 1%)

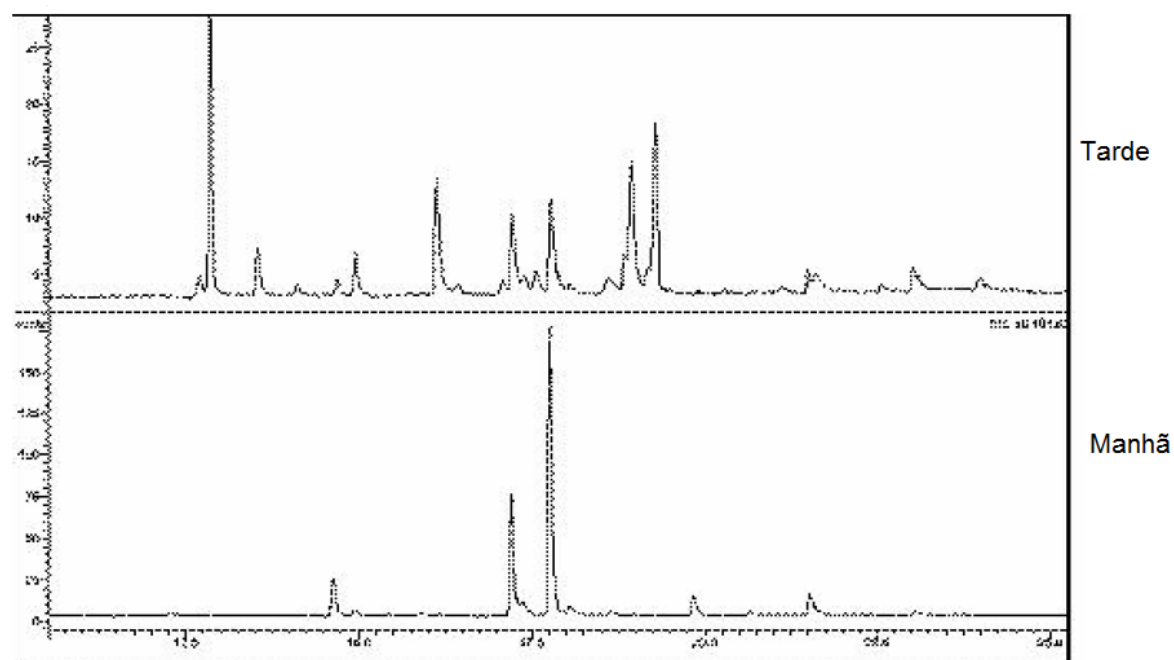


Figura 5 - Cromatogramas dos óleos essenciais extraídos de folhas de *C. sylvestris* Sw. coletadas nos horários 7:00 e 15:00 h (TININIS et al., 2006).

Tabela 6 - Dados da análise de CG-EM do óleo essencial das folhas de *C. sylvestris* Sw.

Substância identificada	t _r (min)	Índice de Kovats calculado	Índice de Kovats literatura ¹	Similaridade EM (%)	Teor relativo (%)
-----	21,175	1357	-----	-----	5,19
β-elemeneno	23,301	1411	1389	97	3,09
α-gurjuneno	23,987	1430	1409	86	0,41
<i>E</i> -cariofileno	24,356	1440	1417	94	0,93
aromadendreno	25,089	1459	1439	96	2,60
-----	25,544	1471	-----	-----	1,30
-----	25,910	1481	-----	-----	0,53
germacreno D	26,661	1500	1484	97	2,30
biciclogermacreno	27,306	1518	1500	94	67,19
viridiflorol	29,518	1580	1592	92	2,06
espatulenol	30,172	1598	1577	86	1,29
-----	30,397	1604	-----	-----	8,06
-----	30,672	1612	-----	-----	3,86
-----	32,290	1659	-----	-----	0,34
-----	33,227	1686	-----	-----	0,84

¹valores obtidos de Adams (2007)

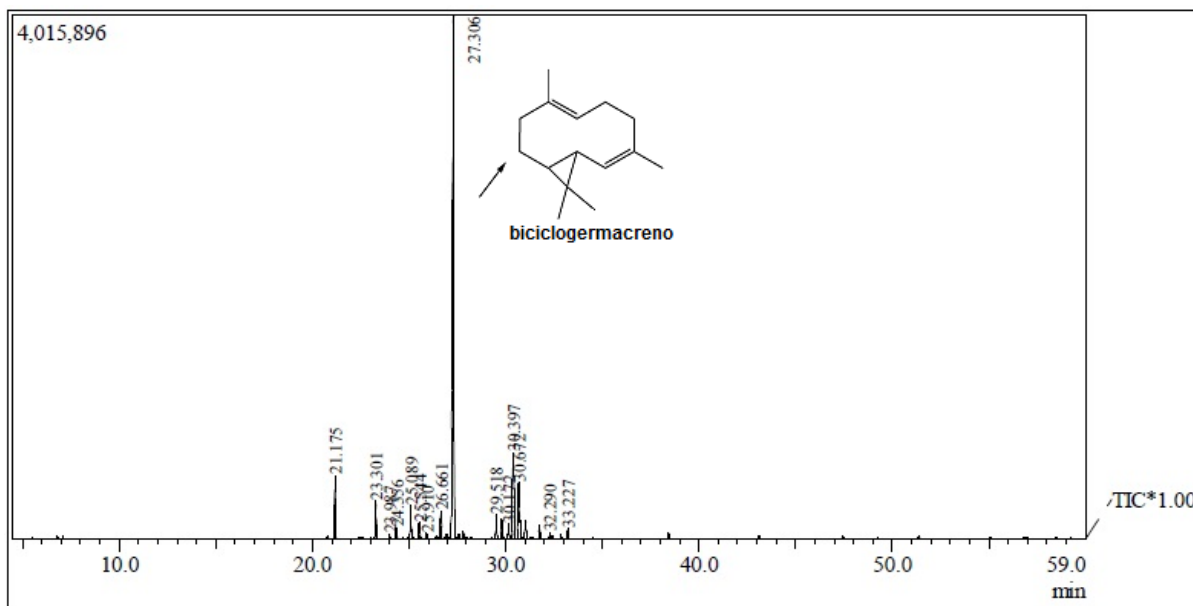


Figura 6 - Cromatograma do óleo essencial de folhas de *C. sylvestris* Sw. obtido em CG-EM.

Na análise do óleo essencial das flores, foram identificados 10 sesquiterpenos, de um total de 19 picos cromatográficos observados (Figura 7). Os picos não identificados apresentaram espectros de massas com similaridade inferior a 80 % em relação aos espectros da biblioteca NIST 08. O óleo essencial das flores apresentou como componente majoritário o bicylogermacreno (45,92 %), seguido por germacreno D que apresentou 17,44%. Os outros componentes apresentaram teor relativo inferior a 10,0 %.

Tabela 7 - Dados da análise de CG-EM do óleo essencial das flores de *C. sylvestris* Sw.

Substância identificada	t_r (min)	Índice de Kovats calculado	Índice de Kovats literatura¹	Similaridade EM (%)	Teor relativo (%)
-----	21,182	1357	-----	-----	2,17
-----	22,450	1389	-----	-----	0,53
α -copaeno	22,689	1395	1374	83	0,28
β -elemeno	23,307	1412	1389	94	1,28
<i>E</i> -cariofileno	24,365	1440	1417	96	9,84
aromadendreno	25,095	1459	1439	92	0,95
α -humuleno	25,639	1474	1452	94	0,98
germacreno D	26,671	1501	1484	97	17,44
biciclogermacreno	27,271	1517	1500	95	45,92
-----	27,624	1527	-----	-----	1,38
δ -cadineno	28,214	1543	1522	91	0,88
viridiflorol	29,524	1580	1592	84	0,50
-----	29,799	1587	-----	-----	1,31
espatulenol	30,177	1598	1577	86	2,88
-----	30,400	1604	-----	-----	7,68
-----	30,675	1612	-----	-----	3,38
-----	32,295	1659	-----	-----	0,44
-----	32,416	1662	-----	-----	0,69
-----	32,847	1675	-----	-----	1,02

¹valores obtidos de Adams (2007)

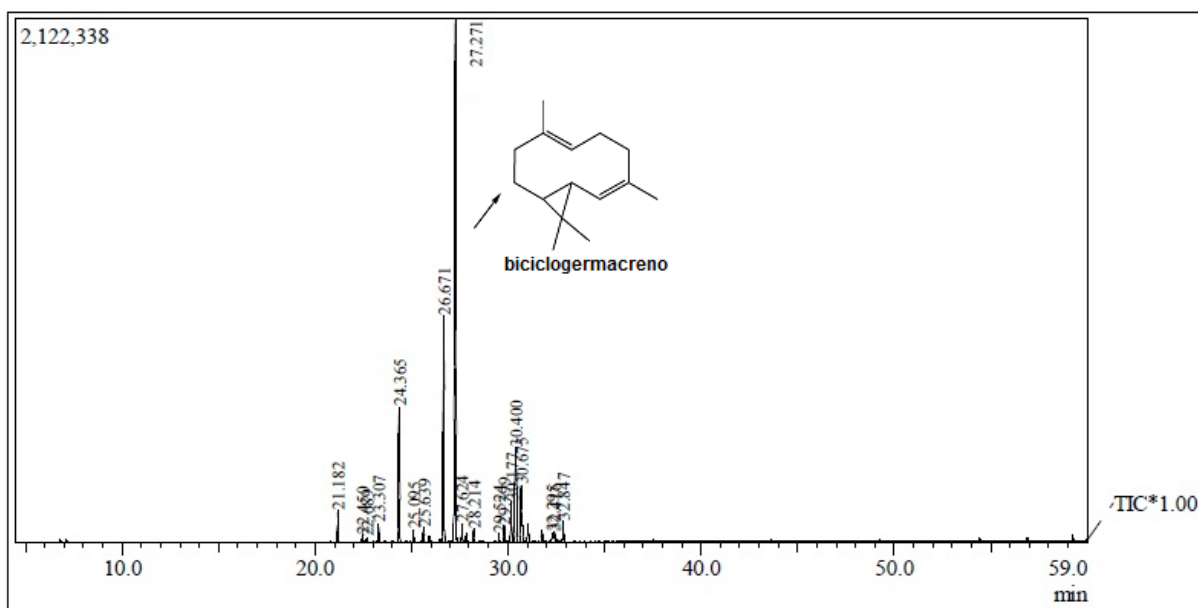


Figura 7 - Cromatograma do óleo essencial de flores de *C. sylvestris* Sw. obtido em CG-EM.

