



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUTOS
NATURAIS E SINTÉTICOS BIOATIVOS



**Substâncias fenólicas e diterpênica de *Casearia arborea (rich.) urb.*
(Salicaceae) e avaliação antimicrobiana do seu diterpeno**

MARIA DENISE LEITE FERREIRA

JOÃO PESSOA

2016

MARIA DENISE LEITE FERREIRA

**Substâncias fenólicas e diterpênica de *Casearia arborea (rich.) urb.*
(Salicaceae) e avaliação antimicrobiana do seu diterpeno**

Dissertação apresentada à coordenação do Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos da Universidade Federal da Paraíba, em cumprimento às exigências para obtenção do Grau de Mestre.

ORIENTADORA: Prof.^a Dr.^a. Maria de Fátima Vanderlei de Souza

JOÃO PESSOA-PB

2016

F383s Ferreira, Maria Denise Leite.
Substâncias fenólicas e diterpênica de *Casearia arborea* (rich.) urb.
(Salicaceae) e avaliação antimicrobiana do seu diterpeno / Maria Denise Leite
Ferreira. - João Pessoa, 2017.
97 f. : il.

Orientadora: Maria de Fátima Vanderlei de Souza.
Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCS

1. Produtos naturais. 2. *Casearia arborea* - substâncias fenólicas. 3. Atividade antimicrobiana. I. Título.

UFPB/BC

MARIA DENISE LEITE FERREIRA

**Substâncias fenólicas e diterpênica de *Casearia arborea* (rich.) urb.
(Salicaceae) e avaliação antimicrobiana do seu diterpeno**

Aprovada em: _____ / _____ / _____

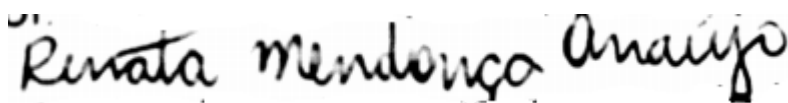
COMISSÃO EXAMINADORA



Prof.^a Dr.^a Maria de Fátima Vanderlei de Souza (UFPB - Orientadora)



Prof. Dr.^a Tatjana Keesen de Souza Lima Clemente (UFPB- Avaliador interno)



Prof. Dr.^a Renata Mendonça Araújo (UFRN- Avaliador externo)

À Deus por sempre me conceder sabedoria nas escolhas dos melhores caminhos, coragem para acreditar e força para não desistir.

Às pessoas que mais amo na vida: Duani Leite, Maria do Socorro Leite, Olívia Dayse, Danúbia e Júlio pelo amor, apoio, confiança e motivação incondicional que sempre me impulsiona em direção às vitórias dos meus desafios.

AGRADECIMENTOS

À Deus por tudo;

Aos meus familiares, especialmente aos meus pais, Dvani e Maria, e as minhas irmãs Olívia e Danúbia, pelo amor e companheirismo;

Ao meu namorado Pedro, por contornar minhas preocupações desnecessárias e ser tão presente em minha vida, longe ou perto;

A minha orientadora professora Dr^a Maria de Fátima Vanderlei pela confiança, incentivo e dedicação;

Aos que me acompanham durante a minha trajetória, os meus amigos: Fátima, Rhayane, Thamires, Yorrana, Emerson, Allysson, Renan, Yago, Priscila, Naiana e Jessica. Em especial á Laísa, Rosany, Yuri e Daniele, pelo incentivo, companheirismo e amor;

Aos amigos da turma de mestrado, Renan, Adriano, Mariana, Luiz André, Ayala, pelo companheirismo nas aulas e por deixa-las menos exaustivas;

A todos que fazem ou fizeram parte da equipe da Prof^a. Fátima Vanderlei pelo aprendizado e amizade: Marianne, Micaelly, Yanna, Yngred, Millen, Davi, Otemberg, Anderson, Jessica, Diégina, Nayara e Isabela.

À banca examinadora pela disponibilidade e contribuição para o aprimoramento deste trabalho.

Aos técnicos e funcionários dos laboratórios pela colaboração na realização da pesquisa.

À todos que direta ou indiretamente contribuíram para realização deste trabalho.

RESUMO

Casearia arborea (Rich.) Urb. (Salicaceae) também conhecida como “pau de pico”, “imbuí amarelo” ou “canela”, é encontrada desde a Guatemala até a Bolívia e Brasil. O estudo fitoquímico da espécie, utilizando técnicas cromatográficas, conduziu ao isolamento do flavonoide Canferol 3-O- α -L-arabinofuranosídeo das folhas e flores, e 4',5,7-trihidroxi-3',5'-dimetoxiflavona (Tricina), e ao reisolamento da Kolavelona (ent-13-hidróxi-2-oxo-trans-cleroda-3,14-dieno) do caule. As substâncias isoladas foram caracterizadas por análise espectroscópica utilizando Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e ^{13}C uni e bidimensionais. A atividade antimicrobiana da substância Kolavelona foi avaliada em diversas cepas, determinando-se sua concentração inibitória mínima (CIM), a atividade antibacteriana do composto foi considerada excelente frente às bactérias testadas, e ativa apenas frente às leveduras da espécie *Candida tropicalis*.

Palavras-chave: *Casearia arborea* (Rich.) Urb., kolavelona, atividade antimicrobiana.

ABSTRACT

Casearia arborea (Rich.) Urb. (Salicaceae) also known as "peak wood", "yellow imbue" or "cinnamon", is found from Guatemala to Bolivia and Brazil. The phytochemical study of the species, using chromatographic techniques led to the isolation of flavonoid kaempferol 3-O- α -L-arabinofuranosídeo of leaves and flowers and 4', 5,7-trihydroxy-3', 5'-dimethoxy (Tricine), and reisolation of Kolavelona (ent-13-hydroxy-2-oxo-trans-3,14-diene-cleroda) of the stem. Both compounds were characterized by spectroscopic analysis using Nuclear Magnetic Resonance ^1H and ^{13}C one- and two-dimensional. The antimicrobial activity of Kolavelona substance was carried out in several strains, determining its minimum inhibitory concentration (MIC), the antibacterial activity of the compound was considered excellent front of the tested bacteria, and only active front of the yeast of the species *Candida tropicalis*.

Keywords: *Casearia arborea* (Rich.) Urb, kolavelona, antimicrobial activity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Caracteres morfológicos mais evidentes em espécies de Casearias.....	23
Figura 2: Casearia arborea (Rich.) Urb.	26
Figura 3: Estrutura química dos cinco diterpenos clerodanos, isolados por Beutler (2000).....	26
Figura 4: Estrutura química dos compostos isolados por Ramirez, (2008)	27
Figura 5: Canferol 3-O- α -L-arabinofuranosídeo (Ca-1)	54
Figura 6: Espectro de RMN ^1H (δ , MeOD, 500 MHz) de Ca-1.....	57
Figura 7: Expansão do espectro de RMN ^1H (δ , MeOD, 500 MHz) de Ca-1	57
Figura 8: Expansão do espectro de RMN ^1H (δ , MeOD, 500 MHz) de Ca-1.	58
Figura 9: Espectro de RMN ^{13}C -APT (δ , MeOD, 500 MHz) de Ca-1.	58
Figura 10: Espansão do espectro de ^1H x ^{13}C -HMQC (δ , MeOD, 500 MHz) de Ca -1.. ..	59
Figura 11: Espansão do espectro de ^1H x ^{13}C -HMQC (δ , MeOD, 500 MHz) de Ca -... ..	59
Figura 12: Espansão do espectro de RMN ^1H x ^{13}C -HMBC (δ , MeOD, 500 MHz) de Ca-1.	60
Figura 13: Espansão do espectro de RMN ^1H x ^{13}C -HMBC (δ , MeOD, 500 MHz) de Ca-1.	60
Figura 14: 4: 4',5,7-trihidroxi-3',5'-dimetoxiflavona (Ca-2).....	63
Figura 15: Espectro de RMN ^1H (δ , MeOD, CDCl_3 , 500 MHz) de Ca-2	66
Figura 16: Expansão do espectro de RMN ^1H (δ , MeOD, CDCl_3 , 500 MHz) de Ca-2... ..	66
Figura 17: Expansão do espectro de RMN ^{13}C -APT (δ , MeOD, CDCl_3 , 500 MHz) de Ca-2.	67
Figura 18: Expansão do espectro de RMN ^{13}C -APT (δ , MeOD, CDCl_3 , 500 MHz) de Ca-2.	67
Figura 19: Espectro de RMN ^1H x ^{13}C -HMQC (δ , MeOD, CD_3OD , 500 MHz) de Ca-2.	68
Figura 20: Espectro de RMN ^1H x ^{13}C -HMQC (δ , MeOD, CDCl_3 , 500 MHz) de Ca-2.	68

Figura 21: Espectro de RMN $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMBC (δ , MeOD, CDCl_3 , 500 MHz) de Ca-2.....	69
Figura 22: Expansão do espectro de RMN $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMBC (δ , MeOD, CDCl_3 , 500 MHz) de Ca-2.....	69
Figura 23: Expansão do espectro de RMN $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMBC (δ , MeOD, CDCl_3 , 500 MHz) de Ca-2.....	70
Figura 24: 13-hidróxi-2-oxo-trans-ent-cleroda-3,14-dieno (Ca-3)	72
Figura 25: Espectro de RMN ^1H de Ca-3 (δ , CDCl_3 , 500 MHz).....	74
Figura 26: Expansão do espectro de RMN ^1H de Ca-3 na região entre 4,90 e 5,90 (δ , CDCl_3 , 500 MHz)	74
Figura 27: Expansão do espectro de RMN ^1H de Ca-3 na região entre 2,34 e 1,70 (δ , CDCl_3 , 500 MHz)	75
Figura 28: Expansão do espectro de RMN ^1H de Ca-3 na região entre 1,16 e 1,40 (δ , CDCl_3 , 500 MHz)	75
Figura 29: Espectro de RMN ^{13}C -BB de Ca-3 (δ , CDCl_3 , 125 MHz).....	76
Figura 30: Expansão do espectro de RMN ^{13}C -APT de Ca-3 na região entre 110,00 a 204,00 (δ , CDCl_3 , 125 MHz)	76
Figura 31: Expansão do espectro de RMN ^{13}C -APT de Ca-3 na região entre 14,00 a 48,00 (δ , CDCl_3 , 125 MHz)	77
Figura 32: Expansão do espectro de RMN ^{13}C -BB de Ca-3 na região entre 74,00 a 208,00 (δ , CDCl_3 , 125 MHz)	77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Fracionamento cromatográfico das fases AcOEt-MeOH (9:1), AcOEtMeOH (7:3) e AcOEt-MeOH (1:1) em XAD-2	40
Tabela 2: Dados comparativos de RMN ¹ H e ¹³ C (δ, MeOD, 500 MHz) de Ca-1 comparados com o modelo da literatura (δ,CDCl ₃ , 500 MHz)..	55
Tabela 3: Dados espectrais de RMN ¹ H e ¹³ C (δ, MeOD, 500 MHz) de Ca-1	56
Tabela 4: Dados comparativos de RMN 13C (δ, MeOD, CDCl ₃ , 500 MHz) de Ca – 2 comparados com o modelo da literatura (δ, DMSO-d ₆ , 500 MHz)	64
Tabela 5: Dados espectrais de RMN 1H e 13C (δ, MeOD, CDCl ₃ 1:1, 500 MHz) de Ca - 2.	65
Tabela 6: Dados comparativos de Ca-3 RMN ¹ H e RMN ¹³ C (δ, CDCl ₃ , 500 e 125 MHz) com modelo a literatura: Kolavelol e Kolavelona (δ, CDCl ₃ , 500 e 125 MHz) (RAMIREZ, 2008)	73
Tabela 7: Valores de CIM (µg/mL) da kolavelona sobre bactérias e leveduras.....	83

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Alguns constituintes químicos isolados de espécies da família Salicaceae e suas atividades biológicas e/ou farmacológicas relatadas na literatura	28
Quadro 2: Representação cromatográfica da fração Hexano-AcOEt (1:1) do extrato etanólico bruto do caule de <i>Casearia arbórea</i> (Rich.) Urb	49
Quadro 3: Representação cromatográfica da fração Hexano-AcOEt (7:3) do extrato etanólico bruto do caule de <i>Casearia arbórea</i> (Rich.) Urb	49
Quadro 4: Representação cromatográfica da sub-fração 18-55 da fração Hexano-AcOEt (7:3) do extrato etanólico bruto do caule de <i>Casearia arborea</i> (Rich.) Urb.....	50

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1: Obtenção e fracionamento do extrato etanólico bruto das folhas e flores de <i>Casearia arborea</i> (Rich.) Urb	43
Esquema 2: Processamento cromatográfico da fração A das folhas e flores de <i>Casearia arborea</i> (Rich.) Urb	44
Esquema 3: Processamento cromatográfico da fração MeOH:H ₂ O (1:1) das folhas e flores de <i>Casearia arborea</i> (Rich.) Urb.....	45
Esquema 4: Obtenção e fracionamento do extrato etanólico bruto do caule de <i>Casearia arborea</i> (Rich.) Urb	46
Esquema 5: Fracionamento cromatográfico da fração Hexano-AcOEt (1:1) do extrato etanólico bruto do caule de <i>Casearia arborea</i> (Rich.) Urb	47
Esquema 6: Fracionamento cromatográfico da fração Hexano-AcOEt (7:3) do extrato etanólico bruto do caule de <i>Casearia arborea</i> (Rich.) Urb	48
Esquema 7: Fracionamento cromatográfico da fração 18/55 do extrato etanólico bruto do caule de <i>Casearia arborea</i> (Rich.) Urb.....	48

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E FÓRMULAS

AcOEt: Acetato de etila

APT: Attached Proton Test

ATCC: American Type Culture Colectio

BB: Broad Band

CCD: Cromatografia em Camada Delgada

CCDP: Cromatografia em Camada Delgada Preparativa

CCDA: Cromatografia em Camada Delgada Analítica

CDCl₃: Clorofórmio deuterado

CHCl₃: Clorofórmio

CIM: Concentração Inibitória Mínima

cm: Centímetro

COSY: Correlation Spectroscopy

d: Duplete

dd: Duplo duplete

DMSO-d₆: Dimetil sulfóxido deuterado

EEB: Extrato Etanólico Bruto

EtOH: Etanol

g: Grama

HMBC: Heteronuclear Multiple Bond Correlation

HMQC: Heteronuclear Multiple Quantum Correlation

HSQC: Heteronuclear Single Quantum Correlation

Hz: Hertz

J: Constante de acoplamento

m: Multiplete

MeOH: Metanol

MeDO: Metanol deuterado

MHz: Mega hertz

mg: Miligrama

µg: Micrograma

mL: Mililitro

NOESY: Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy

OMS: Organização Mundial da Saúde

PB: Paraíba

PgPNSB: Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos

ppm: Partes por milhão

Rf: Fator de Retenção

RMN ^1H : Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

RMN ^{13}C : Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13

s: Singleto

δ : Deslocamento químico em ppm

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1 Considerações sobre a família Saliaceae: aspectos etnobotânicos e etnofarmacológicos	20
2.2 Considerações sobre o gênero <i>Casearia</i>	22
2.3 Considerações sobre a espécie <i>Casearia arborea</i> (Rich.) Urb	25
2.4 Atividade antimicrobiana	32
3 OBJETIVOS	35
3.1 OBJETIVO GERAL	35
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	35
4. ESTUDO FITOQUÍMICO.....	37
4.1 Procedimentos gerais.....	37
4.1.1 Levantamento bibliográfico.....	37
4.1.2 Coleta do material vegetal.....	37
4.1.3 Triagem fitoquímica	37
4.1.4 Isolamento e identificação dos constituintes químicos de <i>Casearia arborea</i> (Rich.) Urb	37
4.1.4.1 Isolamento e identificação dos constituintes químicos de <i>Casearia arborea</i> (Rich.) Urb	38
4.1.4.2 Caracterização dos constituintes químicos	38
4.1.4.3 Ressonância magnética nuclear	38
4.2 Procedimentos cromatográficos	39
4.2.1 Processamento do material botânico das folhas e flores de <i>Casearia arborea</i> (Rich.) Urb.....	39
4.2.2 Cromatografia líquida sob pressão reduzida do extrato etanólico bruto das folhas e flores	39
4.2.3 Processamento cromatográfico das fases AcOEt-MeOH (9:1), AcOEt-MeOH (7:3) e AcOEt-MeOH (1:1) (Fração A) do EEB das folhas e flores de <i>Casearia arborea</i> (Rich.) Urb.....	39
4.3 Processamento do material botânico (Caule)	41

4.3.1 Cromatografia líquida sob pressão reduzida do extrato etanólico bruto do Caule	41
4.3.2 Processamento cromatográfico da fase Hexano-AcOEt (1:1) do EEB do caule de Casearia arborea (Rich.) Urb	41
4.3.3 Processamento cromatográfico para o reisolamento da kolavelona.....	42
5. RESULTADOS	52
5.1 Identificação estrutural das substâncias isoladas de Casearia arborea (Rich.) Urb	52
5.1.1 Identificação estrutural de Ca-1.....	52
5.1.2 Identificação estrutural de Ca-2.....	61
5.1.3 Identificação estrutural de Ca-3.....	70
6. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE Ca-3.	79
6.1 Avaliações da atividade antimicrobiana da kolavelona (Ca-3)	79
6.2 Preparação da solução de Ca-3.....	79
6.3 Obtenção dos microrganismos.....	79
6.4 Obtenção dos meios de cultura.....	80
6.5 Preparação do inóculo.....	80
6.6 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	80
6.7 Resultados da atividade antimicrobiana com Ca-3	81
7. CONCLUSÕES	85
8. REFERÊNCIAS.....	87

Introdução

1 INTRODUÇÃO

As pesquisas com plantas medicinais despertam a cada dia um grande interesse devido à vasta biodiversidade da flora do planeta e à ausência de descobertas de novos fármacos alternativos para tratamento de doenças infecciosas, metabólicas, imunossupressão e câncer (ARAÚJO et al., 2014).

O uso racional de plantas medicinais é uma das alternativas da Organização Mundial de Saúde (OMS), que valoriza o uso das terapias tradicionais, visto seu reconhecimento como forma de tratamento eficaz na atenção básica, podendo ser útil em diversas necessidades da população (TOMAZZONI et al., 2006). Estima-se que 80% da população mundial, com uma média de 3,3 bilhões de pessoas, dependem de plantas como remédio, e a maior parte desse tratamento envolve o uso de extratos e de seus componentes ativos (MAHOMOODALLY; SEEBALUCK, 2013).

De maneira análoga, no Brasil, aproximadamente 82% da população utiliza produtos à base de plantas medicinais nos seus cuidados com a saúde, seja pelo conhecimento tradicional na medicina indígena, quilombola, entre outros povos e comunidades leigas, ou através da tradição entre gerações (BRASIL, 2012).

Na Conferência Internacional sobre Atenção Primária em Saúde realizada em Alma-Ata, em 1978, a OMS passou a reconhecer oficialmente o uso de fitoterápicos com finalidade profilática, curativa e paliativa ou fins de diagnóstico, recomendando aos Estados Membros a difusão dos conhecimentos necessários ao seu uso (GONÇALVES et al., 2013). O uso de medicamentos à base de plantas está a aumentar rapidamente em muitos países, especialmente o Brasil, onde a grande biodiversidade é uma fonte potencial de tratamentos novos e mais acessíveis para diversas condições (MAZZARI; PRIETO, 2014).

Atualmente, os principais instrumentos norteadores para o Desenvolvimento das ações/programas com plantas medicinais e fitoterapia são: a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde (SUS), com diretrizes e linhas de ação para “Plantas Medicinais e Fitoterapia no SUS”, e a “Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos”, com abrangência da cadeia produtiva de plantas medicinais (GUIMARÃES; MOURA, 2015).

Nos últimos quarenta anos, graças aos progressos alcançados com os métodos cromatográficos e espectroscópicos, os conhecimentos sobre plantas medicinais foram consideravelmente aumentados, obtendo-se um elevado número de novos constituintes isolados e identificados. Vários estudos farmacológicos que comprovam a ação dessas substâncias, além de trabalhos referentes aos mecanismos que envolvem a bioformação desses constituintes no vegetal fomentam estes conhecimentos sobre plantas medicinais (DA CUNHA, 2003).

Outro ponto de relevância é a crescente busca de novos agentes antimicrobianos, uma vez que o elevado potencial de recombinação genética das bactérias tem provocado o aumento de cepas multirresistentes e conseqüentemente, tornando ineficazes muitos fármacos antimicrobianos disponíveis no mercado (CWALA; IGBINOSA; OKOH, 2011)

Diante de fatos que revelam a grande importância que envolve o estudo das drogas de origem vegetal e sabendo que, para atender seus critérios de qualidade, eficácia, segurança e alicerçar seu uso pelas populações, inúmeras pesquisas precisam ser desenvolvidas. Fundamentado neste princípio escolheu-se para este estudo, explorar o potencial fitoquímico e antimicrobiano de *Casearia arborea* (Rich.) Urb. família Salicaceae, cujas espécies são bastante citadas na literatura pelas suas atividades anti-inflamatórias e antibacterianas (PHILIPSEN et al., 2013; STANSTRUP et al.; 2010).

Revisão da Literatura

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Considerações sobre a família Salicaceae: aspectos etnobotânicos e etnofarmacológicos

A família Salicaceae possui distribuição cosmopolita, de ocorrência nos trópicos e subtropicais das Américas, África, Ásia, Austrália e ilhas do Pacífico, com cerca de 50 gêneros e aproximadamente 1000 espécies (SOUZA; LORENZI, 2012). No Brasil são citados 18 gêneros e 99 espécies, destas 30 são consideradas endêmicas, e encontram-se nos mais diferentes ambientes, dos domínios da floresta amazônica, mata atlântica, caatinga, cerrado, pantanal até os campos sulinos (MARQUETE; TORRES; MEDEIROS, 2014).

Originalmente, Salicaceae Mirb. era composta dos gêneros *Populus* e *Salix*, ambos habitando o hemisfério norte (ANGUS, 1997; JUDD; MANCHESTER, 1997). A análise filogenética a partir de dados morfológicos e moleculares indicaram relações com os membros da ordem *Malpighiales* e novas circunscrições para a família Salicaceae têm sido propostas: a maior parte ou toda a família Flacourtiaceae não cianogênicos, entre eles destaca-se o gênero *Casearia*. Esta relação monofilética é sustentada por sequências de DNA, que apoiam uma relação próxima entre estes táxons (JUDD et al., 2009).

O nome Salicaceae, tem prioridade de uso sobre Flacourtiaceae, de acordo com as regras da nomenclatura botânica e deve ser utilizado em detrimento de Flacourtiaceae (SOBRAL et al., 2006).

A família Salicaceae é composta por árvores, arbustos ou raramente lianas, folhas simples, alternas ou raramente opostas, margem comumente serrada ou inteira com pontuações translúcidas; Apresenta inflorescência em racemos alongados e bracteados, fascículos ou cimeiros terminais ou axilares; Suas flores são andróginas ou unissexuadas, actinomorfas, hipóginas ou períginas, de cálice 3-6-mero, dialissépalo ou gamossépalo, com prefloração imbricada ou valvar, corola 3-8-mera, dialipétala, prefloração imbricada ou valvar; estames (1) 2-numerosos livres ou unidos entre si, com anteras rimosas, alongadas; ovário súpero, unilocular, bi a pluriovulado; fruto do tipo cápsula ou baga, raramente drupa (BARROSO et al., 2002; SOUZA; LORENZI, 2012).

Do ponto de vista etnobotânico, merece destaque o uso medicinal dos gêneros *Casearia* e *Salix*, que juntamente com o gênero *Populus*, são utilizados como árvores ornamentais. A maioria dos gêneros que ocorrem no Brasil é formada por poucas espécies e possuem distribuição restrita, à exceção de *Casearia* e *Xylosma* e, em menor escala *Banara*, *Ryania*, *Prockia* e *Laetia* (MORITZ, 2010).

Em estudos prévios com algumas de suas espécies, foram reportadas várias atividades biológicas relevantes, tendo como exemplos: propriedades antibacterianas, antivirais, hipolipêmicas e hipoglicemiantes, antiofídicas e citotóxicas (PHILIPPSEN et al., 2013).

São produtoras de um largo espectro de substâncias bioativas (MOSADDIK et al., 2004). Espécies do gênero *Ryania* possuem substâncias tóxicas em todas as partes vegetais (JEFFERIES et al., 1992). A substância rianodina foi isolada da espécie *Ryania speciosa*, sendo que esta substância foi um dos primeiros produtos naturais utilizados como inseticidas (ROEL et al., 2000).

Espécies do gênero *Salix*, por sua vez, são conhecidas pela produção de salicina, salicortina, salicilol e compostos fenólicos glicosilados (POHJAMO et al., 2003; FERNANDES et al., 2009).

O uso na medicina popular de *Flacourtia indica*, principalmente por nativos da Índia, onde os frutos são usados para o tratamento de icterícia e as raízes para problemas estomacais, estimulou uma pesquisa com as partes aéreas, onde foi observado que um dos constituintes majoritários do extrato AcOEt, o poliotrisosideo, apresentou forte atividade antiplasmodial (KAOU et al., 2010).

A quimiotaxonomia da família mostrou-se diversificada, podendo-se destacar algumas classes de produtos naturais como: lignanas, terpenóides, cumarinas, alcaloides, saponinas e flavonoides, onde inúmeras substâncias isoladas apresentam significativa atividade farmacológica, segundo várias literaturas. O Quadro 1 (Pág. 28) elenca alguns constituintes químicos isolados de espécies de *Salicaceae*, suas atividades farmacológicas e/ou biológicas, ressaltando assim a sua importância quimiotaxonômica.

2.2. Considerações sobre o gênero *Casearia*

O gênero *Casearia* é composto por cerca de 180 espécies arbóreas distribuídas pela região neotropical, África, Malásia, Austrália e ilhas do Pacífico (THADEO et al., 2009). No Brasil são encontradas 45 espécies, sendo 19 restritas ao território brasileiro e 25 com ampla distribuição, que exibem muita variação morfológica, embora muitos sejam, vegetativamente, bem semelhantes (ALFORD, 2003).

As espécies do gênero se apresentam como árvores e arbustos de tronco com casca lisa e fissurada, com ramos cilíndricos, delgados, raramente armados, levemente flexuosos a eretos, acinzentados ou amarronzados; Apresentam folhas dísticas, estípulas ovadas a subuladas, caducas ou persistentes, folíolos glabros ou pubescentes, pecíolo subcilíndrico a cilíndrico; Inflorescências fasciculadas, multifloras ou paucifloras; Flores hermafroditas, monoclamídeas, pequenas, esverdeadas, 5 sépalas, soldadas na base, reflexas na antese, 10 estames, uni seriados, perigíneos, filetes livres, anteras globosas; Ovário sésil, estilete inteiro, estigmas simples ou trifido no ápice, globoso ou capitado; Fruto do tipo cápsula, globosa, trivalvar; Sementes numerosas, glabras a pubescente (SLEUMER, 1980; MARQUETE, 2001; LIMA et al., 2004).

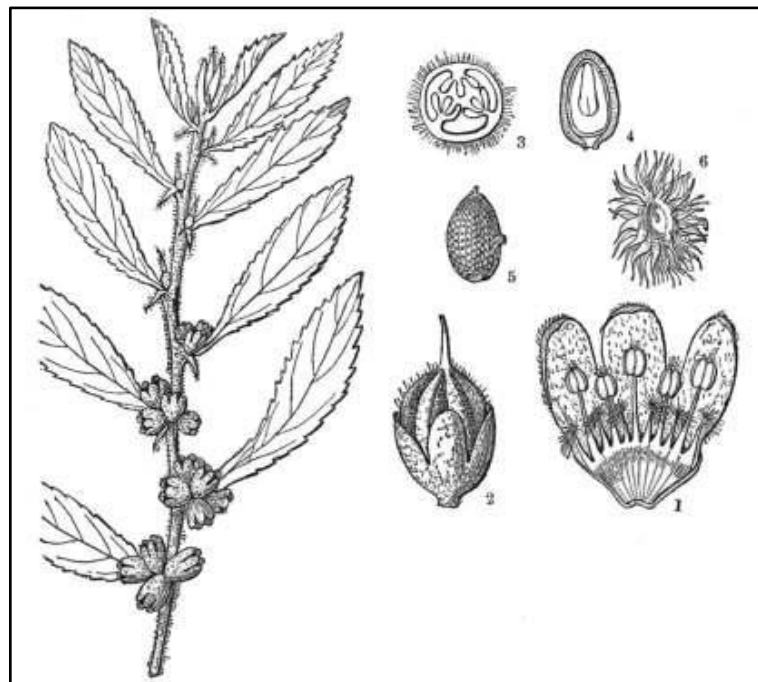


Figura 1: Caracteres morfológicos mais evidentes em espécies de *Casearias* (1- parte de um cálix em corte aberto; 2- pistilo; 3- corte longitudinal do ovário; 4- corte longitudinal da semente; 5- semente; 6- arilo, removido da semente).

Fonte: WATSON; DALLWITZ, 2008.

As espécies de *casearias* são utilizadas como remédios populares na América do Sul e em países da Ásia desde os tempos antigos, algumas são bem conhecidas pelo homem devido aos seus vários usos, como é o caso da *Casearia sylvestris*, popularmente conhecida como *guaçatonga*, uma das mais conhecidas e estudadas desse táxon botânico. Há relatos de que os índios tupis utilizavam a *guaçatonga* para tratar ferimentos e picadas de cobras. A *C.sylvestris* é matéria-prima para vários estudos e fonte de inspiração na busca de novos fármacos e de terapias alternativas para patologias como neoplasias malignas (ESTEVES et al., 2005; FERREIRA et al., 2010, 2011). Essa espécie apresenta princípios farmacológicos, que garantem a existência de propriedades medicinais importantes. Suas folhas contêm teores elevados de óleos essenciais, flavonoides, saponinas, taninos, resinas e antocianosídeos (SILVA FIALHO et al., 2010) com ação antitumoral, antifúngica e antibiótica, enquanto sua ação anti-inflamatória foi considerada similar ao piroxicam e meloxicam (MARQUES et al., 2013).

