



# Identificação de diterpenos clerodânicos em diferentes órgãos de *Casearia sylvestris* Swartz

Carvalho, E.S.<sup>1</sup>; Santos, A.G.<sup>2</sup>; Cavalheiro, A.J.<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais, Departamento de Química Orgânica, Instituto de Química, Univ. Estadual Paulista, UNESP, Araraquara, SP, Brasil

<sup>2</sup>Laboratório de Farmacognosia, Departamento de Princípios Ativos Naturais e Toxicologia, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Univ. Estadual Paulista, UNESP, Araraquara, SP, Brasil

Recebido 16/04/2009 / Aceito 21/01/2010

## RESUMO

*Casearia sylvestris* Swartz (*Salicaceae*) é uma espécie vegetal arbórea ou arbustiva, disseminada pelo território brasileiro e bastante utilizada em nossa medicina popular. Diversos diterpenos clerodânicos bioativos típicos do gênero *Casearia* foram isolados desta espécie (ex. casearinas e casearvestrinas). O objetivo principal deste trabalho foi avaliar a presença de diterpenos clerodânicos em diferentes órgãos de *C. sylvestris*, utilizando técnicas analíticas cromatográficas e espectroscópicas. Os extratos dos diferentes órgãos foram analisados por cromatografia em camada delgada, cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos e ressonância magnética nuclear de <sup>1</sup>H. Nas análises cromatográficas foram utilizados diterpenos clerodânicos isolados de *C. sylvestris* como padrões, incluindo *rel-19S-acetóxi-18R-butanoilóxi-18,19-epóxi-6S-hidróxi-2R-(2-metilbutanoilóxi)-5S, 8R, 9R, 10S-cleroda-3,13(16),14-trieno*, isolado do caule pela primeira vez. Foram obtidos perfis fitoquímicos dos órgãos avaliados. Os resultados indicaram a presença de diterpenos clerodânicos em toda planta, prevalecendo em maior número nas folhas. Além disso, os resultados também indicam que em caules, flores e raízes há predomínio de diterpenos clerodânicos com padrão diênico diferente daqueles obtidos de folhas de *C. sylvestris*.

**Palavras-chave:** *Casearia sylvestris*. Diterpenos clerodânicos. *Salicaceae*. *Flacourtiaceae*. Cromatografia.

## INTRODUÇÃO

*Casearia sylvestris* Swartz (guaçatonga, erva-de-bugre) é uma espécie vegetal arbórea ou arbustiva com ocorrência em pelo menos 22 estados brasileiros (Torres & Yamamoto, 1986; Marquete, 2001; Chase, 2002). Trata-se de espécie da medicina tradicional brasileira, tendo como principais indicações o tratamento de úlceras, gastrites, picadas de cobras, cicatrizante tópico e antitérmico

(Hoehne, 1939; Correa, 1975; Junges et al., 1985). Extratos de suas folhas apresentaram atividade anti-inflamatória, antiulcerogênica, cicatrizante, citotóxica em linhagens de células tumorais e antiofídica (Basile et al., 1990; Itokawa et al., 1990; Borges et al., 2000; Sertiè et al., 2000; Silva et al., 2004; Gomes et al., 2005; Oshima-Franco et al., 2005). Extratos de outros órgãos também apresentaram atividades farmacológicas (ex. tripanossomicida) (Espíndola et al., 2004; Mesquita et al., 2005). Ensaio realizado com extratos de folhas indicaram sua baixa toxicidade (Basile et al., 1990; Maistro et al., 2004).