Dentre as substâncias identificadas nos OE das flores e das folhas, o α -copaeno, o α -humuleno e o δ -cadineno foram identificadas apenas nas flores, e o α -gurjuneno apenas nas folhas. Dos 19 picos encontrados em flores e 15 em folhas, 11 picos possuem mesmo t_R , sendo que destes 4 substâncias não foram identificadas.

4.3 Doseamento de compostos fenólicos totais

Para determinar a concentração de fenólicos totais nos extratos, foi utilizada uma curva analítica obtida a partir da leitura em triplicata da absorbância de soluções de ácido gálico de diferentes concentrações.

Com a utilização do reagente de Folin-Ciocalteu e leitura de absorbâncias das soluções de ácido gálico, foi construída uma curva analítica (figura 8) obtendo-se assim uma equação de reta. A tabela 8 apresenta os dados obtidos para a curva analítica.

Tabela 8 - Dados de absorbância relativos às soluções de ácido gálico de diferentes concentrações.

Concentração do ácido gálico (µg/mL)	Média das absorbâncias (UA)
1,25	0,194
2,50	0,370
4,00	0,529
5,00	0,580
7,50	0,855
9,00	1,067
10,00	1,147
10,50	1,221
20,00	2,112

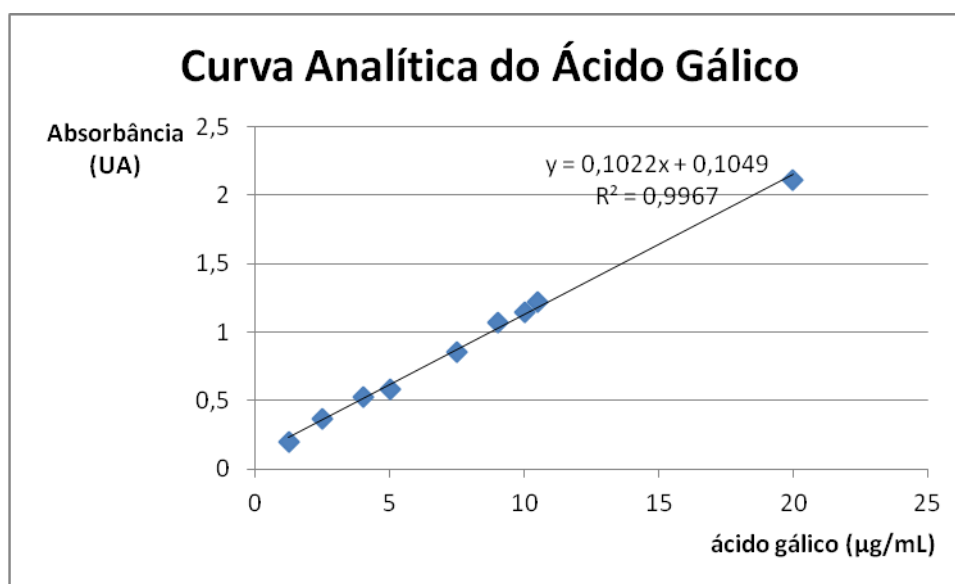


Figura 8 - Curva analítica obtida para o ácido gálico para determinação do teor de fenólicos totais utilizando o reagente de Folin-Ciocalteu.

A leitura das absorbâncias de cada extrato foi feita em triplicata e a média dos valores foi calculada, como pode ser observado na Tabela 9.

Tabela 9 - Dados de absorvância relativos às soluções dos extratos.

EXTRATO	MÉDIA ABSORBÂNCIA
EEFL	0,894
EEFO	0,843
Absorvância do branco = 0,021	

O teor de fenólicos totais equivalentes a ácido gálico nos extratos etanol 70% de flores (EEFL) e de folhas (EEFO) de *C. sylvestris* Sw. foi calculado através da equação da reta (1) obtida na curva padrão citada, descontando-se do valor de absorvância dos extratos o valor de absorvância do branco (0,021):

Equação da reta: $y = 0,1022 \cdot x + 0,1049$ (1)

Sendo y correspondente à absorvância e x à concentração de fenólicos totais.

Segue exemplo de cálculo para o EEFL:

Absorvância = 0,894

Branco = 0,021

Absorvância – Branco = 0,873

$y = 0,1022 \cdot x + 0,1049$

$0,873 = 0,1022 \cdot x + 0,1049$

$0,7681 = 0,1022 \cdot x$

$x = 7,52 \mu\text{g/mL}$

Assim, considerando-se o volume de 1,0 mL, em 50 μg de amostra tem-se 7,52 μg de fenólicos totais, o que em porcentagem representa:

50 μg – 100% $x = 15,03 \%$

7,52 μg – x

Tabela 10 - Teor de fenólicos totais nos extratos etanol 70% de flores e de folhas de *C. sylvestris*.

EXTRATO	TEOR DE FENÓLICOS TOTAIS
EEFL	15,03%
EEFO	14,03%

A partir dos dados da tabela acima, é possível concluir que o teor de fenólicos totais nos extratos analisados foi semelhante. Não foram encontrados dados na literatura sobre o teor de compostos fenólicos totais em extratos de *C. sylvestris* Sw.

4.4 Perfil cromatográfico de diterpenos clerodânicos em CCD

Através da técnica de CCD é possível separar e identificar substâncias presentes nos extratos vegetais. A identificação é obtida através da comparação dos valores dos fatores de retenção (R_f) e coloração das manchas dos padrões (marcadores) e amostras aplicadas. O resultado do R_f (2) é obtido pela seguinte equação:

$$\text{Equação: } R_f = \frac{\text{distância percorrida pela substância}}{\text{distância percorrida pelo fase móvel}} \quad (2)$$

Pela análise da placa cromatográfica foi possível calcular os fatores de retenção (R_f) das amostras para verificar a presença de diterpenos clerodânicos (casearina B, caseargrewiina F e casearina X) nas amostras dos extratos.

Tabela 11 - Valores de R_f dos padrões utilizados na análise por CCD.

Padrões	R_f
Casearina B	0,29
Caseargrewiina F	0,25
Casearina X	0,35

Através dos valores de R_f de manchas dos extratos foi possível observar a presença de casearina X nos extratos EHFL, EHFO, EAFL e EAFO. A presença de caseargrewiina F foi verificada em todos extratos com exceção de EEFO. A casearina B não foi identificada em nenhum dos extratos.

