



**UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS**  
**ESCOLA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E RECURSOS**  
**NATURAIS DA AMAZÔNIA**

**MARIA TERESA FACHIN ESPINAR**

**ESTUDO QUÍMICO E BIOLÓGICO DE**  
***Casearia javitensis* KUNTH**

**MANAUS**  
**2015**

**MARIA TERESA FACHIN ESPINAR**

**ESTUDO QUÍMICO E BIOLÓGICO DE**  
***Casearia javitensis* KUNTH**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia da Universidade do Estado do Amazonas (UEA), como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Biotecnologia e Recursos Naturais.

**Orientadora: Profa. Dra. Cecilia Veronica Nunez**

**MANAUS**

**2015**

ESPINAR, MARIA

Estudo químico e biológico de *Casearia javitensis* KUNTH/ Maria Teresa Fachin Espinar - Manaus: UEA, 2015.

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia) - Universidade do Estado do Amazonas, 2015.

Orientador: Profa. Dra. Cecilia Veronica Nunez

*Dedicatória.*

*Á memória da minha amada mãe Luzmila,  
você sempre estará no meu coração.  
Á meu pai Manuel, pelos ensinamentos de vida,  
pela perseverança e seu infinito amor por mim.*

*“Aprendi que a coragem não é a ausência do medo, mas o triunfo sobre ele. O homem corajoso não é aquele que não sente medo, mas o que conquista esse medo”.*

Nelson Mandela.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pela fé que me mantém firme na minha caminhada, fortalecendo o meu coração com seu infinito amor, bondade e presença na minha vida, por ter colocado no meu caminho as pessoas que foram o meu suporte e companhia neste período de estudos e trabalho.

A minha orientadora Dra Cecilia Veronica Nunez, pela orientação, principalmente pela acolhida e confiança em mim depositada. Pela paciência e pelos ensinamentos, a minha eterna gratidão.

À minhas irmãs Tania, Nathalie, por acreditar em mim, mesmo estando longe, me demonstraram o seu carinho e apoio constante.

À minha família em Manaus, em especial a minha prima Blanca, por seu amor, compreensão, ajuda e por aguentar minhas horas de estresse e ansiedade no tempo do meu mestrado.

À minha amiga Lorena Cursino, pela grande amizade, pelo apoio, por estar sempre me dando forças, pelos conselhos, e por estar sempre pronta em ajudar o que me fez sentir que nunca estou só.

À minha amiga Laila Pedroza, amiga de todas as horas, pelas nossas longas conversas, risadas e brincadeiras que só a gente entende, e pela ajuda nas horas de trabalho.

Às minhas queridas amigas Daiane Martins, Giselle Mendes, pela amizade, pela força e apoio, por me ajudarem com o meu “*portunhol*”, pela paciência, muito obrigada.

Aos amigos que sempre estiveram junto comigo, pela sincera amizade e apoio: Rodrigo, David, Manoel, Izabel, Lais, Jessica e Juliana.

Aos colegas do Laboratório 2, Maria Carolina, pela realização dos testes biológicos, Fabielle pela realização das amostras de RMN, e aos demais, Vanessa, Tais, Jaci, Sabrina, Kissinara, Felipe, Julio, Fabiane, Paula, Anne, Juliana, Luana e Weison.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia (MBT – UEA).

Aos professores e colegas de curso do Mestrado em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia.

Ao CNPq, PPBio, CENBAM e CAPES, pelo apoio financeiro para realização deste projeto.

A todos que de alguma forma, direta ou indiretamente, me auxiliaram na execução deste projeto.

## RESUMO

No Brasil, especialmente na região Amazônica, existe uma grande biodiversidade de espécies vegetais que ainda não foram estudadas química e biologicamente. Nesse sentido, o presente trabalho teve como objetivo realizar o estudo químico e biológico dos extratos de *Casearia javitensis* Kunth. Assim os extratos hexânicos e metanólicos bem como as fases obtidas dos extratos metanólicos dos galhos e das folhas de *Casearia javitensis* foram testados para determinar seu potencial antibacteriano, mediante o método de difusão em poço, também para verificar a atividade antioxidante (DPPH e  $\text{Fe}^{3+}$ /fenantrolina), e de toxicidade frente à *Artemia salina*. As frações obtidas da fase acetato de etila dos extratos metanólicos das folhas e dos galhos apresentaram um alto potencial antioxidante, sendo que a análise em CCDC dessa fração foi positiva com  $\text{FeCl}_3$ , indicando a possível presença de substâncias fenólicas. Os extratos hexânicos dos galhos e das folhas apresentaram atividade frente às bactérias *Corynebacterium glutamicum*, *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus*. Os extratos metanólicos de folhas e galhos foram ativos frente às bactérias *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Serratia marcescens*. Os ensaios frente à *A. salina* mostraram que nenhum dos extratos foram considerados como tóxicos. O fracionamento dos extratos hexânicos e metanólicos das folhas permitiu o isolamento de duas substâncias: o  $\beta$ -sitosterol e o 4-hidroxifenil-6-cafeoil- $\beta$ -L-glicosídeo (um fenol-glicosídeo), respectivamente, as quais foram identificadas através da análise dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  e de espectrometria de massas.

Palavras-chave: Antioxidante, fenol-glicosídeo, atividade antibacteriana, *Artemia salina*

## ABSTRACT

In Brazil, especially in the Amazon region, there is a great biodiversity of plant species that have not been studied chemically and biologically yet. Therefore the aim of the present study was to perform chemical and biological studies of *Casearia javitensis* Kunth extracts. Then the hexanic and methanolic extracts as the fractions obtained from the methanolic extract of the branches and leaves from *Casearia javitensis* have been tested in order to identify the antimicrobial activity by diffusion method well, antioxidant activity (DPPH and Fe<sup>3+</sup>/phenanthroline) and toxicity against *Artemia salina*. The fractions of ethyl acetate phase obtained from the methanol extracts of the leaves and branches showed a high antioxidant potential, and the analysis by TLC of these fractions were revealed with FeCl<sub>3</sub>, indicating the presence of phenolic compounds. The hexanic extract of the branches and leaves showed activity against the bacteria: *Corynebacterium glutamicum*, *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus*. The methanolic extracts of leaves and branches were active against *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* and *Serratia marcescens*. The assay against *A. salina* showed that none of these extracts were considered toxic. The fractionation of the hexane and methanolic extracts of the leaves yielded two compounds:  $\beta$ -sitosterol and 4-hydroxyphenyl-6-caffeoyl- $\beta$ -L-glycoside (a phenol-glycoside), respectively, which were identified by <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR analysis and mass spectrometry.

**Keywords:** Antioxidant, phenol glycoside, antibacterial, *Artemia salina*



## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO I

|   |    |
|---|----|
| Tabela 1. Dados de RMN de $\delta_H$ de 4-hidroxifenil-6-cafeoil- $\beta$ -L-glicosídeo em CD <sub>3</sub> OD, comparados com a literatura.....   | 43 |
| Tabela 2. Resultado da atividade antibacteriana dos extratos e frações de <i>Casearia javitensis</i> , pelo método de difusão em poço. ....   | 46 |
| Tabela 3. Escala para interpretação dos resultados da atividade antioxidante.....   | 47 |
| Tabela 4. Resultados da avaliação da capacidade antioxidante de extratos e fases de <i>Casearia javitensis</i> obtidos pelas metodologias de DPPH e Fe <sup>3+</sup> /Fenantrolina..... | 47 |
| Tabela 5. Ensaio de toxicidade dos extratos de <i>C. javitensis</i> .....   | 48 |

## LISTA DE FIGURAS

### INTRODUÇÃO

|   |    |
|---|----|
| Figura 1. Uma visão simplificada das principais vias de biossíntese de metabólitos secundários e sua correlação com o metabolismo primário..... | 16 |
| Figura 2. Alguns exemplos de metabólitos secundários, com propriedades farmacológicas. .  | 18 |
| Figura 3. Esquema de processo de descoberta de produtos naturais. ....  | 19 |
| Figura 4. Esqueletos carbônicos de flavonoides com atividade antioxidante. ....   | 24 |
| Figura 5 Ocorrência mundial do gênero <i>Casearia</i> (MOBOT). ....   | 27 |
| Figura 6. Moléculas isoladas de <i>Casearia</i> .....   | 31 |
| Figura 7. A-- <i>Casearia javitensis</i> jovem de porte arbóreo. B-- Detalhe das folhas de <i>Casearia javitensis</i> .....                     | 31 |

### CAPITULO I

|   |    |
|---|----|
| Figura 1. Correlações observadas no espectro de RMN gCOSY, observados para a substância 2. .... | 42 |
|---|----|

## SUMÁRIO

|        |   |    |
|--------|---|----|
| 1      | INTRODUÇÃO.....   | 12 |
| 2      | REFERENCIAL TEÓRICO.....  | 14 |
| 2.1.   | Reconhecimento de Produtos Naturais.....  | 14 |
| 2.2.   | Biodiversidade de plantas no Brasil.....  | 14 |
| 2.3.   | Metabólitos secundários.....  | 14 |
| 2.4.   | Metodologias para buscar substâncias bioativas.....   | 18 |
| 2.4.1. | Monitoramento bioguiado.....  | 18 |
| 2.4.2. | Avaliação dos extratos, fracionamento e posterior ensaio biológico da substância isolada..... | 19 |
| 2.5.   | Bioensaios.....   | 20 |
| 2.6.   | Ensaio Antibacterianos.....   | 20 |
| 2.6.1. | Métodos de difusão.....   | 22 |
| 2.6.2. | Métodos de diluição.....  | 22 |
| 2.7.   | Antioxidantes.....  | 23 |
| 2.8.   | Toxicidade frente à <i>Artemia salina</i> .....   | 25 |
| 2.9.   | Espécie vegetal.....  | 25 |
| 2.9.1. | Família Salicaceae.....   | 25 |
| 2.9.2. | Gênero <i>Casearia</i> .....  | 26 |
| 2.9.3. | <i>Casearia javitensis</i> Kunth.....   | 31 |
| 3      | OBJETIVOS.....  | 32 |
|        | Objetivo geral.....   | 32 |
|        | Objetivos específicos.....  | 32 |
|        | CAPÍTULO I.....   | 33 |
|        | Coleta e identificação do material vegetal.....   | 36 |
|        | Análises fitoquímica.....   | 37 |
|        | Avaliação da atividade antibacteriana.....  | 38 |
|        | Atividade antioxidante.....   | 39 |
|        | Toxicidade frente a <i>Artemia salina</i> .....   | 40 |
|        | RESULTADOS E DISCUSSÃO.....   | 40 |
|        | CONCLUSÃO.....  | 48 |
|        | REFERÊNCIAS.....  | 49 |
|        | ANEXOS.....   | 56 |

## 1 INTRODUÇÃO

O uso terapêutico das plantas certamente vem desde muito tempo, com as civilizações Suméria e Acádica. Os produtos naturais formam uma parte integral dos antigos sistemas de medicina tradicional, como é o caso da China e o Egito, os quais inclusive até hoje continuam usando terapias com produtos naturais tradicionais, especialmente no oriente (SATYAJIT e SARKER, 2007). De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), aproximadamente 3,4 bilhões de pessoas ao redor do mundo dependem da medicina tradicional baseada em plantas (WHO, 2005).

Entre os medicamentos aprovados, entre 1981 a 2006, pelo FDA, 50% são direta ou indiretamente derivados de produtos naturais (FERREIRA, 2010).

Em algumas áreas terapêuticas, a contribuição de produtos naturais tem sido muito grande, onde 65% e 34% das drogas antibacterianas e anticancerígenas respectivamente (aprovadas pela FDA entre 1981 e 2010), são produtos naturais ou análogos estruturais de produtos naturais. Em 2000 cerca de 60% de todas as drogas em ensaios clínicos para diversos tipos de câncer eram de origem natural (NEWMAN E CRAGG, 2012). As plantas produzem uma grande variedade de compostos orgânicos, a maioria dos quais não participa diretamente no seu crescimento e desenvolvimento. Essas substâncias são conhecidas como metabólitos secundários, tem uma distribuição dependente e limitada aos diferentes grupos taxonômicos que compõem o reino das plantas. Suas funções, muitas vezes desconhecidas, vêm sendo cada vez mais estudadas e elucidadas com maior frequência (BRISKIN, 2000).

Os produtos naturais têm gerado muito interesse, principalmente devido à capacidade de produzir diversos metabólitos secundários com atividades biológicas importantes. Esse interesse não é somente acadêmico, muitos deles apresentam utilidades como, por exemplo, polímeros, fibras, gomas, óleos, aromatizantes, perfumes e drogas (VIEGAS et al., 2006).

O reconhecimento das propriedades biológicas (antibacterianos, antioxidantes, entre outros) presentes em muitos dos produtos naturais tem incrementado o foco atual desse campo, ou seja, a busca de novos produtos que possam ser usados como medicamentos, inseticidas e herbicidas ( HARVEY et al., 2015).

Devido uma grande parte dos medicamentos que está no mercado, ter sua origem de produtos naturais, em especial das plantas, o Brasil, com uma enorme diversidade, pode contribuir amplamente para o desenvolvimento de novos medicamentos produzidos a partir de plantas (FERREIRA et al., 1998).

Dentro dessa enorme biodiversidade florística encontra-se nas regiões tropicais do Brasil, uma grande variedade de plantas que compõe a família Salicaceae. Esta apresenta árvores muito prolíferas produtoras de compostos fenólicos, salicilatos comumente chamados de glicosídeos fenólicos, também apresenta taninos, entre outros compostos (ALVES et al., 2007; MOSADDIK et al., 2004).

O gênero *Casearia* pertencente à família Salicaceae, está representado por mais de 180 espécies descritas na literatura, das quais 70 encontram-se distribuídas no continente americano e 37 estão presentes no Brasil (MARQUETE, 2007). Entre as espécies mais representativas e estudadas do gênero estão a *Casearia sylvestris*, a qual demonstrou ter atividade citotóxica (VIEIRA-JUNIOR et al., 2011), anti-inflamatória e antioxidante (ALBANO et al., 2013).

Quimicamente, as espécies do gênero *Casearia* são conhecidas pelo fato de apresentarem na sua composição vários diterpenos, triterpenos e ácidos hexanoicos e caproicos (PRIETO et al., 2013). Sendo que na literatura revisada não foram encontrados estudos químicos e biológicos aprofundados sobre a espécie *C. javitensis*, portanto o objetivo do estudo foi avaliar as atividades biológicas de *Casearia javitensis* Kunth e identificar as classes de metabólitos secundários presentes em cada extrato.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1. Reconhecimento de Produtos Naturais

Na história da humanidade o homem sempre buscou combater as doenças que o afetavam, às vezes, por acaso, observando outros animais doentes que consomem certas ervas, o homem aprendeu que as plantas poderiam ser um grande aliado na luta contra as doenças. Desde então, as plantas foram as maiores fornecedoras dos mais variados modelos de moléculas com propriedades bioativas. Além das plantas serem utilizadas para aliviar as doenças, também foram usadas como alucinógenas e como parte das crenças religiosas (VIEGAS, BOLZANI e BARREIRO, 2006).

### 2.2. Biodiversidade de plantas no Brasil

O desenvolvimento do comércio no Brasil, sempre teve uma estreita relação com os produtos naturais (especiarias, bálsamos e essências), desde o pau-brasil (*Caesalpinia echinata*), do qual era obtido um corante de cor vermelha, muito utilizado e comercializado na Europa para tingimento de roupas e como tinta de escrever, até a cana-de-açúcar como uma importante fonte de ingressos econômicos para o país (PINTO, 1995).