Folhas e cascas de *Casearia obliqua* são popularmente utilizadas como diurético, sudorífero, antiofídico, no combate às dermatoses e à hanseníase (PLANTAS BRASILEIRAS, 2002). Já *Casearia decandra* é usada como antiofídica, cicatrizante, anti-inflamatória e antitérmica (GONÇALVES et al., 2009), e segundo estudo realizado por Menezes (2004), esta espécie apresenta resposta farmacológica, em modelos experimentais de úlcera gástrica.

Em relatos anteriores o gênero *Casearia* é citado também pela presença de cumarinas (SHEN et al., 2004a), glicosídeos fenólicos (MOSADDIK et al., 2006) e glicosídeos cianogênicos (SPENCER; SEIGLER, 1985). Tendo se caracterizado pela ocorrência de várias substâncias de interesse farmacológico, como saponinas e alcaloides (CHANG et al., 2003).

Diversos estudos já revelaram o potencial antimicrobiano das espécies do gênero, entre as estudadas estão, *Casearia multinervosa* (MOSADDIKET al., 2004) e *C. sylvestris* (SCHNEIDER, 2008; TAVARES et al., 2008).

Algumas atividades farmacológicas apresentadas por espécies de *Casearia* foram patenteadas. Os diterpenos esculentina A e B isolados de *C. esculenta*

apresentaram ações citotóxica em células tumorais e antiinflamatórias, a respectiva patente foi depositada na Europa por uma empresa farmacêutica (BAL-TEMBE; K.VIJAYA; BHAGWAN, 1999).

Para *C. sylvestris*, estão relacionadas três outras patentes: a primeira relacionada à ação citotóxica das casearinas, patenteada no Japão (BREWERI; ITOKAWA, 1989), a outra, relata a ação antiulcerogênica apresentada por uma fração rica desses metabólitos, depositada pela FAPESP, UNESP e USP, e ao Instituto de Ciências Biológicas da USP (SERTIÉ; CARVALHO; PANIZZA, 2000). Recentemente, pesquisadores da Faculdade de Odontologia de Piracicaba (UNICAMP) depositaram uma patente de fitoterápicos à base de extratos de *C. sylvestris* para o tratamento do herpes (UNICAMP, 2005).

Uma pesquisa extensiva realizada por Xia et al. (2015) a respeito dos metabólitos secundários, atividades biológicas e farmacológicas do gênero, mostrou que a sua quimiotaxonomia é rica em diferentes classes de compostos, incluindo terpenoides, flavonoides, glicosídeos, fenilpropanóides, muitos descritos pela primeira vez na literatura, como os vários diterpenos do tipo clerodano, que predominam nesse gênero, de onde até o momento foram isoladas 287 substâncias, onde tanto os compostos individuais como extratos, exibiram uma gama de propriedades medicinais, entre elas citotoxicidade contra diversas linhagens de células tumorais humanas, hipoglicemiantes, antiofídicas, antiulcerogênicos, anti-inflamatórios (XIA et al., 2015).

Diante do exposto, tanto no que se refere à composição química, quanto à utilização medicinal, aos estudos farmacológicos e usos na medicina tradicional de espécies do gênero *Casearia*, torna-se necessário aprofundar os seus estudos fitoquímicos e farmacológicos, sendo estes, os pontos responsáveis por a escolha de *Casearia arborea* (Rich.) Urb. para o desenvolvimento do nosso trabalho.

O Quadro 1 (Pág. 28) expõe alguns compostos isolados de espécies de *Casearia* e suas atividades biológicas e/ou farmacológicas.

2.3. Considerações sobre a espécie *Casearia arborea* (Rich.) Urb.

Casearia arborea (Rich.) Urb. também conhecida como “pau de pico”, “imbuí amarelo” ou “canela”, é encontrada desde a Guatemala até a Bolívia e Brasil. No Brasil esta espécie está distribuída pelas regiões Norte (AM, AP, RR, RO e PA), Nordeste (CE, PE e BA), Centro-Oeste (GO) e Sudeste (MG, ES, RJ e SP). Pode ocorrer desde baixas altitudes até cerca de 1600 m. (Figura 2, pág. 26) (MARQUETE; VAZ, 2007).

Sua madeira é utilizada comercialmente como lenha, em construções rurais e também em trabalhos de marcenaria (ALVINO; SILVA; RAYOLVOL, 2005; MARQUETE, 2005). É uma árvore de tronco vigoroso e não ramificado, cujos indivíduos são mais frequentes no interior da floresta e apresentam uma copa bem formada, pode atingir até 14 m de altura. Suas folhas são alternas, bordos serrados com cerdas curtas, pecioladas e com nervuras ocultas pelo indumento. Uma das características diagnósticas do gênero é a presença de traços e pontuações translúcidas que em *C. arborea* se mostram esparsas e dispersas em toda a superfície. Suas inflorescências são do tipo pedunculado, denso, tomentosas e suas flores são pediceladas, pequenas, de cor alva a esverdeada. Possui fruto imaturo, ovóide, vinoso-esverdeado com sementes oblongas parcialmente cobertas por um arilo franjado de cor amarela (MARQUETE; VAZ, 2007).

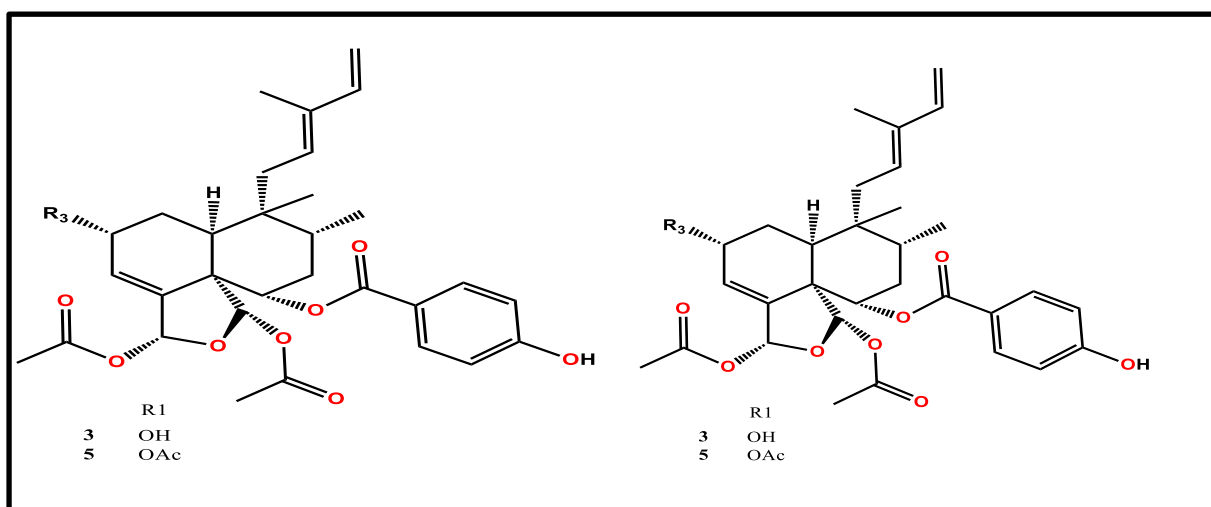
Quanto aos estudos fitoquímicos e farmacológicos com a espécie, a literatura relata apenas dois trabalhos: Beutler et al., (2000) e Ramirez, (2008). No primeiro, foram isolados e identificados cinco novos diterpenos clerodanos e uma curcubitacina, além da atividade citotóxica do extrato das raízes de *Casearia arborea* (Figura 3, pág. 26) No segundo, dois esteroides, dois diterpenos clerodanos, além de uma mistura de diterpeno clerodano com um éster (Figura 4, pág. 27).

Figura 2: *Casearia arborea* (Rich.) Urb.



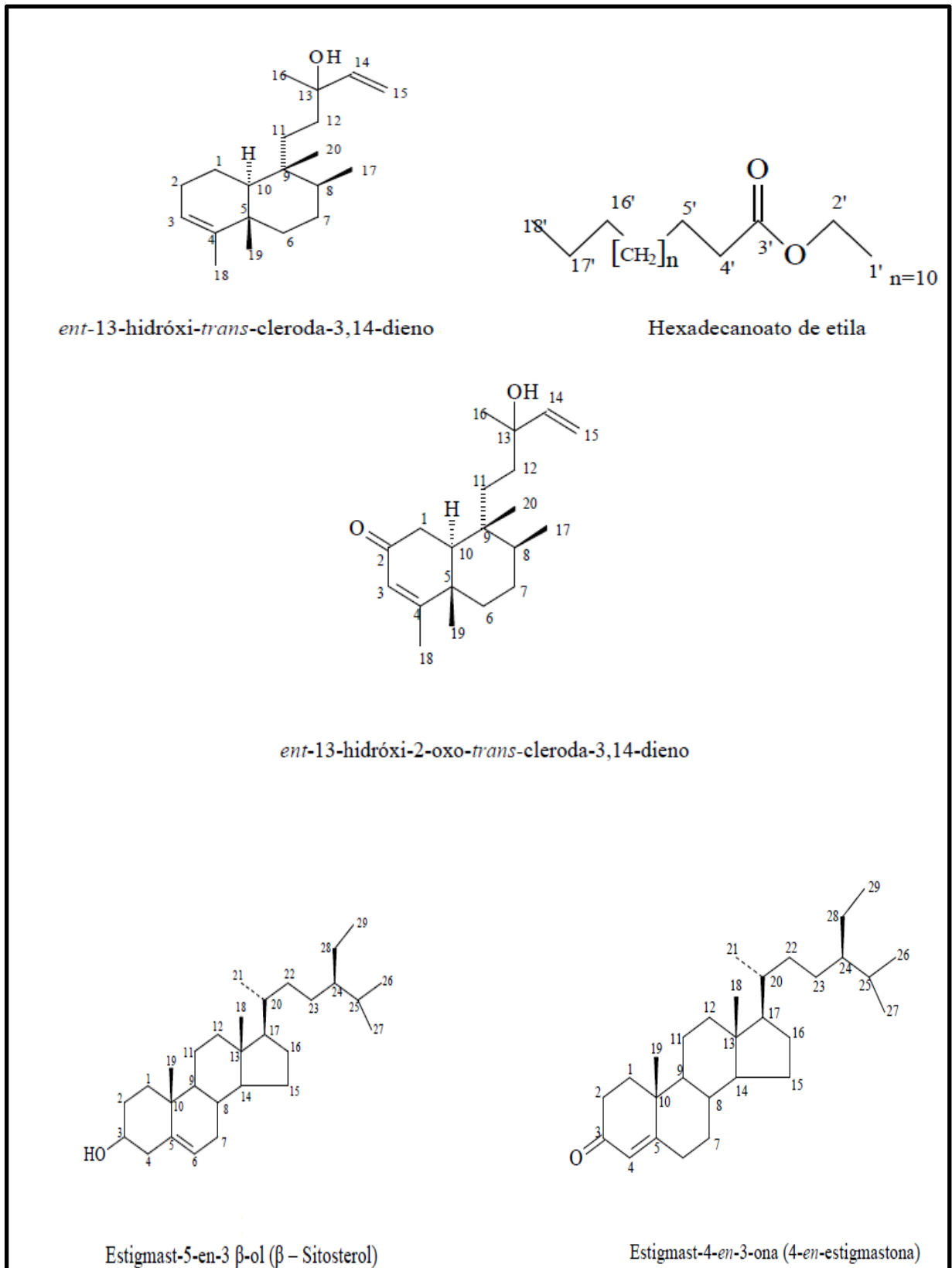
Fonte: TORRES; RAMOS, 2007.

Figura 3: Estrutura química dos cinco diterpenos clerodanos, isolados por Beutler (2000). 1- Casearborina A; 2- Casearborina B; 3- Casearborina C; 4- Casearborina D; 5- Casearborina E.



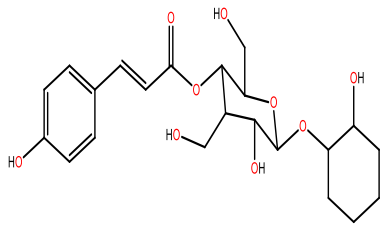
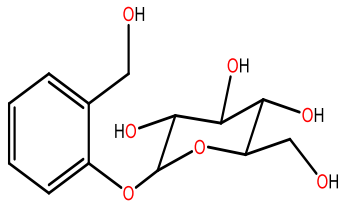
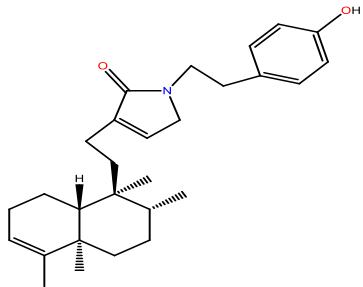
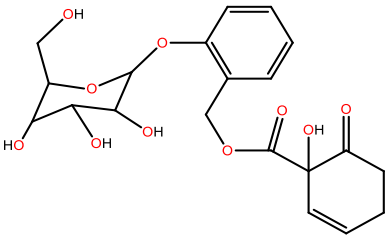
Fonte: BEUTLER, 2000.

Figura 4: Estrutura química dos compostos isolados por Ramirez, (2008).

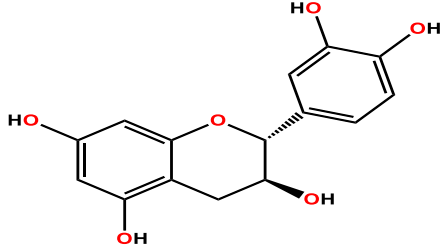

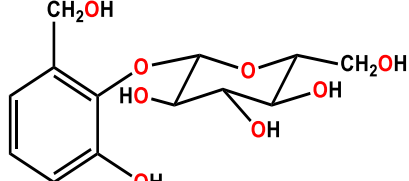
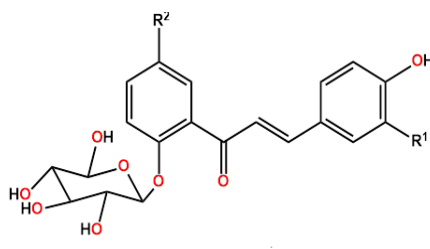


Fonte: RAMIREZ, 2008

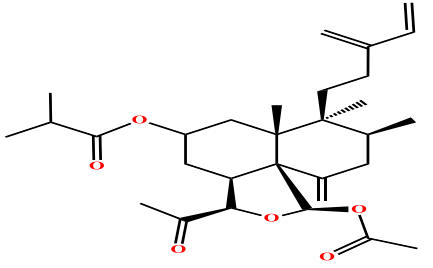
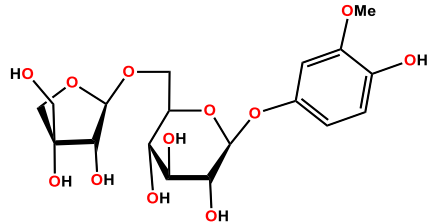
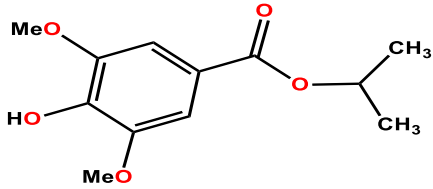
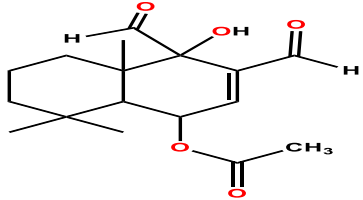
Quadro 1: Alguns constituintes químicos isolados de espécies da família Salicaceae e suas atividades biológicas e/ou farmacológicas relatadas na literatura.

Estruturas	Espécie	Atividades biológicas	Referências
 <p>Isograndidentatina</p>	<i>Populus davidiana</i>	Antioxidante	SI; WU, 2009
 <p>Salicina</p>	<i>Salix martiana</i> <i>Hasseltia floribunda</i>	Analgésica, Anti-inflamatória	FERNANDES et al., 2009 DAGVADORJ et al., 2010
 <p>Equinofilina A</p>	<i>Casearia sylvestris</i>	Citotóxica	WANG et al., 2009
 <p>Salicortina</p>	<i>Populus fremontii</i> <i>Populus angustifolia</i> <i>Salix sericea</i> <i>Hasseltia floribunda</i>	Analgésica	REHILL et al., 2005 ORIANIS et al., 2000

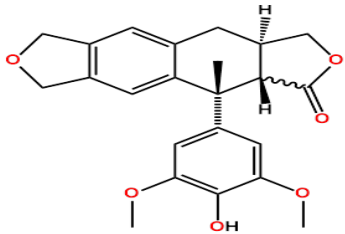
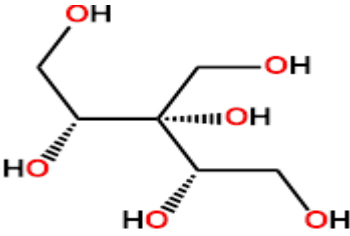
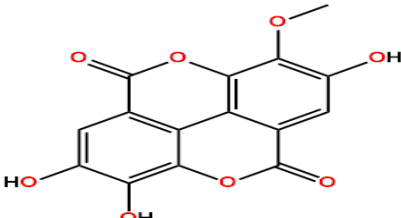
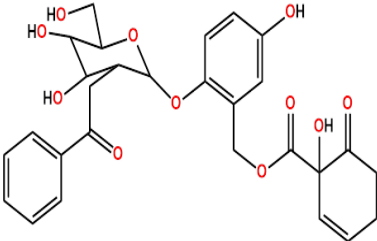
Continuação: Alguns constituintes químicos isolados de espécies da família Salicaceae e suas atividades biológicas e/ou farmacológicas relacionadas na literatura.

 <p>Catequina</p>	<p><i>Casearia clarkei</i></p>	<p>Anticancerígena</p>	<p>SHAARI; WATERMAN, 1994</p> <p>KUZUHARA et al., 2008</p>
 <p>Ácido gárlico</p>	<p><i>Hydnocarpus Anthelminthica</i></p>	<p>Anti-inflamatória</p> <p>Antinociceptiva</p>	<p>LIMA et al., 2005</p>
 <p>Idesina</p>	<p><i>Idesia policarpa</i></p> <p><i>Casearia costulata</i></p>	<p>Inibição da produção de óxido nítrico</p>	<p>CHOU et al., 1997</p> <p>MOSADDIK et al., 2007a</p>
 <p>Suwonpopulosídeo R1= H, R2= OH</p> <p>Populosídeo R1=OH, R2= H</p>	<p><i>Populus davidiana</i></p> <p><i>Populus alba x glandulosa</i></p>	<p>Antioxidante</p>	<p>SI; WU, 2009</p> <p>KWON; BAE, 2009</p>

Continuação: Alguns constituintes químicos isolados de espécies da família Salicaceae e suas atividades biológicas e/ou farmacológicas relatadas na literatura.

 <p>Diacetoxi-epoxi-isobutanoil-clerodano</p>	<p><i>Casearia grewiifolia</i> <i>var. gelonioides</i></p>	<p>Citotóxica Fagoínibitória</p>	<p>MOSADDIK et al., 2007b</p>
 <p>3-metoxi-4-hidroxi-1-O-β-D-furanapiose-(1''-- 6'')-β-D-glucopiranoisfenil glicosídeo</p>	<p><i>Casearia velutina</i></p>	<p>Anti-veneno de cobra</p>	<p>CHAI et al., 2010</p>
 <p>Iso Butil-3,5-dimetil éter</p>	<p><i>Casearia sylvestris</i></p>	<p>Citotóxica</p>	<p>SILVA et al., 2008b SILVA; CHAAR; YANO, 2009</p>
 <p>Ugandensidial</p>	<p><i>Xylos maciliatifolia</i></p>	<p>Antibacteriana</p>	<p>PHILIPPSEN et al., 2013</p>

Continuação: Alguns constituintes químicos isolados de espécies da família Salicaceae e suas atividades biológicas e/ou farmacológicas relatadas na literatura.

 <p>2_-hidroxi-4'-demetildesoxipodophyllotoxina</p>	<p><i>Casearia clarkei</i></p>	<p>Ação contra o papiloma vírus-HPV</p>	<p>SHAARI; WATERMAN, 1994</p>
 <p>3-Hidroximetil xilitol</p>	<p><i>Casearia esculenta</i></p>	<p>Hipoglicemiante</p>	<p>CHANDRAMOHAN et al., 2010 GOVINDASAMY et al., 2011</p>
 <p>Ácido 3-O-metielálgico</p>	<p><i>Casearia sylvestris</i></p>	<p>Anti-inflamatório Antialérgico Citotóxico</p>	<p>DA SILVA et al., 2008</p>
 <p>4-hidroxitremulacina</p>	<p><i>Dovyalis caffra</i> <i>Dovyalis zeyheri</i></p>	<p>Antimicrobiana</p>	<p>STANSTRUP et al., 2010</p>

2.4. Atividade antimicrobiana

Os antibióticos são compostos naturais ou sintéticos capazes de inibir o crescimento ou causar a morte de fungos ou bactérias e, podem ser classificados como bactericidas/fungicidas, quando causam a morte de bactérias/fungos, ou bacteriostáticos/fungistáticos quando promovem a inibição do crescimento microbiano (GUIMARÃES et al., 2010; NOBRE et al., 2002).

Dentre as razões que justificam a necessidade urgente do surgimento de novos agentes antibióticos destacam-se: as doenças infecciosas, que são a segunda maior causa de mortalidade do mundo; as altas taxas de resistência microbiana em ambientes hospitalares; o decréscimo constante observado no número total de novos agentes antimicrobianos aprovados pelo FDA; e a necessidade de agentes que atuem por mecanismos de ação diferentes aos atuais fármacos em uso, com maior seletividade e menor toxicidade (GUIMARÃES et al., 2010).

Desta maneira, desenvolvimento de novos fármacos de origem natural que são utilizados no combate e/ou controle dos microrganismos permanece significativa no contexto científico mundial (AYRES et al., 2008; COWAN, 1999; CRAGG; NEWMAN; SNADER, 1997; PACKER; LUZ, 2007; RATES, 2001).

A utilização tradicional de produtos naturais, aliada ao desenvolvimento científico, tem propiciado grandes avanços no estudo de plantas medicinais. A diversidade estrutural dos seus fitoconstituintes lhes confere um grande potencial terapêutico como fonte de matéria prima farmacêutica para a obtenção de novos agentes antimicrobianos ou como modelos para o desenvolvimento de novos fármacos (MIMICA MATANOVIC et al., 2010; MARZOUK et al., 2009).

No Brasil, as pesquisas sobre substâncias antimicrobianas de origem vegetal iniciaram-se com Cardoso e Santos (1948) que avaliaram extratos de 100 diferentes espécies indicadas pela medicina popular como anti-inflamatórios ou cicatrizantes/antimicrobianos. Os extratos de cinco espécies apresentaram atividade contra *S. aureus*, *Escherichiacoli* e *Proteus X-19* (SANDERS; WEATHERWAX; MCCLUNG, 1945).

Vários metabólitos secundários são investigados em relação as suas propriedades antimicrobianas (COWAN, 1999; MAHADY, 2005), dentre estes, destacam-se os flavonoides (BYLKA; MATLAWSKA; PILEWSKI, 2004), taninos

(SCALBERT, 1991; SOUZA et al., 2007), alcaloides (O'DONNELL; GIBBONS, 2007), saponinas (BAHRAMINEJAD et al., 2008) e terpenoides (SHAI et al., 2008), metabólitos secundários largamente investigados e que possuem potencial atividade antimicrobiana, o que os torna uma excelente fonte de matéria-prima farmacêutica para a obtenção de novos agentes.

A atividade antimicrobiana pode ser avaliada de diversas formas, os métodos comumente utilizados são o de difusão em disco, difusão utilizando cavidades feitas no ágar, diluição em ágar e diluição em caldo para determinação da concentração inibitória mínima - CIM (NASCIMENTO et al, 2007; NOSTRO et al., 2004; CIMANGA et al., 2002; SHAFI et al., 2002; CANILLAC; MOUREY, 2001; TAKAISI-KIKUNI et al., 2000).

Objetivos

3 OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

O Objetivo geral desse trabalho consistiu em realizar um estudo fitoquímico e a avaliação antimicrobiana de um diterpeno da espécie *Casearia arbórea* (Rich.) Urb., contribuindo assim, para o conhecimento quimiotaxonômico e farmacológico da família Salicaceae.

3.2. Objetivos específicos

- Isolar e caracterizar estruturalmente os constituintes químicos de *Casearia arbórea* (Rich.) Urb. com o intuito de conhecer o perfil dos metabólitos secundários produzidos pela espécie, através de métodos cromatográficos e espectroscópicos, respectivamente;
- Reisolhar e identificar a substância 13-hidróxi-2-oxo-trans-ent-cleroda-3,14-dieno (Kolavelona) de *Casearia arbórea* (Rich.) Urb. por métodos cromatográficos e espectroscópicos, respectivamente, para análise do potencial antimicrobiano;
- Disponibilizar frações, substâncias isoladas e caracterizadas estruturalmente para realização de testes farmacológicos;
- Comprovar cientificamente o que a medicina popular cita, e publicar artigo científico;
- Qualificar recursos humanos a nível de IC e mestrado.

Estudo fitoquímico

4 ESTUDO FITOQUÍMICO

4.1 Procedimentos gerais

4.1.1 Levantamento bibliográfico

O levantamento bibliográfico do gênero *Casearia* foi realizado no SciFinder, Google Scholar, PubMed, Scielo, Chemical Abstracts, Biological Abstracts, NAPRALERT, além de pesquisas na Internet e em anais de eventos nacionais e internacionais.

4.1.2 Coleta do material vegetal

A espécie *Casearia arborea* (Rich.) Urb. foi coletada no município de Porto Grande/AP, em novembro de 2006. A identificação da espécie foi realizada pela botânica Rosângela do Socorro Ferreira Rodrigues Sarquis do Instituto de Pesquisa Científica e Tecnológica do Estado do Amapá-IEPA. Uma exsicata do material se encontra arquivada no herbário deste instituto sob o código 2304.

4.1.3 Triagem fitoquímica

A detecção da presença de determinados grupos de metabólitos, para um melhor direcionamento da pesquisa, foi realizada através de uma triagem fitoquímica. As frações dos extratos etanólicos brutos (Folhas e flores-Caule) foram testadas com os reagentes de Bouchardat, Mayer, Dragendorff, que mostraram resultado negativo para a possível presença de alcalóides. Os testes também foram negativos para taninos mediante reação com gelatina 0,5% e FeCl₃. Os testes Lieberman-Bouchardat e fita de magnésio demonstraram a presença de terpenoides, esteroides e flavonoides, respectivamente (MATOS, 1997).

4.1.4 Isolamento e identificação dos constituintes químicos de *Casearia arborea* (Rich.) Urb.

Os experimentos relativos ao isolamento e identificação estrutural dos constituintes químicos de *Casearia arborea* (Rich.) Urb. foram realizados no Laboratório de Fitoquímica Prof. Dr. Raimundo Braz Filho (IPeFarM/UFPB).

4.1.4.1 Procedimentos cromatográficos

As cromatografias em coluna foram desenvolvidas utilizando-se como fase estacionária sílica gel 60 (Merck) 7734 (partículas com 0,063-0,2 mm, 70-230 mesh), Sephadex LH-20 (Merck), ou XAD-2, tendo como suportes colunas de vidro cilíndricas com dimensões variando de acordo com a quantidade de amostra a ser cromatografada. Os solventes comerciais P.A. foram utilizados como fase móvel. Cromatografia em Camada Delgada Analítica (CCDA) foi empregada para a análise e reunião das frações obtidas por cromatografia em coluna e, quando necessário, utilizou-se a Cromatografia em Camada Delgada Preparativa (CCDP) para purificação de constituintes químicos. As substâncias em análise foram evidenciadas pelo uso de radiação ultravioleta nos comprimentos de onda de 254 e 366 nm e impregnação das placas em cubas de vidro saturadas por vapores de iodo.

4.1.4.2 Caracterização estrutural dos constituintes químicos

A caracterização estrutural dos constituintes químicos isolados de *Casearia arborea* (Rich.) Urb. foi realizada por análise dos espectros de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio e Carbono 13, utilizando técnicas uni e bidimensionais (COSY, HMQC, HMBC e NOESY), e comparações com modelos da literatura.

4.1.4.3 Ressonância Magnética Nuclear

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear das substâncias isoladas foram obtidos utilizando o espectrômetro Bruker, a 500 MHz (^1H) e 125 MHz (^{13}C) do Nucal-UFPB). Os solventes utilizado na dissolução das amostras foram clorofórmio e metanol deuterados (CDCl_3 e MeOD, respectivamente), Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em partes por milhão (ppm) e as constantes de acoplamento em Hz.

4.2 Processamento do material botânico

4.2.1 Processamento do material botânico das folhas e flores de *Casearia arborea* (Rich.) Urb.

O material botânico fresco (1500 g) foi desidratado em estufa à temperatura de 40°C durante 96 horas, sendo em seguida triturado para obtenção do pó (650 g) que foi, então, macerado em etanol (EtOH) a 95 % por 72 horas, processo repetido até extração exaustiva dos constituintes químicos.

A solução extrativa etanólica foi concentrada em rotaevaporador a 40° C, fornecendo 80 g do extrato etanólico bruto das folhas e flores de *Casearia arborea* (Rich.) Urb. (Esquema 1, pág. 43).