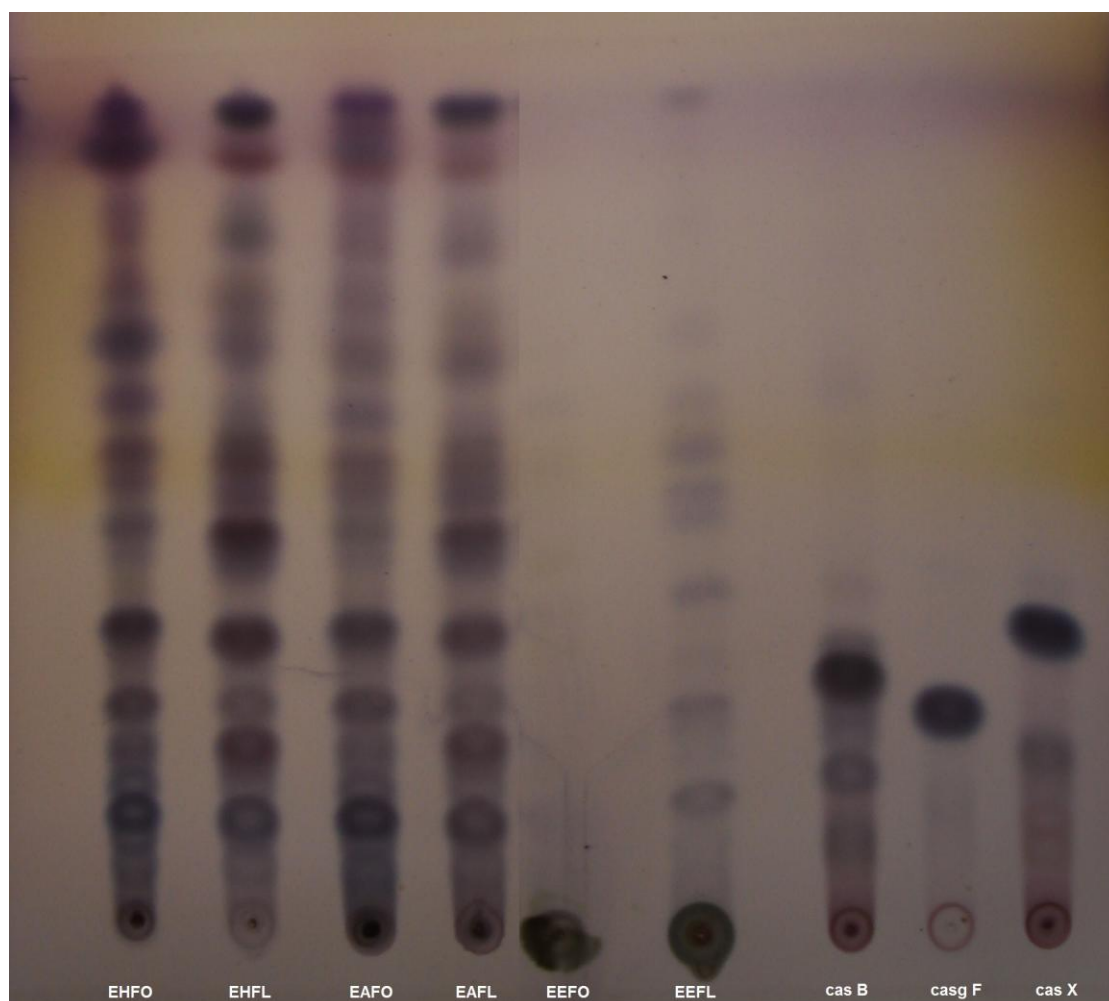


Figura 9 - Cromatoplate resultante da análise dos extratos de flores e folhas (*C. sylvestris*). Sequência das amostras: EHFO, EHFL, EAFO, EAFO, EEFO, EEFL, casearina B, caseargrewiina F e casearina X (com exceção da caseargrewiina F, os padrões apresentaram mais de uma mancha; casearinas B e X correspondem às manchas principais).

No extrato EHFO foram observadas 18 manchas, das quais 15 foram correspondentes com todas as 15 manchas encontradas em EHFL.

No extrato EAFO foram observadas 20 manchas, das quais 16 são correspondentes com todas as 16 manchas encontradas no extrato acetato de etila:hexano:isopropanol de flores.

No extrato EEFO não se observou mancha, porém no EEFL foram observadas 9 manchas correspondentes às encontradas nos extratos EAFL e EHFL.

De forma geral, os perfis cromatográficos dos extratos etanólicos 70% apresentaram-se mais simples, o que já era esperado devido a menor seletividade (maior polaridade do etanol 70%) pelos diterpenos clerodânicos. Os perfis cromatográficos dos extratos EAFL, EAFO, EHFL e EHFO foram semelhantes, bem como os mesmos diterpenos foram identificados em todos eles, sugerindo semelhança no perfil químico por CCD em flores e folhas.

4.5 Perfil cromatográfico de diterpenos clerodânicos por CLAE-DAD

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 $\lambda_{\text{máx}} = 232\text{-}235$ ou $223\text{-}229$ nm, respectivamente (CARVALHO et al., 2009; ESPÍNDOLA et al., 2004; ITOKAWA et al., 1990) (Figura 10).

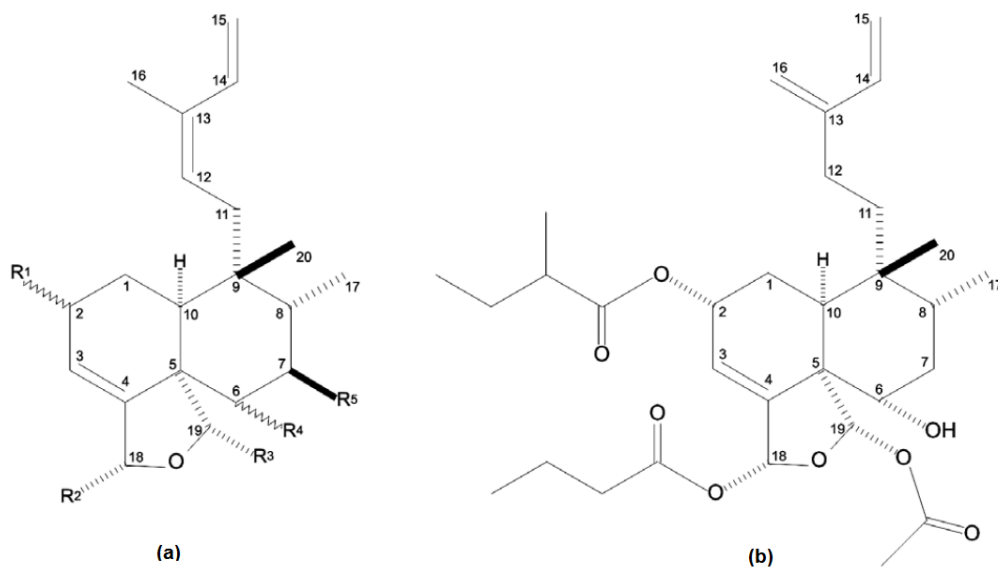


Figura 10 - (a) estrutura química geral das casearinas A-X, casearvestrinas A-C e da caseargrewiina F; **(b)** *rel*-19*S*-acetóxi-18*R*-butanoiloxi-18,19-epóxi-6*S*-hidróxi-2*R*-(2-metilbutanoilóxi)-5*S*,8*R*,9*R*,10*S*-cleroda-3,13(16),14-trieno (CARVALHO et al., 2009).

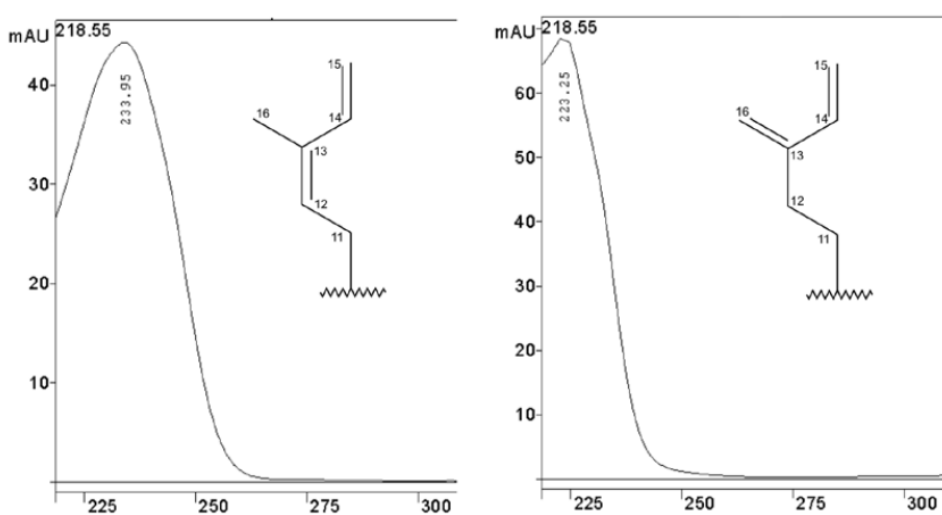


Figura 11 - Esquerda - espectro no UV da casearina B e modelo diênico com ligações duplas em C12Z e C14. **Direita** - espectro no UV do diterpene **10b** (Figura 10) e modelo diênico com ligações duplas em C13(16) e C14 (CARVALHO et al., 2009).

Assim, foi sugerido neste trabalho que os picos com espectro no UV com $\lambda_{\text{max}} = 223\text{-}229$ ou $232\text{-}235$ nm são diterpenos clerodânicos.

Nas figuras 12, 13, 14, 15, 16 e 17 encontram-se os cromatogramas dos extratos EAFO, EAFL, EHFO, EHFL, EEFO e EEFL.