Foram isolados de *C. sylvestris* mais de 30 diterpenos clerodânicos, 28 dos quais típicos de *Casearia*, incluindo as casearinas A-X (Itokawa et al., 1990; Morita et al., 1991; Carvalho et al., 1998; Santos et al., 2007; Wang et al., 2009; Santos et al., 2010) e a caseargrewiina F (Santos et al., 2010), isoladas de folhas; as casearvestrinas A-C, isoladas de folhas e ramos (Oberlies et al., 2002) (Figura 1a); e o diterpeno *rel-19S-acetóxi-18R-butanoilóxi-18,19-epóxi-6S-hidróxi-2R-(2-metilbutanoilóxi)-5S, 8R, 9R, 10S-cleroda-3,13(16),14-trieno* (1b), isolado das cascas das raízes (Espíndola et al., 2004). A estrutura destes diterpenos *cis*-clerodânicos (Figura 1a) é formada por um sistema decalínico (anéis A e B) com metilas em C8 (C17) e C9 (C20), uma ligação dupla em C3, uma cadeia lateral em C9 (C11-C16) com um dieno conjugado terminal, um terceiro anel (C) di-hidrofurânico/diacetálico formado a partir de C18 e C19, além de substituintes oxigenados (funções éster, éter, álcool ou cetona) presentes nos carbonos 2, 6, 7, 18 e 19 (substituintes R<sup>1</sup> a R<sup>5</sup> na Figura 1a). Com exceção do diterpeno 1b, com o dieno terminal em C13(16)/C14, os demais diterpenos clerodânicos isolados de *C. sylvestris* apresentam esse grupo diênico em C12Z/C14. Alguns destes diterpenos apresentaram atividades citotóxica em linhagens de células tumorais, anti-ulcerogênica e tripanossomicida, dentre outras (Itokawa et al., 1990; Morita et al., 1991; Carvalho et al., 1998; Oberlies et al., 2002; Espíndola et al., 2004; Santos, 2008). Diterpenos clerodânicos de estrutura menos complexa como 15-hidróxi-3-cleroden-2-ona (1c) e (-)-ácido hardwickiico (1d) também foram isolados de suas folhas (Santos et al., 2007).