4.2.2 Cromatografia líquida sob pressão reduzida do extrato etanólico bruto das folhas e flores

O extrato etanólico bruto das folhas e flores de *Casearia arborea* (Rich.) Urb. (80 g) foi submetido a uma filtração sob vácuo, em sílica gel 60 (Merck) 7734 (partículas com 0,063-0,2 mm, 70-230 mesh), tendo como suporte um funil de buchner com placa porosa adaptado com um papel de filtro. Como fase móvel foram utilizados Hexano, AcOEt e MeOH, puros ou em misturas binárias, em ordem crescente de polaridade, estas soluções foram então concentradas em rotaevaporador sob pressão reduzida, obtendo-se suas respectivas frações (Esquema 1, pág. 43).

4.2.3. Processamento cromatográfico das fases AcOEt-MeOH (9:1), AcOEt-MeOH (7:3) e AcOEt-MeOH (1:1) (Grupo A) do EEB das folhas e flores de *Casearia arborea* (Rich.) Urb.

As frações AcOEt-MeOH (9:1), AcOEt-MeOH (7:3) e AcOEt-MeOH (1:1) foram avaliadas por CCDA (Cromatografia em Camada Delgada Analítica) e reunidas devido a sua semelhança, obtendo 8,0 gramas da fração denominada de grupo A, que foi então cromatografada em coluna utilizando XAD-2 como fase estacionária e como eluentes, H₂O, MeOH, Acetona, AcOet e Hexano, sozinhos ou

em misturas binárias, as quantidades obtidas podem ser observadas na tabela abaixo (Esquema 2,pág. 44).

Tabela 1: Fracionamento cromatográfico do grupo A em XAD-2.

Sistema de eluição	Peso
H ₂ O	1,0 g
MeOH: H ₂ O (3:7)	0,900 g
MeOH: H ₂ O (1:1)	1,5 g
MeOH	1,2 g
Acetona	0,600 g
AcOEt	0,650 g
Hex	0,150 g

A fração MeOH:H₂O (1:1) (1,5g), oriunda do grupo A, foi submetida a cromatografia em coluna com sephadex LH 20, tendo como eluente MeOH, obtendo-se 101 frações, que foram analisadas e reunidas de acordo com a sua semelhança de eluição observada em CCDA. A fração 24-31(0,200 g) foi recromatografada seguindo a mesma metodologia anteriormente descrita, resultando em 26 frações que foram combinadas através de análise em CCDA, e deste processo a sub-fração reunida 9/22 (0,048 g) foi aplicada em placa cromatográfica para CCDP (Cromatografia em Camada Delgada Preparativa) utilizando-se placas Merk que foram eluídas com AcOEt:Hex (8:2). Cada faixa foi cortada separadamente, extraída com AcOEt:MeOH (1:1) e as soluções obtidas foram filtradas e concentradas para recuperar as substâncias isoladas (Esquema 3, pág. 45).

As substâncias oriundas da CCDP foram analisadas por CCDA e RMN de ¹H para verificar se a separação foi satisfatória. Destas a faixa 2 foi considerada pura e codificada como o composto **Ca-1** (3,5 mg).

4.3 Processamento do material botânico (Caule)

O material botânico fresco (3000 g) foi desidratado em estufa à temperatura de 40°C durante 96 horas, sendo em seguida triturado para obtenção do pó (1000 g) que foi, então, macerado em etanol (EtOH) a 95 % por 72 horas, processo repetido até extração exaustiva dos constituintes químicos.

A solução extrativa etanólica foi concentrada em rotaevaporador a 40° C, fornecendo 150 g do extrato etanólico bruto do caule de *Casearia arborea* (Rich.) Urb. (Esquema 4, pág. 46) (RAMIREZ, 2008).

4.3.1 Cromatografia líquida sob pressão reduzida do extrato etanólico bruto do Caule

O extrato etanólico bruto do caule de *Casearia arborea* (Rich.) Urb. (150 g) foi submetido a uma filtração sob vácuo em sílica gel 60 (Merck) 7734 (partículas com 0,063-0,2 mm, 70-230 mesh), tendo como suporte um funil de buchner com placa porosa adaptado com um papel de filtro. Como fase móvel foram utilizados Hexano, AcOEt e MeOH, puros ou em misturas binárias, em ordem crescente de polaridade. As frações foram concentradas em evaporador rotativo sob pressão reduzida, obtendo-se suas respectivas frações. As frações AcOEt-MeOH (9:1) e (7:3) forneceram um precipitado (ppt) e um sobrenadante (ssb) cada (Esquema 4, pág. 46) (RAMIREZ, 2008).

4.3.2 Processamento cromatográfico da fase Hexano-AcOEt (1:1) do EEB do caule de *Casearia arborea* (Rich.) Urb.

A partir de 3,20 g da fração Hexano-AcOEt (1:1) (Esquema 4, pág.) submetidos a cromatografia em coluna com sílica gel 60 (partículas com 0,063-0,2 mm) empregando hexano, acetato de etila e metanol como eluentes, em ordem crescente de polaridade, foram obtidas 186 frações de 25 mL cada (Esquema 5, pág. 47) que foram concentradas em rotaevaporador, analisadas e reunidas por CCDA, de acordo com suas semelhanças de eluição (Quadro 2, pág. 49). A fração

reunida 60-94 forneceu 0,007 g de uma substância que se apresentou como um pó amarelo, sendo então codificada como **Ca-2** (Esquema 5, pág. 47).

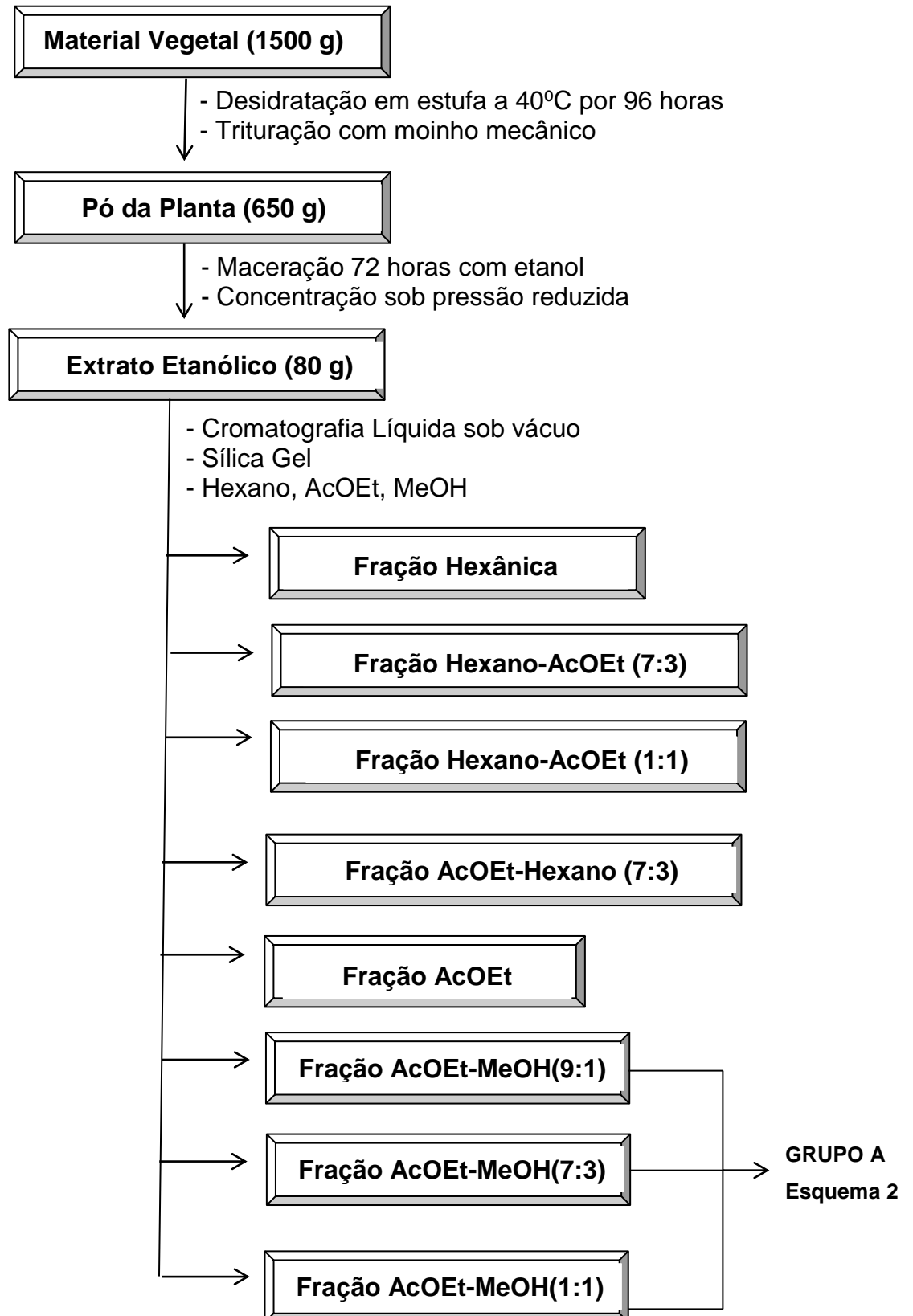
4.3.3 Processamento cromatográfico para o reisolamento da kolavelona

A fração Hexano:AcOEt (7:3) (3,5 g) obtida do EEB (caule) de *Casearia arborea* (Rich.) Urb foi submetida à cromatografia em coluna com sílica gel 60 (partículas com 0,063-0,2 mm) empregando-se hexano, acetato de etila e metanol como eluentes, sozinhos ou misturas binárias em ordem crescente de polaridade, deste processo foram obtidas 166 frações de 25 mL cada (Esquema 6, pág. 48) que foram concentradas em rotaevaporador, analisadas e reunidas por CCDA, de acordo com suas semelhanças de eluição (Quadro 3, pág. 49).

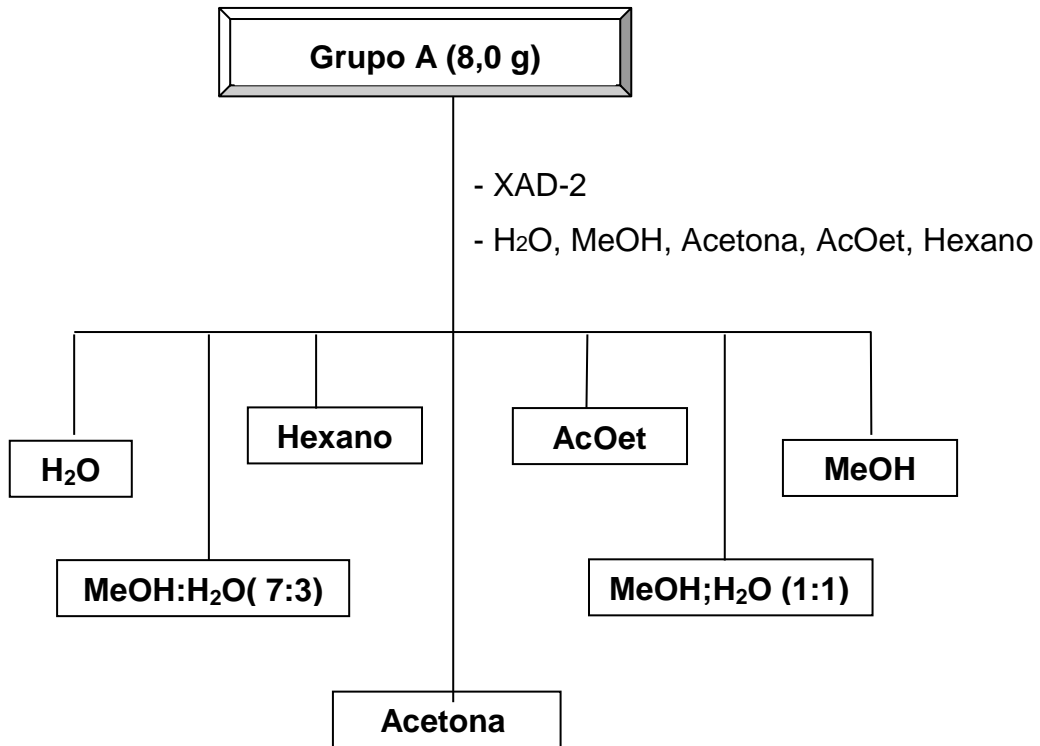
Verificou-se a presença da kolavelona na fração 18-55 (0,702 g), quando comparada em CCDA com o seu padrão (Kolavelona) isolada por Ramirez (2008), esta fração foi então cromatografada novamente, pela mesma metodologia anteriormente descrita, obtendo-se 90 frações (Esquema 7, pág. 48) (Quadro 4, pág. 50).

A sub-fração 18-43 forneceu 0,270 g de cristais brancos, foi feita então uma análise comparativa desta fração com o padrão da kolavelona, mostrando que ambas apresentavam o mesmo padrão de eluição. Um espectro de RMN H^1 nos permitiu propor que essa fração poderia tratar-se da kolavelona, sendo assim codificada como **Ca-3** (Esquema 7, pág. 48) (Quadro 4, pág. 50).

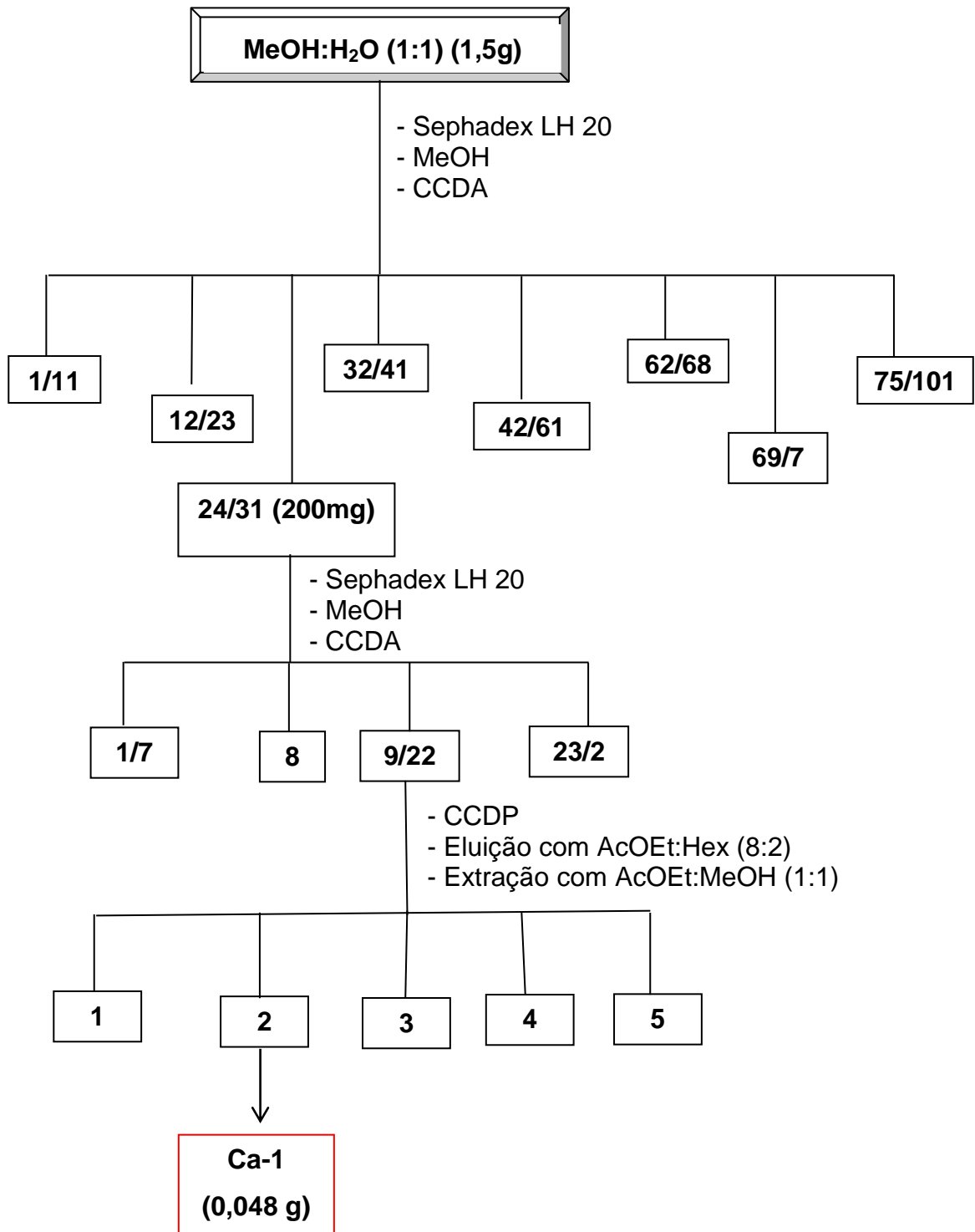
Esquema 1: Obtenção e fracionamento do extrato etanólico bruto das folhas e flores de *Casearia arborea* (Rich.) Urb.



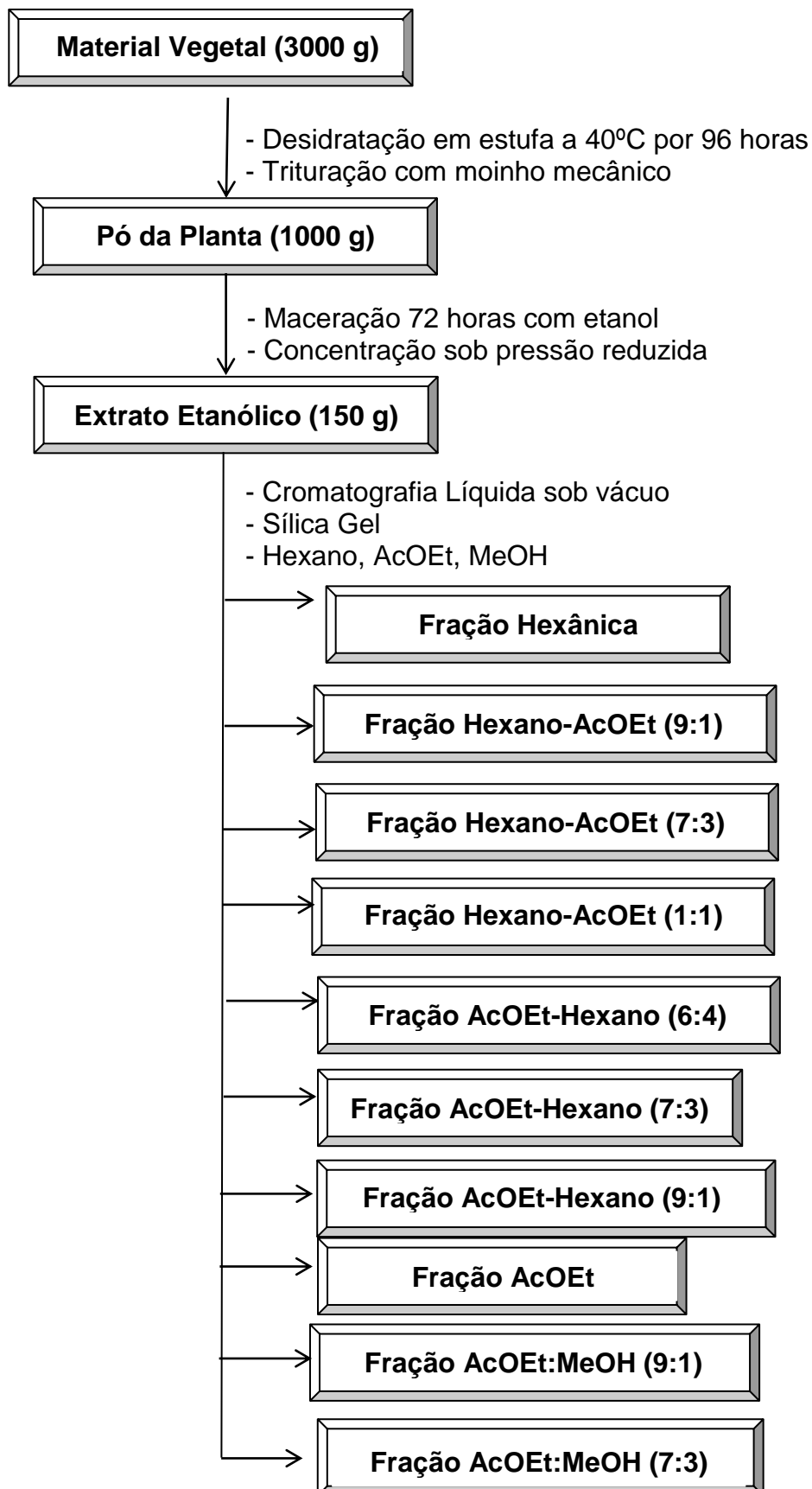
Esquema 2: Processamento cromatográfico do grupo A das folhas e flores de *Casearia arborea* (Rich.) Urb.



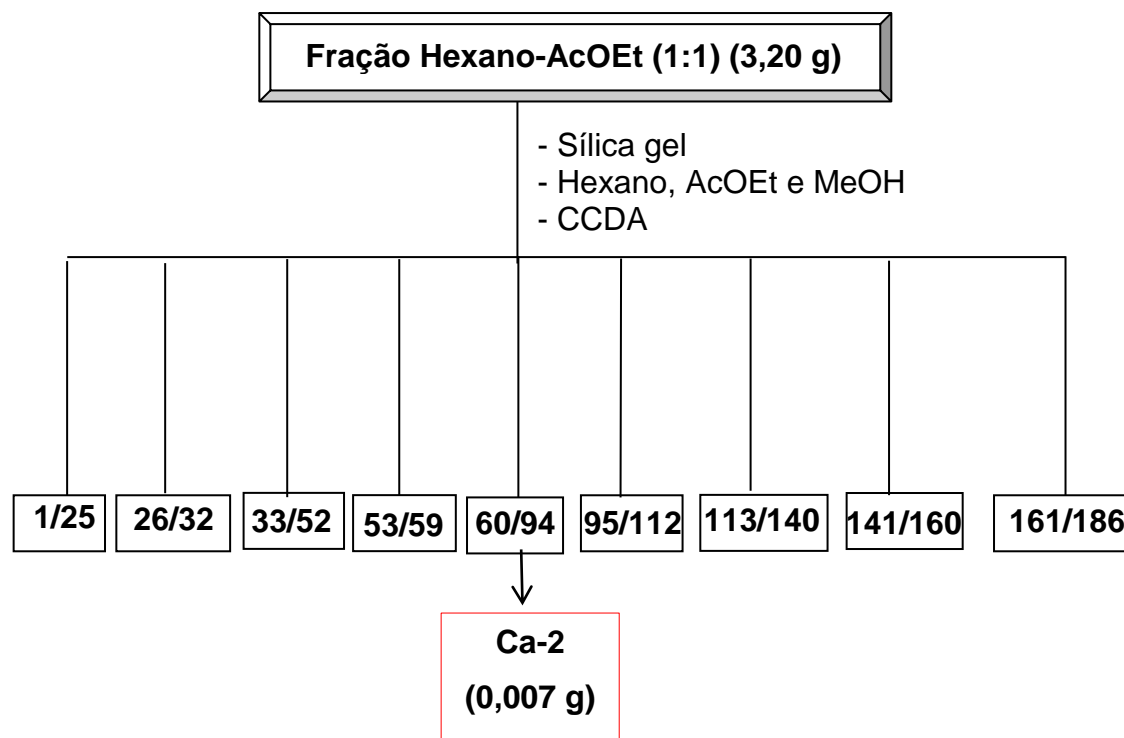
Esquema 3: Processamento cromatográfico da fração MeOH:H₂O (1:1) das folhas e flores de *Casearia arborea* (Rich.) Urb.



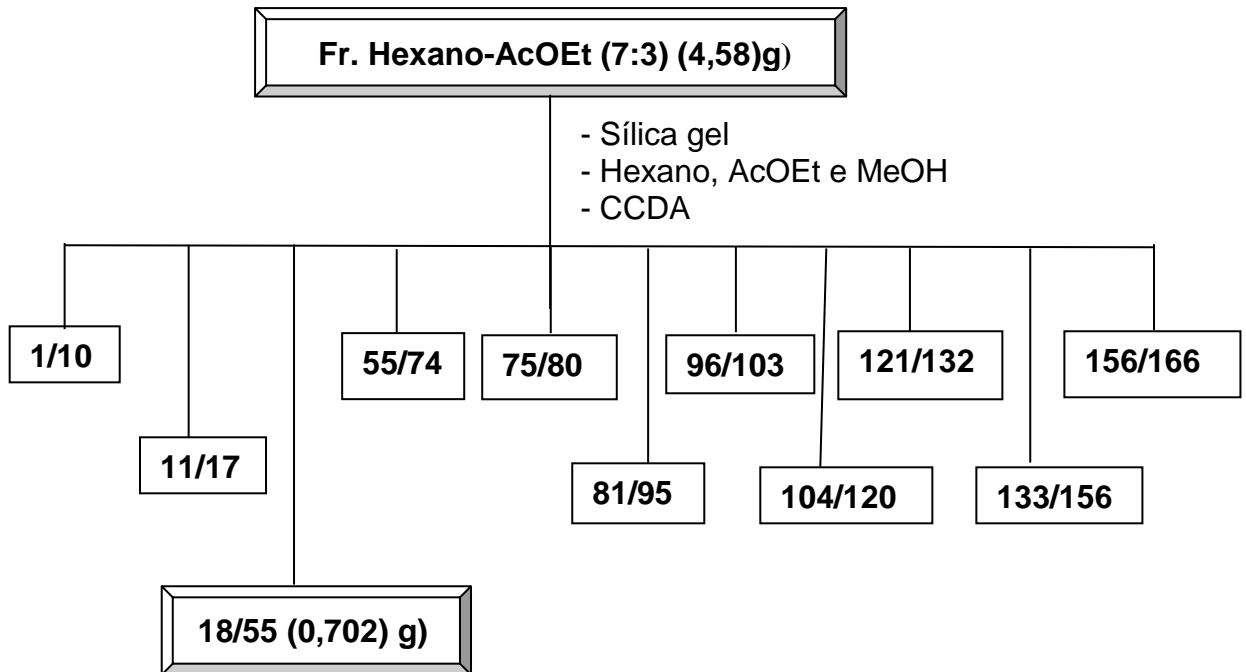
Esquema 4: Obtenção e fracionamento do extrato etanólico bruto do caule de *Casearia arborea* (Rich.) Urb.



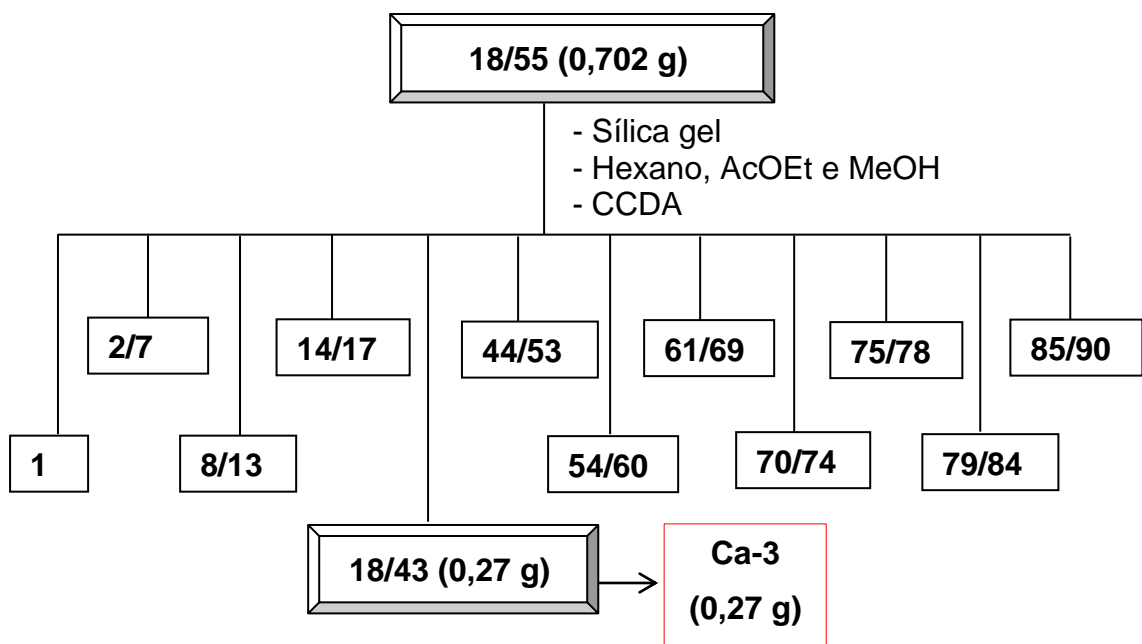
Esquema 5: Fracionamento cromatográfico da fração Hexano-AcOEt (1:1) do extrato etanólico bruto do caule de *Casearia arborea* (Rich.) Urb.



Esquema 6: Fracionamento cromatográfico da fração Hexano-AcOEt (7:3) do extrato etanólico bruto do caule *Casearia arborea* (Rich.) Urb.



Esquema 7: Fracionamento cromatográfico da fração 18/55 do extrato etanólico bruto do caule *Casearia arborea* (Rich.) Urb.



Quadro 2: Representação cromatográfica da fração Hexano-AcOEt (1:1) do extrato etanólico bruto do caule de *Casearia arbórea* (Rich.) Urb.

Eluentes	Frações Obtidas	Frações Reunidas
Hexano	-	-
Hexano-AcOEt (95:5)	1-25	1-25
Hexano-AcOEt (9:1)	26-32	26-32
Hexano-AcOEt (8:2)	33-52	33-52
Hexano-AcOEt (7:3)	53-90	53-59
Hexano-AcOEt (6:4)	91-112	60-94
Hexano-AcOEt (1:1)	113-140	95-112
Hexano-AcOEt (4:6)	141-160	113-140
Hexano-AcOEt (3:7)	161-186	141-160 161-186

Quadro 3: Representação cromatográfica da fração Hexano-AcOEt (7:3) do extrato etanólico bruto do caule de *Casearia arbórea* (Rich.) Urb.