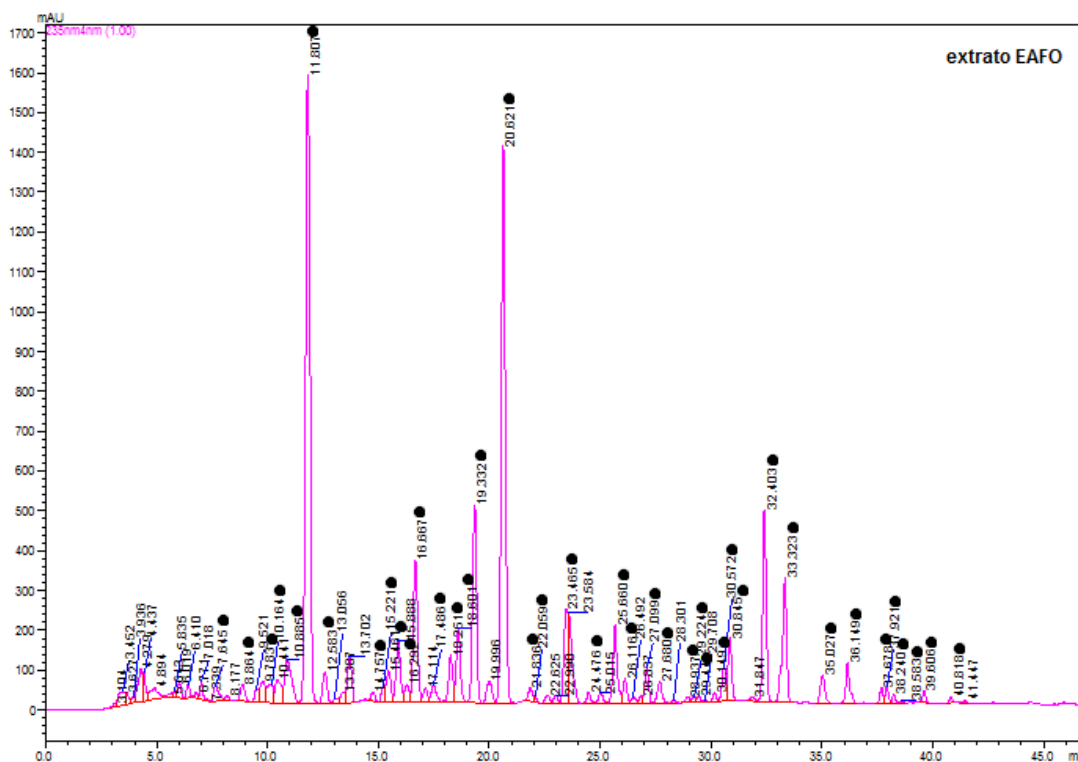


Figura 12 - Cromatograma obtido em CLAE-DAD ($\lambda = 235$ nm) do extrato acetato de etila:hexano:isopropanol de folhas (EAFO). O símbolo (●) indica picos com espectro no UV semelhante ao das casearinas ($\lambda_{\text{máx}} = 232\text{-}235$ nm).

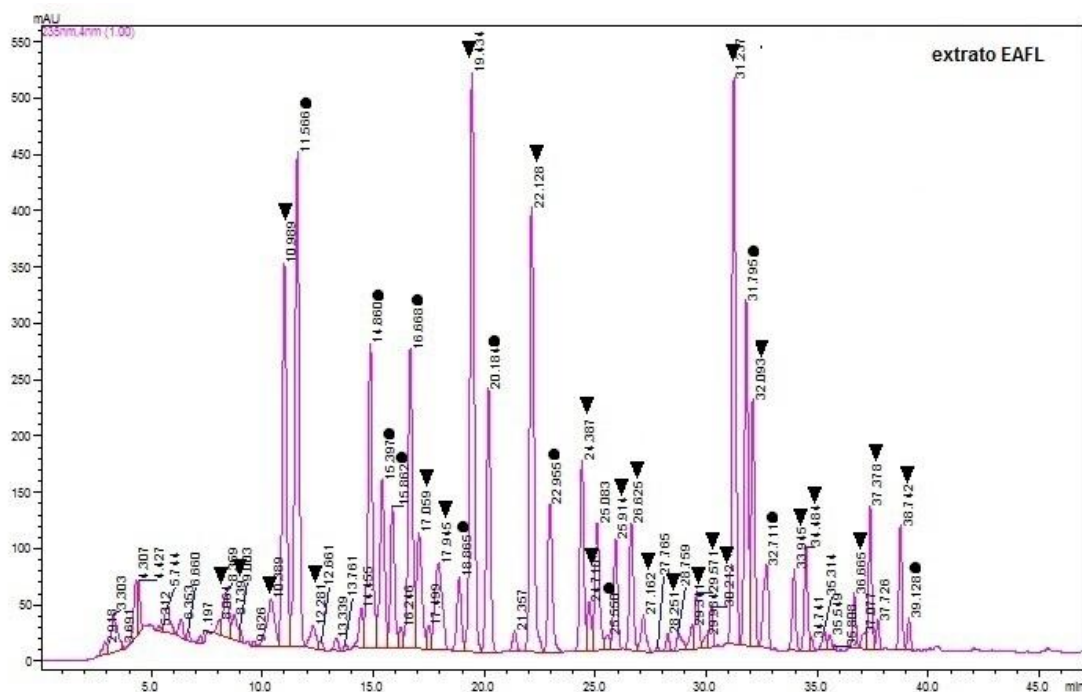


Figura 13 - Cromatograma obtido em CLAE-DAD ($\lambda = 235 \text{ nm}$) do extrato acetato de etila:hexano:isopropanol de flores EAFL. O símbolo (●) indica picos com espectro no UV semelhante ao das casearinas ($\lambda_{\text{m\acute{a}x}} = 232-235 \text{ nm}$) e o símbolo (▼) picos com espectro no UV semelhante ao de **10b** ($\lambda_{\text{m\acute{a}x}} = 223-229 \text{ nm}$).

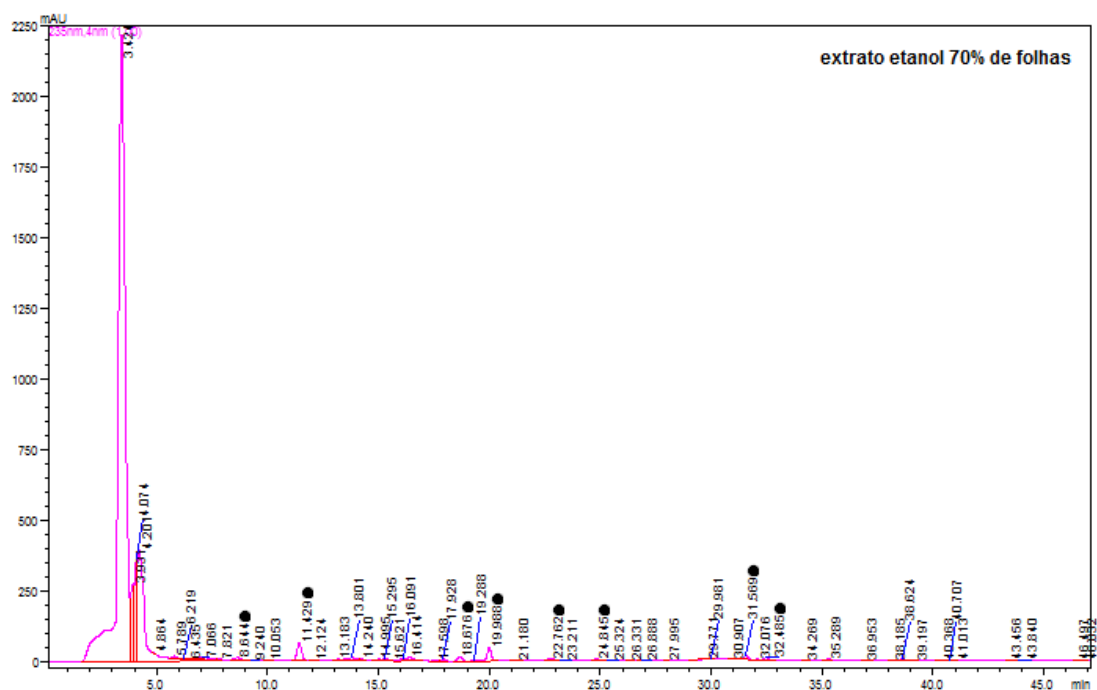


Figura 14 - Cromatograma obtido em CLAE-DAD ($\lambda = 235$ nm) do extrato etanol 70% de folhas (EEFO). O símbolo (●) indica picos com espectro no UV semelhante ao das casearinas ($\lambda_{\text{máx}} = 232\text{-}235$ nm).

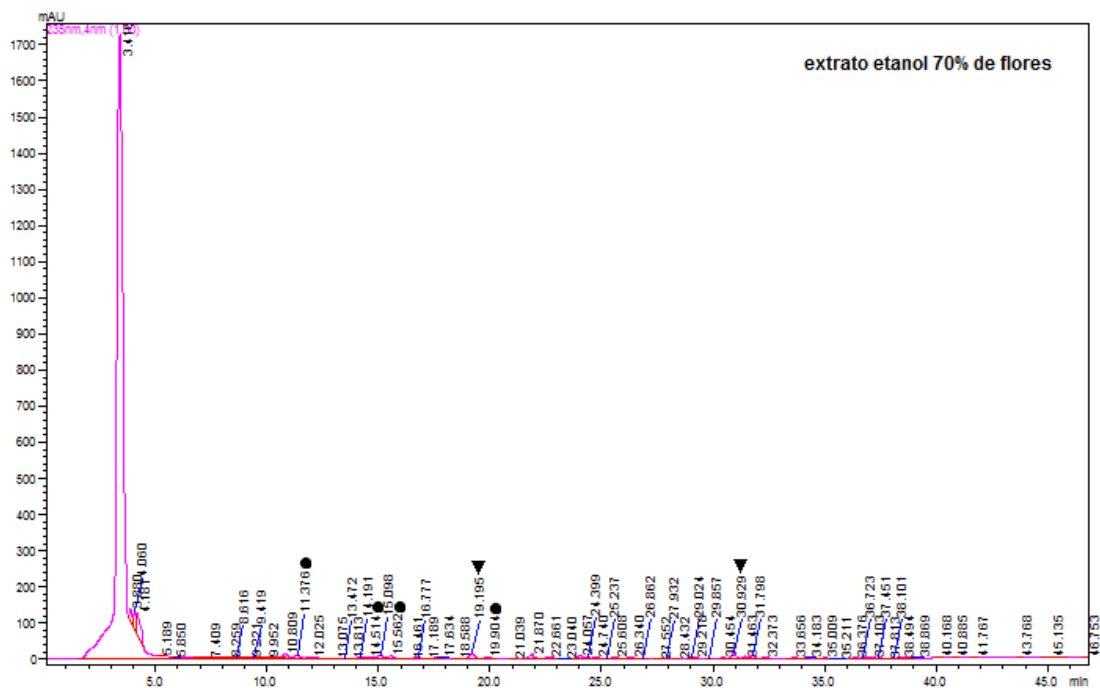


Figura 15 - Cromatograma obtido em CLAE-DAD ($\lambda = 235$ nm) do extrato etanol 70% de flores (EEFL). O símbolo (●) indica picos com espectro no UV semelhante ao das casearinas ($\lambda_{\text{máx}} = 232\text{-}235$ nm) e o símbolo (▼) picos com espectro no UV semelhante ao de **10b** ($\lambda_{\text{máx}} = 223\text{-}229$ nm).