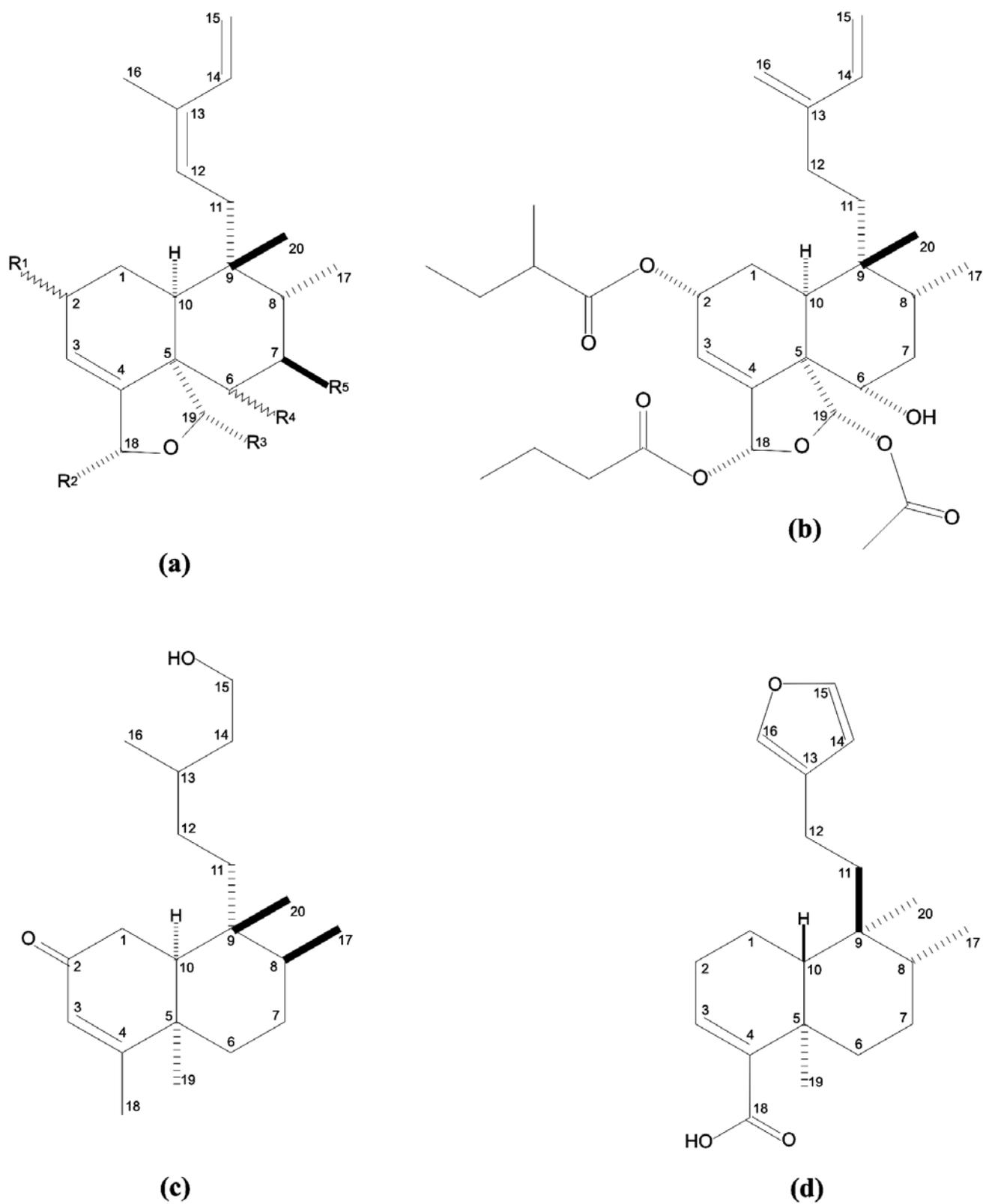


Figura 1: Diterpenos clerodânicos isolados de *C. sylvestris*: (a) estrutura química geral das casearinas A-X, casearvestrinas A-C e da caseargreiviina F; (b) *rel*-19*S*-acetóxi-18*R*-butanoilóxi-18,19-epóxi-6*S*-hidróxi-2*R*-(2-metilbutanoilóxi)-5*S*,8*R*,9*R*,10*S*-cleroda-3,13(16),14-trieno; (c) 15-hidróxi-3-cleroden-2-ona; (d) (-)-ácido hardwickiico.

Dados da literatura mostram que espécies de *Casearia* produzem diterpenos clerodânicos típicos distribuídos em vários órgãos, que diferem basicamente quanto à posição do dieno na cadeia lateral e quanto aos grupos substituintes oxigenados (Gibbons et al., 1996; Beutler et al., 2000; Prakash et al., 2002; Shen et al., 2005). No caso de *C. sylvestris* os estudos fitoquímicos têm se concentrado nas folhas, havendo pouca informação sobre outros órgãos. Desta forma, o objetivo principal deste trabalho foi avaliar a ocorrência de diterpenos clerodânicos em partes diferentes de *C. sylvestris*, utilizando técnicas analíticas cromatográficas e espectroscópicas.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Material vegetal

Folhas, flores, caules e raízes de *C. sylvestris* foram coletados em Araraquara-SP, próximo ao distrito de Bueno de Andrada em 24/07/2006. Exsicatas dos indivíduos amostrados CSL01 (21°39'59,1" Sul; 48°12'22,5" Oeste) e CSL02 (21°40'4,2" Sul, 48°12'21,4" Oeste) foram depositadas no herbário do Instituto Agrônomo de Campinas. O material vegetal foi seco em estufa a cerca de 40° C por 7 dias e fragmentado em moinho de facas.

Tabela 1: Resultados das análises cromatográficas e espectroscópicas realizadas com extratos etanólicos e hexânicos de diferentes órgãos de *C. sylvestris*.