Eluentes	Frações Obtidas	Frações Reunidas
Hexano	1-10	-
Hexano-AcOEt (9:1)	11-20	-
Hexano-AcOEt (8:2)	21-55	-
Hexano-AcOEt (7:3)	56-74	1-10
Hexano-AcOEt (6:4)	75-80	11-17
Hexano-AcOEt (1:1)	81-95	18-55
Hexano-AcOEt (4:6)	96-103	96-103
AcOEt	104-120	121-132
AcOEt-MeOH (9:1)	121-132	133-156
AcOEt-MeOH (8:2)	133-166	156-166

Quadro 4: Representação cromatográfica da sub-fração 18-55 da fração Hexano-AcOEt (7:3) do extrato etanólico bruto do caule de *Casearia arborea* (Rich.) Urb.

Eluentes	Frações Obtidas	Frações Reunidas
Hexano	-	-
Hexano-AcOEt (95:5)	1-16	1
Hexano-AcOEt (9:1)	17-44	2-7
Hexano-AcOEt (8:2)	45-53	8-13
Hexano-AcOEt (7:3)	54-58	14-17
Hexano-AcOEt (6:4)	59-69	18-43
Hexano-AcOEt (1:1)	70-84	44-53
Hexano-AcOEt (4:6)	85-86	54-60
Hexano-AcOEt (3:7)	87-88	61-69
Hexano-AcOEt (2:8)	89-90	70-74
Hexano-AcOEt (1:9)	91-92	75-78
AcOEt	93-94	79-84
AcOEt-MeOH (98:2)	95-80	85-90

Resultados e Discussão

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Identificação estrutural das substâncias isoladas de *Casearia arborea* (Rich.) Urb.

5.1.1. Identificação estrutural de Ca-1

A substância *Ca-1* apresentou-se como um pó amarelo. A identificação foi realizada com base nos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C uni- e bidimensional.

O espectro de RMN de ^1H e suas expansões (Tabela 2, pág. 49; Figuras 6 à 8, págs. 57 e 58), exibiram dois dubletos em 6,92 e 7,95, com integração para dois hidrogênios cada, e ambos com uma constante de acoplamento 8,8 Hz, fato que indica uma correlação *orto* entre esses hidrogênios. Esses sinais, o perfil do espectro e comparações com dados da literatura levaram a sugerir que eles correspondem respectivamente aos hidrogênios H-3'/5' e H-2'/6' do anel B, sugerindo que *Ca-1* possui um sistema AA'BB' no seu anel B de um núcleo flavonoidico (SILVERSTEIN; WEBSTER, 2000). De acordo com as figuras 6 a 8 (Págs. 57 e 58) a molécula de *Ca-1* possui o anel A dissustituído, uma vez que foram observados dois dupletos para os hidrogênios 6 e 8 desse anel, em δ_{H} 6,19 e δ_{H} 6,39, respectivamente, ambos com um $J=2,0$ Hz (GOMES *et al.*, 2011) que confirma um acoplamento meta entre esses hidrogênios, e esclarece que existem substituintes nos C-5 e C-7 do anel A do núcleo flavonoidico.

Este espectro revelou a ausência de um singleto em $\sim\delta_{\text{H}}$ 6,80 característico do hidrogênio da posição 3 de flavonas, e levantou a hipótese que a posição C-3 de *Ca-1* possui como substituinte uma unidade osídica, essa hipótese foi fortalecida pelos sinais na região entre δ_{H} 3,34-4,33 característicos de hidrogênios oximetínicos de unidade osídica, além de um singleto em δ_{H} 5,47 característico do hidrogênio anomérico H-1'' de unidade α -arabinofuranosil (HARBONE; MABRY, 1982) (Figuras 6 à 8, págs. 57 e 58)

A comparação dos dados de RMN de ^1H de *Ca-1* com dados da literatura (Modelo 1, tabela 2, pág. 55) permitiram propor que a substancia em análise poderia tratar-se do canferol 3-O- α -L-arabinofuranosídeo.

O espectro de RMN de ^{13}C utilizando a técnica APT (Tabela 2, pág. 55; Figura 9, pág. 9) apresentou 20 sinais, sendo 13 na região entre δ_{C} 179,8 e 95,0 atribuídos

a 15 carbonos de núcleo flavona com um sistema do tipo AA'BB', além dos cinco sinais na região entre 109,6 e 62,5 característicos de carbonos de unidade osídica. O sinal em δ_C 159,2 atribuído ao C-2, fortaleceu a proposta da existência do açúcar na posição 3, uma vez que quando esta posição não está substituída por unidade osídica o deslocamento C-2 absorve próximo a 147 ppm, o mesmo acontece com o deslocamento do C-3 que absorve em $\sim\delta_C$ 138,0 quando não glicosilado, para δ_C 135,0 quando ligado a ose (HARBORNE; MABRY, 1996).

Os valores dos deslocamentos químicos dos carbonos 1'', 2'' e 4'' em δ_C 109,6; δ_C 83,3 e δ_C 88,0 respectivamente, indicaram que a unidade osídica ligada ao C-3 é a arabinofuranose, quando comparado com os dados apontados por Ribeiro et al. (2013) (Tabela 2, pág. 55)

O espectro heteronuclear utilizando a técnica de HMQC (Figuras 10 e 11, pág. 59) mostrou as correlações diretas entre H-6/C-6 (δ_H 6,20/ δ_C 100,2) e H-8/C-8 (δ_H 6,39/ δ_C 95,0) confirmando a substituição nos C-5 e C-7 do anel A de Ca-1. A correlação entre H-1''/C-1'' pode ser vista pelos sinais em δ_H 5,47/ δ_C 109,6, fato que confirmou a existência do carbono anomérico da arabinofuranose. A figura 10 (Pág. 59) evidencia as correlações diretas entre os hidrogênios e os carbonos da unidade de arabinofuranose (Tabela 3, pág. 56).

O espectro de HMBC (Figuras 12 e 13, pág. 60) mostrou correlações a três ligações (J^3) do H-1'' com o C-4'', como também deste hidrogênio com o C-3''. Neste espectro também foram visualizadas correlações J^3 do H-6 com os C-8 e C-10 e do H-8 com o C-10, além das correlações J^3 do H-3' com o C-1' e C-5'. A localização de um grupo hidroxila na posição C-4' foi definida pela correlação J^2 entre o H-3' e o C-4' (δ_H 6,93/ δ_C 161,6). Ainda foram observadas correlações a J^2 entre o H-8 com os C-7 e C-9 e do H-6 com os C-7 e C-5 (Tabela 3, pág. 56).

A análise dos dados espectroscópicos de RMN de 1H e RMN de ^{13}C de Ca-1 utilizando técnicas uni e bidimensionais e comparações com os dados encontrados na literatura (RIBEIRO et al., 2013) (Tabelas 2 e 3, págs. 55 e 56) permitiram identificar a substância **Ca-1** como sendo a estrutura Canferol 3-O- α -L-arabinofuranosídeo, flavonoide relatado pela primeira vez no gênero Casearia (XIA et al., 2015).

Figura 5: Canferol 3-O- α -L-arabinofuranosídeo (Ca-1).

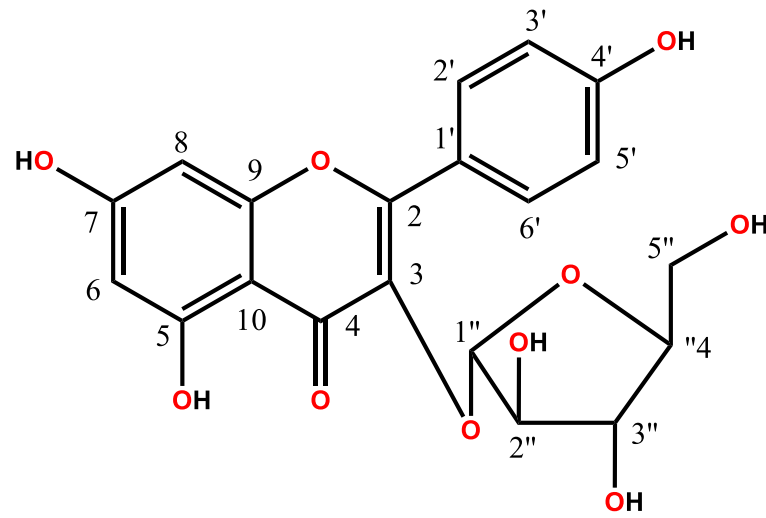
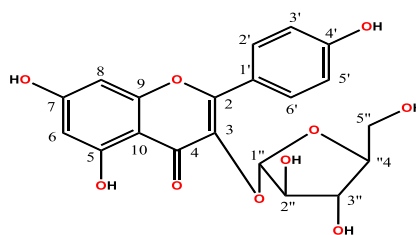
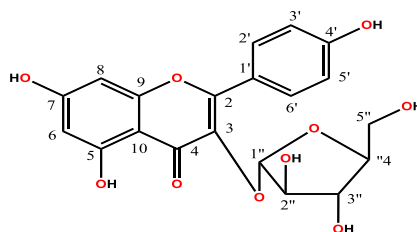


Tabela 2: Dados comparativos de RMN ^1H e ^{13}C (δ , MeOD, 500 MHz) de *Ca-1* comparados com o modelo da literatura (δ , CDCl_3 , 500 MHz) (RIBEIRO *et al.*, 2013).



C	<i>Ca-1</i>		Modelo-1	
	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}
2	-	159,2	-	159,4
3	-	134,8	-	135,0
4	-	179,8	-	179,9
5	-	163,0	-	163,1
6	6,19 (d, J= 2,0 Hz)	100,2	6,22 (d, J= 2,0 Hz)	99,9
7	-	164,9	-	166,0
8	6,39 (d, J= 2,0 Hz)	95,0	6,41 (d, J= 2,0 Hz)	94,8
9	-	158,6	-	158,6
10	-	105,3	-	105,7
1'	-	122,8	-	122,8
2'	7,95 (d, J= 8,8 Hz)	131,9	7,96 (d, J= 9,0 Hz)	132,0
3'	6,92 (d, J= 8,8 Hz)	116,5	6,92 (d, J= 9,0 Hz)	116,5
4'	-	161,6	-	161,6
5'	6,93 (d, J= 8,8 Hz)	116,5	6,92 (d, J= 9,0 Hz)	116,5
6'	7,96 (d, J= 8,8 Hz)	131,9	7,96 (d, J= 9,0 Hz)	132,0
1''	5,47 (s)	109,6	5,49 (s)	109,7
2''	4,32 (dd, J= 3,0 Hz)	83,3	4,32 (dd, J= 3,0 Hz)	83,4
3''	3,92 (dd, J= 3,2 e 5,0 Hz)	78,6	3,90 (dd, J= 3,0 e 5,0 Hz)	78,7
4''	3,80 (dd, J= 4,4 e 9,1 Hz)	88,0	3,80 (dd, J= 4,5 e 9,0 Hz)	88,1
5''	3,34	62,5	3,49	62,6

Tabela 3: Dados espectrais de RMN ^1H e ^{13}C (δ , MeOD, 500 MHz) de Ca-1.

C	$^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ – HMQC		$^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ – HMBC	
	δ_{H}	δ_{C}	$^2J_{\text{H,C}}$	$^3J_{\text{H,C}}$
2	-	159,2		
3	-	134,8		
4	-	179,8		
5	-	163,0		
6	6,20 (<i>d</i> , $J = 2,2\text{Hz}$)	100,2	C-5; C-7	C-8; C-10
7	-	164,9		
8	6,39 (<i>d</i> , $J = 2,0\text{ Hz}$)	95,0	C-7; C-9	C-10
9	-	158,6		
10	-	105,3		
1'	-	122,8		
2'	7,96 (<i>d</i> , $J = 8,8\text{ Hz}$)	131,9		
3'	6,93 (<i>d</i> , $J = 8,8\text{ Hz}$)	116,5	C-4'	C-1'; C-5'
4'	-	161,6		
5'	6,93 (<i>d</i> , $J = 8,8\text{ Hz}$)	116,5		
6'	7,58 (<i>d</i> , $J = 8,8\text{ Hz}$)	131,9		
1''	5,47 (<i>s</i>)	109,6		C-3''; C-4''
2''	4,32 (<i>dd</i> , $J = 3,0\text{ Hz}$)	83,3		
3''	3,92 (<i>dd</i> , $J = 3,2\text{ e } 5,0\text{ Hz}$)	78,6		
4''	3,80 (<i>dd</i> , $J = 4,4\text{ e } 9,1\text{ Hz}$)	88,0		
5''	3,34	62,6		

Figura 6: Espectro de RMN ^1H (δ , MeOD, 500 MHz) de Ca-1.

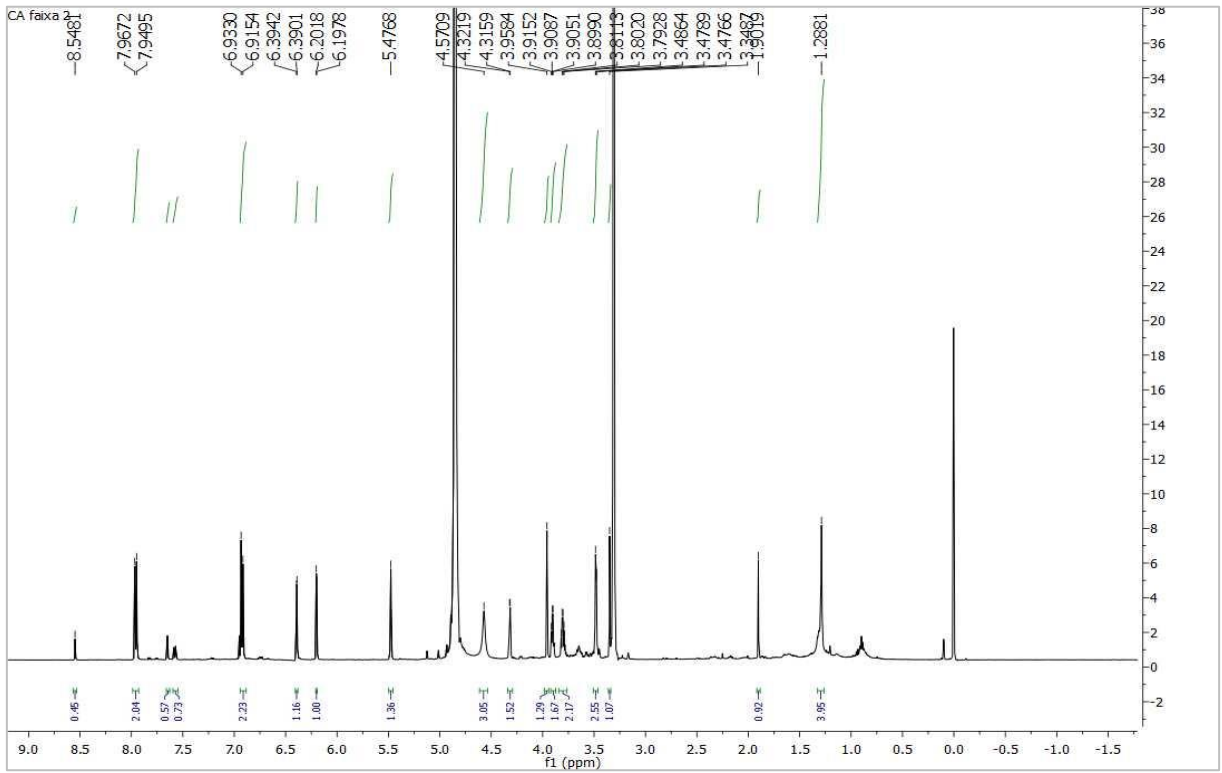


Figura 7: Expansão do espectro de RMN ^1H (δ , MeOD, 500 MHz) de Ca-1.

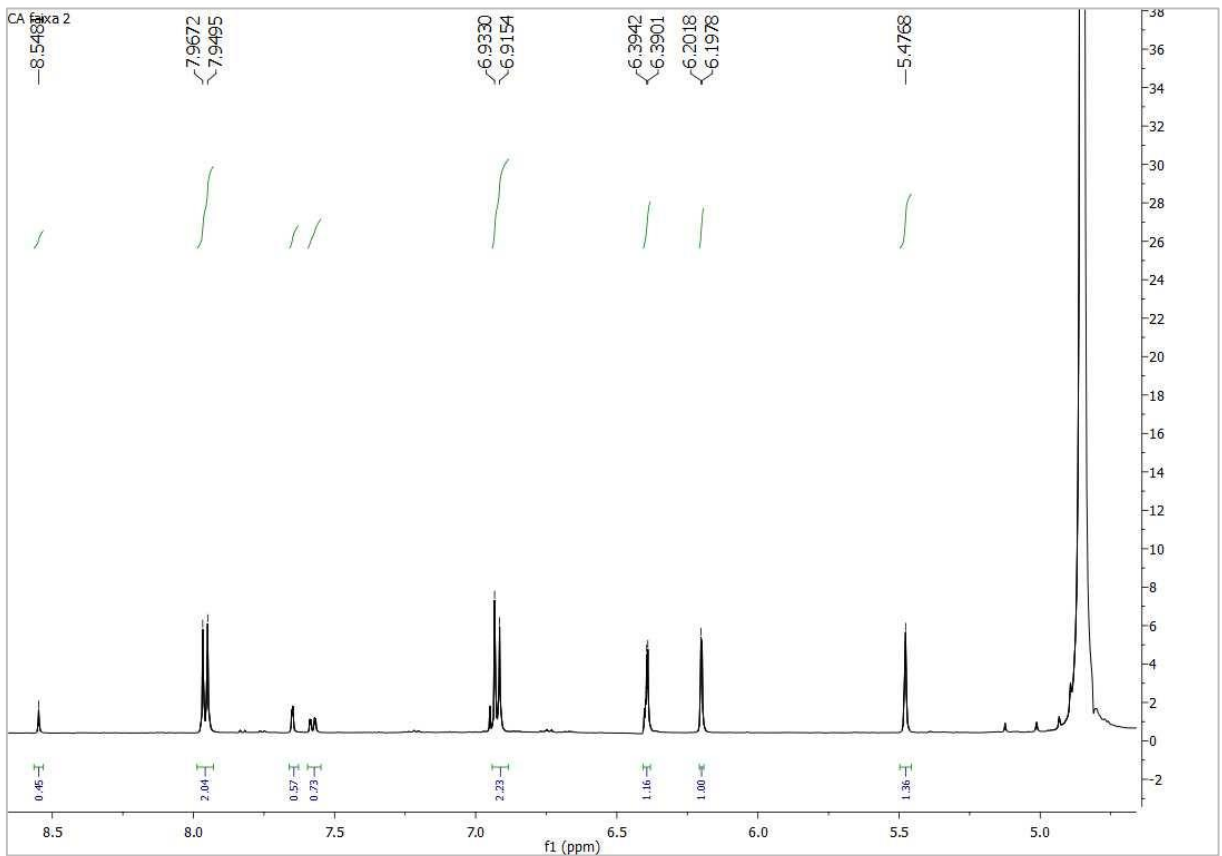


Figura 8: Expansão do espectro de RMN ^1H (δ , MeOD, 500 MHz) de Ca-1.

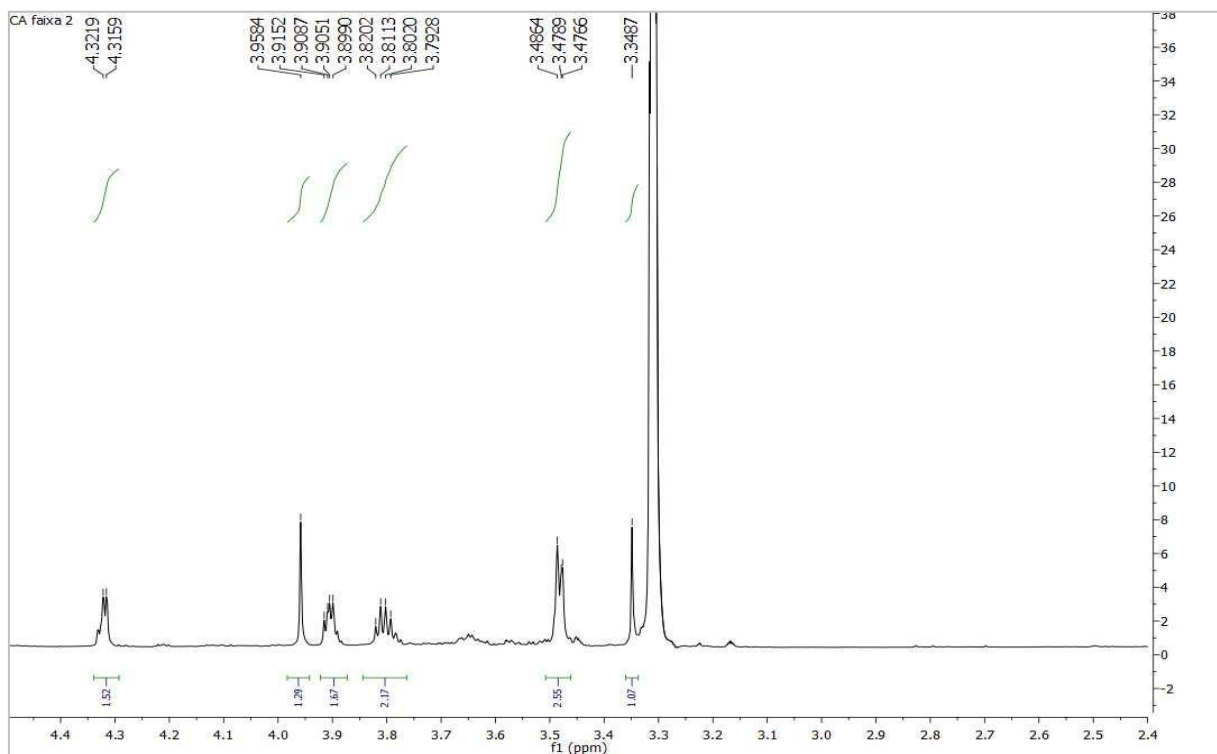


Figura 9: Espectro de RMN ^{13}C -APT (δ , MeOD, 500 MHz) de Ca-1.

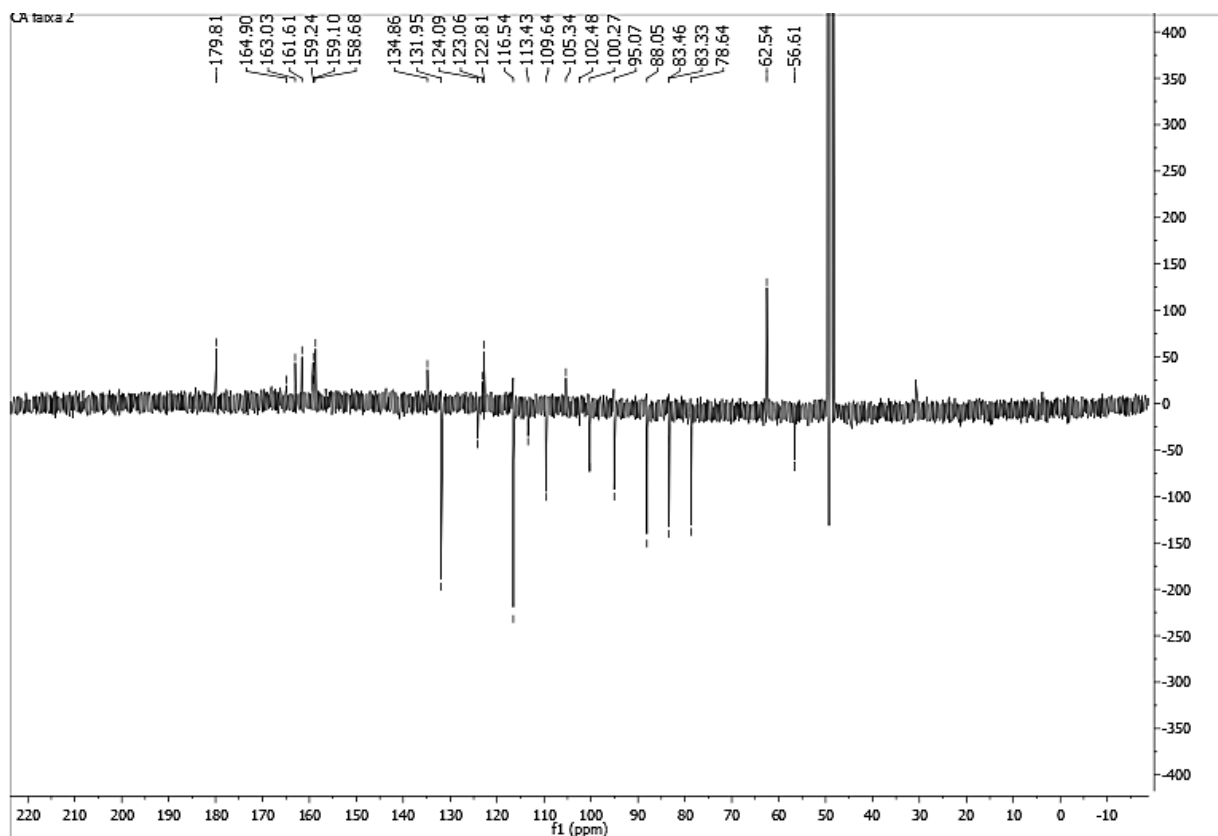


Figura 10: Expansão do espectro de RMN $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMQC (δ , MeOD, 500 MHz) de Ca-1.

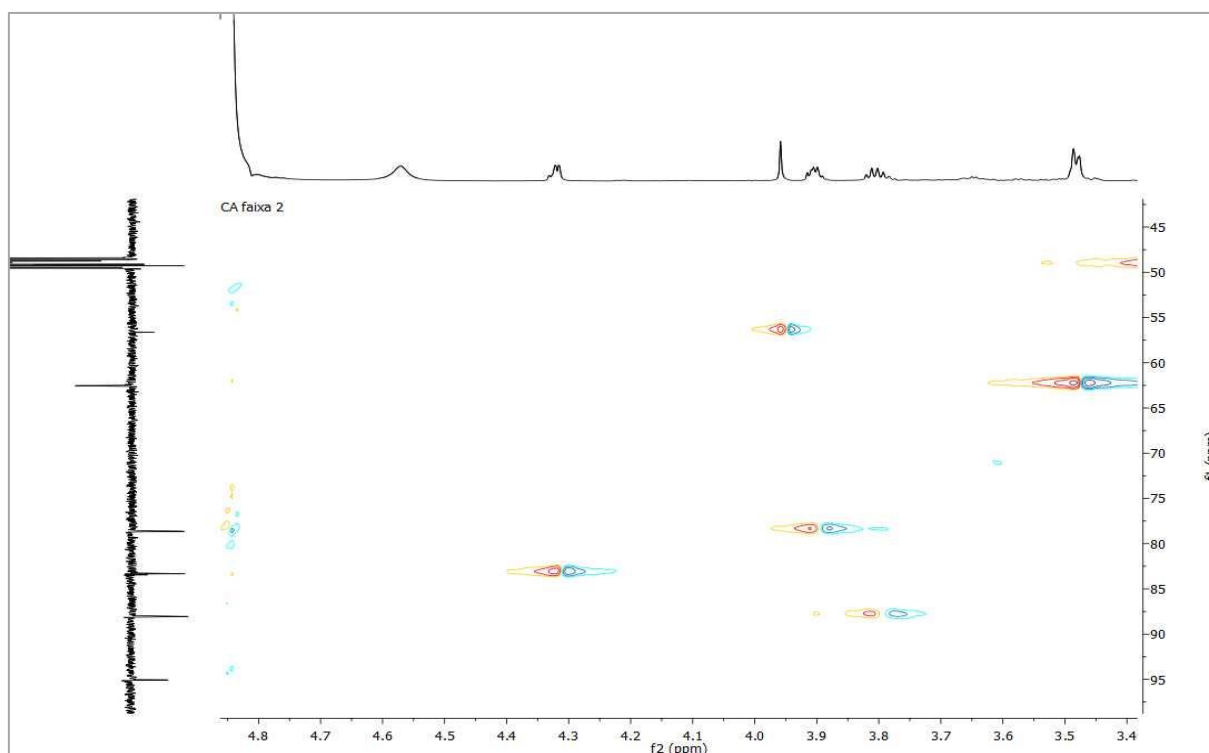


Figura 11: Expansão do espectro de RMN $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMQC (δ , MeOD, 500 MHz) de Ca-1.