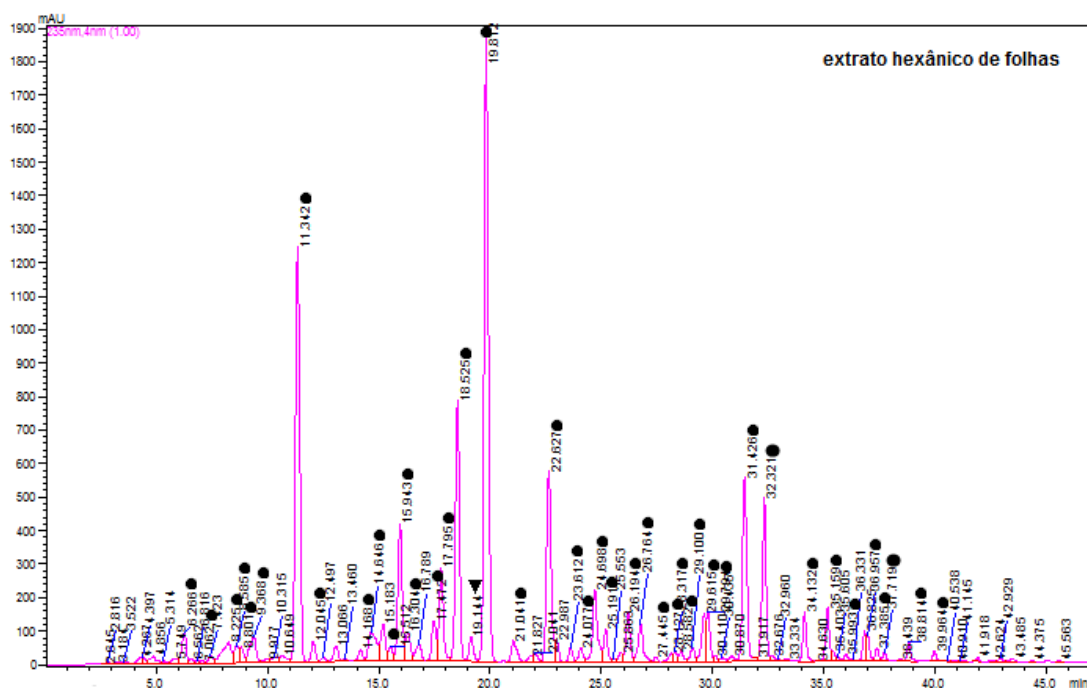


Figura 16 - Cromatograma obtido em CLAE-DAD ($\lambda = 235$ nm) do extrato hexânico de folhas (EHFO). O símbolo (●) indica picos com espectro no UV semelhante ao das casearinas ($\lambda_{\text{máx}} = 232\text{-}235$ nm) e o símbolo (▼) picos com espectro no UV semelhante ao de **10b** ($\lambda_{\text{máx}} = 223\text{-}229$ nm).

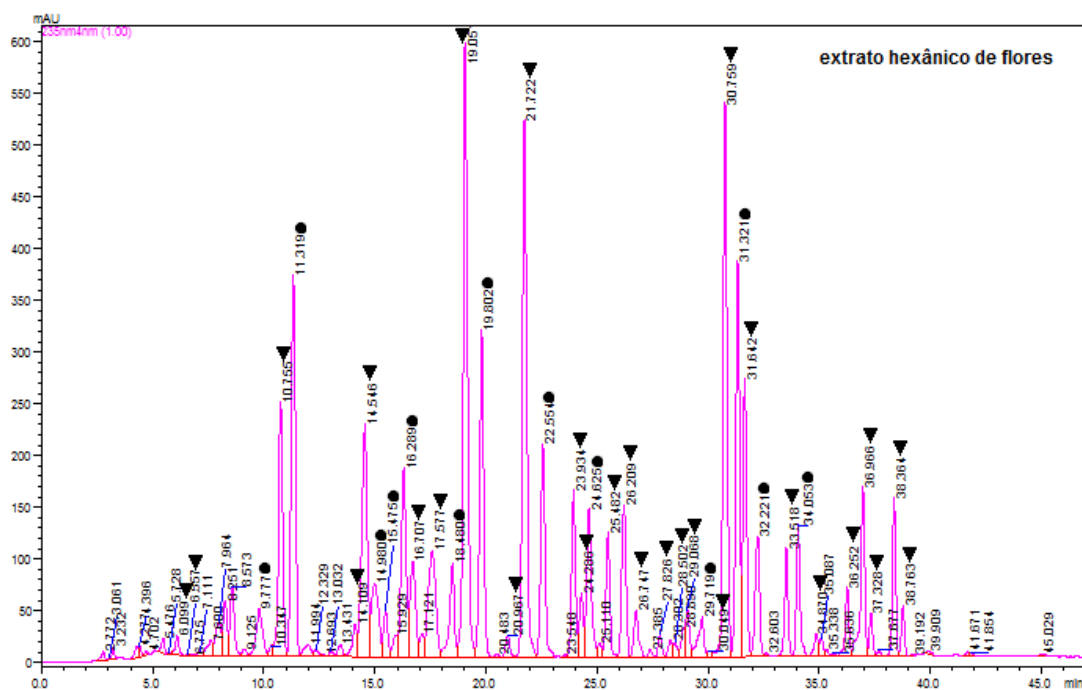


Figura 17 - Cromatograma obtido em CLAE-DAD ($\lambda = 235$ nm) do extrato hexânico de flores (EHFL). O símbolo (●) indica picos com espectro no UV semelhante ao das casearinas ($\lambda_{\text{máx}}$ - 232-235 nm) e o símbolo (▼) picos com espectro no UV semelhante ao de **10b** ($\lambda_{\text{máx}}$ - 223-229 nm).

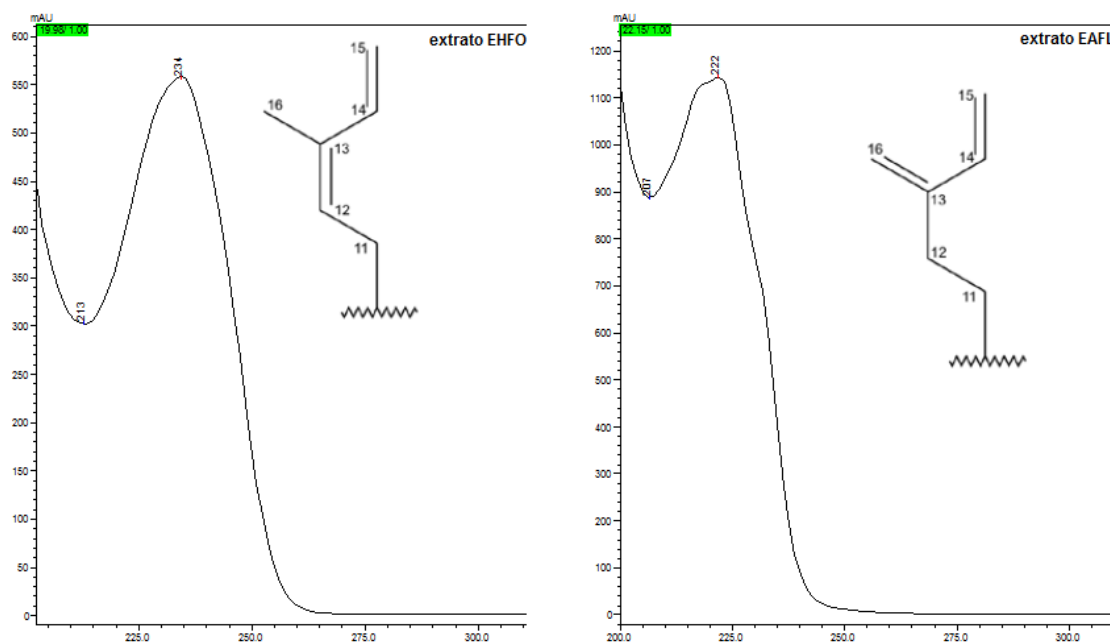


Figura 18 - Esquerda - espectro no UV do pico com t_R de 19,81 min relativo a diterpeno do tipo das casearinas com $\lambda_{m\acute{a}x}$ = 235 nm do cromatograma de EHFO com modelo diênico com ligações duplas em C12Z e C14. **Direita** - espectro no UV do pico com t_R de 22,15 min com $\lambda_{m\acute{a}x}$ = 229 nm relativo a diterpeno do cromatograma do extrato EAFL com modelo diênico com ligações duplas em C13(16) e C14.