Devido a grande diversidade de espécies vegetais, estima-se que a flora mundial possua entre 250 mil e 500 mil espécies. Dentro do território brasileiro são encontradas aproximadamente 120 mil espécies, já que a cada ano são descobertas novas espécies o que contribui com o incremento destas cifras, a localização desta flora no Brasil está especialmente concentrada na região amazônica. Cerca de duas mil plantas são usadas como medicinais e apenas 10% foram cientificamente investigadas do ponto de vista químico-farmacológico (DI STASI e HIRUMA-LIMA, 2002).

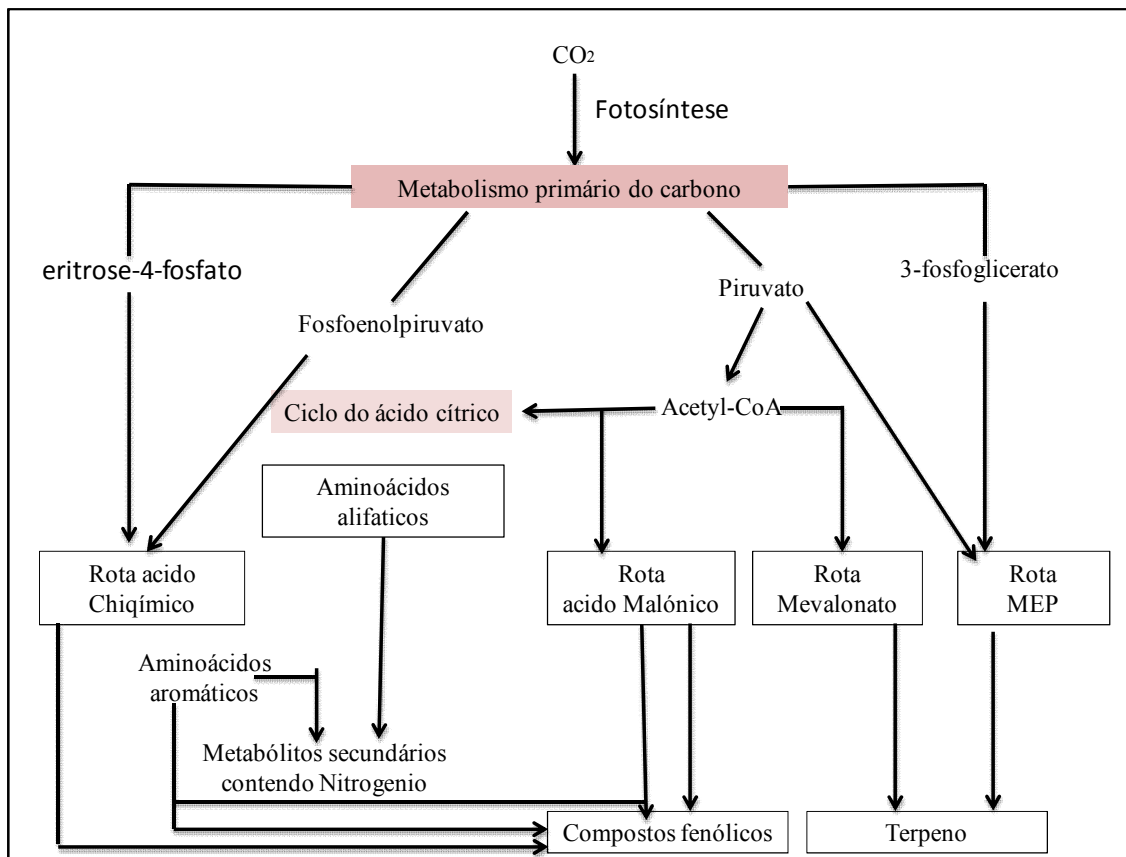
### 2.3. Metabólitos secundários

O metabolismo dos organismos vivos, através das diversas rotas biossintéticas, gera uma grande variedade de metabólitos, os quais são substâncias que participam nos mais diversos tipos de funções. Os metabólitos primários são aquelas moléculas que intervêm diretamente em processos essenciais que determinam a sobrevivência, crescimento e reprodução das plantas. Por outro lado, os metabólitos secundários são aqueles compostos químicos cuja biossíntese é restrita a algumas espécies de organismos vivos, que cumprem funções não essenciais nas plantas, por tal razão a sua falta não compromete seu desenvolvimento (DA SILVA, DOS SANTOS e BIANCHI, 2010).

Embora o metabolismo secundário nem sempre seja necessário para que uma planta complete seu ciclo de vida, ele desempenha um papel importante na interação das plantas com o meio ambiente, a fim de resolver situações específicas enfrentadas pelos organismos produtores em um momento particular como o ataque de micro-organismos patógenos, competição entre plantas e herbivoria (BUCHANAN, 2002). Tendo também o papel de atração de organismos benéficos como polinizadores, dispersores de sementes e micro-organismos simbiotes (BIDLACK et al., 2000).

Os fatores bióticos e estresses abióticos (como aqueles associados com mudanças de temperatura, conteúdo de água, níveis de luz, exposição a UV e deficiência de nutrientes minerais) influenciam na produção dos metabólitos (BRISKIN, 2000; TAIZ e ZEIGER, 2010).

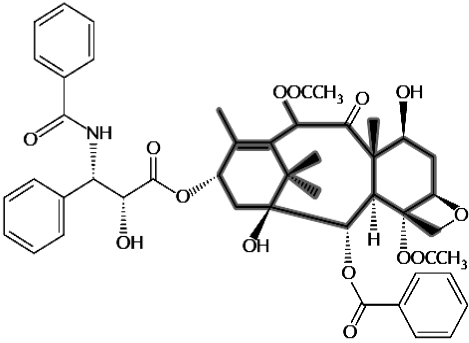
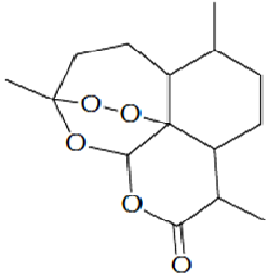
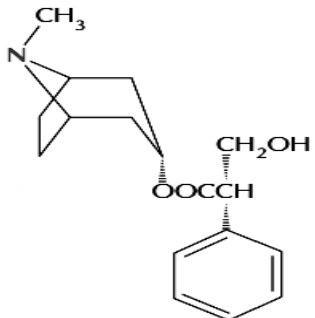
Os metabólitos secundários produzidos pelas plantas podem ser divididos em três grupos quimicamente diferentes: terpenos, compostos fenólicos e alcaloides (Figura 1). Os terpenos são biossintetizados a partir da acetyl-CoA através do ácido mevalônico (no citoplasma) ou dos intermediários glicolíticos como o piruvato e 3-fosfoglicerato (no cloroplasto). Os compostos fenólicos são derivados do ácido chiquímico e alguns têm biossíntese mixta com o acetato. Por fim, os alcaloides são derivados de aminoácidos aromáticos (triptofano, tirosina), os quais são derivados do ácido chiquímico, e também de aminoácidos alifáticos (ornitina, lisina) (BUCHANAN, 2002).

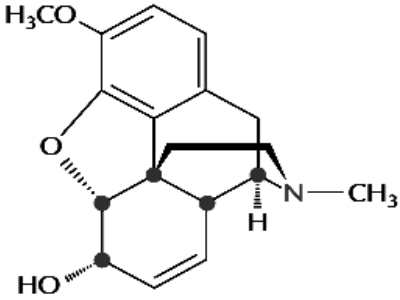
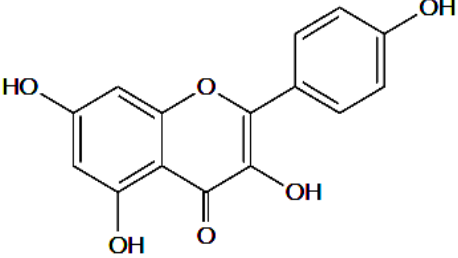


**Figura 1.** Uma visão simplificada das principais vias de biossíntese de metabólitos secundários e sua correlação com o metabolismo primário (TAIZ e ZEIGER, 2010).

Muitas plantas tem a capacidade de produzir diversos tipos de moléculas, as quais exercem um profundo efeito fisiológico em sistemas dos mamíferos ou outros animais, assim, eles são conhecidos como o princípio ativo das plantas, convertendo-se na principal fonte de produtos farmacêuticos, aditivos alimentares, aromas e pesticidas. Com a descoberta do efeito fisiológico de uma determinada planta (Figura 2) são feitos esforços para conhecer a natureza química exata destas drogas (chamado princípio ativo) (RAMAWAT, 2009).



| ESTRUTURA  | ESPÉCIE VEGETAL          | PROPRIEDADES                       |
|--|--------------------------|------------------------------------|
|  <p><b>TAXOL</b> (terpenos)</p>         | <i>Taxus brevifolia</i>  | Anticancerígeno                    |
|  <p><b>ARTEMISININA</b> (terpenos)</p> | <i>Artemisia annua</i>   | Antimalárico                       |
|  <p><b>ATROPINA</b> (alcaloide)</p>   | <i>Atropa belladonna</i> | Vasodilatadora,<br>anticolinérgica |

|   |                                      |   |
|---|--------------------------------------|---|
|  <p><b>CODEINA</b> (alcaloide)</p>     | <p><i>Papaver<br/>somniferum</i></p> | <p>Analgésico,<br/>Antitússico</p>  |
|  <p><b>KAEMPFEROL</b> (flavonoide)</p> | <p><i>Glycine max</i></p>            | <p>Protetor UV-B, redutor<br/>substancial na incidência<br/>de câncer de próstata e<br/>mama.</p> |

**Figura 2.** Alguns exemplos de metabólitos secundários, com propriedades farmacológicas (SATYAJIT D. SARKER, 2007).

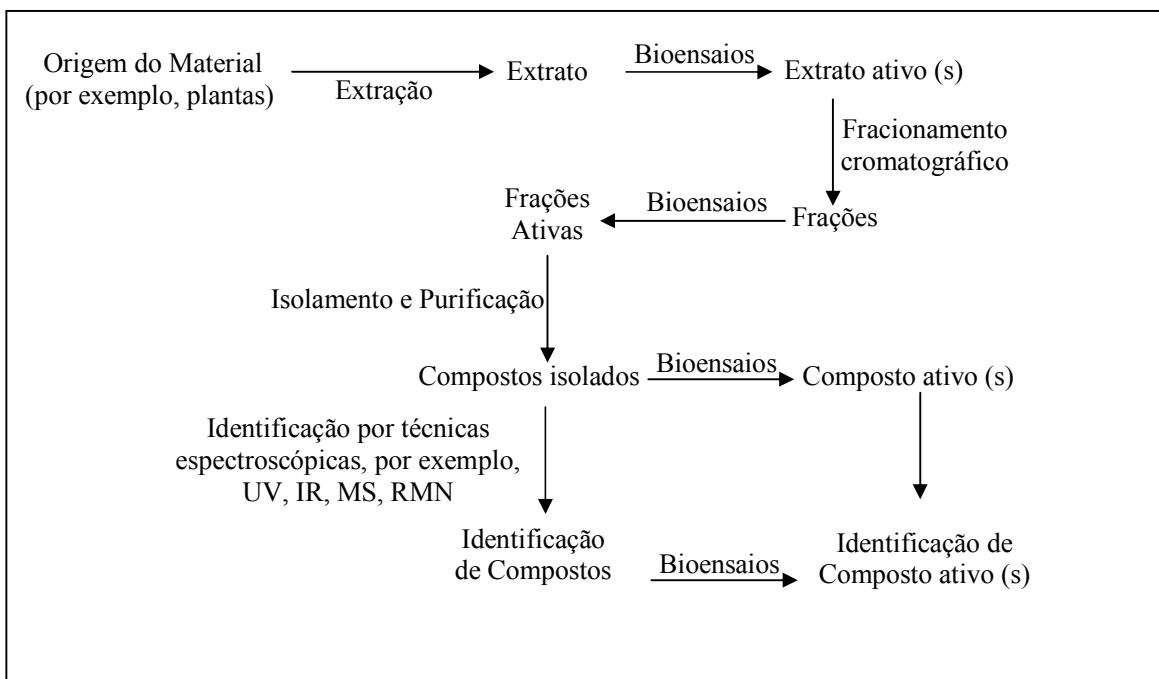
#### 2.4. Metodologias para buscar substâncias bioativas

Substâncias bioativas são encontradas em diversas matrizes vegetais como raízes, sementes, folhas, caule, flores e frutos. A importância desses produtos está não somente no seu uso *in natura*, mas também como base para a formulação de novos produtos alimentícios, cosméticos ou medicinais. Para esse uso industrial, muitas vezes é requerido o isolamento das substâncias ativas. Esta busca pode ser feita através do fracionamento biomonitorado ou bioguiado ou de forma mais clássica, através do fracionamento dos extratos ativos e posterior avaliação das substâncias isoladas nos ensaios para o qual o extrato foi ativo (LAHLOU, 2013)

##### 2.4.1. Monitoramento bioguiado

Tradicionalmente, o método de descoberta de medicamentos a partir de produtos naturais começa por avaliar os extratos brutos, no caso de dar um resultado positivo, o extrato é fracionado e o princípio ativo isolado é identificado. Cada passo do fracionamento é geralmente guiado por um bioensaio e o processo é chamado de isolamento guiado por bioensaio (SATYAJIT D. SARKER, 2007).

O esquema a seguir (Figura 3) apresenta uma visão geral do processo tradicional biomonitorado de descoberta de drogas de um produto natural.



**Figura 3.** Esquema de processo de descoberta de produtos naturais (SATYAJIT D. SARKER, 2007).

#### 2.4.2. Avaliação dos extratos, fracionamento e posterior ensaio biológico da substância isolada

Às vezes opta-se pelo isolamento de produtos naturais, independentemente da bioatividade, o que resulta no isolamento de um determinado número de substâncias adequado para serem utilizados posteriormente numa triagem biológica; devido a que alguns bioensaios requerem de quantidades grandes da substância como, por exemplo, o teste inseticida, ou em outros casos são testes com um elevado custo, o que dificulta muitas vezes realizar um fracionamento biomonitorado (SATYAJIT D. SARKER, 2007).

O processo para este tipo de metodologia começa com a avaliação biológica e também fitoquímica dos extratos vegetais através do uso de técnicas como a cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC) e de reveladores químicos e físicos. Assim, escolhe-se o extrato a fracionar, seja por apresentar elevada atividade biológica ou por indicar a presença de metabólitos de interesse para o grupo de pesquisa. Uma vez escolhido o extrato, são realizadas diversas análises por CCDC, com a finalidade de obter as condições adequadas para o fracionamento. O fracionamento é realizado utilizando para isto diferentes técnicas como a cromatografia em coluna aberta, partição líquido-líquido, cromatografia em camada delgada preparativa, cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), entre outras. Finalmente

as substâncias isoladas são identificadas e avaliadas quanto a suas atividades biológicas através dos bioensaios (AZMIR et al., 2013).

### **2.5. Bioensaios**

Os bioensaios podem ser definidos como todos aqueles testes que são usados para determinar a atividade biológica de um extrato vegetal ou uma substância isolada a partir de um extrato. As etapas pré-clínicas (uso de animais) e clínicas (com seres humanos, fase I, II e III) são posteriores e obrigatórias para se tornar um medicamento (HOUGHTON, 2000).