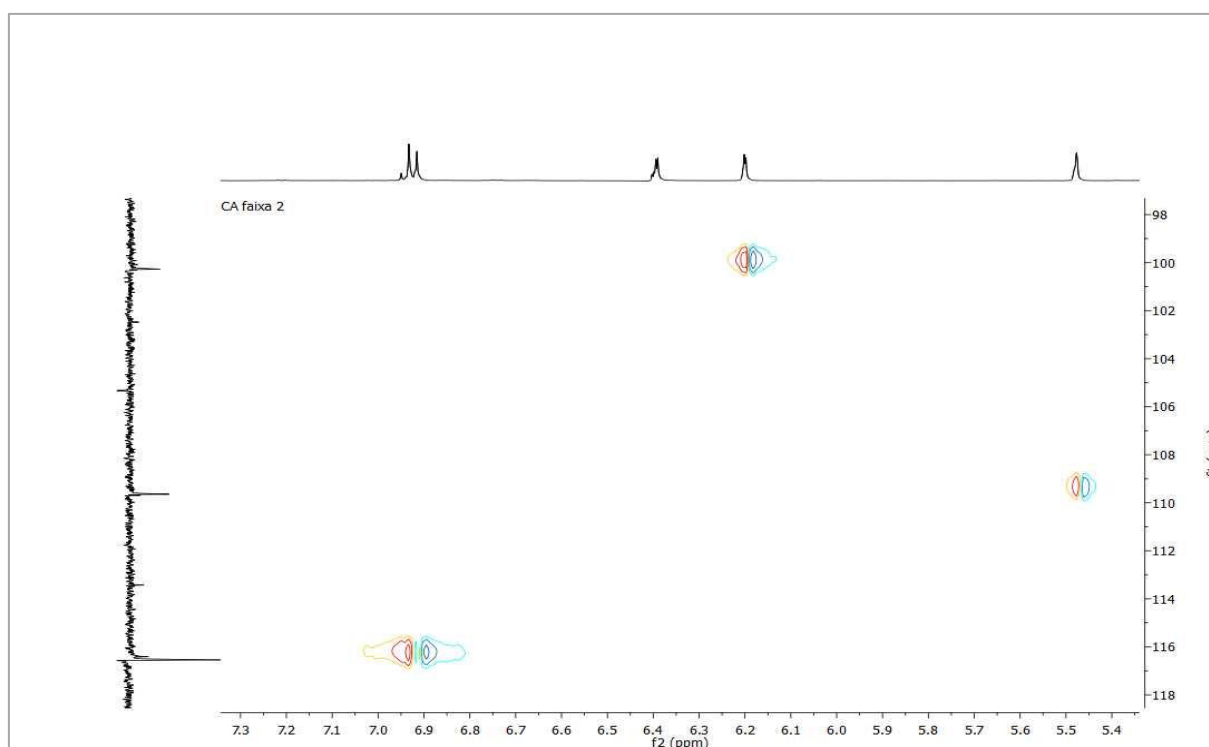


Figura 12: Expansão do espectro de RMN $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMBC (δ , MeOD, 500 MHz) de Ca-1.

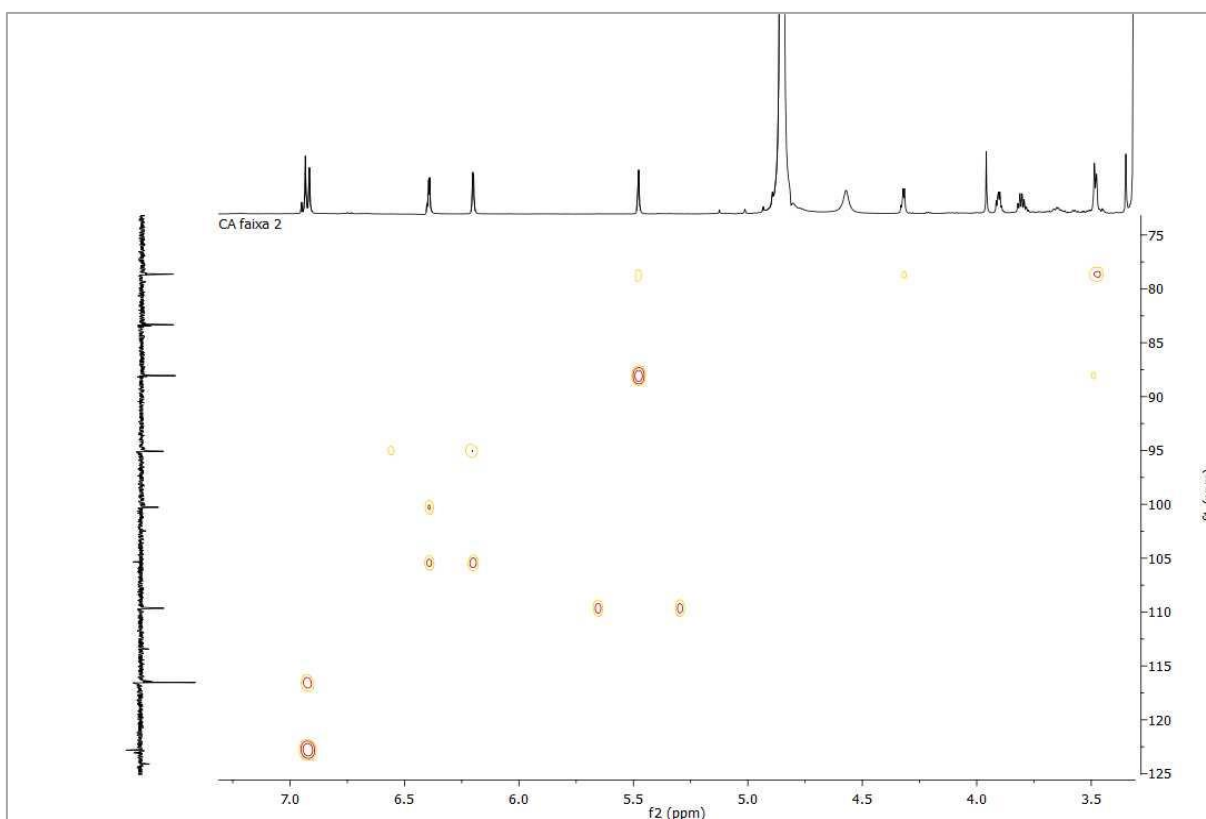
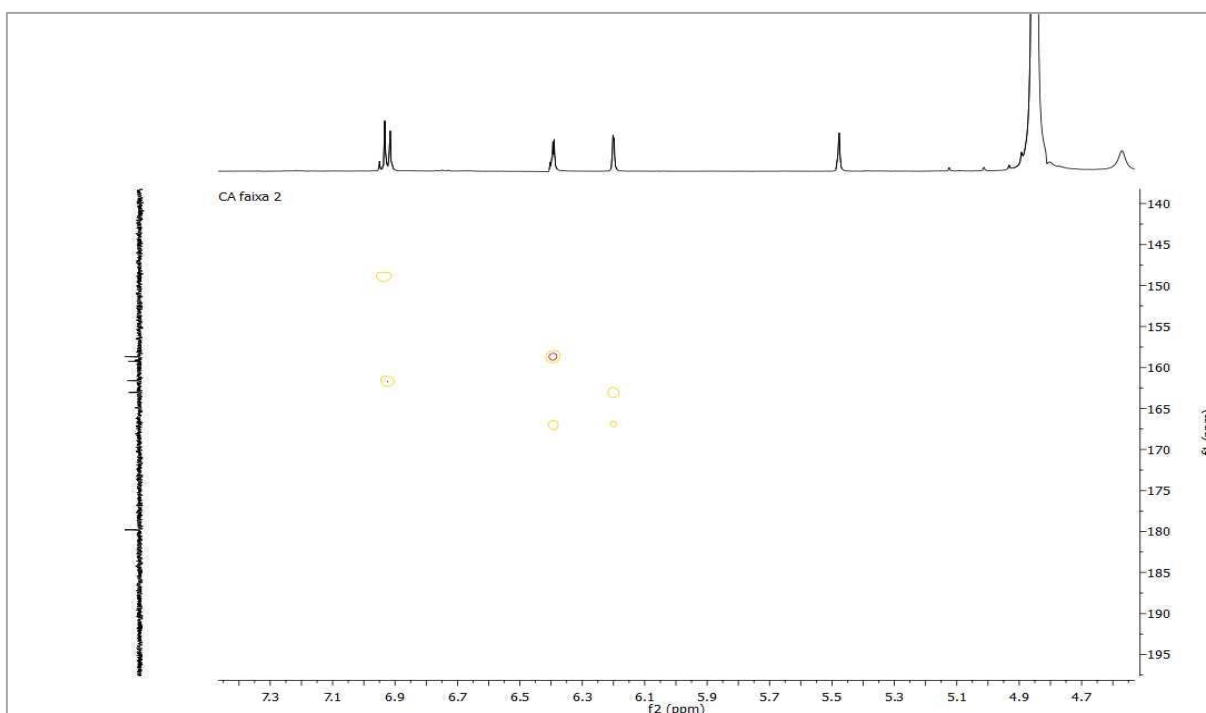


Figura 13: Expansão do espectro de RMN $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMBC (δ , MeOD, 500 MHz) de Ca-1.



5.1.2. Identificação estrutural de Ca-2

O composto codificado como Ca-2 foi isolado como um pó amarelo (0,007 g) e teve sua estrutura identificada através de experimentos de RMN de ^1H , ^{13}C (Uni e bidimensionais) além de comparação com dados da literatura (JIAO et al., 2007).

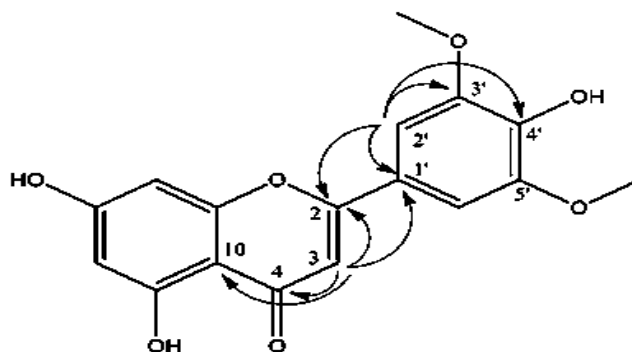
Analisando o espectro de RMN de ^1H e as suas expansões (Figuras 15 e 16, pág. 66), observou-se dois dupletos em δ_{H} 6,20 (1H) e δ_{H} 6,44 (1H) ambos com constante de acoplamento 2,0 Hz referente a acoplamento *meta*, típicos dos hidrogênios 6 e 8 do esqueleto flavonoídico substituído nas posições 5 e 7 do anel A (JIAO et al., 2007). A presença de um singlete em δ_{H} 6,60 (1H) indicou que a posição C-3 do anel C de Ca-2 não se encontra substituída. Observou-se, ainda, um singlete em δ_{H} 7,20 com integral para 2H, que quando comparado com o modelo da literatura (Mo-2) pode ser atribuído aos hidrogênios equivalentes, H-2' e H-6' do anel B tetrasubstituído de núcleo flavanoidico. Além disso, observou-se um singlete intenso em δ_{H} 3,93 (6H, s), em região característica de hidrogênios de grupo metoxila ligado a carbono de núcleo aromático, com integração para seis hidrogênios, então se levantou a hipótese de que existiriam dois grupos metoxilas nas posições C-3' e C-5' do anel B do núcleo flavanoidico, fato que justificou a equivalência dos H-2' e H-6' (Tabela 4, pág. 64).

A análise dos espectros de RMN de ^1H de Ca-2 e comparações com os dados do modelo 2 (JIAO et al., 2007), permitiram propor que a molécula em análise tratar-se-ia do 4',5,7-trihidroxi-3',5'-dimetoxiflavona (Tricina) (Figura 14, pág. 63).

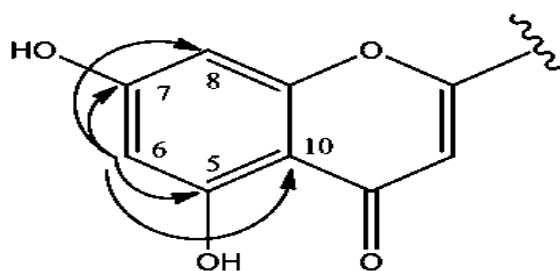
O espectro de RMN de ^{13}C utilizando a técnica APT (Figuras 17 e 18, pág. 67) exibiu sinais para 17 carbonos, corroborando com a estrutura flavonoidica. O sinal em δ_{C} 183,7 ppm é típico de carbonila na posição 4 de flavonas. A absorção em δ_{C} 105,2, com intensidade para 2C foi atribuída aos C-2' e C-6', que se apresentam quimicamente e magneticamente equivalentes, fortalecendo a proposta da localização das duas metoxilas nos C-3' e C-5' do anel B da estrutura, sendo a existência destas metoxilas na molécula de Ca-2, confirmadas pelo sinal com intensidade para dois grupos metoxilas em δ_{C} 57,0 ppm. As demais absorções, entre δ_{C} 165 e 95 ppm equivalentes aos carbonos da estrutura básica do flavonoide, e comparações com dados da literatura fortalecem nossa proposta que Ca-2 trata-se do 4',5,7-trihidroxi-3',5'-dimetoxiflavona (PENG, 2011; JIAO et al., 2007; KUWABARA et al., 2003) (Tabela 4, pág. 64).

O espectro de correlação heteronuclear HMQC (Figuras 19 e 20, pág. 68) mostrou correlações que permitiram atribuir os hidrogênios ligados diretamente aos seus respectivos carbonos. Pôde-se observar que os hidrogênios H-6 e H-8 estão a J^1 com os sinais em δ_C 100,1(C-6) e δ_C 95,0 (C-8) respectivamente, confirmando a substituição nos C-5 e C-7 do anel A de Ca-2. A correlação direta entre o sinal em δ_H 3,93 e o δ_C 57,0, confirmou a existência de metoxilas em Ca-2. A correlação entre H-3/C-3 pode ser vista pelos sinais em δ_H 6,60/ δ_C 104,6, afirmando que essa posição não se encontra substituída, ainda foram visualizadas, correlações entre os hidrogênios e carbonos 2'/6' (δ_H 7,20/ δ_C 105,2) do anel B (Tabela 5, pág. 65).

A análise das correlações exibidas no espectro HMBC (Figuras 21 à 23, pág. 69 e 70) permitiram realizar o completo assinalamento da estrutura de Ca-2. Foram observadas correlações a três ligações (J^3) entre o sinal de H-2' e H-6' (δ_H 7,20) com os C-2 e C-4' e a J^2 com os carbonos C-3' e C-5', comprovando o padrão de substituição do anel B, também foi evidenciada uma correlação atribuída a 3',5'-OCH₃ com os sinais em C-3' e C-5', afirmando a presença de metoxilas ligadas nesses carbonos. O hidrogênio da posição 3 (6,60) mostrou correlação a J^3 com os carbonos da posição 10 e 1' e a J^2 com os C-4 e C-2 (Tabela 5, pág. 65). Algumas destas correlações são mostradas logo a seguir:



O espectro HMBC (Figuras 21 à 23, pág. 69 e 70) evidenciou ainda a correlação entre o hidrogênio na posição 6 (δ_H 6,20) a J^3 com C-10 e C-8, e a J^2 com os C-5 e C-7, confirmando assim que essas posições estão substituídas, e também foi exibida uma correlação J^3 do H-8 com o C-10 (Tabela 5, pág. 65). Algumas destas correlações podem ser observadas a seguir:



A compilação dos dados espectrais (Tabela 4 e 5, págs. 64 e 65) e comparação com dados da literatura (JIAO *et al.*, 2007; KUWABARA *et al.*, 2003) permitiram identificar a estrutura de Ca-2 como a 4',5,7-trihidroxi-3',5'-dimetoxiflavona, também conhecida como tricina, flavona isolada pela primeira vez no gênero *Casearia* (XIA *et al.*, 2015).

Figura 14: 4',5,7-trihidroxi-3',5'-dimetoxiflavona (Ca-2).

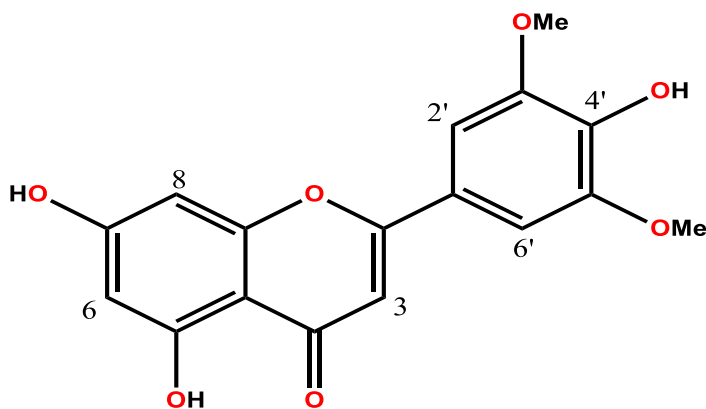
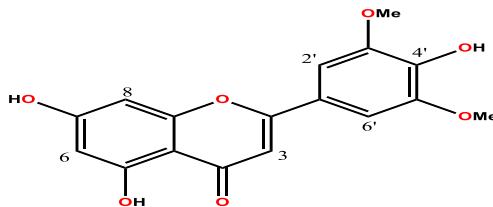
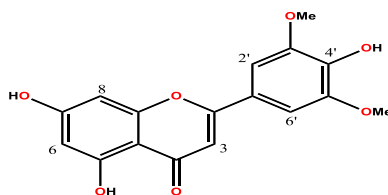


Tabela 4: Dados comparativos de RMN de ^1H e ^{13}C (δ , MeOD, CDCl_3 1:1, 500 MHz) de Ca-2 comparados com o modelo da literatura (δ , DMSO- d_6 , 500 MHz) (JIAO *et al.*, 2007).



C	Ca-2		Modelo-2	
	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}
2		165,9		164,6
4		183,7		182,3
5		159,3		157,8
7		165,8		164,2
9		163,1		161,9
10		104,9		104,2
1'		122,6		120,9
3' e 5'		149,5		148,7
4'		141,1		140,3
CH				
3	6,60 (1H, s)	104,5	6,96 (1H, s)	104,1
6	6,20 (1H, d, J=2,0 Hz)	100,1	6,17 (1H, d, J=2,0 Hz)	99,3
8	6,44 (1H, d, J=2,0 Hz)	95,0	6,52 (1H, d, J=2,0 Hz)	94,7
2' e 6'	7,20 (2H, s)	105,2	7,31 (2H, s)	104,8
-OCH ₃				
3' e 5'	3,93 (6H, s)	57,0	3,88 (6H, s)	56,0

Tabela 5: Dados espectrais de RMN ^1H e ^{13}C (δ , MeOD, CDCl_3 1:1, 500 MHz) de Ca-2.



C	$^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ – HMQC		$^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ – HMBC	
	δ_{H}	δ_{C}	$^2J_{\text{H,C}}$	$^3J_{\text{H,C}}$
2	-	165,9		
4	-	183,7		
5	-	159,3		
7	-	165,8		
9	-	163,1		
10	-	104,9		
1'	-	122,6		
3' e 5'	-	149,5		
4'	-	141,7		
CH				
3	6,60 (1H, s)	104,5	C-2; C-4	C-1'; C-10
6	6,20 (1H, d, $J = 2,0$ Hz)	100,1	C-5; C-7	C-8; C-10
8	6,44 (1H, d, $J = 2,0$ Hz)	95,0		C-10
2' e 6'	7,20 (2H, s)	105,28	C-1'; C-3'	C-2; C-4'
-OCH ₃				
3' e 5'	3,93 (6H, s)	57,0		

Figura 15: Espectro de RMN ^1H (δ , MeOD, CDCl_3 , 1:1, 500 MHz) de Ca-2.

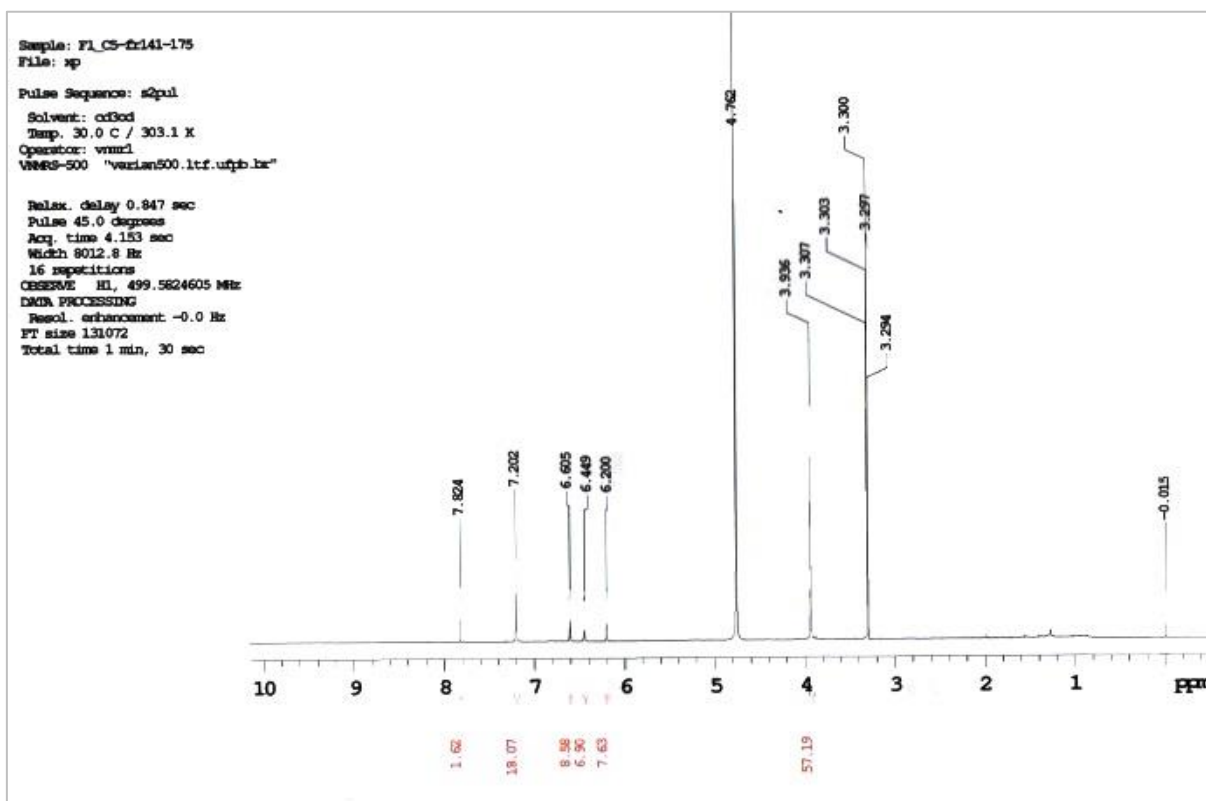


Figura 16: Expansão do espectro de RMN ^1H (δ , MeOD, CDCl_3 , 1:1, 500 MHz) de Ca-2.

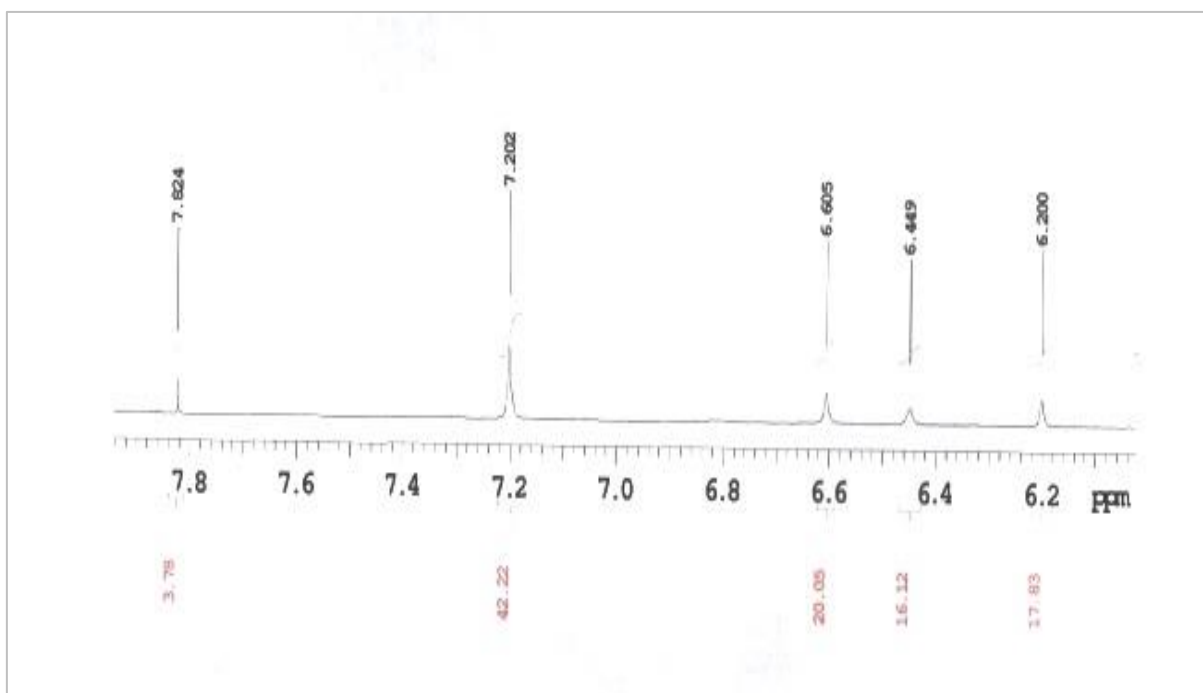


Figura 17: Expansão do espectro de RMN ^{13}C -APT (δ , MeOD, CDCl_3 , 1:1, 500 MHz) de *Ca-2*.

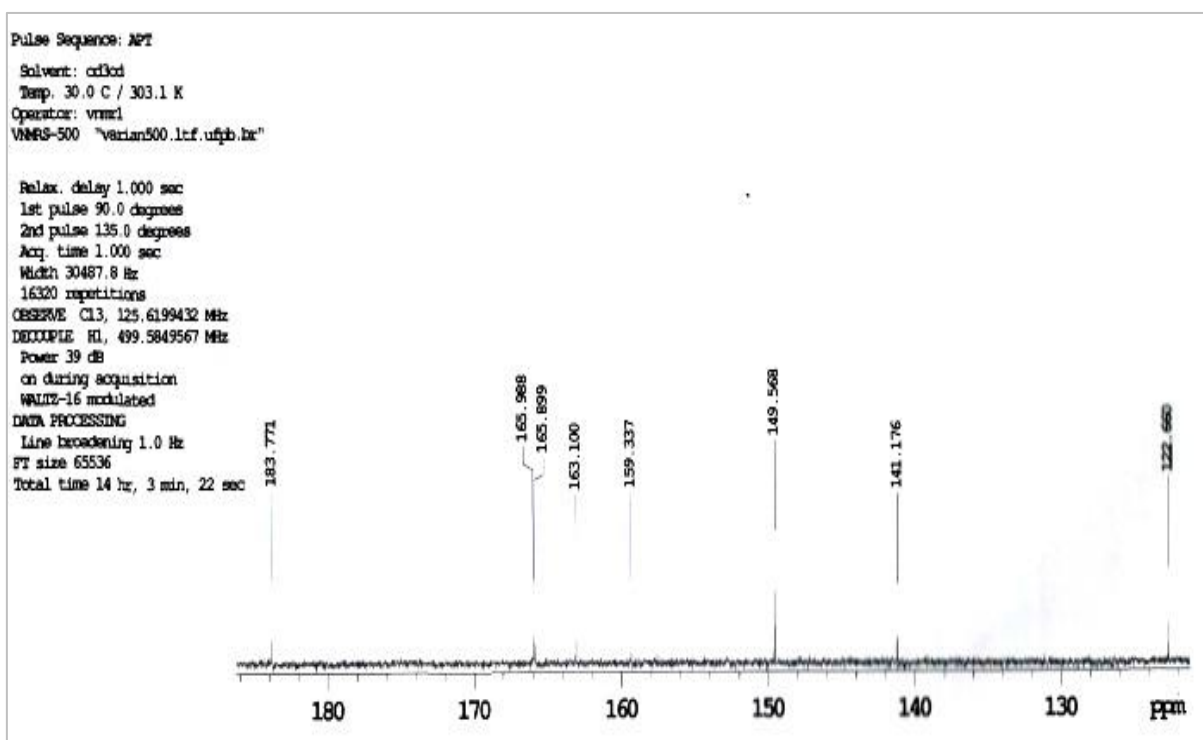


Figura 18: Expansão do espectro de RMN ^{13}C -APT (δ , MeOD, CDCl_3 , 1:1, 500 MHz) de *Ca-2*.

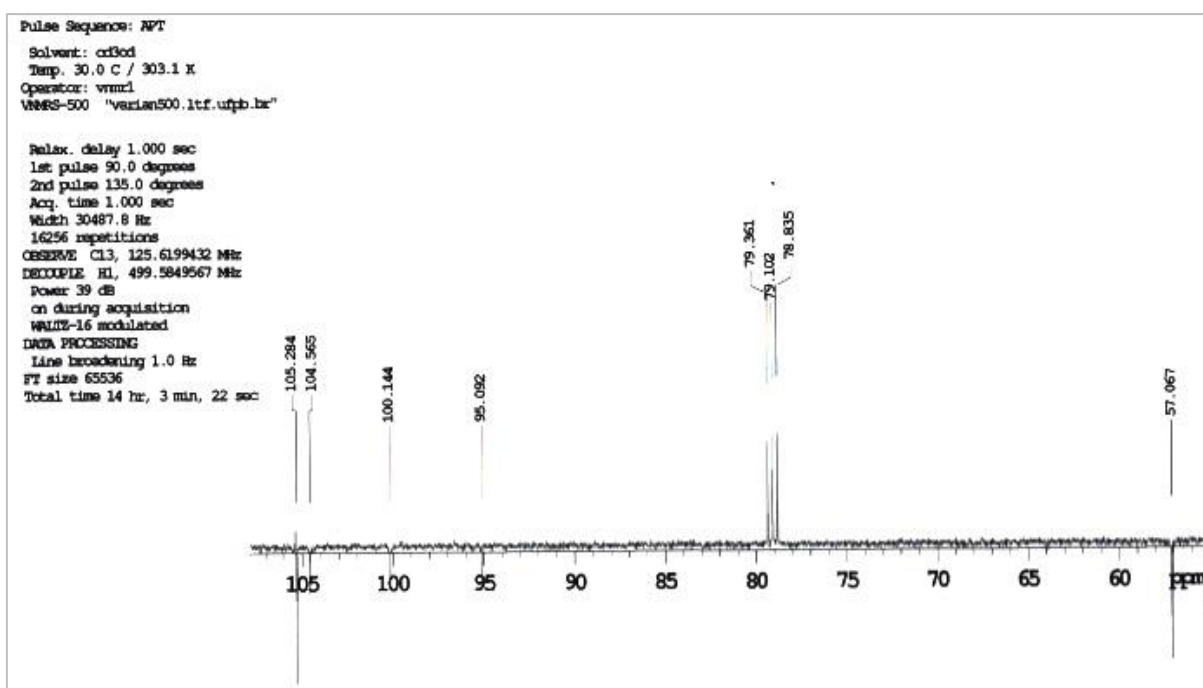


Figura 19: Espectro de RMN $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMQC (δ , MeOD, CDCl_3 , 1:1, 500 MHz) de Ca-2.