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

<sup>1</sup>número de manchas dos extratos com R<sub>f</sub> semelhante ao das casearinas (EFS2 e casearina X)

<sup>2</sup>presença de sinais no espectro de RMN de <sup>1</sup>H dos extratos semelhantes aos das casearinas

<sup>3</sup>número de picos nos cromatogramas dos extratos com espectro no UV semelhante ao das casearinas ( $\lambda_{\max}$  - 232-235 nm)

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

### Solventes

Nas extrações e procedimentos cromatográficos de bancada foram utilizados solventes grau P.A. (Synth<sup>®</sup>). Nas análises e separações em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) utilizou-se metanol grau cromatográfico (J. T. Baker<sup>®</sup>) e água ultrapura (18 M $\Omega$  cm) preparada em purificador Milli Q (Millipore<sup>®</sup>). CDCl<sub>3</sub> (Cambridge Isotope Lab<sup>®</sup>) foi usado nas análises por ressonância magnética nuclear (RMN).

### Perfil de diterpenos clerodânicos em diferentes órgãos de *C. sylvestris*

A identificação de diterpenos foi realizada através de cromatografia em camada delgada de fase normal (CCD), ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN de <sup>1</sup>H) e cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa com detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD).

Preparação das amostras: 100 g de cada droga vegetal - folhas, flores, madeira do caule, cascas do caule e raízes - foram extraídos sucessivamente com etanol (EtOH) e hexano (Hex) em banho ultrassônico (Elma<sup>®</sup>, modelo Transsonic<sup>®</sup>, 35 KHz), com 1.100 mL de cada solvente, divididos em 3 etapas (cerca de 360 mL cada) de 20 min de extração. Em seguida, os extratos foram concentrados em rotaevaporador (Büchi<sup>®</sup>) e secos em dessecador com sílica gel, sob pressão reduzida. O rendimento obtido para cada extrato está indicado na Tabela 1.

Análises por CCD. Os extratos secos foram dissolvidos em acetato de etila (AcOEt) (10,0 mg/mL) e aplicados em placas de vidro cobertas com sílica gel G60 Merck<sup>®</sup> (20 x 20 cm x 0,25 mm). Como fase móvel foi utilizada a mistura de solventes Hex/AcOEt/isopropanol (65:32:03, v/v/v) e como revelador anisaldeído sulfúrico. Os padrões utilizados foram a casearina X (AcOEt, 5,0 mg/mL) e uma mistura de casearinas obtidas de folhas de *C. sylvestris* por Santos (2008) chamada de EFS2 e contendo as casearinas B, D, H, X e a caseargrewiina F (AcOEt, 10,0 mg/mL).

Análises por RMN de <sup>1</sup>H. Os espectros foram obtidos em espectrômetro Varian<sup>®</sup> Inova 500 11,7 T, usando CDCl<sub>3</sub> como solvente e tetrametilsilano (TMS) como padrão interno. Concentração dos extratos: 30-60 mg/mL.

Análises por CLAE-DAD. O pré-tratamento das amostras incluiu extração em fase sólida (EFS) com sílica de fase reversa (C-18 Merck<sup>®</sup> 40-63  $\mu$ m, 2 x 1 cm). Cerca de 5,0 mg dos extratos secos foram dissolvidos em 1,0 mL de eluente (CH<sub>3</sub>OH/H<sub>2</sub>O 98:02, v/v), aplicados na coluna de EFS e eluídos com mais 4,0 mL do eluente. A fração recolhida foi filtrada em membrana (0,22  $\mu$ m, PVDF Millipore<sup>®</sup>), seca em dessecador com sílica gel sob pressão reduzida, pesada e solubilizada em volume suficiente de CH<sub>3</sub>OH para obter-se uma concentração final de cerca de 3,0 mg/mL. Os cromatogramas foram obtidos em cromatógrafo Varian<sup>®</sup> (bomba ProStar<sup>®</sup> 240, detector de arranjo de diodos ProStar<sup>®</sup> 330, injetor automático ProStar<sup>®</sup> 410, programa Star Chromatography<sup>®</sup>), utilizando coluna de fase reversa (fenil-hexil Phenomenex<sup>®</sup>, 250 x 4,6 mm, 5  $\mu$ m), eluição