Uma das principais características do processo de descoberta de drogas nos últimos 30 anos tem sido a introdução em pequena escala em sistemas de ensaios biológicos *in vitro*, que podem testar muitas amostras para a atividade em um curto período de tempo e, assim, proporcionar resultados do teste com um número de réplicas suficiente para efetuar a análise estatística, como o caso dos testes antibacterianos, antioxidantes e de toxicidade frente à *Artemia salina* (BRISKIN, 2000).

### **2.6. Ensaios Antibacterianos**

O corpo humano é habitado por milhares de diferentes espécies bacterianas, algumas vivendo de forma transitória, outras numa relação parasítica permanente. Do mesmo modo as bactérias estão presentes no ambiente que nos cerca, incluindo o ar que respiramos, sendo que muitas destas bactérias são relativamente inofensivas, mas outras são capazes de produzir doenças que ameaçam a vida (MURRAY, ROSENTHAL e PFALLER, 2010).

As bactérias que têm a propriedade de causar doenças ou lesões podem resultar pela presença de toxinas que estas produzem, ou quando a bactéria invade sítios anatômicos que são normalmente estéreis. Os mecanismos das interações entre um micro-organismo infectante e o hospedeiro humano são complexos, a capacidade de aderência microbiana, o sítio de exposição e a habilidade do hospedeiro em responder ao micro-organismo, determinam o resultado da interação (VERONESI e FOCACCIA, 2002).

O corpo humano é notadamente adaptado em controlar a exposição a micróbios patogênicos, embora essa resposta imune seja frequentemente muito lenta ou tardia. As infecções também podem ser controladas com uma variedade de agentes terapêuticos, infelizmente muitos micróbios podem desenvolver resistência até aos mais potentes antibióticos (MURRAY, ROSENTHAL e PFALLER, 2010).

A utilização bem sucedida de qualquer agente terapêutico é comprometida pelo desenvolvimento potencial de tolerância ou resistência a este composto a partir do momento

em que é utilizado pela primeira vez. Isto é verdade para os agentes utilizados no tratamento de infecções bacterianas, fúngicas, parasitárias e virais e para o tratamento de doenças crônicas, como câncer e diabetes, que se aplica a doenças causadas ou sofridas por todos os organismos vivos, incluindo os seres humanos, animais, peixes, plantas, insetos, etc. Uma grande variedade de mecanismos fisiológicos e bioquímicos podem ser responsáveis pela resistência (DAVIES e DAVIES, 2010).

As infecções causadas por bactérias multirresistentes são um problema crescente devido ao surgimento e propagação da resistência a medicamentos antimicrobianos, e a falta de desenvolvimento de novos antimicrobianos. Os métodos tradicionais de descoberta de antibióticos não conseguiram manter o ritmo com a evolução da resistência. Portanto, novas estratégias para controlar infecções bacterianas são altamente desejáveis (ABREU, MCBAIN e SIMOES, 2012).

Metabólitos secundários de plantas já demonstraram seu potencial como antibacterianos quando usados sozinhos ou em sinergia com outros metabólitos e ainda potencializadores de outros agentes antibacterianos. O uso de produtos fitoquímicos e extratos de plantas como agentes modificadores de resistência (RMAs) representa um tema de pesquisa cada vez mais ativa. Fitoquímicos atuam frequentemente através de diferentes mecanismos do que os antibióticos comerciais e podem, portanto, ser úteis no tratamento de bactérias resistentes. A utilidade terapêutica destes produtos deve ser clinicamente comprovada (DAVIES e DAVIES, 2010; SIMOES, BENNETT e ROSA, 2009).

A primeira geração de drogas vegetais era geralmente empregada em sua forma bruta. Vários medicamentos eficazes utilizados no seu estado natural, como quina, ópio, beladona e aloe foram selecionados como agentes terapêuticos com base em evidências empíricas de sua aplicação clínica por sociedades tradicionais de diferentes partes do mundo. Após a revolução industrial, uma segunda geração de medicamentos à base de plantas surgiu com base em processamento científico da planta para isolar "os seus componentes ativos" (IWU, DUNCAN e OKUNJI, 1999).

Os agentes fitofarmacêuticos de segunda geração eram moléculas puras e alguns dos compostos foram ainda mais farmacologicamente ativos do que os seus análogos sintéticos. Exemplos notáveis foram a quinina de *Cinchona*, reserpina de *Rauvolfia* e, mais recentemente taxol a partir de espécies de *Taxus* (IWU, DUNCAN e OKUNJI, 1999).

Atualmente existem diversas técnicas de triagem para definir se o extrato de uma determinada planta possui atividade antimicrobiana, desde as mais simples, que podem ser realizadas rotineiramente, até as mais sofisticadas, que muitas vezes se tornam indisponíveis

em alguns laboratórios. Apesar disso, há poucos estudos que relatam qual o melhor método de triagem a ser utilizado de acordo com o tipo de extrato a ser testado, mesmo no que se refere às técnicas mais simples (ALVES et al., 2008).

Os métodos para avaliar a atividade antibacteriana estão classificados, em três grupos principais: métodos de difusão, métodos de diluição e bioautografia. As técnicas de difusão têm sido amplamente usadas para avaliar extratos de plantas com atividade antimicrobiana (RAMIREZ e CASTANO, 2009).

### **2.6.1. Métodos de difusão**

O método de difusão em ágar é uma das técnicas mais usadas dentro da rotina dos laboratórios de análise clínica e recomendada pela Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI 2002). Através desta técnica é possível avaliar a inibição do crescimento de bactérias, utilizando-se diferentes tipos de reservatórios, como discos de papel filtro impregnados com a substância avaliada os quais são colocados na superfície do meio de cultura previamente inoculado com as bactérias ou realizando poços nessa superfície onde é colocada uma concentração conhecida do antibacteriano, posteriormente é observado a correlação entre a concentração da substância e a capacidade para gerar halos de inibição ao redor dos discos ou poços, o que representa o potencial antibacteriano das substâncias avaliadas (SILVA, et. al., 2005; VALGAS, et. al., 2007).

### **2.6.2. Métodos de diluição**

O método de diluição em caldo é uma técnica *in vitro*, que pode ser realizada através de macrodiluição em tubos, e microdiluição em microplacas de 96 poços, os quais são preparados adicionando-se concentrações seriadas da substância que esta sendo avaliada, colocando-se uma solução padrão do inóculo das bactérias teste, sendo estas posteriormente incubadas durante 24 horas (VALGAS, et. al., 2007).

Após o período de incubação é possível medir de forma quantitativa a atividade de uma determinada substância antimicrobiana frente às bactérias, determinando a concentração mínima inibitória (CMI) a qual é definida como a concentração mais baixa da substância testada capaz de inibir o crescimento bacteriano após o tempo de incubação. E a concentração mínima bactericida (CBM) considerada como aquela concentração da substância testada capaz de evitar ou impedir o crescimento de bactérias, a qual é determinada depois de realizar-se uma subcultura em placas de ágar sem o antibacteriano, com o conteúdo dos poços onde não houve aparente crescimento de bactérias no ensaio do CMI (CLSI 2002).

### 2.6.3 Bioautografia

É um método de avaliação da atividade antibacteriana no qual utiliza-se a cromatografia em camada delgada comparativa, onde as amostras são aplicadas e desenvolvidas em placas cromatográficas usando-se os solventes adequados que permitam a separação dos compostos presentes no extrato ou fração. Posteriormente as placas cromatográficas são colocadas em placas de Petri, sobre as quais são colocados os meios de cultura contendo os inóculos com as bactérias. O princípio do método corresponde ao método de difusão em Agar, observando-se também a formação de halos de inibição onde houver substâncias antibacterianas presentes no extrato ou fração (o que indica atividade).

### 2.7. Antioxidantes

Os antioxidantes são substâncias químicas ou produtos biológicos que neutralizam de uma forma direta ou indireta os efeitos nocivos dos radicais livres ou oxidantes (ZAMORA, 2007), sendo esses radicais livres produzidos por funções celulares normais ou ainda induzidos por diferentes fatores ambientais ou fisiológicos tais como a radiação ultravioleta e exercício físico extenuante (COUTINHO et al., 2009).

Entre os radicais livres estão incluídos o radical hidroxila (OH), o ânion superóxido ( $O_2^-$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e óxido nítrico (NO). Tais espécies, devido à sua elevada reatividade química, podem levar a uma peroxidação lipídica, oxidação de certas enzimas, a oxidação e degradação de proteínas e aos danos mutagênicos no ácido desoxirribonucleico (ADN) (GENESTRA, 2007).

Através de reações de oxidação-redução, a modificação de uma variedade de moléculas envolvidas na maioria das vias de sinalização celular, ou, moléculas da matriz extracelular podem ver-se afetadas pela ação dos radicais livres e sua produção pode aumentar de uma maneira descontrolada, a qual é conhecida como situação de estresse oxidativo (LOPEZ et al., 2012).

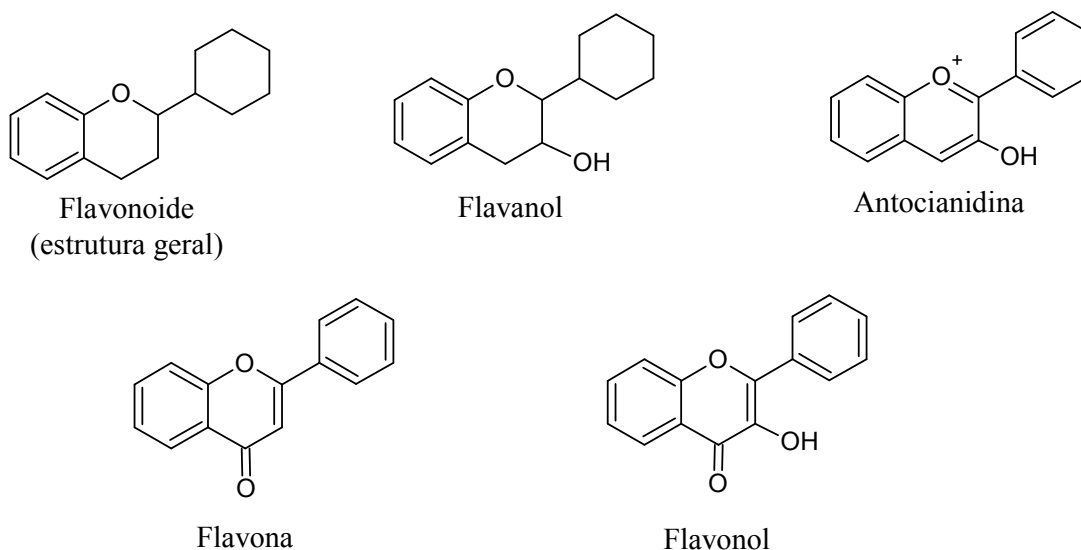
Diversos estudos demonstram que os radicais livres são os responsáveis pelo desenvolvimento de doenças degenerativas como câncer, diabetes, doenças cardiovasculares, hipertensão, e doenças neuro-degenerativas como Alzheimer, o que motivou o interesse pelos compostos antioxidantes no intuito por combater tais doenças assim como melhorar a qualidade de vida das pessoas que delas padecem (KORGE et al., 2008; MANSUROGLU et al., 2014; YING et. al., 2013).

Sendo a morte celular um processo irreversível de oxidação, por conseguinte, um antioxidante eficaz, deve parar o processo degenerativo que termina com a morte da célula

(PHAM-HUY et al., 2008). Compostos derivados de plantas com atividade antioxidante têm sido isolados das mais diversas famílias de plantas, sendo os compostos fenólicos as substâncias mais representativas desta atividade (RAMAWAT, 2009).

Uma alta proporção de flavonoides ocorre naturalmente como glicosídeos solúveis em água. Quantidades consideráveis de flavonoides são consumidas diariamente em nossa dieta quando há consumo de vegetais. Alguns flavonoides são particularmente benéficos, atuando como antioxidantes (Figura 4) e dando proteção contra doenças cardiovasculares e certos tipos de câncer. Sua natureza fenólica lhes permite neutralizar os radicais livres prejudiciais, tais como superóxido e radicais hidroxilas (ALVES et al., 2007; SATYAJIT D. SARKER, 2007).

A quercetina, em particular, é quase sempre presente em quantidades substanciais em tecidos da planta, e é um poderoso antioxidante, quelante de metais, eliminador de radicais livres, e impede a oxidação da lipoproteína de baixa densidade. Os flavonóides no vinho tinto (quercetina, kaempferol e antocianidinas) e no chá (catequinas e ésteres catequina galato) também demonstraram serem antioxidantes eficazes. Os flavonóides contribuem para as cores nas plantas, amarelos de chalconas e flavonóis, e vermelhos, azuis e violetas de antocianidinas (DEWICK, 2002).



**Figura 4.** Esqueletos carbônicos de flavonoides com atividade antioxidante (CASTAÑEDA, RAMOS e IBANÉZ, 2008).

Vários ensaios para avaliar a atividade de varredura do radical livre e potencial redox são descritos na literatura. O ensaio espectrofotométrico com 2,2-difenil-1-(2,4,6-trinitrofenil)-hidrazila (DPPH) é um teste simples e amplamente utilizado. DPPH é um



radical livre estável, não natural. Os radicais de oxigênio reativos, tais como hidroxila, alcoxila, e superóxido, os quais desempenham um importante papel nos processos biológicos oxidativos, são reduzidos pelo radical DPPH. Inúmeras séries de compostos químicos apresentaram uma correlação estreita entre a atividade do DPPH e um determinado antioxidante em ambos os modelos biológicos e não biológicos (CHEN, BERTIN e FROLDI, 2012).

Os compostos químicos, como polifenóis, entre outros, têm a capacidade para capturar e deslocar elétrons, fornecendo essas substâncias com propriedades oxidantes. Assim, o ensaio de eliminador de radical livre de DPPH apresenta-se como um teste de previsão do potencial da atividade antioxidante e podem ser utilizados para o rastreamento de substâncias químicas sintéticas, bem como produtos naturais (SHARMA e BHAT, 2009).

## **2.8. Toxicidade frente à *Artemia salina*.**

O camarão de água salgada, *Artemia salina* Leach, tem sido utilizado por várias décadas como um organismo teste para avaliar a toxicidade de produtos naturais e também avaliar o efeito dos produtos químicos em ambientes aquáticos. O ensaio com esse microcrustáceo é utilizado rotineiramente em laboratórios de todo o mundo para pré-triagem de extratos de plantas com potencial medicinal (por exemplo, antimicrobianos ou antiparasitários), para fracionamento biomonitorado de constituintes bioativos de extratos de plantas e para a detecção de efeitos citotóxicos (MAYORGA, et al., 2010).

Este crustáceo de água salgada é amplamente utilizado para testes de toxicidade com extratos de plantas devido à disponibilidade comercial dos cistos. As larvas eclodidas dos cistos são usadas em todo o mundo na aquicultura e em aquariologia como alimento vivo para peixes juvenis. Os cistos de *A. salina* permanecem viáveis durante muitos anos e são, por conseguinte, uma adequada fonte biológica para um bioensaio rápido, simples e barato (CARBALLO, et al., 2010) e por possuir correlação com atividade antitumoral e antibacteriana (LAGARTO, et al., 2011).