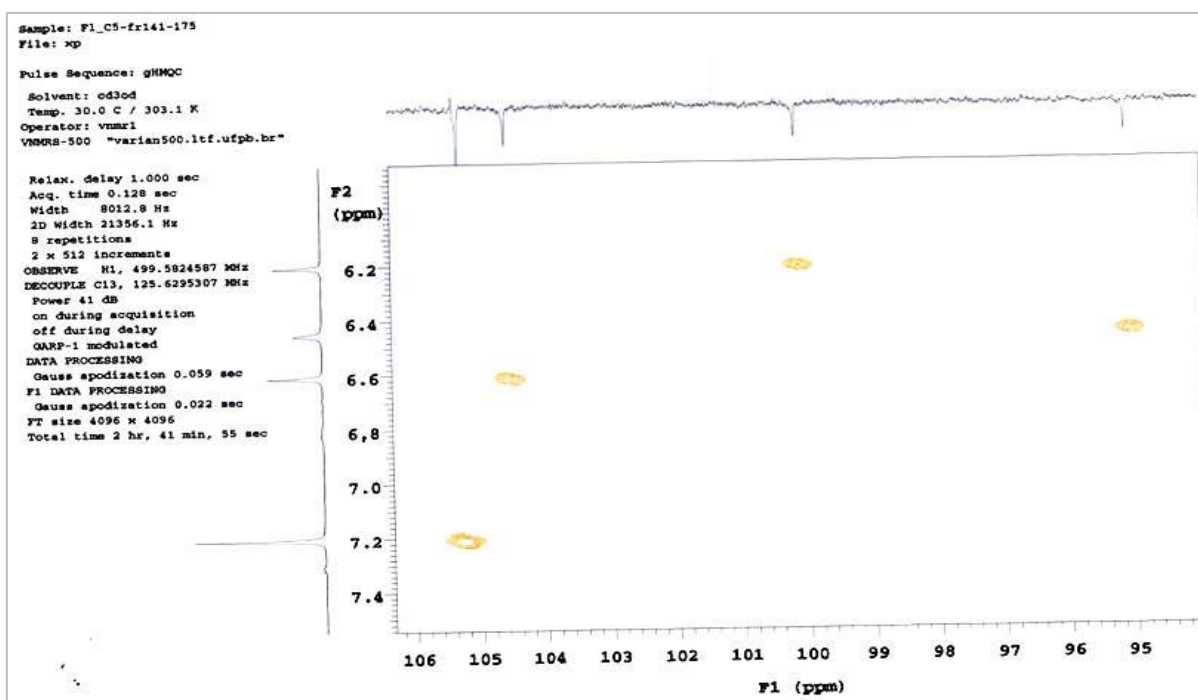


Figura 20: Espectro de RMN $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMQC (δ , MeOD, CDCl_3 , 1:1, 500 MHz) de Ca-2.

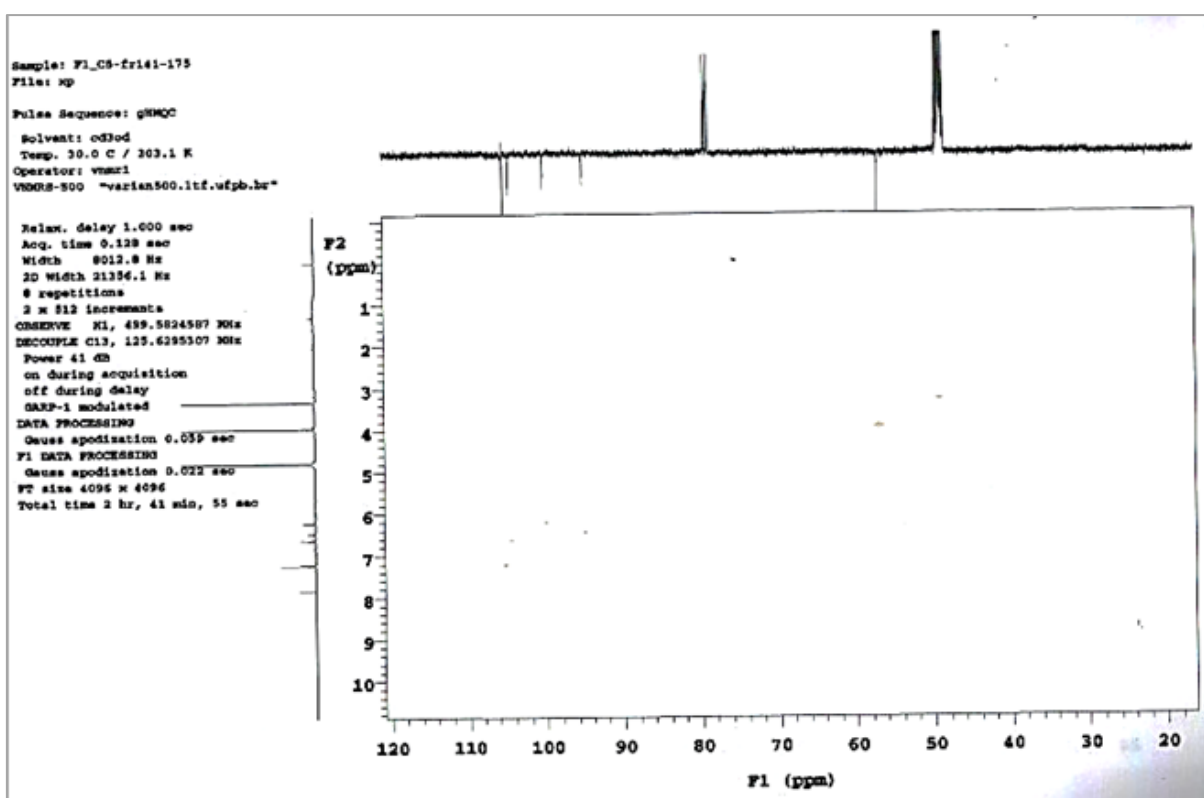


Figura 21: Espectro de RMN $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMBC (δ , MeOD, CDCl_3 , 1:1, 500 MHz) de Ca-2.

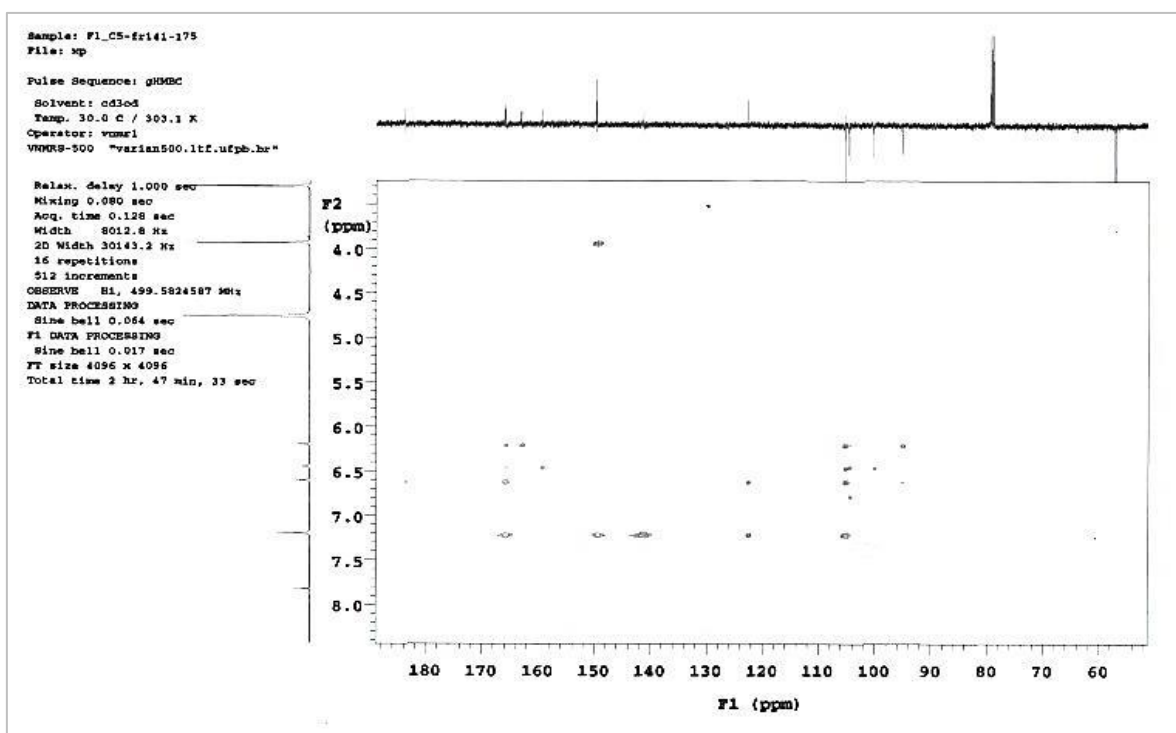


Figura 22: Expansão do espectro de RMN $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMBC (δ , MeOD, 1:1, CDCl_3 , 500 MHz) de Ca-2.

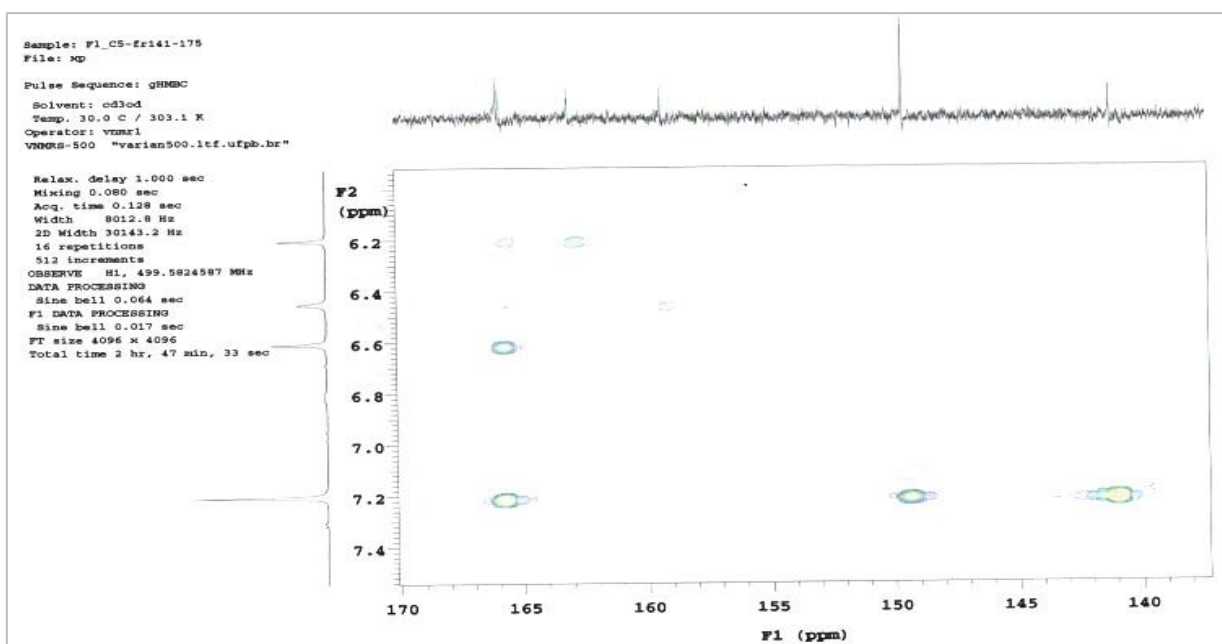
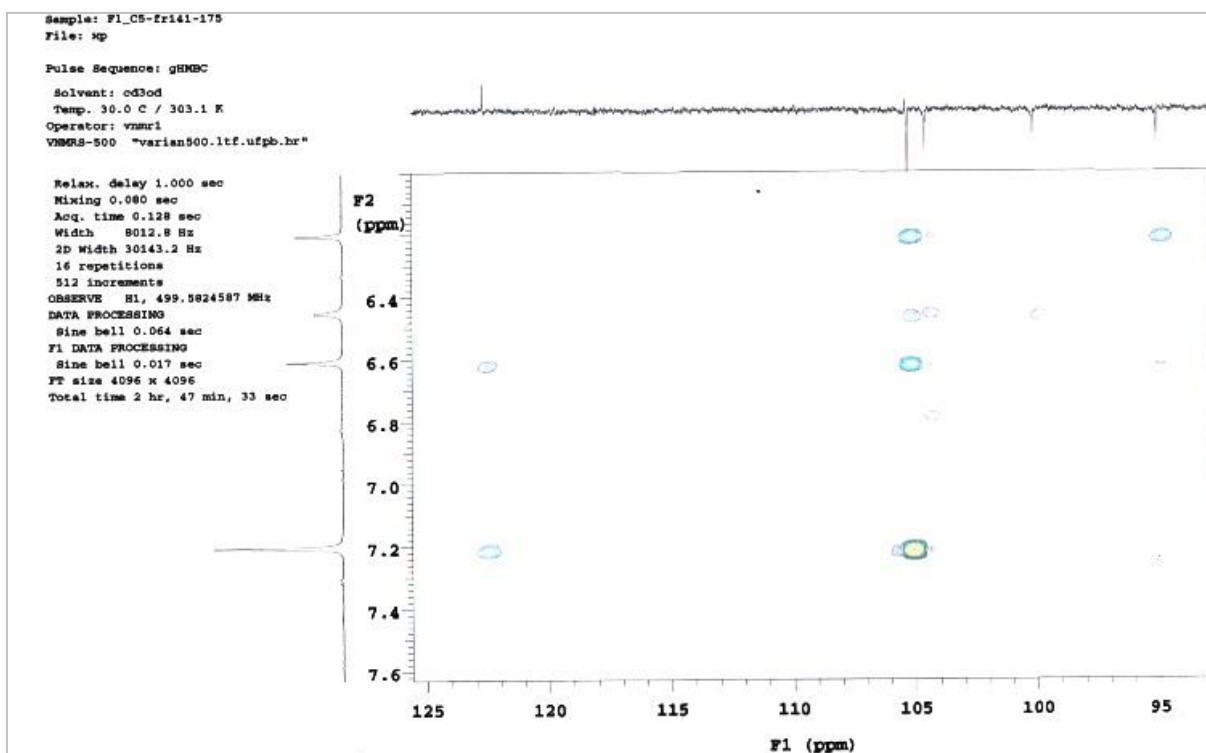


Figura 23: Expansão do espectro de RMN $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMBC (δ , MeOD, CDCl_3 , 1:1, 500 MHz) de Ca-2.



5.1.3. Identificação estrutural de Ca-3

A substância denominada de Ca-3 foi isolada na forma de cristais brancos (0,270 g).

Seu espectro de RMN ^1H e expansões (Figuras 25 à 28, págs. 74 e 75) mostraram feições bastante semelhantes a diterpenos com esqueleto do tipo clerodano que são comuns no gênero *Casearia* (KANOKMEDHAKUL et al., 2007). Três singletos (3H) e dois dubletos (2H) foram evidenciados em δ_{H} 1,24 (s), δ_{H} 1,06 (s), δ_{H} 0,76 (s) e δ_{H} 1,83 (d, $J = 1,50$ Hz) e δ_{H} 0,78 (d, $J = 6,00$ Hz), respectivamente, referentes a cinco metilas, sendo a menos protegida (δ_{H} 1,83), característica de grupo metila ligado a carbono sp^2 (NAGASHIMA et al., 2001). Três sinais referentes a hidrogênios olefínicos se fizeram presentes e levaram a propor que a molécula em análise possui um grupo vinil terminal. Um duplo duplete em δ_{H} 5,82 que acopla trans (dd, $J = 17,3$ Hz) com o duplo duplete em δ_{H} 5,14 (dd, $J = 17,3$ Hz) e cis com o duplo duplete em δ_{H} 5,02 (dd, $J = 10,5$ Hz), este sinal por sua vez acopla geminal com

o sinal em δ_H 5,14, ambos com $J=1,0$ Hz. Outro sinal de H olefínico em Ca-3 encontra-se desprotegido (δ_H 5,66, d, $J=1,0$ Hz), quando comparado ao H-3 δ_H 5,18 (s) (RAMIREZ, 2008) e δ_H 5,16 (s) (LOPES et al., 1999) do kolavelol, o que sugere uma modificação no ambiente químico do hidrogênio da posição C-3 de Ca-3, provocada por uma possível carbonila em C-2 (Tabela 6, pág. 73).

Análise dos dados de RMN 1H de Ca-3, e comparações com aqueles obtidos para a kolavelona, em estudo realizado por Ramirez (2008) com *Casearia arborea (rich.) urb.* permitiram propor que Ca-3 poderia ser a 13-hidróxi-2-oxo-trans-ent-cleroda-3,14-dieno (Kolavelona).

Os espectros de RMN ^{13}C utilizando a técnica BB (Broad Band) e APT (Figuras 29 a 32, págs. 76 e 77) mostraram sinais para 20 átomos de carbono, que fortaleceu a proposta que Ca-3 pertence a classe dos diterpenos, entre estes pôde-se observar quatro sinais bastante desprotegidos, que quando comparados com os dados espectrais do kolavelol de Lopes et al. (1999) e Ramirez (2008), puderam ser atribuídos aos carbonos do anel A da estrutura em análise: δ_c 34,85 (C-1), δ_c 200,2 (C-2), δ_c 125,4 (C-3) e δ_c 172,3 (C-4), o que fortalece a sugestão da presença de um grupo carbonila α , β insaturada no C-2 (Tabela 6, pág. 73).

Dos 20 sinais para carbonos apresentado, salienta-se um sinal de carbono olefínico terminal em δ_c 112,0 (C-15); um sinal para carbono não hidrogenado cujo substituinte é um grupo hidroxila em δ_c 73,0 (C-13) e sinais para 5 metilas: δ_c 27,9 (C-16), 15,6 (C-17), 18,8 (C-18), δ_c 18,3 (C-19) e δ_c 17,9 (C-20), o que corroborou a proposta do esqueleto clerodano para a molécula. Sendo o penúltimo deslocamento, (C-19), o que caracteriza uma configuração trans entre os anéis A e B, dados que fortaleceram a proposta que Ca-3 tratava-se da kolavelona (NAGASHIMA et al., 2001; BECKER et al., 2004 e Tabela 6, pág. 73).

Dados espectrais de Ca-3 quando comparados à literatura (Tabela 6, pág. 72), permitiram concluir que a substância em análise tratava-se da: 13-hidróxi-2-oxo-trans-ent-cleroda-3,14-dieno (Kolavelona), reisolada em *C. arborea (Rich.) Urb.* (Salicaceae).

Figura 24: 13-hidróxi-2-oxo-trans-ent-cleroda-3,14-dieno (Kolavelona) (Ca-3)

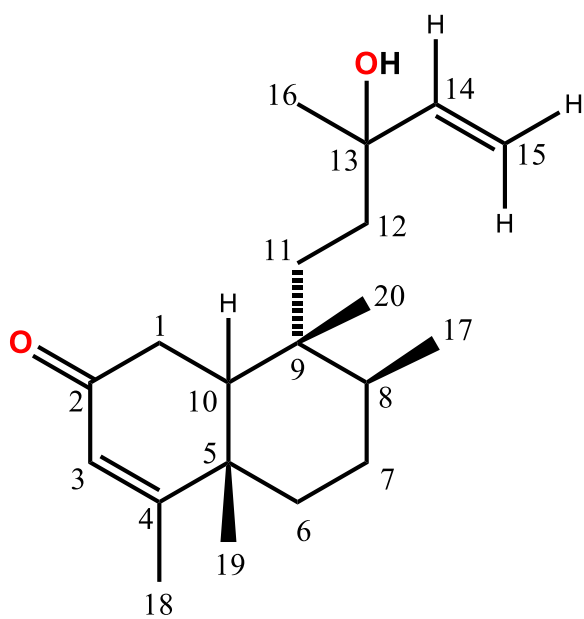


Tabela 6: Dados comparativos de Ca-3 RMN¹H e ¹³C (δ , CDCl₃, 500 e 125 MHz) com a literatura: kolavelol e kolavelona (δ , CDCl₃, 500 e 125 MHz) (RAMIREZ, 2008).

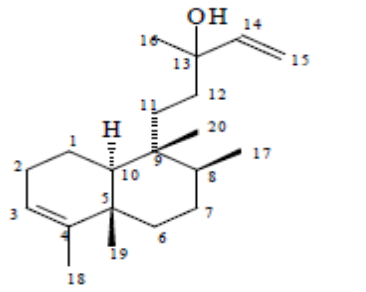
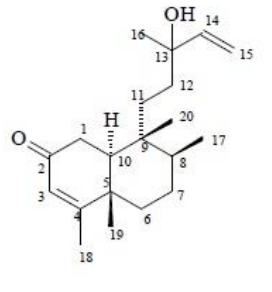
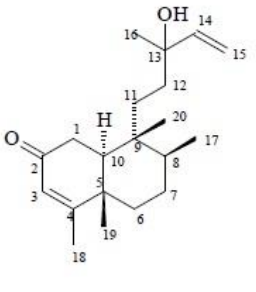
C	 Kolavelol (RAMIREZ, 2008)		 Kolavelona (RAMIREZ, 2008)		 Ca-3 = Kolavelona	
	δ_H	δ_C	δ_H	δ_C	δ_H	δ_C
1	-	18,4	-	34,83	-	34,85
2	-	27,0	-	200,4	-	200,2
3	5,18 (s)	120,6	5,67 (d, $J=1,5$ Hz)	125,4	5,66 (d, $J=1,0$ Hz)	125,4
4	-	144,7	-	172,6	-	172,3
5	-	37,0	-	39,8	-	39,7
6	-	36,4	-	35,5	-	35,5
7	-	27,6	-	26,8	-	26,8
8	-	18,7	-	35,9	-	35,8
9	-	38,5	-	38,3	-	38,3
10	-	46,5	-	45,6	-	45,6
11	-	32,0	-	31,2	-	31,2
12	-	36,4	-	34,7	-	34,8
13	-	73,6	-	73,0	-	73,0
14	5,89 (dd, $J=17,30$ Hz)	145,3	5,82 (dd, $J=17,3$ e $10,5$ Hz)	14,7	5,82 (dd, $J=17,3$ e $10,5$ Hz)	144,7
15 ^a	5,06 (d, $J=17,30$ Hz)	112,0	5,02 (dd, $J=10,5$ e $1,0$ Hz)	112,0	5,02 (dd, $J=10,5$ e $1,0$ Hz)	112,0
15 ^b	5,20 (d, $J=17,3$ e $10,8$ Hz)	112,0	5,14 (dd, $J=17,3$ e $1,0$ Hz)	112,0	5,14 (dd, $J=17,3$ e $1,0$ Hz)	112,0
16	1,28 (s)	28,0	1,24 (s)	27,8	1,22 (s)	27,9
17	5,06 (d, $J=17,3$ Hz)	16,1	0,79 (d, $J=6,05$ Hz)	15,6	0,78 (d, $J=6,0$ Hz)	15,6
18	1,58 (s)	18,2	1,83 (d, $J=1,5$ Hz)	18,8	1,83 (d, $J=1,5$ Hz)	18,8
19	0,99 (s)	20,1	1,06 (s)	18,3	1,06 (s)	18,3
20	0,72(s)	18,7	0,76 (s)	17,9	0,76 (s)	17,9

Figura 25: Espectro de RMN ^1H de Ca-3 (δ , CDCl_3 , 500 MHz).

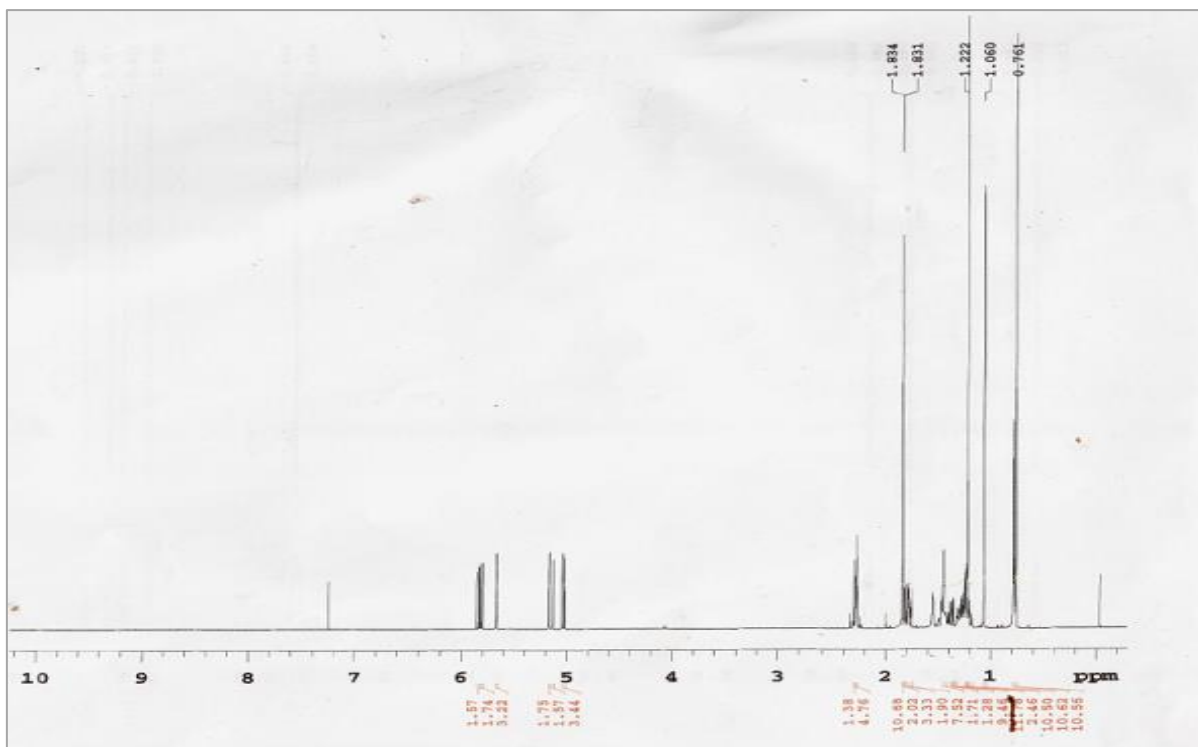


Figura 26: Expansão do espectro de RMN ^1H de Ca-3 na região entre 4,90 e 5,90 (δ , CDCl_3 , 500 MHz).

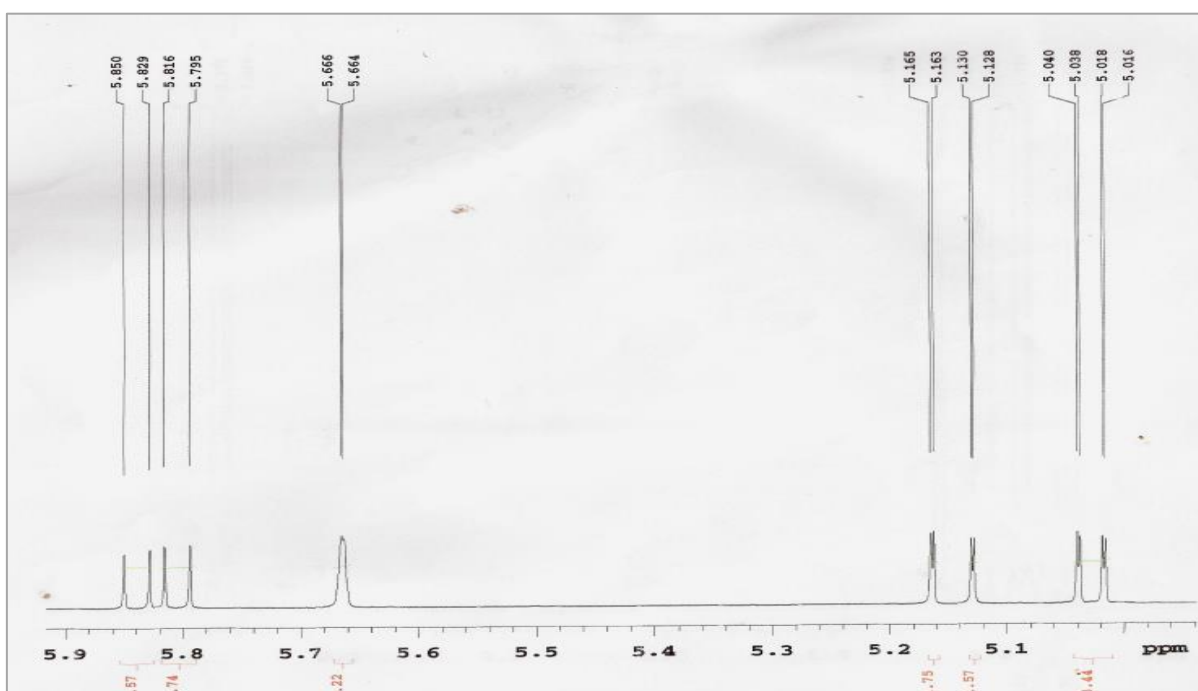


Figura 27: Expansão do espectro de RMN ^1H de Ca-3 na região entre 2,34 e 1,70 (δ , CDCl_3 , 500 MHz).