As análises por CLAE-DAD sugeriram a presença de diterpenos clerodânicos em todos os extratos com maior número de picos relativos a estas substâncias nos extratos das folhas. A Tabela 12 apresenta o número de picos observados com valores de $\lambda_{m\acute{a}x}$ relativos aos diterpenos clerodânicos, bem como a soma das áreas dos picos nos diferentes valores de $\lambda_{m\acute{a}x}$. A observação dos dados da Tabela 12 demonstra predomínio em número de picos (informação qualitativa) com $\lambda_{m\acute{a}x}$ = 232-235 nm (modelo diênico em C12Z e C14), bem como da área total destes em extratos de folhas. De outro lado, em flores há predomínio dos picos com $\lambda_{m\acute{a}x}$ = 223-229 nm, relativos aos diterpenos com o modelo diênico em C13(16) e C14. Estes dados são coerentes com os obtidos por Carvalho et al. (2009).

Tabela 12 - Dados das análises por CLAE-DAD dos extratos de *C. sylvestris*.

Extrato	$\lambda_{\text{máx}} = 222\text{-}229 \text{ nm}$		$\lambda_{\text{máx}} = 232\text{-}235 \text{ nm}$	
	área total	n. de picos	área total	n. de picos
EAFO	-	-	91.474.862	41
EAFL	42.570.305	26	28.433.892	12
EHFO	1.023.624	01	118.409.619	43
EHFL	52.942.005	28	29.458.049	13
EEFO	-	-	2.405.103	08
EEFL	407.215	02	322.690	04

4.5.1 Quantificação de diterpenos totais do tipo das casearinas ($\lambda_{\text{máx}} = 232\text{-}235 \text{ nm}$) expressos como caseargrewiina F

A curva analítica da caseargrewiina F (Figura 19) foi construída a partir de suas concentrações *versus* valores das áreas dos picos nos cromatogramas (Tabela 13) (PIERRI, 2013).

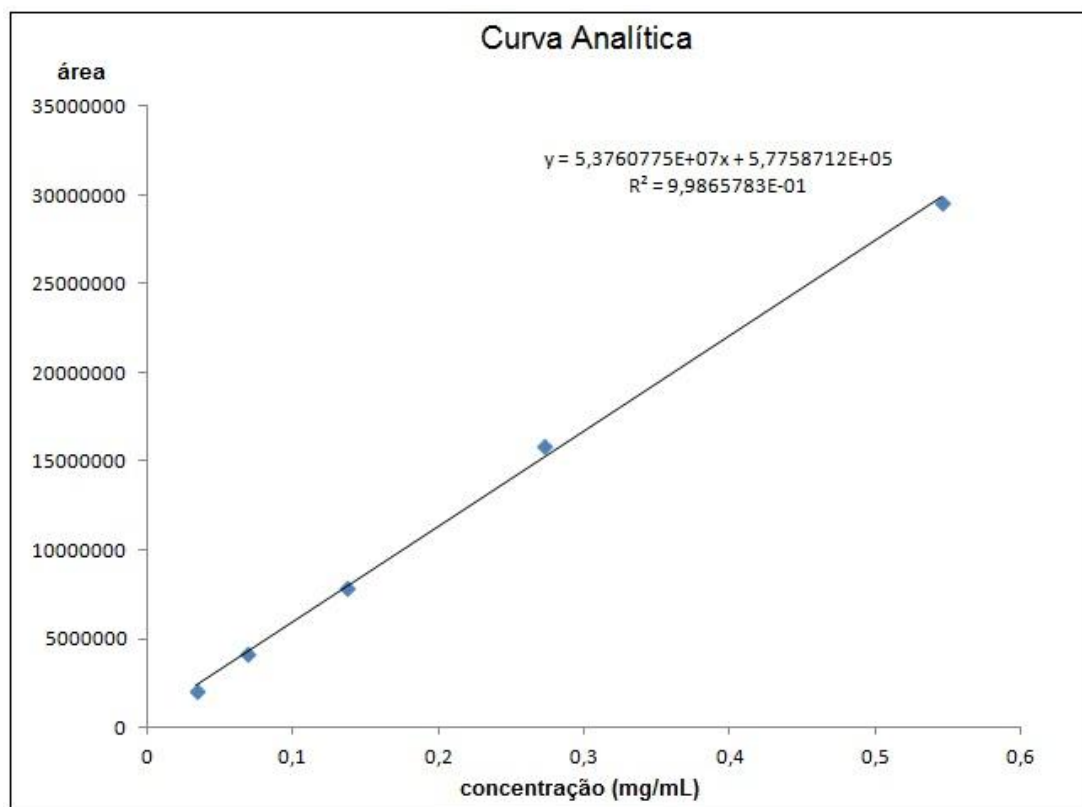


Figura 19 - Curva de calibração para solução padrão de caseargrewiina F em metanol.

Equação: [caseargrewiina F] = $\frac{\text{Área} - 577587,12}{53760775}$, onde $r^2 = 0,99866$. **(3)**

Tabela 13 - Dados das análises em CLAE-DAD da caseargrewiina F para a construção da curva analítica.

Concentração (mg/mL)	Área dos picos ¹
0,034	2090560,0
0,068	4161704,5
0,136	7910669,0
0,272	15882679,0
0,545	29559941,0

¹média de três análises.

A quantificação de diterpenos do tipo das casearinas em relação à caseargrewiina F foi realizada considerando-se os picos dos cromatogramas com banda no espectro no UV semelhante à observada para estas substâncias (Figuras 12 a 17, com $\lambda_{\text{máx}} = 232\text{-}235$ nm. A caseargrewiina F foi selecionada como marcador para quantificar os diterpenos do tipo das casearinas, pois há dificuldade em se obter padrões cromatográficos dos diversos diterpenos clerodânicos em folhas de *C. sylvestris* (cerca de 30) (PIERRI, 2013). Apesar do extenso conhecimento sobre ações farmacológicas e fitoquímica das folhas, há apenas um trabalho publicado sobre metabólitos secundários de suas flores (CARVALHO et al., 2009).

Portanto, foi utilizada a soma das áreas de todos os picos com uma banda com $\lambda_{\text{máx}} = 232\text{-}235$ nm para o cálculo da concentração no extrato de diterpenos do tipo das casearinas. A partir da equação da reta (Equação 3) da curva analítica e dos dados obtidos da análise dos extratos EAFO, EAFL, EHFO, EHFL, EEFO e EEFL (Tabela 14 e Figuras 12 a 17) calcularam-se as concentrações de diterpenos do tipo das casearinas expressos como caseargrewiina F nesses extratos, cujos valores constam na tabela 14.

Tabela 14 - Dados obtidos na quantificação de diterpenos do tipo casearinas em relação à caseargrewiina F nos extratos de *C. sylvestris* Sw. ($\lambda_{\text{máx}}$ = 232-235 nm).

Extrato	Área total	Concentração de diterpenos (mg/mL)	Massa inicial da amostra (mg)	% diterpenos (m/m)	n. de picos
EAFO	91.474.862	1,691	6,0	28,18	41
EAFL	28.433.892	0,518	7,5	6,91	12
EHFO	118.409.619	2,192	5,4	40,59	43
EHFL	29.458.049	0,537	7,3	7,36	13
EEFO	2.405.103	0,034	9,2	0,40	08
EEFL	322.690	Não detectado	9,5	-	04

A partir da tabela 14 é possível observar que a maior concentração de diterpenos do tipo casearinas em relação à caseargrewiina F ocorreram nos extratos EHFO e EAFO, cujos valores foram 40,59% e 28,18% respectivamente.

Em trabalho desenvolvido por Carvalho et al. (2009), o extrato hexânico de folhas apresentou 9 picos e o extrato hexânico de flores 5 picos em $\lambda_{\text{máx}}$ = 231-235 nm (Figura 3). Porém, nesse trabalho o extrato hexânico de folhas apresentou 43 picos e o extrato hexânico de flores 13 picos em $\lambda_{\text{máx}}$ = 231-235 nm. Esse fato pode justificado segundo artigo de Claudino et al. (2013) que verificaram maior teor de diterpenos do tipo das casearinas em *C. sylvestris* var. *sylvestris* em relação a *C. sylvestris* var. *lingua*; em nosso trabalho utilizamos um indivíduo pertencente a var. *sylvestris* (AGS102) enquanto no desenvolvido por Carvalho et al. (2009) foram utilizados dois indivíduos da var. *lingua* (CSL01 e CSL02).

5 CONCLUSÃO

Para a realização deste trabalho foram produzidos extratos secos e óleos essenciais de folhas e de flores de *Casearia sylvestris* Sw. Amostras dos extratos foram submetidas a análises por CCD, CLAE-DAD e determinação espectrofotométrica do teor de fenólicos totais. Os óleos essenciais foram analisados por CG-EM.