## **2.9. Espécie vegetal**

### **2.9.1. Família Salicaceae**

Salicaceae é atualmente posicionada na ordem Malpighiales e está dividida em três subfamílias: Samydoideae, Scyphostegioideae e Salicoideae. Tem distribuição cosmopolita, sendo constituída de 55 gêneros e mais de 1.010 espécies (STEVENS, 2001). No Brasil, está

representada por 19 gêneros e 100 espécies, ocorrendo em todos os domínios fitogeográficos (SOUZA e LORENZI, 2012).

Como características desta família estão a presença de árvores ou arbustos, as folhas podem ser simples, alternas ou espiraladas, pecioladas, estipuladas. Inflorescência racemosa, terminal ou axilar, e fruto tipo cápsula (VASQUEZ e WEBBER, 2010).

Espécies da família Salicaceae são economicamente importantes pelo seu uso medicinal, como no caso de espécies do gênero *Salix* que são conhecidas pela presença de salicilatos, que são glicosídeos fenólicos, das quais se extrai o ácido acetilsalicílico utilizado como base de diversos analgésicos (SOUZA e LORENZI, 2012).

Estudos químicos prévios de espécies de Salicaceae forneceram principalmente as seguintes substâncias: salicina, salicortina, 2'-cinamoilsalicortina, salicina di-glicosilada, salicilol, 2'-O-acetilsalicina, 2'-O-acetilsalicortina e *m*-hidroxibenzil- $\beta$ -D-glicosídeo (BELYANIN et al., 2012). Diversas atividades farmacológicas foram descritas para estas substâncias, destacando-se a analgésica, antiinflamatória e antioxidante (COUTINHO et al., 2009).

Algumas outras espécies têm uso ornamental, como no caso de *Salix babylonica* (chorão) e *Populus nigra* (choupo) (SOUZA e LORENZI, 2012). A madeira de espécies do gênero *Casearia* tem utilidade comercial sendo utilizada para lenha, na construção civil e para marcenaria (MARQUETE, 2007).

### **2.9.2. Gênero *Casearia***

O gênero *Casearia* é composto por cerca de 180 espécies em todas as regiões tropical e subtropicais do mundo, incluindo a África, Ásia, Austrália, América do Norte e América do Sul, e as ilhas do Pacífico (Figura 5) (XIA et al., 2014). No Brasil, são encontradas 45 espécies, sendo 19 restritas ao território brasileiro e 25 com ampla distribuição (MOBOT, 2014). O gênero *Casearia* foi descrito por Jacquin em 1760, sob o basônimo de *Samyda nitida* L. e foi incluído na tribo Casearieae (MARQUETE, 2007).



**Figura 5.** Ocorrência mundial do gênero *Casearia* (MOBOT).

A classificação taxonômica do gênero *Casearia* sempre foi controversa, tem sido subordinado a diferentes famílias, desde o século XIX aos nossos dias. Anteriormente enquadrada em Flacourtiaceae, porém estudos recentes sobre filogenia baseado em aspectos moleculares, ecológicos e morfológicos indicaram que os gêneros *Xylosma*, *Scolopia*, *Homalium*, *Idesia*, e *Casearia*, por terem uma ligação de biossíntese para a produção de glicosídeos de álcool 2,5-dihidroxibenzila estariam em Salicaceae, segundo o sistema de classificação APG II (MARQUETE, 2007; XIA et al., 2014).

A morfologia deste gênero é descrito como: arbustos ou pequenas árvores; folhas alternativas, geralmente pecioladas, apresentando flores bissexuais, pequenas, geralmente agrupadas em axilar (XIA et al., 2014).

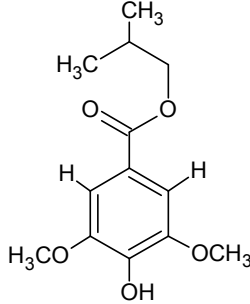
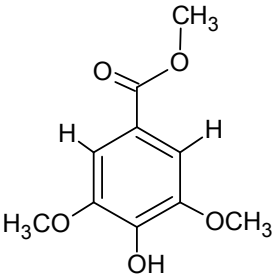
Algumas plantas do gênero *Casearia* são utilizados como parte da medicina popular para o tratamento de infecções e mordeduras de cobras. Devido às suas diversidades estruturais e farmacológicas, os metabólitos secundários destas plantas têm sido sempre um campo de pesquisa atraente, com o potencial de ser compostos de sucesso e, eventualmente, novas drogas terapêuticas (MATTOS et al., 2007; PRIETO et al., 2013; SILVA et al., 2008).

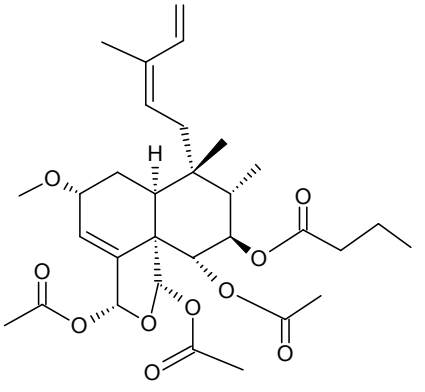
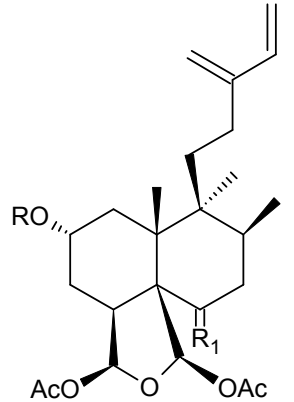
Estudos fitoquímicos anteriores sobre diferentes espécies de *Casearia* revelou a presença de terpenóides, especialmente os diterpenos oxigenados com esqueletos tricíclicos clerodânicos (FERREIRA et al., 2010). Sesquiterpenos e monoterpênos, bem como outras classes de metabólitos secundários, também foram isolados vários outros metabólitos, incluindo glicosídeos fenólicos e flavonoides (RAYANIL et al., 2012).

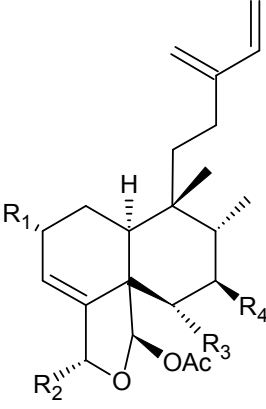
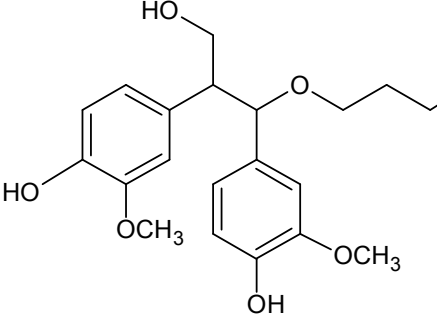
Uma série de pesquisas corroboraram as propriedades medicinais das espécies de *Casearia*, tais como citotoxicidade, hipoglicemia, veneno anti-cobra, antiúlcera e anti-inflamatório entre outro (XIA et al., 2014). Casearina X, diterpeno isolado da *C. rupestris* demonstrou fortes efeitos citotóxicos em células mononucleares de sangue periférico humano (FERREIRA et al., 2010). Assim, estudos realizados por Vieira-Junior G. e colaboradores (2011), avaliaram os extratos das folhas de *C. rupestris*, isolando quatro novos diterpenoides clerodanicos, os quais foram avaliados quanto a sua atividade citotóxica. Os resultados obtidos nos testes biológicos mostraram que ditos metabólitos apresentam uma significativa atividade citotóxica frente a quatro tipos de células.

Uma triagem fitoquímica realizada por Mossadik e colaboradores (2004) com os extratos MeOH de *Casearia costulata*, *C. grewifolia*, *C. grayi*, *C. multnervosa*, *C. sp.*, mostraram que o gênero *Casearia* é promissor em relação as significativas atividades antioxidantes, citotóxicas e também antimicrobianas apresentadas.

As estruturas de alguns metabólitos secundários descritos são mostradas a seguir na Figura 6. Uma revisão mais aprofundada das substâncias isoladas de espécies de *Casearia* foi feita por Xia et al (2014) onde descrevem o isolamento de 235 substâncias.

| NOME DA MOLÉCULA                             | ESTRUTURA  | ESPÉCIE / REFERÊNCIA                            |
|--|--|---|
| éter de galato-3,5-dimetila (IGDE)           |  | <i>Casearia sylvestris</i> / SILVA et al., 2008 |
| éter metílico de galato-3,5-dimetila (MGDE). |  |   |

| <p>Casearina B (CASB).</p>  |    | <p><i>Casearia sylvestris</i> /<br/>PRIETO et al., 2013</p> |    |                      |   |                      |    |              |   |                        |    |              |    |   |
|---|--|---|----|----------------------|---|----------------------|----|--------------|---|------------------------|----|--------------|----|---|
| <p>(rel)-2(R),18(S),19(R)-<br/>Triacetoxi-18,19-epoxi-<br/>4(S),5(S),9(S),10(R)-clerodan-<br/>13(16),14-dien-6-ona (<b>1</b>)<br/>(rel)-2(R),18(S),19(R)-<br/>Triacetoxi-18,19-epoxi-<br/>4(S),5(R),8(S),9(S),10(R)-<br/>clerodan-13(16),14-dieno (<b>2</b>)<br/>(rel)-18(S),19(R)-Diacetoxi-<br/>18,19-epoxi-2(R)-(2ξ-<br/>methylbutanoil)-<br/>4(S),5(S),9(S),<br/>10(R)-clerodan-13(16),14-<br/>dien-6-ona (<b>3</b>)<br/>(rel)-18(S),19(R)-Diacetoxi-<br/>18,19-epoxi-2(R)-<br/>(isobutanoil)-4(S),5(R),<br/>9(S),10(R)-clerodan-<br/>13(16),14-dieno (<b>4</b>)<br/>(rel)-18(S),19(R)-Diacetoxi-<br/>18,19-epoxi-2(R)-(2ξ-<br/>metilbutanoil)-<br/>4(S),5(R),9(S),10(R)-clerodan-<br/>13(16),14-dieno (<b>5</b>)</p> |  <table data-bbox="678 1092 1114 1396"> <thead> <tr> <th>R</th> <th>R1</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1 CH<sub>3</sub>CO</td> <td>O</td> </tr> <tr> <td>2 CH<sub>3</sub>CO</td> <td>H2</td> </tr> <tr> <td>3 EtCH(Me)CO</td> <td>O</td> </tr> <tr> <td>4 Me<sub>2</sub>CHCO</td> <td>H2</td> </tr> <tr> <td>5 EtCH(Me)CO</td> <td>H2</td> </tr> </tbody> </table> | R   | R1 | 1 CH <sub>3</sub> CO | O | 2 CH <sub>3</sub> CO | H2 | 3 EtCH(Me)CO | O | 4 Me <sub>2</sub> CHCO | H2 | 5 EtCH(Me)CO | H2 | <p><i>Casearia grewiifolia</i> /<br/>MOSSADIK, et. al.,<br/>2007b</p> |
| R   | R1   |   |    |                      |   |                      |    |              |   |                        |    |              |    |   |
| 1 CH <sub>3</sub> CO  | O  |   |    |                      |   |                      |    |              |   |                        |    |              |    |   |
| 2 CH <sub>3</sub> CO  | H2   |   |    |                      |   |                      |    |              |   |                        |    |              |    |   |
| 3 EtCH(Me)CO  | O  |   |    |                      |   |                      |    |              |   |                        |    |              |    |   |
| 4 Me <sub>2</sub> CHCO  | H2   |   |    |                      |   |                      |    |              |   |                        |    |              |    |   |
| 5 EtCH(Me)CO  | H2   |   |    |                      |   |                      |    |              |   |                        |    |              |    |   |

| <p>Casearupestrina A <b>(1)</b><br/> Casearupestrina B <b>(2)</b><br/> Casearupestrina C <b>(3)</b><br/> Casearupestrina D <b>(4)</b><br/> 2,7-di-O-acetilcasearupestrina A <b>(5)</b><br/> 2,6-di-O-acetilcasearupestrina D <b>(6).</b></p> |  <table border="1" data-bbox="678 695 1110 1150"> <thead> <tr> <th></th> <th>R<sub>1</sub></th> <th>R<sub>2</sub></th> <th>R<sub>3</sub></th> <th></th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td><b>1</b></td> <td>OH</td> <td></td> <td>OAc</td> <td>2Z,4E-decadienoate</td> </tr> <tr> <td><b>2</b></td> <td>OH</td> <td>OAc</td> <td>OH</td> <td></td> </tr> <tr> <td><b>3</b></td> <td>OH</td> <td>OCH<sub>3</sub></td> <td>OH</td> <td></td> </tr> <tr> <td><b>4</b></td> <td>OH</td> <td>OAc</td> <td>OAc</td> <td></td> </tr> <tr> <td><b>5</b></td> <td>OAc</td> <td></td> <td>OAc</td> <td>2Z,4E-decadienoate</td> </tr> <tr> <td><b>6</b></td> <td>OAc</td> <td>OAc</td> <td>OAc</td> <td></td> </tr> </tbody> </table> |  | R <sub>1</sub> | R <sub>2</sub>     | R <sub>3</sub> |  | <b>1</b> | OH |  | OAc | 2Z,4E-decadienoate | <b>2</b> | OH | OAc | OH |  | <b>3</b> | OH | OCH <sub>3</sub> | OH |  | <b>4</b> | OH | OAc | OAc |  | <b>5</b> | OAc |  | OAc | 2Z,4E-decadienoate | <b>6</b> | OAc | OAc | OAc |  | <p><i>Casearia rupestris</i> /<br/> VIEIRA-JUNIOR G.<br/> et. al., 2011</p> |
|--|--|--|----------------|--------------------|----------------|--|----------|----|--|-----|--------------------|----------|----|-----|----|--|----------|----|------------------|----|--|----------|----|-----|-----|--|----------|-----|--|-----|--------------------|----------|-----|-----|-----|--|---|
|  | R <sub>1</sub>   | R <sub>2</sub>   | R <sub>3</sub> |                    |                |  |          |    |  |     |                    |          |    |     |    |  |          |    |                  |    |  |          |    |     |     |  |          |     |  |     |                    |          |     |     |     |  |   |
| <b>1</b>   | OH   |  | OAc            | 2Z,4E-decadienoate |                |  |          |    |  |     |                    |          |    |     |    |  |          |    |                  |    |  |          |    |     |     |  |          |     |  |     |                    |          |     |     |     |  |   |
| <b>2</b>   | OH   | OAc  | OH             |                    |                |  |          |    |  |     |                    |          |    |     |    |  |          |    |                  |    |  |          |    |     |     |  |          |     |  |     |                    |          |     |     |     |  |   |
| <b>3</b>   | OH   | OCH <sub>3</sub>   | OH             |                    |                |  |          |    |  |     |                    |          |    |     |    |  |          |    |                  |    |  |          |    |     |     |  |          |     |  |     |                    |          |     |     |     |  |   |
| <b>4</b>   | OH   | OAc  | OAc            |                    |                |  |          |    |  |     |                    |          |    |     |    |  |          |    |                  |    |  |          |    |     |     |  |          |     |  |     |                    |          |     |     |     |  |   |
| <b>5</b>   | OAc  |  | OAc            | 2Z,4E-decadienoate |                |  |          |    |  |     |                    |          |    |     |    |  |          |    |                  |    |  |          |    |     |     |  |          |     |  |     |                    |          |     |     |     |  |   |
| <b>6</b>   | OAc  | OAc  | OAc            |                    |                |  |          |    |  |     |                    |          |    |     |    |  |          |    |                  |    |  |          |    |     |     |  |          |     |  |     |                    |          |     |     |     |  |   |
| <p>2,3-bis(4-hidroxi-3-metoxifenil)-3-butoxipropan-1-ol <b>(1)</b><br/><br/> eritro-2,3-bis(4-hidroxi-3-metoxifenil)-3-butoxipropan-1-ol <b>(2)</b></p>  |  <p><b>1:</b> treo<br/> <b>2:</b> eritro</p>   | <p><i>Casearia grewiifolia</i> /<br/> RAYANIL et al.,<br/> 2012.</p> |                |                    |                |  |          |    |  |     |                    |          |    |     |    |  |          |    |                  |    |  |          |    |     |     |  |          |     |  |     |                    |          |     |     |     |  |   |