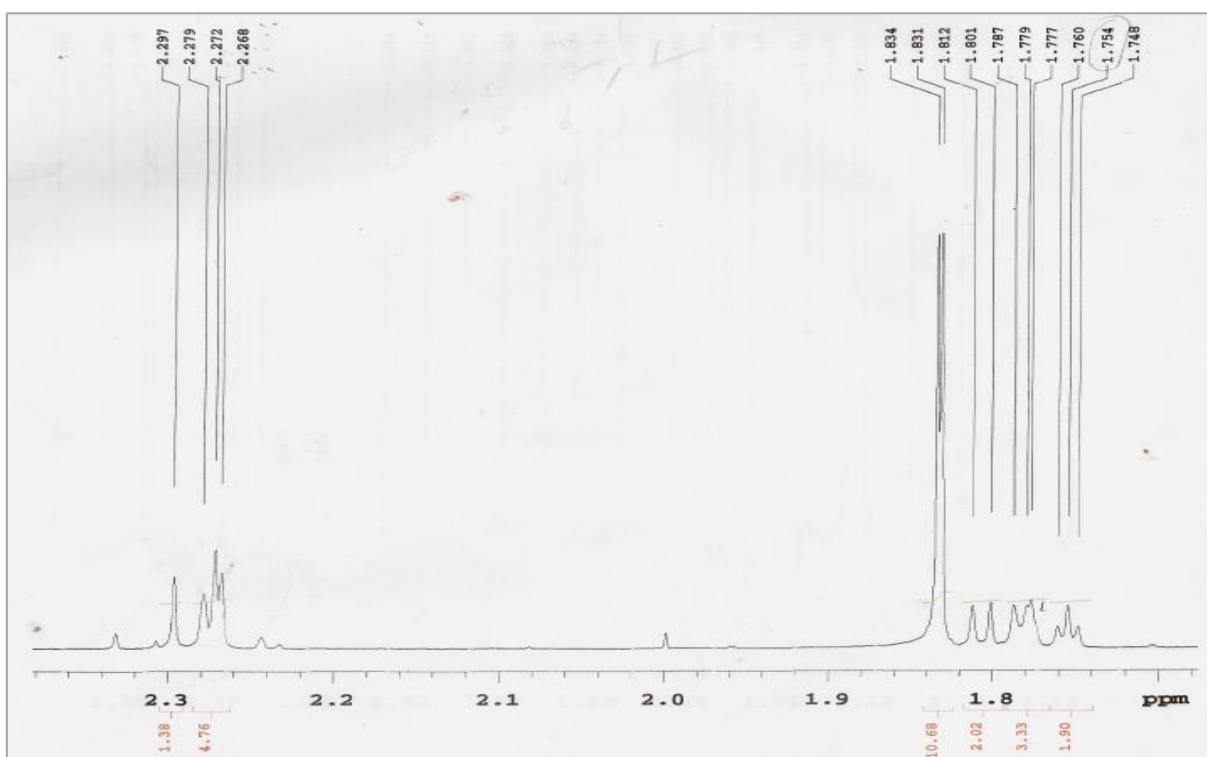


Figura 28: Expansão do espectro de RMN ^1H de Ca-3 na região entre 1,16 e 1,40 (δ , CDCl_3 , 500 MHz).

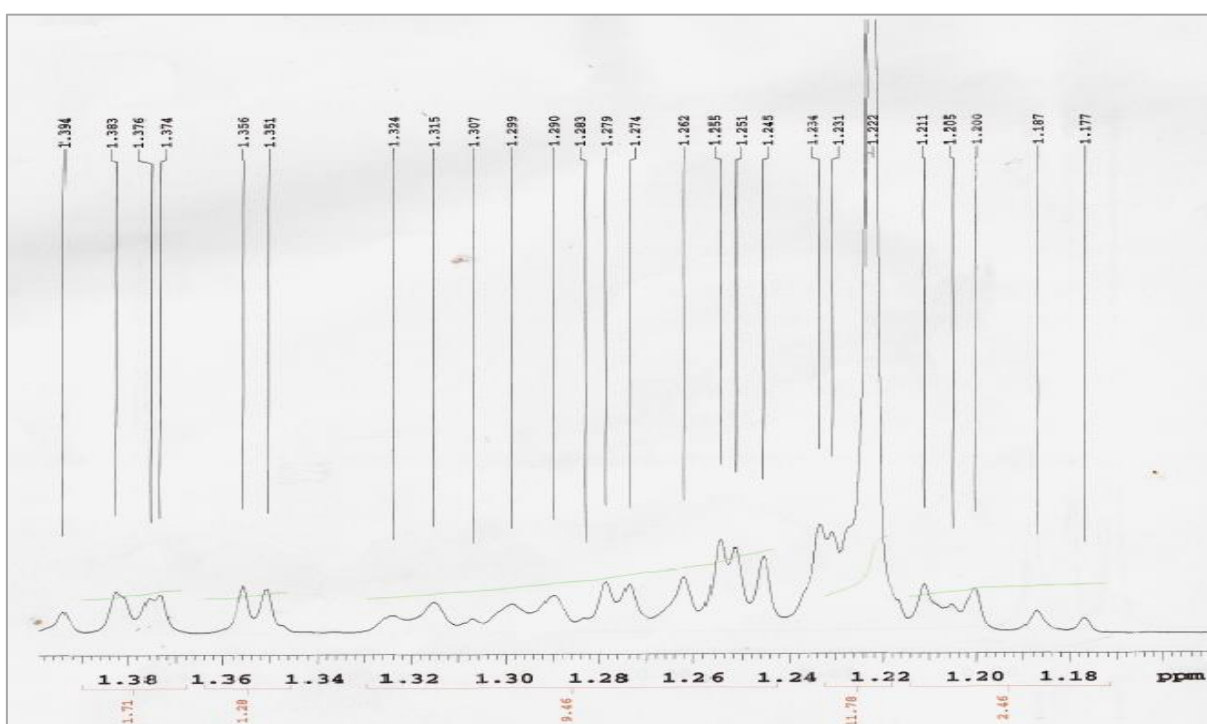


Figura 29: Espectro de RMN ^{13}C -BB de Ca-3 (δ , CDCl_3 , 125 MHz).

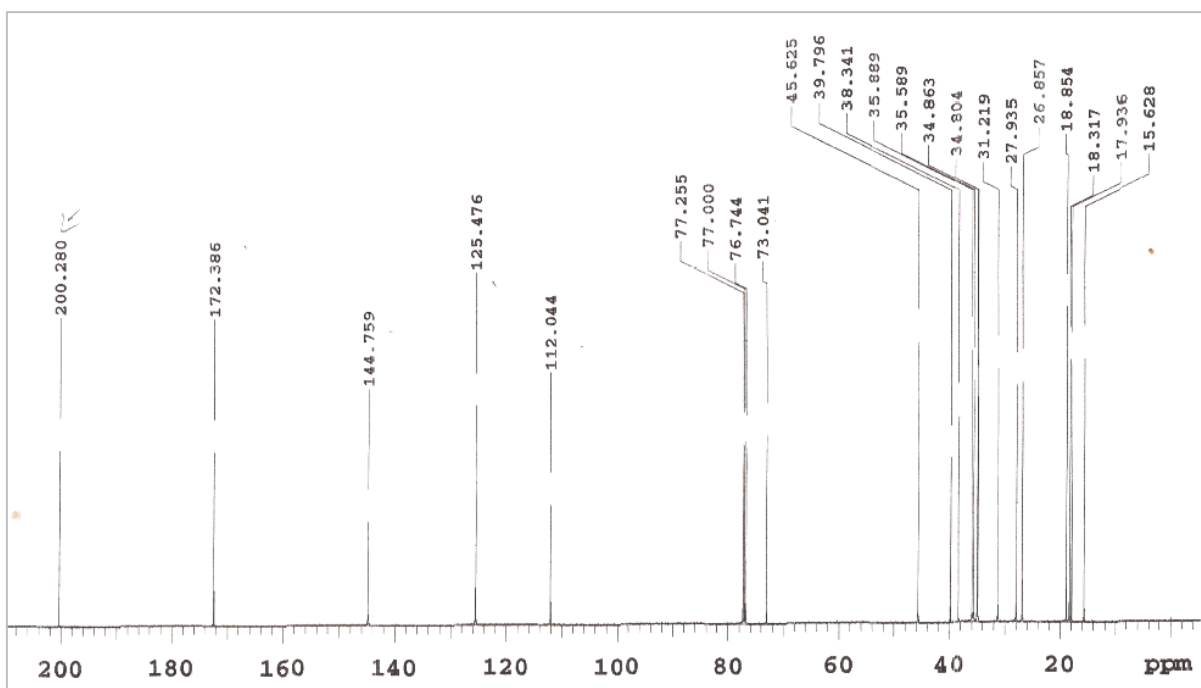


Figura 30: Expansão do espectro de RMN ^{13}C -APT de Ca-3 na região entre 110,00 a 204,00 (δ , CDCl_3 , 125 MHz).

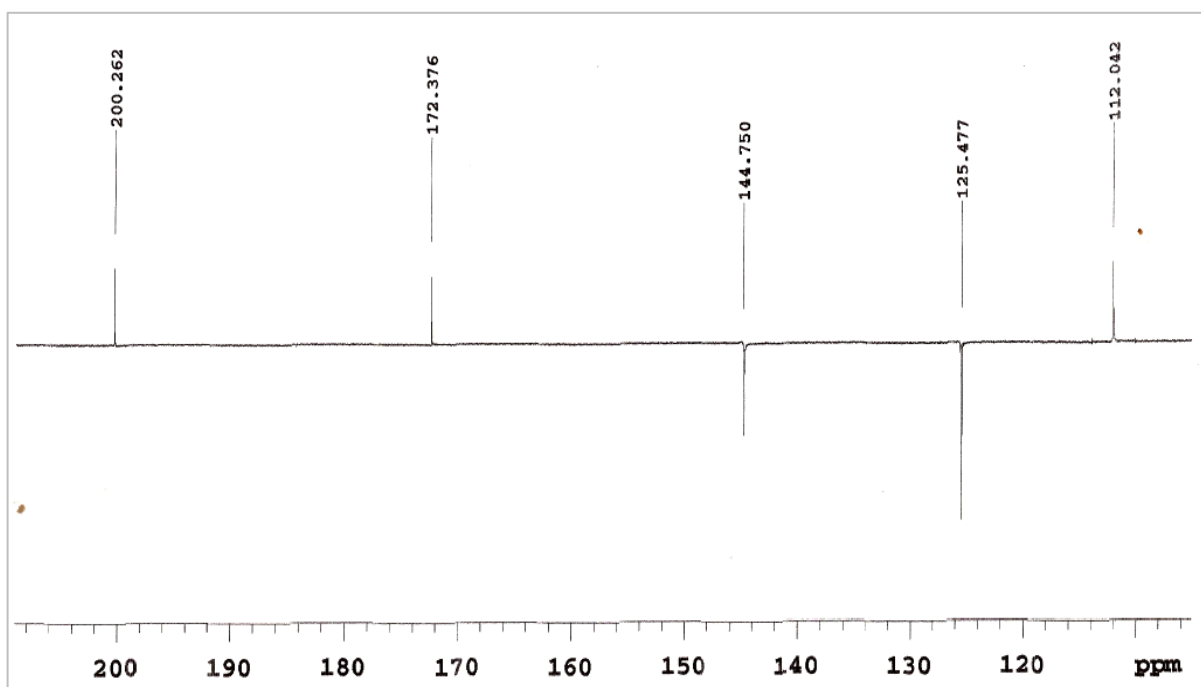


Figura 31: Expansão do espectro de RMN ^{13}C -APT de Ca-3 na região entre 14,00 a 48,00 (δ , CDCl_3 , 125 MHz).

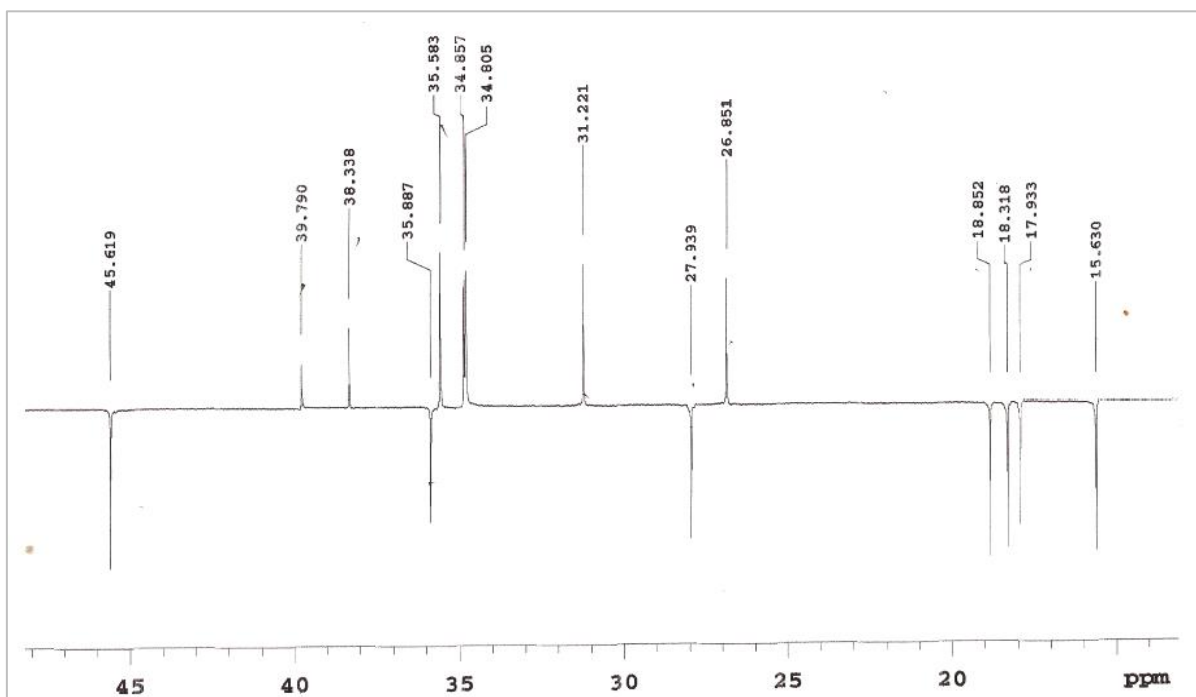
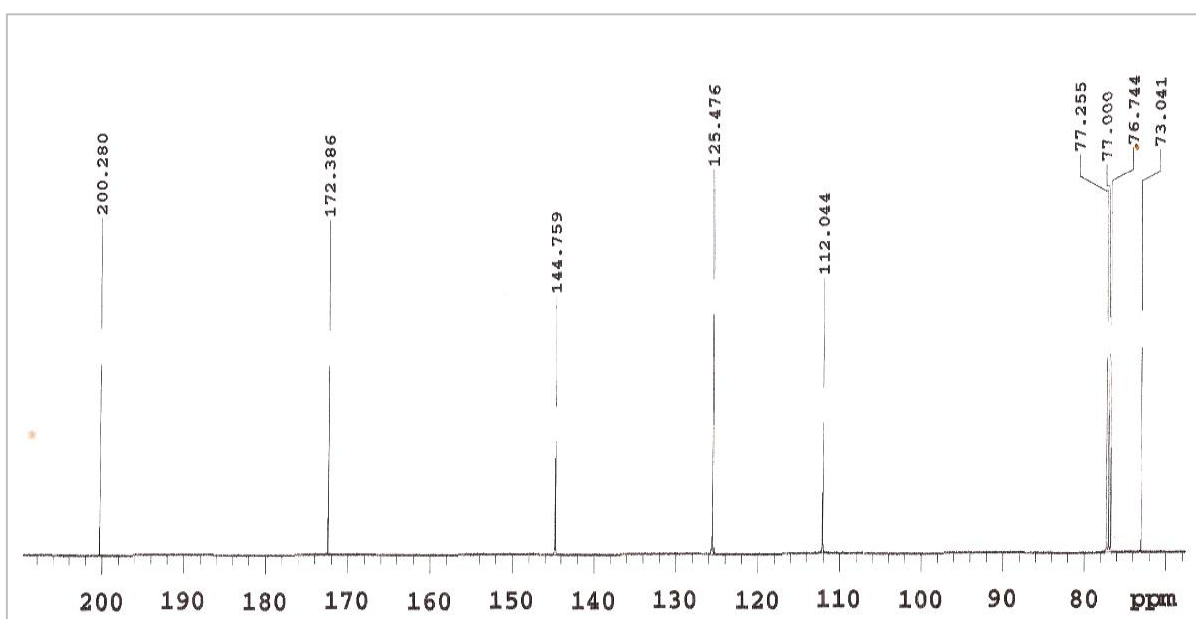


Figura 32: Expansão do espectro de RMN ^{13}C -BB de Ca-3 na região entre 74,00 a 208,00 (δ , CDCl_3 , 125 MHz).



6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE Ca-3

6.1 Avaliações da atividade antimicrobiana da kolavelona (Ca-3)

A substância kolavelona reisolada em *Casearia arborea* (Rich.) Urb. foi avaliada quanto ao seu potencial antimicrobiano sobre microrganismos patogênicos. Os experimentos foram realizados em parceria com a Prof.^a Dr.^a Edeltrudes Oliveira /UFPB no Laboratório de Microbiologia do Departamento de Fisiologia e Patologia (CCS/UFPB).

6.2 Preparação da solução de Ca-3

A solução de kolavelona foi preparada adotando-se o seguinte procedimento: em tubo de ensaio esterilizado, foram adicionados 900 µg de kolavelona, 24 µL de TWEEN 80 como agente emulsificante e quantidade suficiente para 3 mL de água destilada estéril. A mistura foi agitada por cinco minutos no agitador de tubos Vortex (FANEM/ Brasil), obtendo-se uma solução de concentração final de 300 µg/mL. A partir desta, foram realizadas diluições seriadas em razão de dois utilizando o próprio meio de cultura líquido estéril como diluentes obtendo-se as concentrações inferiores (ALEGRINI et al., 1972).

6.3 Obtenção dos microrganismos

Para avaliação da atividade antimicrobiana da substancia Ca-3 (Kolavelona) foram selecionados 20 cepas de microrganismos, constituídos de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, além de fungos leveduriformes. Entre estas 6 cepas microbianas obtidas da coleção do Laboratório de Micologia (LM), 1 cepa do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB-USP/SP) e 12 cepas padrão da “American Type Culture Collection” (ATCC).

As cepas teste foram *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *S. aureus* (ATCC 25923), *S. epidermidis* (ATCC 12228), *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Pseudomonas aeruginosas* (ATCC 25853), *P. aeruginosa* (ATCC 9027), *Escherichia coli* (Clássica C), *E. coli* (ATCC 18739), *E. coli* (ATCC 8733), *Shigella flexineri* (LM 412), *Candida albicans* (ATCC 90028), *C. albicans* (ATCC 76615), *C. albicans* (LM 142V), *C. albicans* (JCB 12), *C. tropicalis* (ATCC 13803), *C. tropicalis* (LM 028), *C. krusei*

(ATCC 6258), *C. krusei* (LM 12), *C. guilliermondii* (LM 2101) e *C. guilliermondii* (LM 011).

As cepas estoque bacterianas foram mantidas em ágar Muller Hinton (AMH) e as leveduras em ágar Sabouraud dextrose (ASD) sob refrigeração (8°C).

6.4 Obtenção dos meios de cultura

Os meios de cultura utilizados foram os meios sólidos ASD e AMH, além do meio líquido caldo Sabouraud dextrose (CSD) e caldo Muller Hinton (CMH) (Difco Laboratories Ltda) para as leveduras e bactérias, respectivamente. A preparação destes meios seguiu as instruções dos fabricantes e foram distribuídos em balões e tubos de ensaios adequados para os ensaios de atividade antimicrobiana.

6.5 Preparação do inoculo

Na preparação do inoculo microbiano, as bactérias foram mantidas em AMH e as leveduras em ASD, durante 24-48 horas a 37 °C. O mesmo foi preparado e padronizado em solução fisiológica (0,85 %) esterilizada, contendo Tween 80 (1 %). Cada suspensão teve sua turbidez visualmente comparada e ajustada àquela apresentada pela suspensão de sulfato de bário do tubo 0,5 da escala McFarland, a qual corresponde a um inoculo de aproximadamente 10^6 unidades formadoras de colônias/mL (UFC/mL) (BAUER; KIRBY; TURCK, 1966; CLEELAND; SQUIRES, 1991; HADACEK; GREGER, 2000).

6.6 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A determinação da CIM da substância frente às espécies bacterianas e fúngicas foram realizadas pelo método de microdiluição, utilizando placas de microtitulação contendo 96 cavidades com fundo em forma de “U” (INLAB/Indústria Brasileira) (KONEMAN et al., 1993; HADACEK; GREGER, 2000). Em cada orifício da placa, foi adicionado 100 µL do meio líquido CSD ou CMH duplamente concentrados.

Em seguida, foram adicionados 100 µL da kolavelona, duplamente concentrado, nas cavidades da primeira linha da placa. E por meio de uma diluição

seriada a uma razão de dois, foram obtidas concentrações de 300 µg/mL até 9 µg/mL. Por fim, adicionou-se 10 µL do inóculo das espécies microbianas nas cavidades, ressaltando que cada coluna da placa refere-se a uma cepa, especificamente. Foram realizados os seguintes controles: Tween 80 (10 % em água destilada); o de crescimento de microrganismos onde havia apenas o caldo e a suspensão dos microrganismos e; um controle com o antimicrobiano padrão cloranfenicol (30 µg/mL) para as bactérias e cetoconazol (50 µg/mL) para as leveduras, ambos da Sigma-Aldrich®.

O ensaio foi realizado em duplicata e incubado a 37 °C durante 24 horas. Após o tempo de incubação foram adicionados 20 µL de resazurina sódica (Sigma-Aldrich®) na concentração de 0,01 % (p/v), reconhecido como indicador calorimétrico de óxido-redução para bactérias. E em paralelo, 20 µL de cloreto de trifeniltetrazolio (TTC) a 1% (Sigma-Aldrich®), um indicador calorimétrico de óxido-redução para leveduras (GRABE, 1976; DESWAL; CHAND, 1997; DUARTE et al., 2005).

As placas foram novamente incubadas a 37°C. A leitura dos ensaios foi procedida por meio da visualização da mudança de coloração nas cavidades de azul para rosa, nos ensaios com bactérias, e de incolor para rosa nos ensaios com leveduras. Esta mudança de coloração indica crescimento do microrganismo. A CIM para cada produto foi definida como a menor concentração capaz de inibir visualmente o crescimento do microrganismo, verificado pela permanência da coloração do corante indicador de crescimento.

6.7 Resultados da avaliação antimicrobiana com Ca-3

O resultado dos ensaios microbiológicos para avaliação do potencial antibacteriano e antifúngico da kolavelona, obtida da espécie vegetal *Casearia arborea* (Rich.) Urb. (Salicaceae) estão expressos na tabela 7, página 82.

A atividade antimicrobiana de Ca-3 foi interpretada e considerada como ativa ou inativa, conforme os seguintes critérios: 50-500 µg/mL = forte/ótima atividade; 600-1500 µg/mL = moderada atividade; acima de 1500 µg/mL = fraca atividade ou produto inativo (HOLETZ et al., 2002; SARTORATTO et al., 2004; HOUGHTON et al., 2007).

A kolavelona (Ca-3) apresentou uma excelente atividade antibacteriana. Sendo ativa contra as espécies bacterianas, pois conseguiu inibir o crescimento de

todas elas na concentração de 300 µg/mL (*S. aureus* ATCC- 6538; *S. aureus* ATCC- 25923; *S. epidermidis* ATCC- 12228; *B. subtilis* ATCC- 6633; *P. aeruginosa* ATCC- 25853; *P. aeruginosa* ATCC- 9027; *E. coli* (clássica C); *E. coli* ATCC- 18739; *E. coli* ATCC- 8733; *S. flexineri* LM- 412), apenas a cepa *Staphylococcus aureus* ATCC- 25923 foi sensível na concentração de 150 µg/mL.

Apresentou-se ativa, apenas frente às leveduras da espécie *Candida tropicalis*, tendo em vista que esses microrganismos foram sensíveis a partir da concentração de 150 µg/mL, os demais fungos leveduriformes foram todos resistentes à kolavelona até a última concentração estudada, não apresentando as atividades esperadas (Tabela 7, pág. 82).

Pelos resultados obtidos com o desenvolvimento desse estudo, verificou-se que Ca-3 foi capaz de inibir o crescimento das bactérias testadas com valores de CIM igual ou inferior a 300 µg/mL, demonstrando assim sua ótima atividade antibacteriana, e também a importância dos diterpenos do tipo clerodano, como uma possível fonte para a pesquisa e o desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos.

Existe um grande número de artigos científicos que evidenciam a capacidade antimicrobiana de diversas classes de diterpenos (BARNI et al., 2009; POLITI et al., 2003; MURTHY et al., 2005; LOGOGLU et al., 2006; TATSIMO et al., 2006), entre eles os do tipo clerodano, que apresentam com muita frequência atividade fungicida e bactericida (MACIEL et al., 2006). Nesse sentido, nossos resultados certamente contribuirão para ampliar o conhecimento do potencial antimicrobiano desta classe de produtos naturais.

Tabela 7: Valores de CIM (µg/mL) da kolavelona (Ca-3) sobre bactérias e leveduras.

Microrganismos	Ca-3	Controles		
	CIM (µg/mL)	Tween 80	Microrganismos	Antimicrobiano
<i>S. aureus</i> ATCC – 6538	300	+	+	-
<i>S. aureus</i> ATCC – 25923	150	+	+	+
<i>S. epidermidis</i> ATCC– 12228	300	+	+	-
<i>B. subtilis</i> ATCC – 6633	300	+	+	-
<i>P. aeruginosa</i> ATCC – 25853	300	+	+	+
<i>P. aeruginosa</i> ATCC – 9027	300	+	+	+
<i>E. coli</i> (clássica C)	300	+	+	-
<i>E. coli</i> ATCC – 18739	300	+	+	+
<i>E. coli</i> ATCC – 8733	300	+	+	+
<i>S. flexneri</i> LM – 412	300	+	+	-
<i>C. albicans</i> ATCC – 90028	>300	+	+	-
<i>C. albicans</i> ATCC – 76615	>300	+	+	-
<i>C. albicans</i> LM – 142 V	>300	+	+	-
<i>C. albicans</i> ICB – 12	>300	+	+	-
<i>C. tropicalis</i> ATCC – 13803	150	+	+	+
<i>C. tropicalis</i> LM – 028	150	+	+	-
<i>C. krusei</i> ATCC – 6258	>300	+	+	+
<i>C. krusei</i> LM – 12	>300	+	+	-
<i>C. guilliermondii</i> LM – 2101	>300	+	+	-
<i>C. guilliermondii</i> LM – 011	>300	+	+	+

+ : Presença de crescimento microbiano; - : Ausência de crescimento microbiano

Conclusões

7 CONCLUSÕES

- O estudo fitoquímico de *Casearia arborea* (Rich) Urb. (Salicaceae), realizado através de métodos cromatográficos usuais e técnicas espectroscópicas de RMN ^1H e ^{13}C uni e bidimensionais em conjunto com os dados da literatura, permitiu reisolar e identificar a kolavelona (ent-13-hidróxi-2-oxo-trans-cleroda-3,14-dieno), e ao isolamento e identificação de duas outras substâncias, o Canferol 3-O- α -L-arabinofuranosídeo, e a 4',5,7-trihidroxi-3',5'-dimetoxiflavona (Tricina), sendo esses inéditos no gênero *Casearia*.
- Este trabalho realizou um estudo biológico pioneiro, em relação à atividade antibacteriana e antifúngica da kolavelona (ent-13-hidróxi-2-oxo-trans-cleroda-3,14-dieno) de *C. arborea* (Rich) Urb. a qual apresentou uma excelente atividade antibacteriana, frente às bactérias testadas, e ativa apenas frente às leveduras da espécie *Candida tropicalis*.

Referências

REFERÊNCIAS

- ALFORD, Mac H. Claves para los géneros de Flacourtiaceae de Perú y del Nuevo Mundo. **Arnaldoa**, v. 10, n.2, p.19-38, 2003.
- ALLEGRIANI, J.; BOUCHBERG, M. S.; MAILLOLS, H. Émulsions d'huiles esentielles fabrication et applications en microbiologie. **Societé de Pharmacie de Montpellier**, v. 33, n.1, p. 86, 1973.
- ALVINO, F. O.; SILVA, M. F. F.; RAYOLVOL, B. P. Potencial de uso das espécies arbóreas de uma floresta secundária, na Zona Bragantina, Pará, Brasil. **Acta Amazônica**, 35: p. 413-420, 2005.
- ANGUS, G. W. Infrageneric classification of Salix (Salicaceae) in the New World. **Syst Bot Monogr**, v. 52, p. 1–121, 1997.
- SILVA, S.L.; CHAAR, J.S.; DAMICO, D.C.S.; FIGUEIREDO, P.M.S.; YANO, T. Antimicrobial activity of ethanol extract from leaves of *Casearia sylvestris*. **Pharma Biol**, v. 46 n. 5, p. 347–351, 2008b.
- ARAÚJO, É. J. F.; ARAÚJO, D Y M L.; FREITAS, R. M.; FERREIRA, P. M. P. Aspectos toxicológicos da planta medicinal *Casearia sylvestris* Swartz: revisão de literatura. **Rev Ciênc Farm Básica Apl.**, v. 35, n.3,p.355-361, 2014.
- AYRES, M. C. C.; BRANDAO, M. S.; VIEIRA-JUNIOR, G. M.; MENOR, J. C. A. S.; SILVA, H. B.; SOARES, M. J. S.; CHAVES, M. H. Atividade antibacteriana de plantas úteis e constituintes químicos da raiz de *Copernicia prunifera*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, p. 90-97, 2008.
- BAHRAMINEJAD, S.; ASENSTORFER, R. E.; RILEY, I. T.; SCHULTZ, C. J. Analysis of the Antimicrobial Activity of Flavonoids and Saponins Isolated from the Shoots of Oats (*Avena sativa* L.) **Journal of Phytopathology**, v.156, p. 1-7, 2008.
- BAL-TEMBE; K. E. K. S. VIJAYA; D. V. BHAGWAN; J. K. S. Isolation of 18,19-diacetoxy-18,19-epoxy-3,13(16),14-clerodatrien-2-one (esculentin A) and 18,19-diacetoxy-18,19-epoxy-3,12,14-clerodatrien-2-isovaleryloxy-6,7-diol (esculentin B) from the *Samydaceae* family, particularly *Casearia esculenta* and their medicinal use. **Aventis Pharma Deuschl and GmbH (Germany)**. EP 0916663A1, 1999.
- BARROSO, G. M.; A. L. PEIXOTO; C. L. F. ICHASO.; GUIMARÃES, E. F.; COSTA, C. G. **Sistemática das angiospermas do Brasil**, vol. 1, 2 ed. Editora UFV, Viçosa, Minas Gerais,Brasil, 2002.
- BARNI, M. V.; CARLINI, M. J.; CAFFERATA, E. G.; PURICELLI, L.; MORENO, S. Carnosic acid inhibits the proliferation and migration capacity of human colorectal cancer cells. **Oncology Reports**, v. 27, n. 14, p. 141-148, 2012.