Os extratos com maior rendimento foram os extratos obtidos com etanol 70%, tanto de folhas como de flores, 20,3 % e 23,4 %, respectivamente. Os menores rendimentos foram obtidos para os extratos hexânicos.

As análises por CG-EM dos óleos essenciais demonstraram que o biciclogermacreno foi o componente majoritário em folhas e flores de *C. sylvestris* Sw. O OE das flores apresentou um total de 19 picos no cromatograma, sendo que 8 destes componentes não foram observados no cromatograma do OE das folhas; destes 3 foram identificados (α -copaeno, α -humuleno e δ -cadineno). O OE das folhas apresentou um total de 15 picos e destes 4 componentes não foram observados no cromatograma do OE das flores e destes apenas 1 foi identificado (α -gurjuneno). Em relação ao t_R , 11 picos são correspondentes nos dois óleos. Assim, foi demonstrado que o óleo essencial de flores é um pouco mais complexo que o óleo das folhas de *C. sylvestris* Sw.

Os extratos EEFL e EEFO apresentaram teores de compostos fenólicos totais semelhantes (15,0 e 14,0 %, respectivamente). Ressalta-se que neste trabalho a composição química de fenólicos em termos qualitativos não foi avaliada.

Na comparação entre os extratos EHFL, EHFO, EAFL e EAFO, as análises por CCD demonstraram que o perfil químico qualitativo de terpenos (diterpenos e

sesquiterpenos) das folhas e flores foi semelhante, com perfil um pouco mais complexo para folhas.

A ocorrência de bandas cromatográficas com valores de R_f entre 0,2-0,4 na cromatoplaça dos extratos pôde indicar a presença de diterpenos clerodânicos típicos de *Casearia*, pois nesta faixa de R_f observaram-se as bandas referentes aos padrões utilizados na técnica (casearina B, caseargrewiina F e casearina X). Observou-se presença de casearina X e caseargrewiina F nos extratos EHFL, EHFO, EAFL e EAFO. Em trabalho realizado por Carvalho et al. (2008), a análise de extratos etanólicos e hexânicos por CCD indicou diversidade de diterpenos clerodânicos encontrados em folhas e flores de *C. sylvestris* Sw.

As análises por CLAE-DAD sugeriram a presença de diterpenos clerodânicos em todos os extratos, sendo o maior número de picos observado nos extratos das folhas. Estas análises demonstraram predomínio em extratos de folhas de número de picos (informação qualitativa) com $\lambda_{m\acute{a}x} = 232-235$ nm (modelo diênico em C12Z e C14), bem como da área total destes. De outro lado, em flores há predomínio dos picos com $\lambda_{m\acute{a}x} = 222-229$ nm, relativos aos diterpenos com o modelo diênico em C13(16) e C14. Foi realizada também a quantificação dos diterpenos totais do tipo das casearinas expressos como caseargrewiina F, sendo que os extratos EHFO e EAFO apresentaram maior concentração de diterpenos do tipo das casearinas (40,6 e 28,2 %, respectivamente).

As técnicas cromatográficas de CCD e CLAE-DAD utilizadas apresentam diferentes seletividades. Neste trabalho, a análise por CCD permitiu identificar dois diterpenos (casearina X e caseargrewiina F) em extratos de folhas e flores que, em geral, apresentaram mesmo perfil cromatográfico. Porém, a análise por CLAE-DAD, especialmente considerando-se os espectros no UV obtidos para os picos, mostrou

que os extratos tem perfil distinto, com predomínio de diterpenos do tipo das casearinas em folhas e com modelo diênico diferente em flores.

De modo geral, o perfil fitoquímico de flores de *Casearia sylvestris* Swartz demonstra a predominância de diterpenos clerodânicos distintos dos de folhas, sendo que este órgão também pode ser fonte de substâncias bioativas, já que estudos demonstraram que extratos de folhas de *C. sylvestris* e diterpenos clerodânicos isolados possuem várias atividades biológicas. De outro lado, com relação à produção de um medicamento fitoterápico a partir de folhas secas e moídas (droga vegetal) de *C. sylvestris* Sw. deve-se considerar que as flores tem composição química distinta, especialmente em termos de diterpenos clerodânicos.

Muitos medicamentos são originados de plantas e outros organismos. Grande parte, por volta de 42%, dos novos fármacos lançados no mundo entre 1981 e 2006 eram produtos naturais, seus derivados ou inspirados em produtos naturais (NEWMAN; CRAGG, 2007). Assim, os metabólitos identificados nas flores de *Casearia sylvestris* Swartz podem servir como modelos para desenvolvimento de novos fármacos.

REFERÊNCIAS

ADAMS, R. P: **Identification of Essential Oil components by Gas Chromatography/ Mass Spectrometry**. 4^a ed. USA: Allured, 2007.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução RDC n. 13, de 14 de março de 2013. 2013a. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2013/rdc0014_14_03_2013.html. Acesso em: 18 out. 2013.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução RDC n. 14, de 14 de março de 2013. 2013b. Disponível em:

http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2013/rdc0014_14_03_2013.html. Acesso em: 18 out. 2013.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução - RE n. 89, de 12 de dezembro de 2008. Disponível em: <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=10241&word=>. Acesso em: 16 out. 2013.

ALBANO, M. N.; SILVEIRA, M. R.; DANIELSKI, L. G.; FLORENTINO, D.; PETRONILHO, F.; PIOVEZAN A. P. Anti-inflammatory and antioxidant properties of hydroalcoholic crude extract from *Casearia sylvestris* Sw. (*Salicaceae*). *Journal of Ethnopharmacology*, v.147, p. 612-617, 2013.

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

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Farmacopeia Brasileira**. 5ª ed. Volumes 1 e 2. Brasília: Anvisa, 2010b.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Formulário de Fitoterápicos da Farmacopéia Brasileira**. Brasília: Anvisa, 2011. 126p.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução ANVISA RDC n. 14, de 31 de março de 2010. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. **Diário Oficial da União**, 5 abr. 2010a.

BRASIL. Decreto n. 5.813, de 22 de junho de 2006. Aprova a política nacional de plantas medicinais e fitoterápicos e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 23 jun. 2006a. Seção 1, p. 2.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria Interministerial n. 2.960, de 09 de dezembro de 2008. Aprova o programa nacional de plantas medicinais e fitoterápicos e cria o comitê nacional de plantas medicinais e fitoterápicos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 10 dez. 2008. Seção 1, p. 56.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria MS n. 886, de 20 de abril de 2010. Institui a Farmácia Viva no âmbito do Sistema Único de Saúde (SUS). **Diário Oficial [da]**

República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, 22 abr. 2010c. Seção 1, p. 75.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria MS/GM n. 971, de 03 de maio de 2006. Aprova a política nacional de práticas integrativas e complementares (PNPIC) no SUS. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 04 mai. 2006b. Seção 1, p. 20.

CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytoterapeutic agents). *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 33, p.179-189, 2000.

CARVALHO, A.C.B.; BALBINO, E.E.; MACIEL, A.; PERFEITO J.P.S. Situação do registro de medicamentos fitoterápicos no Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 2, p. 314-319, 2008.

CARVALHO, E.S.; SANTOS, A.G.; CAVALHEIRO, A.J. Identificação de diterpenos clerodânicos em diferentes órgãos de *Casearia sylvestris* Swartz. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, 30(3), 277-284, 2009.

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

CASTELLANI, D.C.;CASALI, V.W.D.; SOUZA, A.L.; CECON, P.R.; CARDOSO, C.A.; MARQUES, V.B. Produção de óleo essencial em canela (*Ocotea odorífera* Vell.) e guaçatonga (*Casearia sylvestris* Swartz) em função da época de colheita. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais, Botucatu**, v.8, n. 4, p. 104-107, 2006.

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.

CLAUDINO, J. C.; SACRAMENTO, L. V. S.; KOCH, I.; SANTOS, H. A.; CAVALHEIRO, A. J.; TININIS, A. G.; SANTOS, A. G. Evaluation of morpho-anatomical and chemical differences between varieties of the medicinal plant *Casearia sylvestris* Swartz. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*. 2013. Aceito.

CORREA, M. P. *Dicionário das plantas úteis do Brasil e das espécies cultivadas*. Brasília: Ministério da Agricultura/IBDF, 1975, p. 514-516.

ESPÍNDOLA, L. S.; VASCONCELOS JUNIOR, J. R.; DE MESQUITA, M. L.; MARQUIE, P.; DE PAULA, J. E.; MAMBU, L.; SANTANA, J. M. Trypanocidal activity of a new diterpene from *Casearia sylvestris* var. *lingua*. **Planta Medica**, v. 70, n. 11, p. 1093-1095, 2004.

ESTEVEES, I.; SOUZA, I. R.; RODRIGUES, M.; CARDOSO, L. G. V.; SANTOS, L. S.; SERTIÈ, J. A. A.; PERAZZO, F. F.; LIMA, L. M.; SCHNEEDORF, J. M.; BASTOS, J. K.; CARVALHO, J. C. T. Gastric antiulcer and anti-inflammatory activities of the essential oil from *Casearia sylvestris* Sw. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 101, p. 191-196, 2005.

CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R.S. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**, v. 21, n. 1, p. 99-105, 1998.