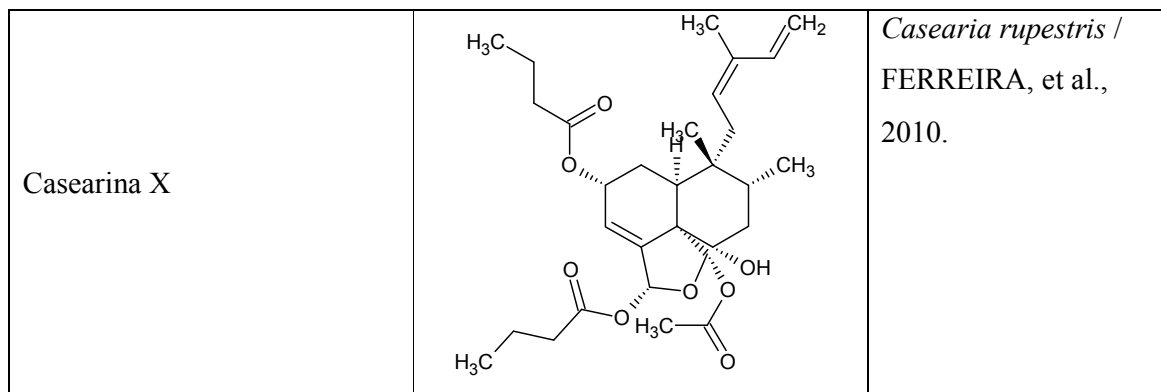


Figura 6. Moléculas isoladas de *Casearia*

### 2.9.3. *Casearia javitensis* Kunth

A espécie *Casearia javitensis* (Figura 7) é conhecida popularmente por caneleira, capanço e mata-calado (MARQUETE et al., 2009). Possui porte arbóreo, folhas oblongas, com a base obtusa e borda do limbo serrilhada, as inflorescências de *C. javitensis* são em fascículos axilares, de tipo glomerulada, e as flores são hermafroditas e monoclamídias. O fruto é uma cápsula ovóide e subglobosa (VASQUEZ e WEBBER, 2010).



Foto: Fachin-Espinar 2013

Figura 7. A-- *Casearia javitensis* jovem de porte arbóreo. B-- Detalhe das folhas de *Casearia javitensis*

De ampla distribuição no território brasileiro, a espécie *C. javitensis* pode ser encontrada na Amazônia, no cerrado e na mata atlântica (MARQUETE et al. 2009).

Na literatura revisada, somente foram encontradas as comunicações em congressos, feitas por nosso grupo de pesquisa, relatando a presença de  $\beta$ -sitosterol, triterpeno friedelina e o esteroide campesterol, principalmente nos extratos dos galhos de *Casearia javitensis*. Não foram encontrados registros de outros estudos fitoquímicos, que visem à caracterização química e biológica aprofundada dos metabólitos da espécie *C. javitensis*.

### 3 OBJETIVOS

#### Objetivo geral

Realizar o estudo químico e biológico dos extratos de *Casearia javitensis* Kunth.

#### Objetivos específicos

- Determinar a atividade dos extratos sobre bactérias e de toxicidade;
- Avaliar o potencial antioxidante;
- Fracionar e purificar os extratos com atividade biológica;
- Identificar a estrutura química das substâncias isoladas por meio de análises de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e espectrometria de massas.



**CAPÍTULO I**

**4-Hidroxifenil-6-cafeoil- $\beta$ -L-glicosídeo isolado das folhas de  
*Casearia javitensis* Kunth**

## **4-Hidroxifenil-6-cafeoil- $\beta$ -L-glicosídeo isolado das folhas de *Casearia javitensis* Kunth**

Maria T. Fachin-Espinar, Maria C. S. Souza, Cecilia V. Nunez\*

Laboratório de Bioprospecção e Biotecnologia, Coordenação de Tecnologia e Inovação  
Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Av. André Araújo, 2936, 69067-375, Manaus,  
AM, Brazil.

\*E-mail: cecilia@inpa.gov.br

No Brasil, especialmente na região Amazônica, existe uma grande biodiversidade de espécies vegetais que ainda não foram estudadas química e biologicamente. Nesse sentido, o presente trabalho teve como objetivo realizar o estudo químico e biológico dos extratos de *Casearia javitensis* Kunth. Assim os extratos hexânicos e metanólicos bem como as fases obtidas dos extratos metanólicos dos galhos e das folhas de *Casearia javitensis* foram testados para determinar seu potencial antibacteriano, mediante o método de difusão em poço, também para verificar a atividade antioxidante (DPPH e  $\text{Fe}^{3+}$ /fenantrolina), e de toxicidade frente à *Artemia salina*. As frações obtidas da fase acetato de etila dos extratos metanólicos das folhas e dos galhos apresentaram um alto potencial antioxidante, sendo que a análise em CCDC dessa fração foi positiva com  $\text{FeCl}_3$ , indicando a possível presença de substâncias fenólicas. Os extratos hexânicos dos galhos e das folhas apresentaram atividade frente às bactérias *Corynebacterium glutamicum*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*. Os extratos metanólicos de folhas e galhos foram ativos frente às bactérias *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* e *Serratia marcescens*. O fracionamento dos extratos hexânicos e metanólicos das folhas permitiu o isolamento de duas substâncias: o  $\beta$ -sitosterol e o 4-hidroxifenil-6-cafeoil- $\beta$ -L-glicosídeo (um fenol-glicosídeo), respectivamente, as quais foram identificadas através da análise dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  e de espectrometria de massas.

Palavras-chave: *Casearia javitensis*, antioxidante, fenol-glicosídeo, atividade antibacteriana.

### ABSTRACT

In Brazil, especially in the Amazon region, there is a great biodiversity of plant species that have not been studied chemical and biologically yet. Therefore the aim of the present study was to perform chemical and biological studies of *Casearia javitensis* Kunth extracts. Then the hexanic and methanolic extracts as the fractions obtained from the methanolic extract of the branches and leaves from *Casearia javitensis* have been tested in order to identify the antimicrobial activity by diffusion method well, antioxidant activity (DPPH and Fe<sup>3+</sup>/phenanthroline) and toxicity against *Artemia salina*. The fractions of ethyl acetate phase obtained from the methanol extracts of the leaves and branches showed a high antioxidant potential, and the analysis by TLC of these fractions were revealed with FeCl<sub>3</sub>, indicating the presence of phenolic compounds. The hexanic extract of the branches and leaves showed activity against the bacteria: *Corynebacterium glutamicum*, *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus*. The methanolic extracts of leaves and branches were active against *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* and *Serratia marcescens*. The fractionation of the hexane and methanolic extracts of the leaves yielded two compounds: β-sitosterol and 4-hydroxyphenyl-6-caffeoyl-β-L-glycoside (a phenol-glycoside), respectively, which were identified by <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR analysis and mass spectrometry.

**Keywords:** *Casearia javitensis*, antioxidant, phenol glycoside, antibacterial.

## INTRODUÇÃO

O gênero *Casearia* pertencente à família Salicaceae, está representado por mais de 180 espécies descritas na literatura, das quais 70 encontram-se distribuídas no continente americano e 37 estão presentes no Brasil (MARQUETE, 2007). A classificação taxonômica do gênero *Casearia* sempre foi controversa, tendo sido subordinado a diferentes famílias.

Anteriormente este gênero estava enquadrado em Flacourtiaceae, porém estudos recentes sobre filogenia baseado em aspectos moleculares, ecológicos e morfológicos indicaram que os gêneros *Xylosma*, *Scolopia*, *Homalium*, *Idesia* e *Casearia*, por terem uma ligação de biossíntese para a produção de glicosídeos de álcool 2,5-dihidroxibenzila estariam em Salicaceae, segundo o sistema de classificação APG II (MARQUETE, 2007; XIA et al., 2014).

Na medicina popular as espécies do gênero *Casearia* são utilizadas para o tratamento de infecções e mordeduras de cobras (PRIETO et al., 2013; SILVA et al., 2008).

Quimicamente são conhecidas pelo fato de apresentarem na sua composição vários diterpenos, triterpenos e ácidos hexanoicos e caproicos (PRIETO et al., 2013), sesquiterpenos e monoterpênicos, bem como outras classes de metabolitos secundários, incluindo glicosídeos fenólicos e flavonoides (RAYANIL et al., 2012).

Nesse contexto, a espécie *Casearia javitensis* da qual só foi encontrado um trabalho realizado pelo nosso grupo de pesquisa, relatando a presença de  $\beta$ -sitosterol, e indícios de triterpeno friedelina e o esteroide campesterol, nos extratos dos galhos; foi escolhida para realizar o estudo químico e a avaliação das atividades antioxidante, antibacteriana e de toxicidade frente à *Artemia salina*.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Coleta e identificação do material vegetal.

O material vegetal foi coletado no dia 16 de janeiro de 2013 na Reserva A. Ducke/INPA, localizado no Km 26, rodovia AM 010, município de Manaus, AM. Exsicata do material coletado foi depositada, sob o número 259224 e identificada por especialistas no Herbário da Coordenação de Pesquisas em Botânica do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA.

### **Obtenção dos extratos vegetais**

O material vegetal foi separado em folhas (261,00 g) e galhos (150,00 g), secos em estufa a 40 °C e triturado em moinho de facas para o preparo dos extratos. O material seco e moído foi primeiramente extraído com hexano, usando ultrassom por 20 min.

Após, o solvente foi filtrado e novamente extraído com hexano, este procedimento sendo repetido mais duas vezes. Após a extração com hexano, o material vegetal foi seco e extraído com metanol, também com auxílio de ultrassom por 20 min, filtrado e este procedimento repetido mais duas vezes. Os extratos filtrados, foram concentrados utilizando evaporador rotativo, sob pressão reduzida, em temperatura <50 °C para obtenção dos extratos hexânico (2,63 g) e metanólico (15,24 g) das folhas; hexânico (0,495 g) e metanólico (1,50 g) dos galhos.

### **Análises fitoquímica**

As análises iniciais dos extratos foram realizadas por cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC), empregando cromatofolhas de alumínio com sílica gel impregnado com indicador de fluorescência (UV<sub>254</sub>). As amostras foram aplicadas em cromatoplas e eluídas com solventes escolhidos em diferentes proporções de acordo com a polaridade das amostras. Foram utilizadas para a revelação das substâncias presentes nas placas cromatográficas luz ultravioleta ( $\lambda$ : 254 e 365 nm), iodo ressublimado, sulfato cérico, cloreto férrico, cloreto de alumínio e anisaldeído sulfúrico.

#### ***Fracionamento e isolamento***

O extrato hexânico das folhas (1,02 g) foi submetido a fracionamento em coluna Cromatográfica de 41 x 3 cm utilizando como fase estacionária 100 g de florisil (Sigma-Aldrich, 100-200 mesh) e eluída em gradiente de concentração com Hexano/Acetona, Acetona, Metanol (90:10, 85:15, 80:20, 75:25, 70:30, 1:1) o que rendeu 32 frações, das quais após a análise por CCDC, as frações 1 a 3 (0,047 g) foram reunidas e fracionada em coluna de florisil com os solventes Hexano/DCM, DCM/AcOEt, AcOEt/MeOH (90:10, 80:20, 70:30, 60:40, 1:1, 30:70, 10:90), obtendo-se 79 frações, sendo reunidas e fracionadas as frações 32-43 (0,32 g) em coluna de alumina (Sigma, Grado: Super I, tipo: WN-6: Neutro), utilizando Hexano/AcOEt (50:50) como eluente, obtendo-se o  $\beta$ -sitosterol (0,005 g).

O extrato metanólico das folhas (10,0 g) foi solubilizado inicialmente com uma mistura de MeOH/H<sub>2</sub>O (80:20) e submetido a partição líquido-líquido com Hexano, DCM e AcOEt. Posteriormente a fase AcOEt (0,30 g) foi fracionada em coluna de Sephadex LH-20 (Sigma) utilizando-se 100% de MeOH como eluente, obtendo-se 23 frações, após a análise

por CCDC as frações 10-12 (0,03 g) foram reunidas e fracionadas em coluna de florisil com os solventes DCM/AcOEt, AcOEt, AcOEt/Acetona, Acetona (50:50, 30:70, 100, 90:10, 80:20, 70:30, 100), obtendo-se 33 frações, sendo a número 18 identificada como fenol-glicosídeo denominado 4-hidroxifenil-6-cafeoil- $\beta$ -L-glicosídeo (6-*O*-cafeoil-arbutin)

As duas substâncias foram analisadas em Ressonância Magnética Nuclear de  $^1\text{H}$  de 300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ .

### **Avaliação da atividade antibacteriana**

Para os ensaios antibacterianos foram utilizadas tanto bactérias gram-positivas e gram-negativas de interesse clínico ou do agro-negócio como: *Aeromonas hydrophila* (ATCC 7966), *Bacillus cereus* (ATCC 14579), *Escherichia coli* (ATCC 11775), *Corynebacterium glutamicum* (ATCC 13032), *Edwardsella tarda* (ATCC 15947), *Nocardia brasiliensis*, *Providencia rettgeri* (ATCC 29944), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 10145), *Pseudomonas fluorescens* (ATCC 13525), *Salmonella enteritidis* (ATCC 6051), *Staphylococcus aureus* (ATCC 12600) e *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883). A avaliação dos extratos e frações foi realizada pelo método de difusão em Agar - Difusão em poço, de acordo com as normas estabelecidas pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2002). Para isto inicialmente os micro-organismos testes foram repicados em caldo Müeller-Hinton, sendo incubadas durante um período de 16 a 24 horas, para a reativação.

Após turvação do caldo Müeller-Hinton (MH), a turbidez da cultura foi ajustada em caldo a uma concentração de 0,5 da escala de McFarland, o que equivale a uma suspensão bacteriana contendo aproximadamente de  $1$  a  $2 \times 10^8$  UFC/mL.

Em placas de Petri esterilizadas, foram adicionados 20 mL de ágar Müeller Hinton, após a solidificação a superfície seca foi inoculada com as bactérias teste. Em seguida, confeccionaram-se poços/orifícios de 6,0 mm, colocando-se neles 50  $\mu\text{L}$  do extrato a uma concentração de 1 mg/mL, e como controle positivo foram adicionados 50  $\mu\text{L}$  de oxitetraciclina a uma concentração de 125  $\mu\text{g/mL}$ . As placas foram incubadas em aerobiose a 30 ou 37  $^\circ\text{C}$  por 18 h. Após esse período, foram observados os halos de inibição resultantes.