com CH<sub>3</sub>OH/H<sub>2</sub>O em gradiente linear de 48-100% (v/v) em 80 min, mais CH<sub>3</sub>OH por 5 min, com vazão de 0,8 mL/min, V<sub>injeção</sub> = 20 µL e detecção no UV na faixa de 210-400 nm. Foram utilizados como padrões cromatográficos (0,5 mg/mL em CH<sub>3</sub>OH) as casearinas B, O, X e a caseargrewiina F, isoladas de folhas de *C. sylvestris* (Santos, 2008) e o diterpeno **1b**, isolado pela primeira vez do caule e cuja determinação estrutural foi realizada através do uso de métodos espectroscópicos e comparação com dados da literatura (Espíndola et al., 2004).

## RESULTADOS

A Tabela 1 resume os resultados das análises cromatográficas e espectroscópicas realizadas.

Na análise por CCD, a ocorrência de bandas cromatográficas entre R<sub>f</sub> 0,2-0,8 nas cromatoplacas dos extratos foi considerada como indicativa da presença de diterpenos clerodânicos típicos de *Casearia*, pois nesta faixa de R<sub>f</sub> observaram-se as bandas referentes aos padrões (casearina X e EFS2). Foram observadas bandas cromatográficas nesta faixa de R<sub>f</sub> nos cromatogramas planares de todos os extratos analisados, o que indicou a presença deste tipo de diterpenos em todos os órgãos, mas com maior diversidade em folhas e flores (Tabela 1).

A ocorrência de casearinas ou diterpenos clerodânicos similares foi confirmada em todos os extratos

analisados pela presença de sinais nas regiões entre δ<sub>5</sub>,00 - 6,90, atribuídos aos hidrogênios diênicos (H12, H14, H15<sub>a</sub>, H15<sub>b</sub>, H16<sub>a</sub>, H16<sub>b</sub>) e aos hidrogênios metínicos do anel C (H18 e H19), além dos sinais em cerca de δ<sub>0</sub>,90 e 2,00, atribuídos aos hidrogênios das metilas de grupos butanoato e acetato, respectivamente (Itokawa et al., 1990; Morita et al., 1991; Oberlies et al., 2002; Espíndola et al., 2004; Shen et al., 2005; Santos et al., 2007; Santos et al., 2010).

Nas análises por CLAE-DAD (cromatogramas nas Figuras 2-4) foi possível identificar alguns diterpenos pela comparação dos respectivos espectros no UV e tempos de retenção (t<sub>R</sub>) com aqueles de padrões isolados de folhas e caule de *C. sylvestris* (Tabela 1). Ainda, foram atribuídos a casearinas ou diterpenos similares os picos cromatográficos que apresentaram espectro no UV com única banda de absorção com λ<sub>máx</sub> entre 232-235 nm ou entre 223-229 nm (Itokawa et al., 1990; Morita et al., 1991; Oberlies et al., 2002; Espíndola et al., 2004; Shen et al., 2005; Santos et al., 2010). Foi confirmada a maior diversidade de casearinas e similares em folhas e flores (Tabela 1). Somente os cromatogramas dos extratos etanólicos de folhas e madeira do caule e dos extratos hexânicos de folhas e flores (Figuras 2 e 3) apresentaram picos com espectro no UV com λ<sub>máx</sub> 232-235 nm (Figura 5), sendo que em folhas o predomínio destes picos foi evidente. Todos os extratos apresentaram nos cromatogramas picos com espectro no UV com absorção máxima próxima de 223 nm (Figura 5), sendo que em flores, raízes, cascas e madeira do caule tais picos