BAUER, A. W. M. M.; KIRBY, J. C.; TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 45, n. 3, p. 493-496, 1966.

BECKER, H.; BLÄS, B.; ZAPP, J. ent-Clerodane diterpenes and other constituents from the liverwort *Adelanthus lindenbergianus* (Lehm.) Mitt. **Phytochemistry**, v. 65, p. 127-137, 2004

BEUTLER J. A.; CALL, M.C.; HERBERT, K. L. ; HERALD, D. L.; PETTIT, G. R.; JOHNSON, T.; SHOEMAKER, R. H.; BOYD, M. R. Novel cytotoxic diterpenes from *Casearia arborea*. **Journal of Natural Products**, v. 63, n. 5, p. 657–661, 2000.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Práticas integrativas e complementares: plantas medicinais e fitoterapia na Atenção Básica. Brasília; 2012.

BREWERY, K.; ITOKAWA, H. Isolation of diterpenes as antitumor agentes from Plants. **Japan**, JP 01.149.779, 1989.

BYLKA, W.; MATLAWSKA, I.; PILEWSKI, N. A. Natural flavonoids as antimicrobial agents. **Journal of American Medical Association**, v.7, p. 24-31, 2004.

CANILLAC, N.; MOUREY, A. Antibacterial activity of the essential oil of *Picea excelsa* on *Listeria*, *Staphylococcus aureus* and coliform bacteria. **Food Microbiol**, v.18, p.261-268, 2001.

CHAI, X. Y.; XU, Z. R.; BAI, C. C.; ZHOU, F. R.; TU, P. F. A new seco-friedelolactone acid from the bark and twigs of *Itoa orientalis*. **Fitoterapia**, v. 80, n. 7, p. 408-410, 2009.

CHANDRAMOHAN, G.; AL-NUMAIR, K. S.; SRIDEVI, M.; PUGALENDI, K. V. Antihyperlipidemic activity of 3-hydroxymethyl xylitol, a novel antidiabetic compound isolated from *Casearia esculenta* (Roxb.) root, in streptozotocin-diabetic rats. **Journal Biochem Mol Toxicol**, v. 24, n. 2, p. 95–101, 2010.

CHANG, K. C.; DUH, C. Y.; CHEN, I. S.; TSAI, I. L. A cytotoxic butenolide, two new dolabellane diterpenoids, a chroman and a benzoquinol derivate Formosan *Casearia membranacea*. **Planta Médica**. v. 69 n. 7, p. 667-672, 2003.

CHOU, C. J.; LIN, L.C., TSAI, W.J.; HSU, S.Y.; HO, L.K. Phenyl- β -D-glucopyranoside derivatives from the fruits of *Idesia polycarpa*. **Journal of Natural Products**, v. 60, 375-377, 1997.

CIMANGA, K.; KAMBU, K.; TONA, L.; APERS, S.; DE BRUYNE, T.; HERMANS, N.; TOTTE, J.; PIETERS, L.; Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils of some aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo. **Journal Ethnopharmacol**, v. 79, p. 213-220, 2002.

CLEELAND, R.; SQUIRES, E. Evaluation of new antimicrobials “in vitro” and experimental animal infection. In: Lorian, V. Antibiotics in laboratory medicine. **Baltimore: Willians & Wikins**, p. 739-788, 1991.

COWAN, M. M. Plant Products as antimicrobial Agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v.12, p. 564-582, 1999.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. SNADER, K. M. Natural products in drugdiscovery and development. **Journal of Natural Products**, v.60, p. 52-60, 2004.

CWALA, Z.; IGBINOSA, E.; OKOH, A. I. Assessment of antibiotics production potentials in four actinomycetes isolated from aquatic environments of the Eastern Cape Province of South Africa. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 5, n. 2, p. 118-124, 2011.

DA SILVA, S.L.; CALGAROTTO, A. K.; CHAAR, J. S.; MARANGONI, S. Isolation and characterization of ellagic acid derivatives isolated from *Casearia sylvestris* SW aqueous extract with anti-PL2 activity. **Toxicon**, v. 52, p. 655-666, 2008.

DAGVADORJ, E.; SHAKER, K. H.; WINDSOR, D.; SCHNEIDER, B.; BOLAND, W. Phenolic glucosides from *Hasseltia floribunda* **Phytochemistry**, v. 71, p. 1900–1907, 2010.

DEMAIN A. L.; SANCHEZ, S. Microbial drug discovery: 80 years of progress. **The Journal of Antibiotics**, v.62, p.5-16, 2009.

DESWAL, D. P.; CHAND, U. Standardization of the tetrazolium test for viability estimation in ricebean (*Vigna umbellata* (Thumb) Ohwi & Ohashi) seeds. **Seed Science and Technology**, v.25, p.409-417, 1997.

DUARTE, M. C. T.; FIGUEIRA, G. M.; SARTORATTO, A.; REHDER, V. L. G.; DELARMELENA, C. Anti-*Candida* activity of Brazilian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 97, p. 305-311, 2005.

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

FERNANDES, C. C.; CURSINO, L. M. C.; NOVAES, J. P.; DEMETRIO, C. A.; PEREIRA-JUNIOR, O. L.; NUNEZ, C. V. Salicilatos isolados de folhas e talos de *Salix martiana* LEYB. (Salicaceae). **Química Nova**, v. 32, n. 4, p. 983-986, 2009.

FERREIRA P.M.P.; Santos, A.G.; Tininis, A.G.; Costa, P.M.; Cavalheiro, A.J.; Bolzani, V.S.; Moraes M.O.; Costa-Lotufo, L.V.; Montenegro, R.C.; Pessoa, C. Casearin X exhibits cytotoxic effects in leukemia cells triggered by apoptosis. **Chemico-Biological Interactions**, v. 188, p. 497-504, 2010.

FERREIRA, P.M.P.; COSTA-LOTUFO, L. V.; MORAES, M. O.; BARROS, F. W.A.; ALINE M.A. MARTINS, A. M. A.; CAVALHEIRO, A.J.; BOLZANI, V.S.; SANTOS, A.G.; PESSOA, C. Folk uses and pharmacological properties of *Casaria sylvestris*: a

medical review. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.83, p.1373-1384, 2011.

GOMES, R.A., RAMIREZ, R.R.A., MACIEL, J.K.S., AGRA, M.F., SOUZA, M.F.V., FALCÃO-SILVA, V.S., SIQUEIRA-JUNIOR, J.P. Phenolic compounds from *Sidastrum micranthum* (A St.-Hil.) Fryxell and evaluation of acacetin and 7,4'-di-O-methylisoscuteallarein as modulator of bacterial drug resistance. **Química Nova**, v.34, p.1385–1388, 2011.

GONÇALVES, N. M. T.; VILA, M. M. D. C.; GERENUTTI, N.; CHAVES, D. S. A. Políticas de saúde para a fitoterapia no Brasil. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v. 18, n. 4, p. 632-637, 2013.

GONÇALVES, T. O; VIEIRA, J. R. G. M; SILVA, D. H. S; CAVALHEIRO, A. J. Hidroquinona: Princípio antioxidante e tóxico de *Casearia decandra* (Salicaceae). **Reunião Anual da SBQ**, cd-rom 1, Fortaleza, Brasil, 2009.

GOVINDASAMY, C.; AL-NUMAIR, K. S.; ALSAIF, M. A.; VISWANATHAN, K. P. Influence of 3-hydroxymethyl xylitol, a novel antidiabetic compound isolated from *Casearia esculenta* (Roxb.) root, on glycoprotein components in streptozotocin-diabetic rats. **J Asian Nat Prod Res**, v. 13, n. 8, p. 700-706, 2011.

GRABE, D. F. Manual de Teste de Tetrazólio. **Brasília: Agiplan**, 1976.

GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. S.; PUPO, M. T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 667-679, 2010.

GUIMARÃES, L.A.L.; MOURA, M.G. M. Educação e saúde: um estudo das plantas medicinais. **Revista Metáfora Educacional (ISSN 1809-2705) – versão on-line**. Editora Dra. Valdeci dos Santos. Feira de Santana – Bahia (Brasil), v.18, p. 25-43, 2015.

HADACEK, F.; GREGER H. Testing of antifungal natural products: methodologies, comparability of results and assay choice. **Phytochemical Analyses**, v. 11, p. 137-147, 2000.

HARBORNE, J. B.; MABRY, T. J. **The Flavonoids: Advances in Research**, University Press, Cambridge, 1982.

HOLETZ, F.B.; HOMES, M. J.; LEE, C. C.; STEVENTON, G. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 7, p. 1027-1031, 2002.

HOUGHTON, P. J.; HOWES, M. J.; LEE, C. C.; STEVENTON, G. Uses and abuses of in vitro tests in ethnopharmacology: visualizing, an elephant. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 110, n. 3, p.391-400, 2007.

JEFFERIES, P. R.; LAM, W. W.; TOIA, R. F.; CASIDA, J. E. Ryania Insecticide: Structural Assignments of Four Natural 8-Hydroxy-10-epiryranoids. **Journal of Agriculture Food Chemistry**, v. 40, p. 509-512, 1992.

JIAO, J.; ZHANG, Y.; LIU, C.; LIU, J.; WU, X.; ZHANG, Y.; .Separation and Purification of Tricin from and Antioxidant Product Derived from Bamboo Leaves. **Journal of Agriculture Food Chemistry**, v. 55, p. 10086–10092, 2007.

JUDD, W. S.; CAMPBRELL, C. S.; KELLOGG, E. A.; STEVENS, P.F.; DONOGHU, M.J. Sistemática vegetal, um enfoque filogenético. 3.Ed. Porto Alegre: **Artmed**, p. 612, 2009.

JUDD, W.S.; MANCHESTER, S.R.Circumscription of Malvaceae (Malvales) as determined by a preliminary cladistics analysis of morphological, anatomical, palynological and chemical characters. **Brittonia**, v. 49, p. 384-405,1997.

KAOU, A. M.; MAHIOU-LEDDER, V.; CANLET, C.; DEBRAUWER, L.; HUTTER, S.; LAGET, M.; FAURE, R.; AZAS, N.; OLLIVIER, E. Antimalarial compounds from the aerial parts of *Flacourtia indica* (Flacourtiaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 130, p. 272-274, 2010.

KANOKMEDHAKUL, S.; KANOKMEDHAKUL, K.; BUAYAIRAKSA, M. Cytotoxic clerodane diterpenoids from fruits of *Casearia grewiifolia*. **Journal of Natural Products**,2007.

KONEMAN E. W.; ALLEN, S. D.; DOWEL-JUNIOR, V. R.; SAMERS, H. M. Diagnóstico Microbiológico. Texto Atlas. **Editora Médica Panamericana**. 2. ed. p. 452-485, 1993.

KUWABARA, H.; MOURI, K.; OTSUKA, H.; KASAI, R.; YAMASAKI, K., Tricin from a malagasy connaraceous plant with potent antihistaminic activity. **Journal of Natural Products**, v. 66, n. 9, 1273, 2003.

KUZUHARA, T.; SUGANUMA, M.; FUJIKI, H. Green tea catechin as a chemical chaperone in câncer prevention. **Cancer Letters**. v. 261, n. 1, p. 12-20, 2008.

KWON, D. J.; BAE, Y. S. Phenolic glucosides from bark of *Populus alba x glandulosa* (Salicaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 37, p. 130–132, 2009.

LIMA, E. O. Plantas e suas propriedades antimicrobianas: uma breve análise histórica. In: Yunes, R. A. & Calixto, J. B. (Eds.) **Plantas Mediciniais sob a ótica da Química Medicinal Moderna**. Chapecó: Editora Argós. 523 p. 2001.

LIMA, L. R.; DIAS, P. SAMPAIO, P. S. P. Flora as Serra do Cipó, Minas Gerais: MAHADY, G.B. Medicinal Plants for the Prevention and Treatment of Bacterial Infections. **Current Pharmaceutical Design**, v.11, p. 2405-2427,2005.

LOGOGLU, E.; ARSLAN, S.; ÖKTEMER, A.; SAKIYAN, I. Biological activities of some natural compounds from *Sideritis sipylea* Boiss. **Phytother Res**, v. 20, p.294-7, 2006.

LOPES, M.X.; BOMM, M.D.; SCHPECTOR, J.Z. Rearranged (4h 2)-abeo-clerodane and clerodane diterpenes from *Aristolochia chamissonis*. **Phytochemistry**, v. 50, p. 455-461, 1999.

MACIEL, M.A.M.; DANTAS, T.N.C.; CÂMARA, J.K.P.; PINTO, A.C.; VEIGA JR.; V.F.; KAISER, C.R.; PEREIRA, N.A.; CARNEIRO, C.M.T.S.; VANDERLINDE, F.A.; LAPA A.J.; AGNER, A.R.; CÓLLUS, I.M.S.; ECHEVARRIA-LIMA, J.; GRYNBERG, N.F.; ESTEVES-SOUZA, A.; PISSINATE, K.; ECHEVARRIA, A. Pharmacological and biochemical profiling of lead compounds from traditional remedies: the case of *Croton cajucara*. **Molecules**, v.2, n 14, p.229-257, 2006.

MAHOMOODALLY, M. F., SEEBALUCK, R.; Current Practices towards the Use of Phytotherapy as Alternative Medicine in the Tropical Island of Mauritius. **Journal of Medical Research and Development**, v. 2, n. 2, p. 35-41, 2013.

MARQUES L. G. A.; SIMÕES, E. R. B.; FERREIRA, P. M. P.; SANTOS, M. R. M. C.; PESSOA, C. Desenvolvimento do potencial tecnológico de *Casearia sylvestris*. **Revista GEINTEC**. São Cristóvão.v. 3. n. 4. p. 70-85, 2013.

MARQUETE, R. Reserva Ecológica do IBGE - OPILIAEAE. **Rodriguésia**, v. 56, n. 87, p. 133-139, 2005.

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

MARQUETE, R.; TORRES, R. B.; MEDEIROS, E. S. Salicaceae. In: Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: [<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB14384>] Acesso em: 21 Jul. 2014.

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

MASOKO, P.; ELOFF, J. N. The diversity of antifungal compounds of six South African *Terminalia* species (Combretaceae) determined by bioautography. **African Journal of Biotechnology**, v.4, n.12, p.1425-1431, 2005.

MATOS, F. J. A. Introdução à Fitoquímica Experimental. Capítulo 7, p. 124 e 126-127, 2ª edição. p. 107-108. Editora UFC, Fortaleza, 1997.

MAZZARI A. L.; PRIETO, J. M. Herbal medicines in Brazil: pharmacokinetic profile and potential herb-drug interactions *Frontiers. Pharmacology*, v. 5, n. 162, p. 1-12, 2014.

MENEZES, F.G. **Avaliação farmacológica e toxicológica de diferentes espécies do Gênero Casearia**. 2004. Tese (Doutorado), Programa de Pós-graduação em farmácia, Universidade de São Paulo.

MIMICA MATANOVIC, S.; BERGMAN, U.; VUKOVIC, D.; WETTERMARK, B.; VLAHOVIC-PALCEVSKI, V. Impact of restricted amoxicillin/clavulanic acid use on *Escherichia coli* resistance-antibiotic DU 90% profiles with bacterial resistance rates:

a visual presentation. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 36, p. 369-373, 2010.

MORITZ, M. I. G. **Investigação química das espécies *Banara parviflora* (A.Gray) Benth., *Calea phyllolepis* Baker e *Verbesina subcordata* DC.** 2010. Tese (Doutorado). Programa de Pós-graduação em farmácia, Universidade Federal de Santa Catarina. Santa Catarina.

MOSADDIK, M. A.; BANBURY, L.; FORSTER, P.; BOOTH, R.; MARKHAM, J.; LEACH, D.; WATERMAN, P. G. Screening of some Australian Flacourtiaceae species for in vitro antioxidant, cytotoxic and antimicrobial activity. **Phytomedicine**, v. 11, n. 5, p. 461-466, 2004.

MOSADDIK, M. A.; FOSTER, P.; BOOTH, R.; WATERMAN, P. G. Phenolic glycosides from some Australian species of Flacourtiaceae. **Biochemical Systematics and Ecology**, v.35, p. 166-168, 2006.

MOSADDIK, M. A.; FOSTER, P. I.; BOOTH, R.; WATERMAN, P. G. Clerodanedieterpenes from the stems of *Caearia grewiifolia* var. *gelonioides* (Flacourtiaceae/Salicaceae sensu lato). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 35, p. 631-633, 2007b.

MOSADDIK, M. A.; FOSTER, P. I.; BOOTH, R.; WATERMAN, P. G. Phenolic glycosides from some Australian species of Flacourtiaceae (Salicaceae sensu lato). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 35, p. 166-168, 2007a.

MURTHY, M.M.; SUBRAMANYAM, M.; BINDU, M.H.; ANNAPURNA, J. Antimicrobial activity of clerodane diterpenoids from *Polyalthia longifolia* seeds. *Fitoterapia* 76, 336-9. (sensu lato). **Biochem Syst Ecol**, 2005 v.35, p.631-633.

NAGASHIMA, F.; SUZUKI, M.; TAKAOKA, S.; AASAKAWA, Y. Sesqui- and diterpenoids from the Japanese Liverwort *Jungermannia infusca*. **Journal of Natural Products**, v. 64, p. 1309-1317, 2001.

NASCIMENTO, P. F. C.; NASCIMENTO, A.C.; RODRIGUES, C.S.; ANTONIOLLI, A. R.; PATRÍCIA O. SANTOS, P. O.; BARBOSA-JÚNIOR, A. M.; TRINDADE, R. C. Antimicrobial activity of the essential oils: a multifactor approach of the methods. **Rev Bras Farmacogn**, v. 17, p. 108-113, 2007.

NOBRE, M. O.; NASCENTE, P. S.; MEIRELES, M. C.; FERREIRO, L. Drogas antifúngicas para pequenos e grandes animais. **Ciência Rural, Santa Maria**, v.32, n.1, p.175-184, 2002.

NOSTRO A.; BLANCO, A.R.; CANNATELLI, M.A.; ENEA, V.; FLAMINI, G.; MORELLI, I.; ROCCARO, S. A.; ALONZO, V. Susceptibility of methicillin-resistant *staphylococci* to oregano essential oil, carvacrol and thymol. **FEMS Microbiol Lett**, v. 230, p. 191-195, 2004.

O'DONNELL, G.; GIBBONS, S. Antibacterial Activity of Two Canthin-6-one Alkaloids from *Allium neapolitanum*. **Phytotherapy Research**, v. 21, p.653-657, 2007.

ORIAN, C. M.; GRIFFITHS, M. E.; ROCHE, B. M.; FRITZ, R. S. Phenolic glycosides and condensed tannins in *Salix sericea*, *S. eriocephala* and their F1 hybrids: not all hybrids are created equal. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 28, p. 619 – 632, 2000.

PACKER, J. F. LUZ, M. M. S. Metodo para avaliacao e pesquisa da atividade antimicrobiana de produtos de origem natural. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.17 p. 102-107, 2007.

PENG, C.W. CONSTITUENTS FROM CHARRED *Cirsium japonicum*. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 47, n. 2, 2011.

PHILIPPSEN, A. F.; MIGUEL, O. M.; MIGUEL, M. D.; LIMA, C. P.; KALEGARI, M.; D.R.A. LORDELLO, A. L. L. Avaliação da atividade antibacteriana das cascas das raízes de *Xylosma ciliatifolia* (Clos) Eichler (Flacourtiaceae/Salicaceae sensu lato). **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v. 18, n. 2, p. 258-267, 2013.

PLANTAS BRASILEIRAS, 2002. Banco de dados – plantas medicinais do Brasil, disponível em: [<http://www.brazilianplants.com/br/database.cfm>] Acesso em: 18/12/2015.

POHJAMO, S. P.; HEMMING, J. E.; WILLFÖR, S. M.; REUNANEN, M. H. T.; HOLMBOM, B. R. Phenolic extractives in *Salix caprea* wood and knots. **Phytochemistry**, p. 165-169, 2003.

POLITI, M.; BRACA, A.; DE TOMMASI, N.; MORELLI, I.; MANUNTA, A.; BATTINELLI, L.; MAZZANTI, G. Antimicrobial diterpenes from the seeds of *Cephalotaxus harringtonia* var. *drupacea*. **Planta Med**, 2003. v.69,p. 468-70.

RAMIREZ, R. R. A. **Abordagem Fitoquímica de uma Espécie da Família Flacourtiaceae - Casearia arborea (Rich.) Urb.** 2008. Dissertação (Mestrado) Programa de pós-graduação em produtos naturais e sintéticos bioativos. Universidade Federal da Paraíba.

RATES, S. M. K. Plants as source of drugs. **Toxicon**, v.39, p.603-613, 2001.

REHILL, B.; CLAUSS, A.; WIECZOREK, L.; WHITHAM, T.; LINDROTH, R. Foliar phenolic glycosides from *Populus fremontii*, *Populus angustifolia*, and their hybrids. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 33, p. 125-131, 2005.

RIBEIRO, E. M.; LUCIANO S. LIMA, L. S.; DAVID, J. M.; VALE, A. E.; LOPES, L. M.X.; DAVID, J.P. A new tropane alkaloid and other constituents of *Erythroxyllum rimosum* (Erythroxyllaceae). **Phytochemistry Letters**, v. 6, n. 2, p. 232-235, 2013.

ROEL, A. R.; VENDRAMIN, J. D.; FRIGHETTO, T. S.; FRIGHETTO, N. Atividade Tóxica de Extratos Orgânicos de *Trichilia pallida* Swartz (Meliaceae) Sobre *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith). **Sociedade de Entomologia Brasileira**, v. 29, n. 4, 2000.

SANDERS, D. W.; WEATHERWAX, P.; MCCLUNG, L. S. Antibacterial Substances from Plants Collected in Indiana. **J Bacteriol.**, v. 49, n. 6, p. 611-5, 1945.

SARTORATTO, A.; MACHADO, A. L. M.; DELARMELINA, C.; FIGUEIRA, G. M.; DUARTE, M. C. T.; REHDER, V. L. G. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, n. 4, p. 275-280, 2004.

SCALBERT, A. Antimicrobial properties of tannins. **Phytochemistry**, v. 30, p.3875-3883, 1991.

SCHNEIDER, N. F. Z; MOURA N. F; MARINS, K. Atividade antimicrobiana das folhas de *Casearia sylvestris* Swart. **Simpósio Brasileiro De Farmacognosia**, cd-rom 7. Maringá, Brasil, 2009.

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

SHAARI, K.; WATERMAN, P. G. Podophyllotoxin-Type Lignans as Major Constituents of the Stems and Leaves of *Casearia clarkei*. **Journal of Natural Products**, v. 57, n. 6, p. 720-724, 1994.

SHAARI, K.; WATERMAN, P. G. Podophyllotoxin-Type Lignans as Major Constituents of the Stems and Leaves of *Casearia clarkei*. **Journal of Natural Products**, v. 57, n. 6, p. 720-724, 1994.

SHAFI, P. M.; ROSAMMA, M.K, KAISER ,J. K.; REDDY, P.S. Antibacterial activity of *Syzygium cumini* and *Syzygium travancoricum* leaf essential oil. **Fitoterapia**, n.73, p.414-416, 2002.

SHEN, Y. C.; WANG, C. H.; CHENG, Y. B.; WANG, L. T.; GUH, J. H.; CHIEN, C. T.; KHALIL, A. T. New cytotoxic clerodane diterpenoids from the leaves and twigs of *Casearia membranacea*. **Journal of Natural Products**. v. 67, p. 316-321, 2004a.

SI, S. L.; WU, L. Phenolic glycosides from *Populus davidianabark* **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 37, p. 221–224, 2009.

SILVA FIALHO, S.; NOGUEIRA, G.M.; DUARTE, C.A.; PAIVA NETO, A.O.; MACORIS, D. G *Casearia sylvestris* na permeabilidade gástrica à sacarose em equinos submetidos a protocolo de indução de úlcera gástrica. **Ciência Rural**, v. 40, p. 348-355, 2010.

SILVA, S. L.; CHAAR, J. S.; DAMICO, D. C. S.; FIGUEIREDO, P. M. S.; YANO, T. Chemotherapeutic potential of two gallic acid derivative compounds from leaves of *Casearia sylvestris* Sw (Flacourtiaceae). **Eur J. Pharmacol**, v. 608, n. 1–3, p.76–83, 2009.

SILVA, S. L.; CHAAR, J. S.; YANO, T. Chemotherapeutic potential of two gallic acid derivative compounds from leaves of *Casearia sylvestris* Sw (Flacourtiaceae). **Eur J. Pharmacol**, v. 608, n. 1–3, p.76–83, 2009.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X. **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos**. 6. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2000.

SLEUMER, H. Flacourtiaceae. In: ROGERON, C. T. (ed). *Fl. Neotrop. Monogr.* 22. **The New York Botanical Garden**, p 1-499, 1980.

SOBRAL, M.; JARENKOW, J. A.; BRACK, P.; IRGANG, B.; LAROCCHA, J.; RODRIGUES, R.S. **Flora Arbórea e Arborescente do Rio Grande do Sul, Brasil**. São Carlos: RiMa: Novo Ambiente, 2006.

SOUZA, T. M.; SEVERI, J. A.; SILVA, V. Y. A.; SANTOS, E.; PIETRO, R. C. L. R. Bioprospeção de atividade antioxidante e antimicrobiana da casca de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (Leguminosae-Mimosoidae). **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 28, p.221-226, 2007.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica Sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado no APG III**. 3ed. Nova Odessa, São Paulo: Instituto Plantarum, p.768, 2012.

SPENCER, K. C. & SEIGLER, D. S. Cyanogenic glycosides and the systematics of the Flacourtiaceae. **Biochemical Systematics and Ecology**. v. 13, n. 4, p.421-431, 1985.

STANSTRUP, J.; RUSCH, A. M.; AGNOLET, S.; RASMUSSEN, H. B.; MOLGAARD, P.; STADEN, J. V.; STAFFORD, G. I.; STAERK, D. Ictoside A and 4-hydroxytremulacin from *Dovyalis caffra* and *Dovyalis zeyheri*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 38, p. 346–348, 2010.

TAKAISIKIKUNI, N. B.; TSHILANDA, D.; BABADY, B. Antibacterial activity of the essential oil of *Cymbopogon densiflorus*. **Fitoterapia**, v.71, p. 69-71, 2000.

TATSIMO, S.J.N.; TANE, P.; MELISSA, J.; SONDEGAM, B.L.; OKUNJI, C.O.; SCHUSTER, B.M.; IWU, M.M.; KHAN, I.A. Antimicrobial principle from *Aframomum longifolius*. **Planta Med**, 2006, v. 72, p. 132-5.

TAVARES, W. L. F.; APOLÔNIO, A. C. M.; GOMES, R. T.; TEIXEIRA, K. I. R.; BRANDÃO, M. G. L.; SANTOS, V. R. Assessment of the antimicrobial activity of *Casearia sylvestris* extract against oral pathogenic microorganisms. **Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.**, v.29, n. 3,p. 257-260, 2008.

THADEO, M.; MEIRA, R. M. S. A.; AZEVEDO, A. A.; ARAÚJO, J. M. Anatomia e histoquímica das estruturas secretoras da folha de *Casearia decandra* Jacq. (Salicaceae). **Revista Brasileira de Botânica**, v. 32, n. 2, 2009.

TOMAZZONI, M. I.; NEGRELLE, R. R. B.; CENTA, M. de L. Fitoterapia popular: a busca instrumental enquanto prática terapêutica. **Revista Texto & Contexto Enfermagem**, v. 15, n. 1, p. 115-21, 2006.

TORRES, R. B.; RAMOS, E. Flacourtiaceae. In M.G.L. Wanderley, G.J. Shepherd, T.S. Melhem & A.M. Giuliatti, Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo. **São Paulo: Fapesp & Instituto de Botânica**, v.5, p. 201-225, 2007.

UNICAMP. Creme à base de erva combate herpes labial. **Jornal da UNICAMP**, p. 8-14, 2005.

WANG, W.; ALI, Z.; LI, X.-C.; SMILLIE, T.A.; GUO, D.-A.; KHAN, I.A..New clerodane diterpenoids from *Casearia sylvestris*. **Fitoterapia**, v. 80, n. 07, p. 404 – 407, 2009.

WATSON, L. & DALLWITZ, M. J. The Families of Flowering Plants. Disponível em: [<http://delta-intkey.com/angio/images/flaco330.gif>] Acesso em: 12/11/2015.

Xia, L.; Guo, Q.; Tu, P.; Chai, X. The genus *Casearia*: a phytochemical and pharmacological overview. **Phytochem Ver**, v.14, p. 99-135, 2015.