Os diâmetros dos halos de inibição total (visualizadas a olho nu) foram mensurados (mm), incluindo o diâmetro do poço usando uma régua.

### **Atividade antioxidante**

O potencial antioxidante de extratos e frações foi avaliado pelas metodologias quantitativas de DPPH e  $\text{Fe}^{3+}$ /fenantrolina (MARTINS et al., 2014) Os resultados obtidos foram expressos em equivalência ao ácido ascórbico (antioxidante padrão). Os experimentos foram realizados em triplicata. Inicialmente, os extratos hexânicos e metanólicos foram submetidos a uma avaliação, e os extratos que tiveram atividade significativa no teste preliminar foram fracionados através de partição líquido-líquido, obtendo-se as fases, Hexano, Diclorometânico, Acetato de etila (AcOEt) e hidroalcoólica, que foram avaliados separadamente. Os extratos também foram analisados em Cromatografia em Camada Delgada Comparativa (CCDC), com revelação em UV (254 e 365nm), cloreto de alumínio e DPPH.

### ***Curvas de calibração com ácido ascórbico***

Inicialmente foram preparadas as soluções de: DPPH (28  $\mu\text{g/mL}$ ),  $\text{Fe}^{3+}$ , 1,10-fenantrolina 0,25% e uma solução de ácido ascórbico com água deionizada em uma concentração de 900  $\mu\text{g/mL}$  a partir da qual foram preparadas diluições resultando nas seguintes concentrações: 0, 90, 180, 360, 540 e 720  $\mu\text{g/mL}$ . Para obtenção da curva de calibração com DPPH foram adicionados em seis micro-tubos 990  $\mu\text{L}$  de DPPH mais 10  $\mu\text{L}$  da solução de ácido ascórbico nas diferentes concentrações. Após 30 minutos, foi realizada a leitura da absorbância em espectrofotômetro no comprimento de 517 nm. Para a obtenção da curva de calibração de  $\text{Fe}^{3+}$ / Fenantrolina foram adicionados em seis novos micro-tubos 10  $\mu\text{L}$  da solução de ácido ascórbico nas diferentes concentrações, mais 10  $\mu\text{L}$  da solução padrão de  $\text{Fe}^{3+}$  e 980  $\mu\text{L}$  da solução 1,10-fenantrolina 0,25%. Após 1 hora foi realizada a leitura da absorbância em espectrofotômetro no comprimento de 508 nm.

### ***1,1-Difenil-2-picrilhidrazila (DPPH)***

A avaliação da atividade antioxidante quantitativa de extratos e frações foi realizada utilizando o método com DPPH, o qual é considerado um radical estável que permite avaliar a capacidade de compostos como sequestradores de radicais, tendo sua absorção máxima a 517 nm. Quando o DPPH recebe um elétron ou um radical hidrogênio torna-se um composto mais estável e sua absorção diminui. Para determinação da absorbância da reação entre o DPPH e os extratos foram utilizados 990  $\mu\text{L}$  de DPPH (28  $\mu\text{g/mL}$  em metanol) e 10  $\mu\text{L}$  da solução de cada um dos extratos a uma concentração de 0,5  $\text{mg/mL}$ , em triplicata. Como controle negativo foi utilizado 990  $\mu\text{L}$  de DPPH (28  $\mu\text{g/mL}$  em metanol) e 10  $\mu\text{L}$  de metanol. Após 30

minutos, foi realizada a leitura da absorbância em espectrofotômetro no comprimento de 517 nm.

### ***Fe<sup>3+</sup>-fenantrolina***

Esta metodologia permite avaliar a capacidade que tem alguns tipos de antioxidantes de agir como agentes quelantes complexando íons metálicos que catalisam a oxidação lipídica, um par de elétrons não compartilhados na sua estrutura promove a ação de complexação. O complexo vermelho-laranja produzido pela reação entre Fe<sup>2+</sup> e 1,10-fenantrolina apresentam a sua absorbância máxima a 515 nm. Para avaliação da atividade antioxidante dos extratos foram utilizados 980 µL da solução de 1,10-fenantrolina e adicionados 10 µL da solução de Fe<sup>3+</sup> e 10 µL da solução dos extratos a uma concentração de 0,5 mg/mL. Sendo utilizado a 1,10-fenantrolina como controle negativo. Todos os testes foram realizados em triplicata.

### **Toxicidade frente a *Artemia salina***

Para o teste, foi utilizado para eclosão uma solução salina (3,8%), e para a eclosão, foram utilizados 10 mg de cistos de *Artemia salina*. As condições de crescimento utilizadas para a eclosão dos cistos foram de: temperatura de 25 a 28 °C, e iluminação em lâmpada fluorescente, durante 48 horas. Após o período de eclosão, as larvas foram transferidas para placas de 24 poços e distribuídas 10 larvas de *A. salina* para cada poço. Em cada placa, foram realizados os controles do meio salino e do solvente, ambos em triplicata. Nos poços onde foram adicionadas as amostras também foram realizados em triplicata. Os extratos foram adicionados nos poços do teste, na concentração inicial de 500 µg/mL. As placas com as larvas de *A. salina* foram mantidas por 24 horas sob iluminação de lâmpada fluorescente. Após esse período, avaliou-se o número de larvas sobreviventes, tanto nos poços de controles quanto no teste.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **Análise fitoquímica**

Os extratos hexânicos das folhas e galhos, assim como o extrato MeOH das folhas quando submetidos a análise por CCDC mostraram a possível presença de terpenos quando revelados com Ce(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>, pois apresentou uma coloração lilás característico desta classe química. Observou-se também a presença de substâncias fluorescentes sob a luz UV indicando a presença de compostos aromáticos. Os extratos MeOH das folhas e galhos, assim



como as frações destas quando revelados com DPPH mostraram a presença de possíveis antioxidantes, o que foi confirmado com os resultados obtidos através da análise quantitativa da atividade antioxidante.

A partir do fracionamento sucessivo realizado do extrato hexânico e metanólico das folhas de *Casearia javitensis* foi possível a obtenção de duas substâncias identificadas como  $\beta$ -sitosterol (**1**) e um fenol-glicosídeo denominado 4-hidroxifenil-6-cafeoil- $\beta$ -L-glicosídeo (**2**).

A substância **1** obtida na forma de cristais, apresentando coloração lilás quando revelada com Anisaldeído e eluída em Hexano/AcOEt (1:1) e Rf de 0,63 cm. Foi identificada através da análise dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  o qual mostra sinais característicos deste composto quando comparados com os dados na literatura (Aragão et. al., 1990), observando-se uma concentração de sinais com deslocamentos entre  $\delta_{\text{H}}$  0,68 e 1,6 ppm correspondentes às metilas presentes neste composto, assim como vários sinais entre  $\delta_{\text{H}}$  1,8 e 2,2 ppm correspondentes aos grupos metilênicos. Também foram observados multipletos com deslocamento em  $\delta_{\text{H}}$  5,3 ppm e em  $\delta_{\text{H}}$  3,5 ppm, sendo estes sinais correspondentes ao próton oleofínico (H-5) e ao hidrogênio carbinólico (H-3), respectivamente (Anexo A). O  $\beta$ -sitosterol é um dos esteroides comumente encontrados em várias espécies de *Casearia* (WANG et al, 2009).

A substância **2**, foi isolada como cristais, apresentando coloração azul escuro quando revelada com  $\text{FeCl}_3$  e eluída em AcOEt/Acetona (80:20) e Rf de 0,50 cm foi identificada pela análise dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  (Anexo B) e COSY, e comparadas com os dados da literatura (RAJU, et. al., 2010; LEI LIU, et. al., 2013) os quais são observados na Tabela 1. Através das análises do espectro de RMN bidimensional (gCOSY) foi possível estabelecer as correlações entre os hidrogênios os quais são mostrados na Tabela e Figura 1.

O RMN de  $^1\text{H}$  mostrou sinais correspondentes a dois anéis benzênicos substituídos, um anel dissubstituído na posição *para*, caracterizado pela presença de quatro hidrogênios com deslocamentos em  $\delta_{\text{H}}$  6,94 (2H, *dd*,  $J= 6,7; 2$  Hz, H- 2, 6) e 6,64 (2H, *dd*,  $J= 6,7; 2$  Hz, H-3, 5), um segundo anel aromático trissubstituído na posição *para e meta*, sendo observados três hidrogênios em  $\delta_{\text{H}}$  6,79 (1H, *d*,  $J= 8,2$  Hz, H-2''), 6,95 (1H, *d*,  $J= 8,2$  Hz, H-3''), 7,06 (1H, *d*,  $J= 2$  Hz, H-5''). Também foram observados a presença de uma dupla ligação *trans* em  $\delta_{\text{H}}$  7,57 (1H, *d*,  $J= 16$  Hz, H-7'') e 6,30 (1H, *d*,  $J= 16$  Hz, H-8'').

Os demais sinais foram atribuídos ao açúcar presente com sinais em  $\delta_{\text{H}}$  desde 3,52 até 5,07 ppm.

Os dados do espectro de massas de alta resolução tipo *Ion trap*, utilizando o modo positivo e negativo, determinou a massa molecular em 434  $m/z$ , condizente com a fórmula molecular  $C_{21}H_{22}O_{10}$ .

Esta substância está sendo descrita pela primeira vez no gênero *Casearia*, porém esta molécula já foi isolada da *Vitex leucoxyton* (Lamiaceae) (RAJU, et. al., 2010). Sendo que esta classe química é característica de espécies pertencentes na família Salicaceae, o que corrobora a nova classificação botânica (Mosaddik et. al., 2006; Lei Liu, et. al., 2013; Belyanin, et. al., 2011).

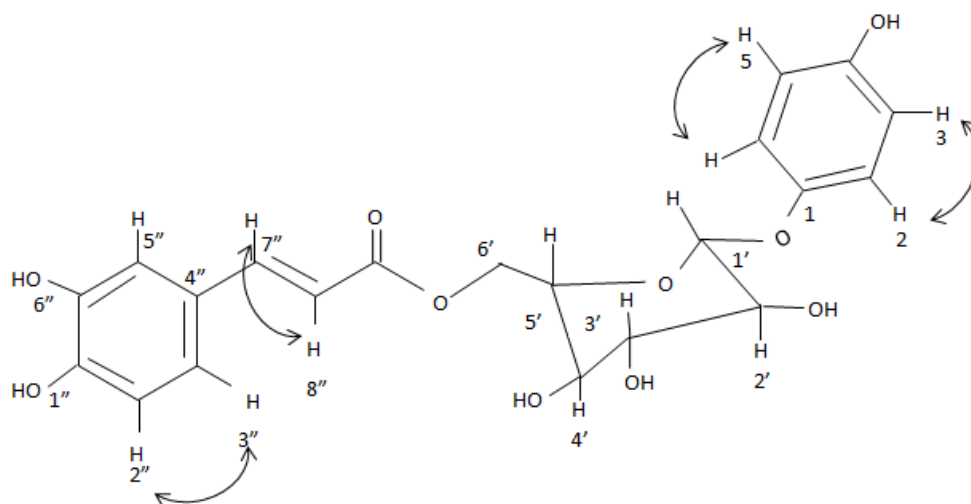


Figura 1. Correlações observadas no espectro de RMN gCOSY, observados para a substância 2.

Tabela 1. Dados de RMN de  $\delta_H$  de 4-hidroxifenil-6-cafeoil- $\beta$ -L-glicosídeo em  $CD_3OD$ , comparados com a literatura\* (RAJU, et. al., 2010)

| Posição | $^1H$ multiplicidade (300 MHz para $^1H$ ) | $^1H$ multiplicidade (600 MHz para $^1H$ ) |
|---------|--|--|
| 1       | -  | -  |
| 2       | 6,94 (2H, <i>dd</i> , $J= 6,7; 2$ Hz)      | 6,94 (2H, <i>d</i> , $J= 9$ Hz)            |
| 3       | 6,64 (2H, <i>dd</i> , $J= 6,7; 2$ Hz)      | 6,65 (2H, <i>d</i> , $J= 9$ Hz)            |
| 4       | -  | -  |
| 5       | 6,64 (2H, <i>dd</i> , $J= 6,7; 2$ Hz)      | 6,65 (2H, <i>d</i> , $J= 9$ Hz)            |
| 6       | 6,94 (2H, <i>dd</i> , $J= 6,7; 2$ Hz)      | 6,94 (2H, <i>d</i> , $J= 9$ Hz)            |
| 1'      | 5,07 (1H, <i>d</i> , $J= 7,64$ Hz)         | 4,74 (1H, <i>d</i> , $J= 7,2$ Hz)          |
| 2'      | 4,10 (1H, <i>d</i> , $J= 7,64$ Hz)         | 3,41 – 3,51 (3H, <i>m</i> )                |
| 3'      | 3,52 – 3,61 ( <i>m</i> )                   | 3,41 – 3,51 (3H, <i>m</i> )                |
| 4'      | 3,52 – 3,61 ( <i>m</i> )                   | 3,41 – 3,51 (3H, <i>m</i> )                |
| 5'      | 3,52 – 3,61 ( <i>m</i> )                   | 3,65 (1H, <i>m</i> )                       |
| 6'      | 4,50 (1H, <i>d</i> , $J= 12$ Hz)           | 4,52 (1H, <i>dd</i> , $J= 12; 2,4$ Hz)     |
|         | 4,32 (1H, <i>dd</i> , $J= 12; 6,7$ Hz)     | 4,35 (1H, <i>dd</i> , $J= 12; 7,2$ Hz)     |
| 1''     | -  | -  |
| 2''     | 6,79 (1H, <i>d</i> , $J= 8,2$ Hz)          | 6,78 (1H, <i>d</i> , $J= 8,4$ Hz)          |
| 3''     | 6,95 (1H, <i>d</i> , $J= 8,2$ Hz)          | 6,92 (1H, <i>dd</i> , $J= 8,4; 1,8$ Hz)    |
| 4''     | -  | -  |
| 5''     | 7,06 (1H, <i>d</i> , $J= 2$ Hz)            | 7,05 (1H, <i>d</i> , $J= 1,8$ Hz)          |
| 6''     | -  | -  |
| 7''     | 7,57 (1H, <i>d</i> , $J= 16$ Hz)           | 7,56 (1H, <i>d</i> , $J= 15,6$ Hz)         |
| 8''     | 6,30 (1H, <i>d</i> , $J= 16$ Hz)           | 6,27 (1H, <i>d</i> , $J= 15,6$ Hz)         |
| 9''     | -  | -  |

\*As correlações foram atribuídas baseadas nos experimentos COSY

### **Avaliação da atividade antibacteriana**

Os resultados obtidos a partir da avaliação antibacteriana foram expressos de acordo com Alves (2000), com base no diâmetro de zona de inibição: menor que 0,9 cm inativo, entre 0,9 e 1,2 cm atividade moderada, entre 1,3 e 1,8 cm ativos, e maior que 1,8 cm muito ativo. Na tabela 2 são mostrados os resultados com as bactérias para as quais os extratos e fases de *C. javitensis* foram ativas. Os extratos hexânicos dos galhos apresentaram halos de inibição de 2,2 cm frente a *C. glutamicum* e de 2,4 cm frente à *S. aureus*, considerados muito ativos. Estudos realizados por Mosaddik e col. (2004) demonstraram através de ensaios de concentração mínima inibitória, que espécies de *Casearia multinervosa* e *Casearia grayi* apresentam uma alta atividade antibacteriana frente à *S. aureus*.