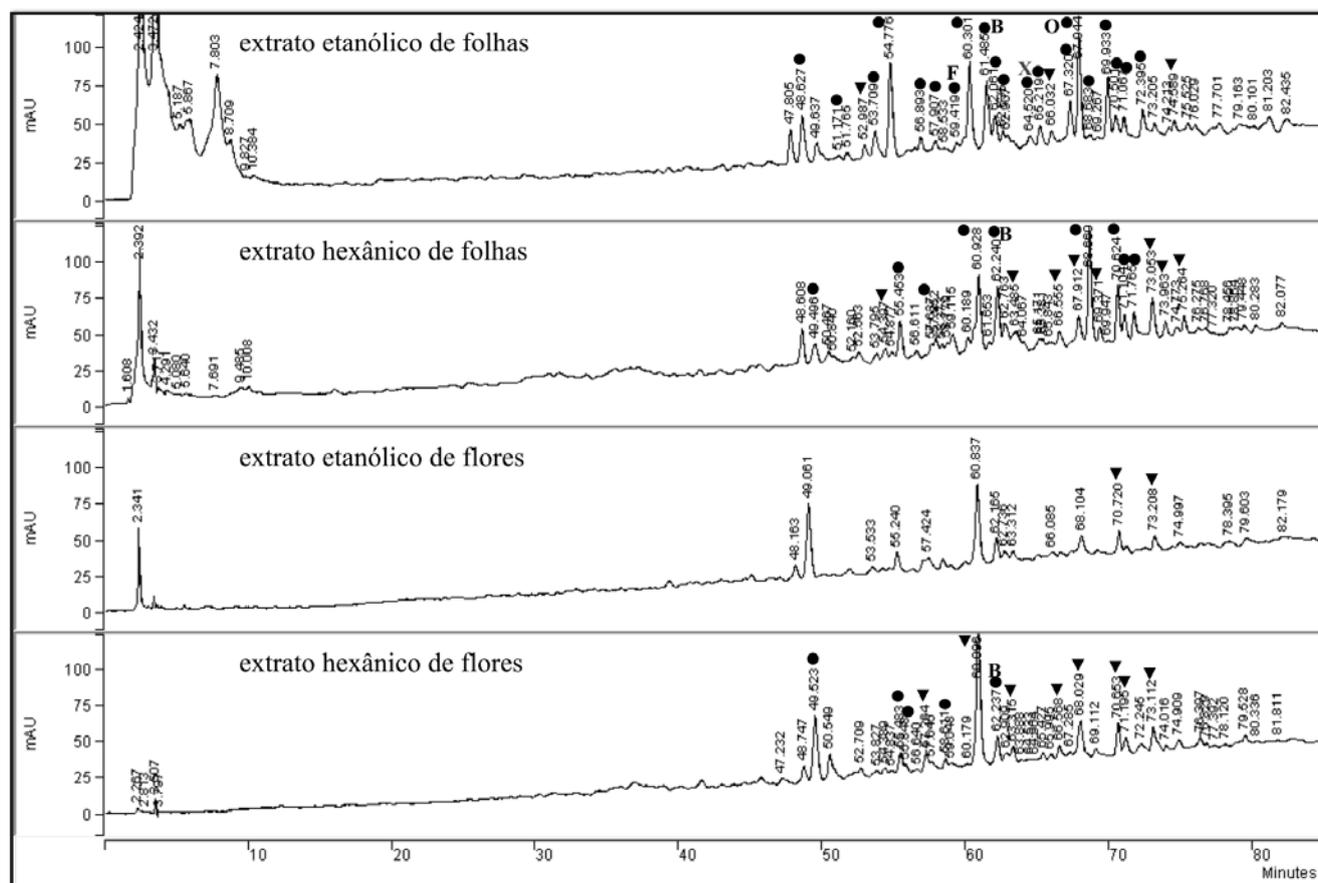


Figura 2: Cromatogramas obtidos em CLAE-DAD ( $\lambda = 235$  nm) dos extratos etanólicos e hexânicos de folhas e flores. O símbolo (●) indica picos com espectro no UV semelhante ao das casearinas ( $\lambda_{\text{máx}}$  - 232-235 nm) e o símbolo (▼) picos com espectro no UV semelhante ao de **1b** ( $\lambda_{\text{máx}}$  - 223-229 nm). Substâncias identificadas - B: casearina B; F: caseargrewiina F; O: casearina O; X: casearina X.