FOLIN, O.; CIOCALTEU, V. On tyrosine and tryptophane determinations in proteins. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 73, n. 2, 1927.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.

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

ITOKAWA, H.; TOTSUKA, N.; TAKEYA, K.; WATANABE, K.; OBATA, E. New Antitumor Principles, Casearins A-F, from *Casearia sylvestris* Sw. (Flacourtiaceae). **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, v.36, n.4, p.1585-1588, 1990.

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

LIMA, Z. P.; SANTOS, R. C.; TORRES, T. U.; SANNOMIYA, M.; RODRIGUES, C. M. LORENZI, H. **Árvores brasileiras**. Nova Odessa: Plantarum, 1992. p. 115.

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, p. 220-221, 2002.

MACIEL, M.A.M.; PINTO, A.C.; JUNIOR, V.F.V.; GRYNBERG, N.F.; ECHEVARRIA, A. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25, n. 3, 429-438, 2002.

MORAES, S. M.; MACHADO, M. I. L. Essential oil of *Casearia grandiflora* Camb. **Journal of Essential Oil Research**, v. 9, p. 697-698, 1997.

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

NEWMAN, M. B.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Last 25 Years. **Journal of natural products**, v.70, n.3, p. 461-477, 2007.

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

OLIVEIRA, A.M.; SANTOS, A.G.; SANTOS, R.A.; CSIPAK, A.R.; OLIVAT, C.; SILVA, I.C.; FREITAS, M.B.; BASSI, C.L.; CAVALHEIRO, A.J.; BOLZANI, V. S.; SILVA, D.H.S.; SAKAMOTO-HOJO, E.T.; TAKAHASHI, C.S.; SOARES, C. Ethanolic extract of *Casearia sylvestris* and its clerodane diterpen (caeargrewiin F) protect against DNA damage at low concentrations and cause DNA damage at high concentrations in mice's blood cells. **Mutagenesis**, vol. 24, n. 6, pp. 501-506, 2009.

PIERRI, E. Avaliação das atividades cicatrizante e anti-inflamatória de *Casearia sylvestris* Swartz em animais e identificação dos marcadores químicos. 2013. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Curso de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade Estadual Paulista-UNESP, Araraquara.

RASLAN, D. S.; JAMAL, C. M.; DUARTE, D. S.; BORGES, M. H.; DE LIMA, M. E. Anti-PLA2 action test of *Casearia sylvestris* Sw. **Bolletín Chimie et Farmacie**, v. 141, n. 6, p. 457-460, 2002.

RENISUS. Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS. 2009. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/RENISUS.pdf>. Acesso em: 18 ago 2013.

RUPPELT, B. M.; PEREIRA, E. F. R.; GONÇALVES, L. C.; PEREIRA, N. A. Abordagem farmacológica de plantas recomendadas pela medicina folclórica como antiofídicas. I – Atividades analgésica e antiinflamatória. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 71, n. 3, p. 54-56, 1990.

SANTOS, A. G. Identificação dos princípios ativos antiulcerogênicos do extrato das folhas de *Casearia sylvestris*: contribuição para o desenvolvimento de um fitoterápico. 2008. 335f. Tese (Doutorado em Química) – Curso de Pós-graduação em Química, Instituto de Química – Universidade Estadual Paulista-UNESP, Araraquara.

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

SANTOS, A.G.; PEREZ, C.C.; TININIS, A.G.; BOLZANI, V.S.; CAVALHEIRO, A.J. Clerodane diterpenes from leaves of *Casearia sylvestris* Swartz. **Química Nova**, v. 30, n. 5, p. 1100-1103, 2007.

SANTOS, L. C.; PELLIZZON, C. H.; ROCHA, L. R.; VILEGAS, W.; SOUZA BRITO, A.R.; CARDOSO, C. R.; VARANDA, E. A.; MORAES, H. P.; BAUAB, T. M.; CARLI, C.; CARLOS, I. Z.; HIRUMA-LIMA, C. A. *Byrsonima fagifolia*: an integrative study to validate the gastroprotective, healing, antidiarrheal, antimicrobial and mutagenic action. **Journal of Ethnopharmacology**, v.120, p. 149-160, 2008.

SASSIOTO, M. C. P.; CARDOSO FILHO, N.; FACCO, G. G.; SODRÉ, S. T.; NEVES, N.; PURISCO, S. U.; FARIAS, A. G. Efeito da *Casearia sylvestris* no reparo ósseo com matriz óssea bovina desvitalizada em ratos. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 19, n. 6, p. 637-641, 2004.

SCARAMUZZO, M. Laboratórios reforçam apostas no segmento fitoterápico. **Sindusfarma**, mar. 2012. Disponível em: <http://www.sindusfarmacomunica.org.br/ver-destaque-da-imprensa/id/527/>. Acesso em: 15 set 2013.

SCAVONE, O.; GRECCHI, R.; PANIZZA, S.; SILVA, R. A. P. S. Guaçatonga (*Casearia sylvestris* Swartz): aspectos botânicos da planta, ensaios fitoquímicos e

propriedade cicatrizante da folha. **Anais de Farmácia e Química de São Paulo**, v.19, n.1, p.73-81, 1979.

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

SCHOENFELDER, T; PICH, C.T.; GEREMIAS, R.; ÁVILA, S.; DAMINELLI, E.N.; PEDROSA, R.C.; BETTIOL, J. Antihyperlipidemic effect of *Casaria sylvestris* methanolic extract. **Fitoterapia**, v.79, p. 465-467, 2008.

SERTIÉ, J. A. A.; CARVALHO, J. C. T.; PANIZZA, S. Antiulcer activity of the crude extract from the leaves of *Casearia sylvestris*. **Pharmaceutical Biology**, v.38, n.2, p. 112-119, 2000.

SILVA, A.C.; BALZ, D.; SOUZA, J.B.D.; MORSCH, V.M.; CORRÊA, M.C.; ZANETTI, G.D.; MANFRON, M.P.; SCHETINGER, M.R.C. Inhibition of NTPDase 5'-nucleotidase, Na⁺/K⁺ - ATPase and acetylcholinesterase activities by subchronic treatment with *Casearia sylvestris*. **Phytomedicine**, v. 13, p. 509-514, 2006.

SILVEIRA P. F.; BANDEIRA, M. A. M.; ARRAIS, P. S. D. Farmacovigilância e reações adversas às plantas medicinais e fitoterápicos: uma realidade. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 4, p. 618-326, 2008.

SINGLETON, V.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTÓS, R. M. Analysis of Total Phenols and Other Oxidation Substrates and Antioxidants by Means of Folin-ciocalteu Reagent. *Methods in Enzymology*, v. 299, p. 152-178, 1999.

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, F. G.; DENARDIN, R. B. N.; MOURA, N. F.; DREVS, S. Allelopathy and genotoxic potential of *Casearia sylvestris* Sw. extracts. **Allelopathy Journal**, v. 20, n. 1, p. 195-202, 2007.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática**: guia ilustrado para identificação das famílias de angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2005. p.333.

THE ANGIOSPERM PHYLOGENY GROUP. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. **Botanical Journal of the Linnean Society**, n. 141, p. 399-436, 2003.

TININIS, A. G. **Desenvolvimento, otimização, validação e utilização de métodos de extração e análise de casearinas em *Casearia sylvestris* Sw.** 2006. 182 f. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2006.

TININIS, A. G.; ASSONUMA, M. M.; TELASCREA, M.; PEREZ, C. C.; SILVA, M. R. S. R. M.; FAVORETO, R.; CAVALHEIRO, A. J. Composição e variabilidade química de óleo essencial de *Casearia sylvestris* SW. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 8, n. 4, p. 132-136, 2006.

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.

TUROLLA, M. S. R.; NASCIMENTO, E. S. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 42, n. 2, p.289-306, 2006.

VANISREE, M.; LEE, C. Y.; LO, S. F.; NALAWADE S. M.; LIN, C. Y.; TSAY, H. S. Studies on the production of some important secondary metabolites from medicinal plants by plant tissue cultures. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, v. 45, p. 1-22, 2004.

VEIGA JUNIOR, V.F.; PINTO, A.C.; MACIEL, M.A.M. Plantas medicinais: cura segura?. **Química Nova**, v. 28, n. 3, 519-528, 2005.

VIEIRA JUNIOR, G.M. **Contribuição ao estudo dos metabólitos secundários do gênero *Casearia* e de algumas de suas atividades biológicas.**2010. 364f. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2010.

WANG W, ALI Z, LI X-C AND KHAN IA. 2010. Neolignans from the Leaves of *Casearia sylvestris* Swartz. *Helv. Chim. Acta* 93: 139-146.

WANG W, LI X-C, ALI Z AND KHAN IA. 2009a. Two new C13 *nor*-isoprenoids from the leaves of *Casearia sylvestris*. *Chem Pharm Bull* 57: 636-638. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*

WANG W, ZHAO J, WANG Y-H, SMILLIE TA, LI X-C AND KHAN IA. 2009b. Diterpenoids from *Casearia sylvestris*. *Planta Med* 75: 1476-1481.

YUNES, R. A.; PEDROSA, R. C.; CECHINEL FILHO, V. Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 147-152, 2001.

ARARAQUARA, 17 de dezembro de 2013.

Polyanna Pereira Aguilár

De acordo,

Orientador
André Gonzaga dos Santos