Enquanto os extratos hexânicos das folhas não apresentaram halos de inibição frente às mesmas bactérias, os extratos hexânicos das folhas e galhos foram ativos com halos de inibição de 1,6 e 1,8 cm respectivamente frente à bactéria *B. cereus*. Para os extratos metanólicos dos galhos e das folhas os halos de inibição frente às bactérias *P. aeruginosa* e *S. aureus* foram de 1,1 cm para ambos os extratos, sendo que somente o extrato metanólico das folhas apresentou atividade antibacteriana frente à *S. marcescens* com halo de inibição de 1,2 cm.

Através dos resultados obtidos foi observado que os extratos hexânicos de folhas e galhos apresentaram atividade antibacteriana somente frente às bactérias gram-positivas, já os extratos metanólicos apresentaram atividade frente às bactérias gram-positivas e gram-negativas. Silva e col. (2008) demonstraram que substâncias presentes nos extratos etanólicos das folhas de *Casearia sylvestris* apresentaram importante atividade antibacteriana frente a ambos os tipos de bactérias, sendo as bactérias gram-positivas as mais sensíveis a esses extratos.

### **Atividade antioxidante**

A avaliação da atividade antioxidante foi realizada medindo a capacidade de sequestro de radicais livres do DPPH e de redução de  $Fe^{3+}$ . Os resultados obtidos foram expressos em equivalência com o ácido ascórbico e interpretados conforme a escala mostrada na tabela 3.

Os resultados obtidos nos ensaios quantitativos mostraram que os extratos metanólicos dos galhos e folhas possuem um alto potencial antioxidante (tabela 4), visto que a equivalência com ácido ascórbico foi observada no intervalo de 0 – 1 (alto potencial). Por tal motivo esses extratos foram fracionados e avaliados, observando-se que a fase acetato de etila (AcOEt) apresentou um alto potencial antioxidante de 0-1.

Esses resultados confirmam o observado na análise em CCDC, onde se verificou o potencial antioxidante qualitativo com DPPH. O reagente  $AlCl_3$  revelou a presença de compostos fenólicos, como flavonoides, na amostra analisada, sendo que a intensidade da coloração foi mais evidente nas frações de AcOEt obtidas do extrato metanólico das folhas, as quais demonstraram maior potencial antioxidante. Resultados similares foram relatados numa triagem realizada para avaliar o potencial antioxidante dos extratos metanólicos de quatro espécies de *Casearia* pela metodologia de ABTS (Mosaddik et. al., 2003), o que evidencia que as espécies do gênero *Casearia* possuem um alto potencial como antioxidantes *in vitro*.

Estudos realizados por Raju e colaboradores (2010), demonstraram através da metodologia do DPPH que a substância 4-hidroxifenil-6-cafeoil- $\beta$ -L-glicosídeo possui uma importante capacidade antioxidante sendo esta superior à apresentada pelos antioxidantes comerciais como BHT (Butil-hidroxitolueno) e o ácido ascórbico.

Os extratos hexânicos de folhas e galhos, assim como as frações obtidas da fase DCM não apresentaram atividade antioxidante para ambas as metodologias utilizadas. Esse resultado pode ser devido ao fato de que nos extratos vegetais as moléculas com maior atividade antioxidante são os compostos fenólicos, os quais se encontram principalmente nos extratos metanólicos (DEWICK, 2002).

### **Toxicidade frente à *Artemia salina***

Os extratos e as frações de *Casearia javitensis* foram testados para avaliar o seu potencial tóxico frente às larvas de *Artemia salina* na concentração inicial de 500  $\mu$ g/mL, os extratos e frações avaliados não apresentaram atividade citotóxica na concentração de 500  $\mu$ g/mL, por esse motivo não foram testados em concentrações menores. Os resultados são apresentados na tabela 5.

O extrato hexânico das folhas apresentou uma taxa de mortalidade de 23% das larvas de *A. salina*, sendo o maior valor observado entre os extratos e frações testadas. O valor para um extrato ser considerado como citotóxico é de 50% de mortalidade das larvas na concentração de 500  $\mu$ g/mL. Os resultados obtidos mostraram que nenhum dos extratos foi considerado citotóxico (FERRIGNI, et al., 1982).

Tabela 2. Resultado da atividade antibacteriana dos extratos e frações de *Casearia javitensis*, pelo método de difusão em poço.

| Partes da planta          | Extratos e Fases+   | <i>Bacillus cereus</i> | <i>Corynebacterium glutamicum</i> | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | <i>Staphylococcus aureus</i> | <i>Serratia marcescens</i> |
|---------------------------|---------------------|------------------------|-----------------------------------|-------------------------------|------------------------------|----------------------------|
| <b>Galho</b>              | Hexano              | 1,8 cm                 | 2,2 cm                            | -                             | 2,4 cm                       | -                          |
| <b>Galho</b>              | Metanol             | -                      | -                                 | 1,2 cm                        | 1,1 cm                       | -                          |
| <b>Galho</b>              | Metanol/Fase DCM    | 1,0 cm                 | 1,3 cm                            | 1,1 cm                        | 1,5 cm                       | -                          |
| <b>Galho</b>              | Metanol/Fase AcOEt  | 1,8 cm                 | -                                 | 0,9 cm                        | 1,1 cm                       | 1,1 cm                     |
| <b>Folha</b>              | Hexano              | 1,6 cm                 | -                                 | -                             | -                            | -                          |
| <b>Folha</b>              | Metanol             | 1,0 cm                 | -                                 | 1,1 cm                        | 1,1 cm                       | 1,2 cm                     |
| <b>Folha</b>              | Metanol/Fase DCM    | 1,0 cm                 | 1,0 cm                            | 0,9 cm                        | 0,9 cm                       | -                          |
| <b>Folha</b>              | Metanol/Fase AcOEt  | 1,3 cm                 | 1,1 cm                            | 1,9 cm                        | 1,6 cm                       | 1,1 cm                     |
| <b>Folha</b>              | Metanol/Fase aquosa | 0,8 cm                 | 1 cm                              | 1,1 cm                        | 1,1 cm                       | 0,9 cm                     |
| <b>Controle positivo*</b> |                     | 2,7 cm                 | 2,4 cm                            | 1,1 cm                        | 2,8 cm                       | 1,1 cm                     |

\*O controle positivo utilizado foi oxitetraciclina a uma concentração de 125 µg/mL.

+ concentração de extratos e fases de 1 mg/ mL

Os halos de inibição foram medidos incluindo o diâmetro do poço.

Tabela 3. Escala para interpretação dos resultados da atividade antioxidante (Martins, et. al., 2014)

| <b>Análise da atividade antioxidante<br/>(mg de extrato/ mg de ácido ascórbico)</b> | <b>Escala de comparação</b> |
|---|-----------------------------|
| <b>Menor que 1,0</b>  | Muito ativo                 |
| <b>Entre 1,1 e 2,0</b>  | Ativo                       |
| <b>Entre 2,1 e 3,0</b>  | Atividade moderada          |
| <b>Maior que 3,1</b>  | Inativo                     |

Tabela 4. Resultados da avaliação da capacidade antioxidante de extratos e fases de *Casearia javitensis* obtidos pelas metodologias de DPPH e Fe<sup>3+</sup>/Fenantrolina

| <b>Extrato<br/>Vegetal/ fração</b>  | <b>Ensaio com DPPH</b>     |                           |  | <b>Ensaio com Fe<sup>3+</sup>/Fenantrolina</b> |                           |  |
|-------------------------------------|----------------------------|---------------------------|--|--|---------------------------|--|
|                                     | Valores médios             |                           |  | Valores médios                                 |                           |  |
|                                     | $ \Delta\text{ABS}_{517} $ | $[\text{AA}]_{\text{eq}}$ | Equiv. (mg de extrato / mg de ácido ascórbico) | $ \Delta\text{ABS}_{508} $                     | $[\text{AA}]_{\text{eq}}$ | Equiv. (mg de extrato / mg de ácido ascórbico) |
| <b>Folhas hexano</b>                | 0,116                      | 1,002                     | 4,991  | 0,062  | 0,322                     | 15,589   |
| <b>Folhas MeOH</b>                  | 0,610                      | 4,895                     | 1,022  | 2,050  | 3,543                     | 1,427  |
| <b>Galhos Hexano</b>                | 0,115                      | 0,989                     | 5,204  | 0,059  | 0,126                     | 40,684   |
| <b>Galhos MeOH</b>                  | 0,610                      | 4,898                     | 1,027  | 2,025  | 3,503                     | 1,447  |
| <b>FoMeOH-FaDCM</b>                 | 0,106                      | 0,781                     | 6,466  | 0,570  | 0,893                     | 5,619  |
| <b>FoMeOH-FaAcOEt</b>               | 0,550                      | 4,666                     | 1,072  | 2,704  | 3,984                     | 1,256  |
| <b>FoMeOH-FaH<sub>2</sub>O/MeOH</b> | 0,262                      | 2,242                     | 2,237  | 0,899  | 1,360                     | 3,857  |
| <b>GaMeOH-FaDCM</b>                 | 0,103                      | 0,909                     | 5,507  | 0,347  | 0,558                     | 9,019  |

Tabela 5. Ensaio de toxicidade dos extratos de *C. javitensis*

| <b>Extrato testado</b> | <b>Concentração utilizada<br/>(<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b> | <b>Mortalidade (%)</b> |
|------------------------|---|------------------------|
| <b>Folhas hexano</b>   | 500   | 23                     |
| <b>Galhos Hexano</b>   | 500   | 20                     |
| <b>Galhos MeOH</b>     | 500   | 20                     |
| <b>FoMeOH-FaAcOEt</b>  | 500   | 10                     |
| <b>FoMeOH-FaDCM</b>    | 500   | 7                      |

## CONCLUSÃO

O estudo fitoquímico do extrato metanólico das folhas de *C. javitensis* permitiu o isolamento de duas substâncias, uma o 4-hidroxifenil-6-cafeoil- $\beta$ -L-glicosídeo (um fenil-glicosídeo) e o  $\beta$ -sitosterol (um esteroide). O fenil-glicosídeo está sendo relatado pela primeira vez no gênero, o que contribui com os conhecimentos sobre a composição química desta espécie.

As análises em CCDC mostram que os extratos metanólicos são uma potencial fonte de terpenos.

A avaliação da atividade antibacteriana do extrato hexânico dos galhos apresentou uma alta atividade frente às bactérias *Corynebacterium glutamicum* e *Staphylococcus aureus*. Já os extratos hexânicos das folhas e dos galhos foram ativos sobre *Bacillus cereus*. Os extratos metanólicos de folhas e galhos foram ativos frente às bactérias *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*, enquanto que o extrato metanólico das folhas foi ativo sobre *Serratia marcescens*.

Quando analisados quanto a sua toxicidade frente *A. salina*, nenhum dos extratos testados foi tóxico.

Com base nos resultados obtidos, a espécie em questão apresenta um forte potencial como fonte de substâncias bioativas, portanto o fracionamento dos extratos ativos continuará com a finalidade de obter as substâncias responsáveis por essas atividades.



**REFERÊNCIAS**

ABREU, A. C.; MCBAIN, A. J.; SIMOES, M. Plants as sources of new antimicrobials and resistance-modifying agents. **Natural Product Reports**, v. 29, n. 9, p. 1007-1021, 2012.

ALBANO, M. N.; da 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**, n. 147, p. 612-617, 2013.

ALVES, C. Q. ; BRANDÃO, H. N.; DAVID, J. M.; PEREIRA, D. J.; DA S. LIMA, L. Avaliação da atividade antioxidante de flavonóides. **Diálogos & Ciência**, v. 5, n. 12, p. 1-8, 2007.

ALVES, E. G.; CHICHARO V. A. H.; ASSIRATI C. L.; CARDOSO F. N. A.J.; ANDRADE, M. L.; CUNHA, W.L. ; GOMES M. C.H. Estudo comparativo de técnicas de screening para avaliação da atividade antibacteriana. **Química Nova**, v. 31, n. 5, p. 1224-1229, 2008.

ARAGÃO, P. C.A.; TOLEDO, J.B., MORAIS, A.A. ; BRAZ-FILHO, R. Substâncias naturais isoladas de *Stigmaphyllon tomentosum* e *Byrsonima variabilis*. **Química nova**, v. 13, n. 4, p.254-259, 1990.

AZMIR, J.; ZAIDUL, I.S.M.; RAHMAN, M.M.; SHARIF, K.M.; MOHAMED, A.; SAHENA, F.; JAHURUL, M.H.A.; GHAFOOR, K.; NORULAINI, N.A.N.; OMAR A.K.M. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. **Journal of Food Engineering**, n.117, p. 426-436, 2013.

BELIANIN, M. L.; STEPANOVA, E. V.; OGORODNIKOV, V. D. First total chemical synthesis of natural acyl derivatives of some phenolglycosides of the family *Salicaceae*. **Carbohydrate Research**, v. 363, p. 66-72, 2012.

BETINA, V. Bioautography in paper and thin-layer chromatography and its scope in the antiriotic field. **Journal of Chromatography**, v. 78, p. 41-51, 1973.

BIANCO DE SOUZA, G. H.; PALAZZO DE MELLO, J. C.; LOPES, N. P. **Revisões em Processos e Técnicas Avançadas de Isolamento e Determinação Estrutural de Ativos em Plantas**. 1. ed. Ouro Preto: UFOP, 312 p. 2012.

BIDLACK, W. R. et al. **Phytochemicals as Bioactive Agents**. 1. ed. [S.l.]: CRC Press LLC, 2000, 297 p.

BRISKIN, D. P. Medicinal Plants and Phytomedicines. Linking Plant Biochemistry and Physiology to Human Health. **Plant Physiology**, v. 124, n. 2, p. 507-514, out. 2000.

BUCHANAN B., G. W. . J. R. Natural Products (secondary metabolites). In: \_\_\_\_\_ **Biochemistry & Molecular Biology Of Plants**. [S.l.]: John Wiley & Sons, 2002. Cap. 24, p. 1250-1318. 2002.

CARBALLO, J. L. et. al., A comparison between two brine shrimp assays to detect in vitro cytotoxicity in marine natural products. **BMC Biotechnology**. v. 2, n. 17, 2002.

CASTAÑEDA, C. B.; RAMOS, L. E.; IBÁÑEZ, V. L. Evaluación de la capacidad antioxidante de siete plantas medicinales peruanas. **Revista Horizonte Medico**, v. 8, n. 1, p. 56-72, julho 2008.

CHEN, Z.; BERTIN, R.; FROLDI, G. EC50 estimation of antioxidant activity in DPPH assay using several statistical programs. **Food Chemistry**, v. 138, p. 414-420, 2012.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Padronização dos Testes de Sensibilidade a Antimicrobianos por Disco-difusão. **Approved Standard. CLSI**, v. 23, n. 1, 2002.

COUTINHO, M. A. S.; MUZITANO, M. F.; COSTA, S. S. Flavonoides: Potenciais agentes terapêuticos para o processo inflamatório. **Revista Virtual de Química**, v. 1, n. 3, p. 241-256, 2009.

CRAVOTTO, G. M. D. et. al. Phytotherapeutics: an evaluation of the potential of 1000 plants. **Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics**, v. 35, n. 1, p. 11-48. fev. 2010.

DA SILVA, E. F.; DOS SANTOS, G. B.; BIANCHI, R. C. **A Química na Natureza**. São Paulo: Sociedade Brasileira de Química, v. 7, p. 70, 2010.

DAVIES, J.; DAVIES, D. Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. **Microbiology And Molecular Biology Reviews**, v. 74, n. 3, p. 417-433, set. 2010.

DEWICK, P. M. **Medicinal Natural Products**. 2. ed. [S.l.]: John Wiley & Sons Ltd, 2002.

DI STASI, L. C.; HIRUMA-LIMA, C. A. **Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica**. 2. ed. São Paulo: UNESP, 594 p. 2002.

FERREIRA VITOR F., P. A. C. A fitoterapia no mundo atual. **Química Nova [online]**, v. 33, n. 9, p. 1829-1829, 2010.

FERREIRA, P. M. P. et al. Casearin X exhibits cytotoxic effects in leukemia cells triggered by apoptosis. **Chemico-Biological Interactions**, v. 188, n. 3, p. 497-503, 2010.

FERREIRA, S. H. et al. **Medicamentos a partir de Plantas Medicinais no Brasil**. 1. ed. [S.l.]: Academia Brasileira de Ciências, 131 p. 1998.

GENESTRA, M. Oxyl radicals, redox-sensitive signalling cascades and antioxidants. **Celullar Signalling**, v. 19, n. 9, p. 1807-1819, 2007.

HARVEY, A. L.; EDRADA-EBEL, R.; QUINN, R. J. The re-emergence of natural products for drug discovery in the genomics era. **Nutere Reviews-Drug Discovery**, v. 14, p. 111-129, 2015

HOUGHTON, P. J. Use of small scale bioassays in the discovery of novel drugs from natural sources. **Phytotherapy Research**, n. 14, p. 419-423, 2000.

IWU, M. M.; DUNCAN, A. R.; OKUNJI, C. O. New Antimicrobials of Plant Origin. **Perspectives on new crops and new uses**, p. 457-462, 1999.

KORGE, P.; PING,P.; WEISS, J. N. Reactive oxygen species production in energized cardiac mitochondria during hypoxia/reoxygenation: modulation by nitric oxide. **Circulation Research**. p. 873–880, 2008.

LAHLOU, M. The Success of Natural Products in Drug Discovery. **Pharmacology and Pharmacy**. n. 4, p. 17-31, 2013

LAGARTO, P. A., SILVA, Y. R., GUERRA, S. I., IGLESIAS, B. L. Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and the estimate of the medium lethal dose (LD50 value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts. **Phytomedicine**, v. 8, n. 5, pp. 395–400, 2011.

LEI LIU, et. al., Phenolic glycosides from the stems of *Homalium ceylanicum* (Gardner) Bentham (Flacourtiaceae/Salicaceae sensu lato). **Biochemical Systematics and Ecology**, n. 46, p. 55-58, 2013

LOPEZ, A. L. et al. Antioxidantes, un paradigma en el tratamiento de enfermedades. **Anacem**, v. 6, n. 1, p. 48-53, 2012.

MANSUROGLU, B.; DERMAN, S.; YABA, A.; KIZILBEY, K. Protective effect of chemically modified SOD on lipid peroxidation and antioxidant status in diabetic rats. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.72, p.79-87, 2014.

MARQUETE, R. O gênero *Casearia* no estado do rio de janeiro, brasil. **Rio de Janeiro: Escola Nacional de Botânica Tropical**, v. 58, n. 4, p. 705-738, 2007.

MARQUETE, R.; TORRES, R. B.; MEDEIROS, E. S. *Salicaceae* in Lista de Espécies da Flora do Brasil. **Jardim Botânico do Rio de Janeiro**, 2009. Acesso em: 18 Fev. 2014.

MARTINS, D. et. al. Tamizaje fitoquímico y evaluación de las actividades biológicas de *Duroia macrophylla* (Rubiaceae). **Journal of Pharmacy & Pharmacognosy Research**, v. 6, n. 2, p. 158-171, 2014

MATTOS, E. S. et al. Evaluation of antinociceptive activity of *Casearia sylvestris* and possible mechanism of action. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 112, p. 1-6, 2007.

MAYORGA, P. et al. Comparison of bioassays using the anostracan crustaceans *Artemia salina* and *Thamnocephalus platyurus* for plant extract toxicity screening. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 6, p. 897-903, 2010.

MEYER, B. N. et al. Brine Shrimp: A convenient general Bioassay for Active Plant Constituents. **Journal of Medicinal Plant Research**, v. 45, p. 31-34, 1982.

MOBOT. Mapa de calor de espécime. In: [HTTP://WWW.TROPICOS.ORG/NAME/40002213?TAB=MAPS](http://www.tropicos.org/name/40002213?TAB=MAPS) **TROPICOS.ORG**. [S.l.]: [s.n.], 2014. acessado em: 17 de fevereiro de 2014.

MOSADDIK, M. A. et al. Screening of some Australian Flacourtiaceae species for in vitro antioxidant, cytotoxic and antimicrobial activity. **Biochemical systematics and ecology**, n. 35, p. 166-168, 2007a.

MOSADDIK, M. A. et al. Clerodane diterpenes from the stems of *Casearia grewiifolia* var. *gelonioides* (Flacourtiaceae/Salicaceae sensu lato). **Biochemical systematics and ecology**, n. 35, p. 631-633, 2007b.

MOSADDIK, M. A. et al. New phenolic glycosides from the stems and leaves of *Casearia multinervosa*. **Natural Product Research**, v. 20 n. 6, p. 641-647, 2006.

MOSADDIK, M. A. et al. Phenolic glycosides from some australian species of flacourtiaceae (salicaceae sensu lato). **Phytomedicine**, v. 11, p. 461-466, 2004.

MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. **Microbiología Médica**. 6. ed. [S.l.]: Elsevier Editora Ltda, 2010. 830 p.

NEWMAN, D. J. ; CRAGG, G.M. Natural Products As Sources of New Drugs over the 30 Years from 1981 to 2010. **Journal of Natural Products**, n.75, p. 311-335, 2012.

OXILIA, R. M. Estrés Oxidativo y Sistema de Defensa Antioxidante. **Instituto de Medicina Tropical**, v. 5, n. 2, p. 23-29, 2010.

PHAM-HUY, L. A. et al. Free Radicals, Antioxidants in Disease and Health. **International journal of Biomedical science**, v. 4, n. 2, p. 89-96, 2008.

PINTO, C. A. O brasil dos viajantes e dos exploradores e a química de produtos naturais brasileira. **Química Nova**, v. 18, n. 6, 1995.

PRIETO, A. M. et al. Assessment of the chemopreventive effect of casearin B, a clerodane diterpene extracted from *Casearia sylvestris* (Salicaceae). **Food and Chemical Toxicology**, v. 53, p. 153-159, 2013.

RAJU, G. G., et. al., Inventores. Pharmaceutically active extracts of vitex leucoxydon, a process of extracting the same and a method of treating diabetes and inflammatory diseases therewith. **United States Patent US007780997B2**. Agosto 24, 2010.

RAMAWAT, K. G. The Chemical Diversity of Bioactive Molecules and Therapeutic Potential of Medicinal Plants. In: RAMAWAT, K. G. **Herbal Drugs: Ethnomedicine to Modern Medicine**. [S.l.]: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2009. Cap. 2, p. 402.

RAMIREZ, L. S.; CASTANO, D. M. Metodologias para evaluar in vitro la actividad antibacteriana. **Scientia et Technica Año XV**, n. 42, p. 263-268, Agosto 2009.

RAYANIL, K.; NIMNOUN, C.; TUNTIWACHWUTTIKU, P. New phenolics from the wood of *Casearia grewiiifolia*. **Phytochemistry Letters**, v. 5, p. 59-62, 2012.

SATYAJIT D. SARKER, L. N. **Chemistry for Pharmacy Students: general, organic, and natural product chemistry**. 1. ed. [S.l.]: John Wiley & Sons Ltd, v. I, 2007. 540 p.

SHARMA, O. P.; BHAT, T. K. DPPH antioxidant assay revisited. **Food Chemistry**, v. 113, p. 1202-1205, 2009.

SILVA, S. L. et al. Antimicrobial Activity of Ethanol Extract from Leaves of *Casearia sylvestris*. **Pharmaceutical Biology**, v. 46, n. 5, p. 347-351, 2008.

SILVA M.T.G., SIMAS, S. M., BATISTA, T.G. F. M., CARDARELLI, P. T. T. C. B. Studies on antimicrobial activity, invitro, of *Physalis angulata* L. (Solanaceae) fraction and physalin B bringing out the importance of assay determination. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 7, pp. 779, 2005

SIMOES, M.; BENNETT, R. N.; ROSA, E. A. S. Understanding antimicrobial activities of phytochemicals against multidrug resistant bacteria and biofilms. **Natural Products Reports**, v. 26, n. 6, p. 746-757, 2009.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica Sistemática – guaiustrado para identificação das famílias de fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG III**. 3. ed. [S.l.]: Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2012. 768 p.

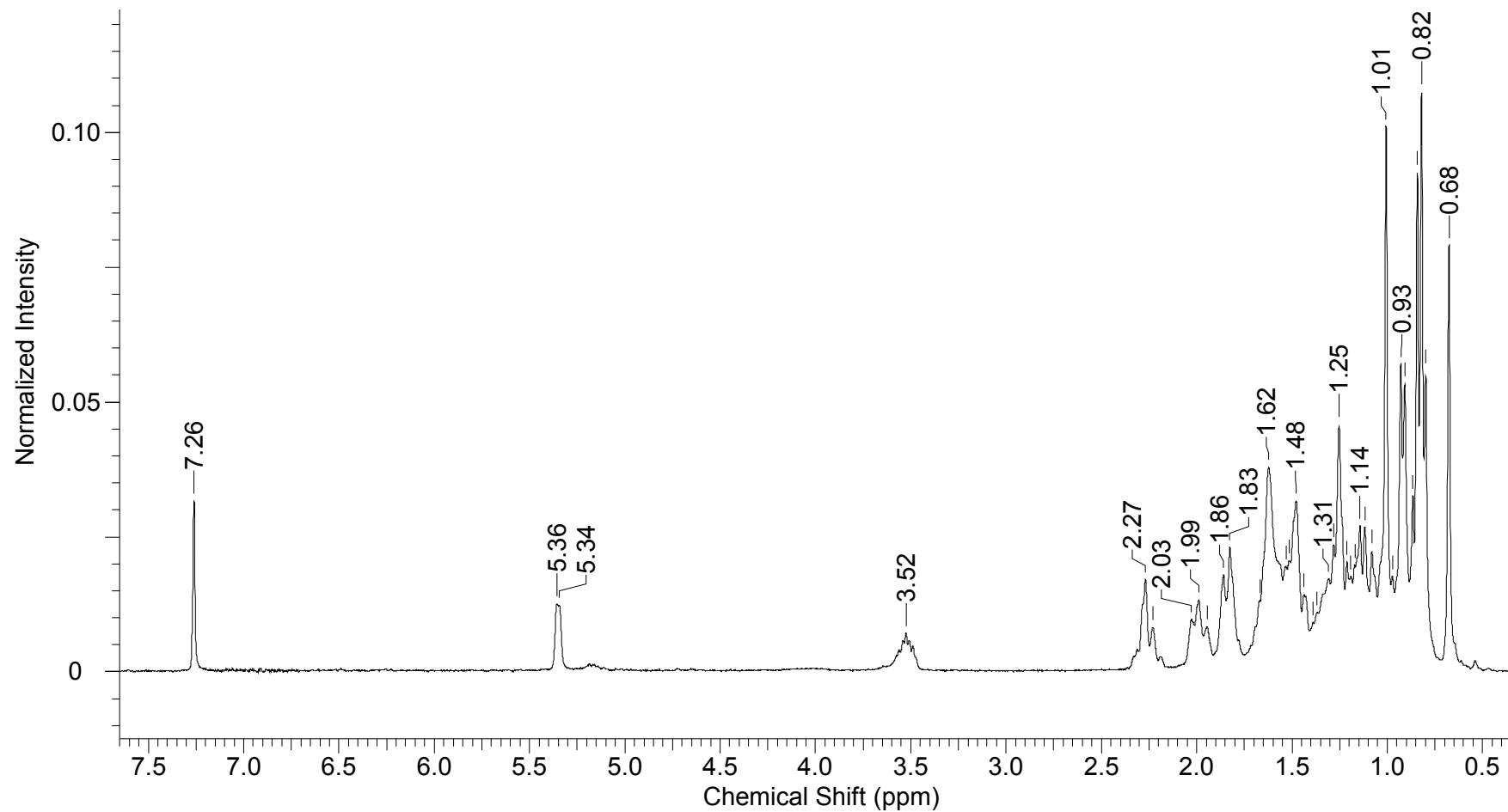
STEIN, G.; WEISS, J. Chemical effects of ionizing radiations. **Nature**, v. 161, p. 650-650, 1948.

STEVENS, P. F. **Angiosperm Phylogeny Website**. [S.l.]: [s.n.], 2001. Version12. Disponível em [www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/](http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/). Acesso em 14/02/2014.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. Secondary metabolites and Plant defense. In: TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant Physiology**. 5. ed. [S.l.]: Sinauer Associates, Inc, 2010. p. 782.

- VALGAS, C.; MACHADO DE SOUZA, S.; SMÂNIA, E. F. A.; SMÂNIA JR, A. Screening methods to determine antibacterial activity of natural products. **Brazilian Journal of Microbiology**, n. 38, p. 369-380, 2007.
- VASQUEZ, S. P. F.; WEBBER, A. C. Biologia floral e polinização de *Casearia grandiflora*, *Casearia javitensis* e *Lindackeria paludosa* (Flacourtiaceae) na região de Manaus, AM. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 33, n. 1, p. 131-141, 2010.
- VERONESI, R.; FOCACCIA, R. **Tratado de infectologia**. 2. ed. [S.l.]: Atheneu, v. 1, 2002.
- VIEGAS, J. C.; BOLZANI, V. D. S.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova [online]**, v. 29, n. 2, p. 326-337, 2006.
- VIEIRA-JUNIOR, G. M. et al. Cytotoxic Clerodane Diterpenes from *Casearia rupestris*. **Journal of Natural Products**, n. 74, p. 776-781, jul. 2011.
- WANG W, ZHAO JP, WANG YH, SMILLIE TA, LI XC, KHAN IA. Diterpenoids from *Casearia sylvestris*. **Planta Med**, n. 75, p.1436–1441, 2009.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. General guidelines for methodologies on research and evaluation of traditional medicine, WHO, Geneva, Switzerland, 2005.
- YING, P.; YICUN, C.; QINGNAN, L.; XIAOYU, Y.; JINZHI, W.; JINHONG, Z. The synthesis and evaluation of novel hydroxyl substituted chalcone analogs with *in vitro* anti free radicals pharmacological activity and *in vivo* anti-oxidation activity in a free radical-injury Alzheimer's model. **Molecules**, v. 18, p. 1693-1703, 2013
- XIA, L. et al. The genus *Casearia*: a phytochemical and pharmacological overview. **Phytochem Rev**, 2014.
- ZAMORA, D. J. Antioxidants: micronutrients fighting for health. **Revista Chilena de Nutricion**, v. 34, p. 1-11, 2007.

## ANEXOS

Anexo A- Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de  $\beta$ -sitosterol (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).



Anexo B- Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de 4-hidroxifenil-6-cafeoil- $\beta$ -L-glicosídeo (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ).