são predominantes (Figuras 2-4). Além disso, alguns picos observados nos extratos hexânicos, com exceção de folhas, apresentaram espectros no UV com duas bandas de absorção ( $\lambda_{\text{máx}}$  de cerca de 225 e 280 nm).

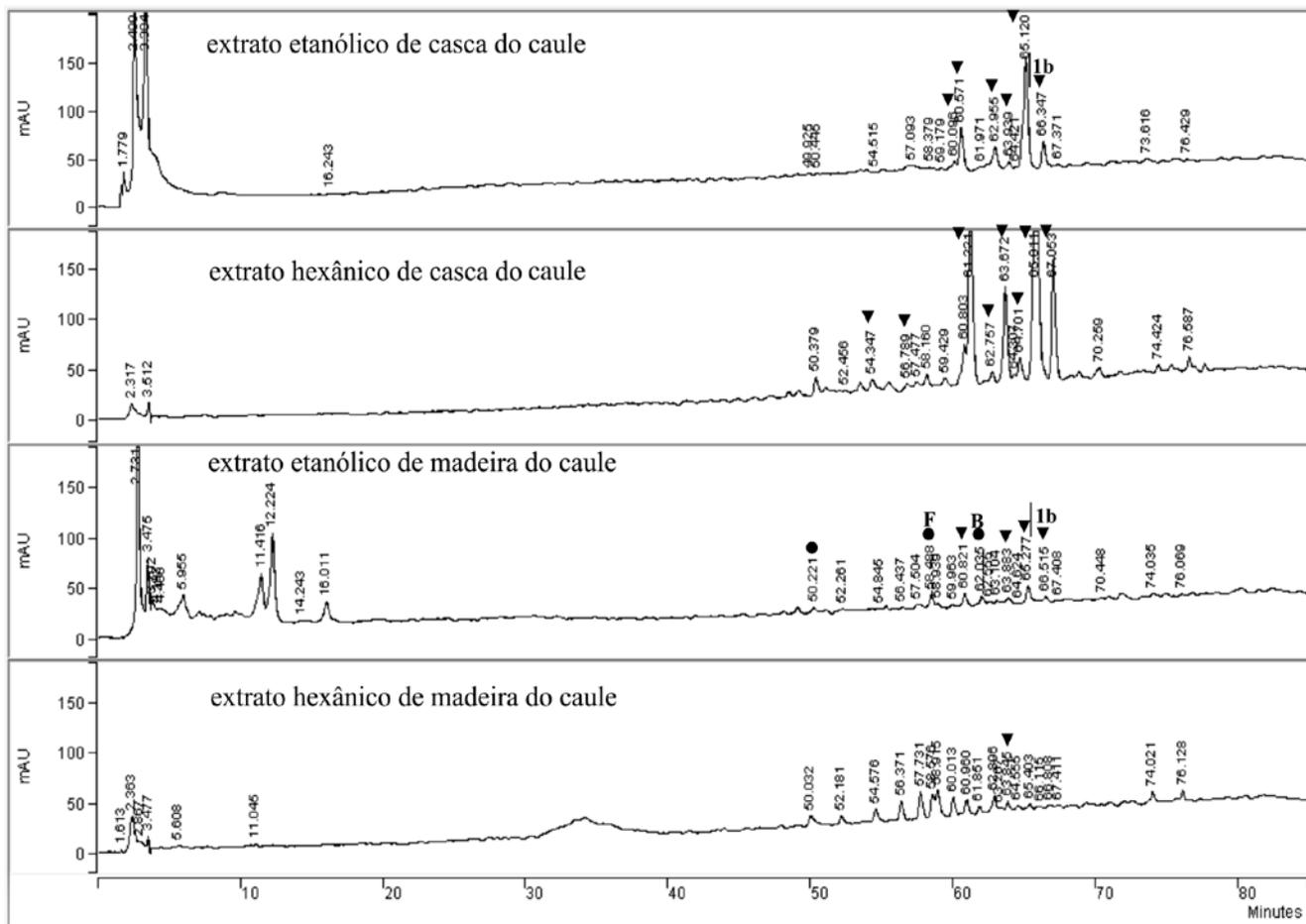


Figura 3: Cromatogramas obtidos em CLAE-DAD ( $\lambda = 235$  nm) dos extratos etanólicos e hexânicos de casca do caule e de madeira do caule. O símbolo (●) indica picos com espectro no UV semelhante ao das casearinas ( $\lambda_{\text{máx}}$  - 232-235 nm) e o símbolo (▼) picos com espectro no UV semelhante ao de **1b** ( $\lambda_{\text{máx}}$  - 223-229 nm). Substâncias identificadas - B: casearina B; F: caseargrewiina F; **1b**.

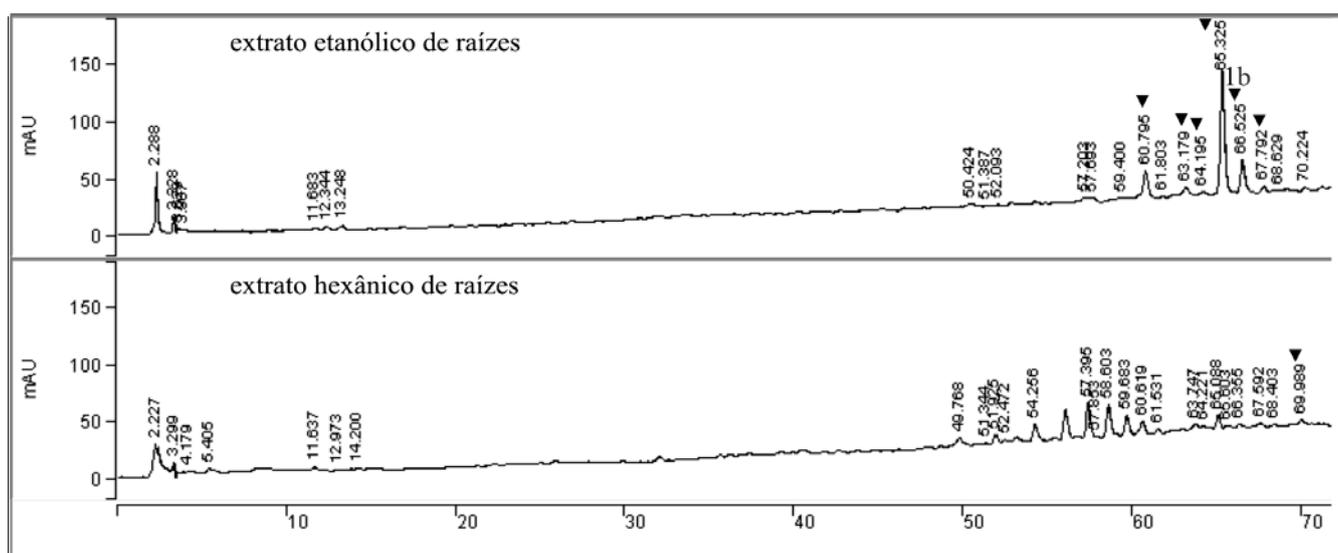


Figura 4: Cromatogramas obtidos em CLAE-DAD ( $\lambda = 235$  nm) dos extratos etanólicos e hexânicos de raízes. O símbolo (▼) indica picos com espectro no UV semelhante ao de **1b** ( $\lambda_{\text{máx}}$  - 223-229 nm). Substância identificada - **1b**.

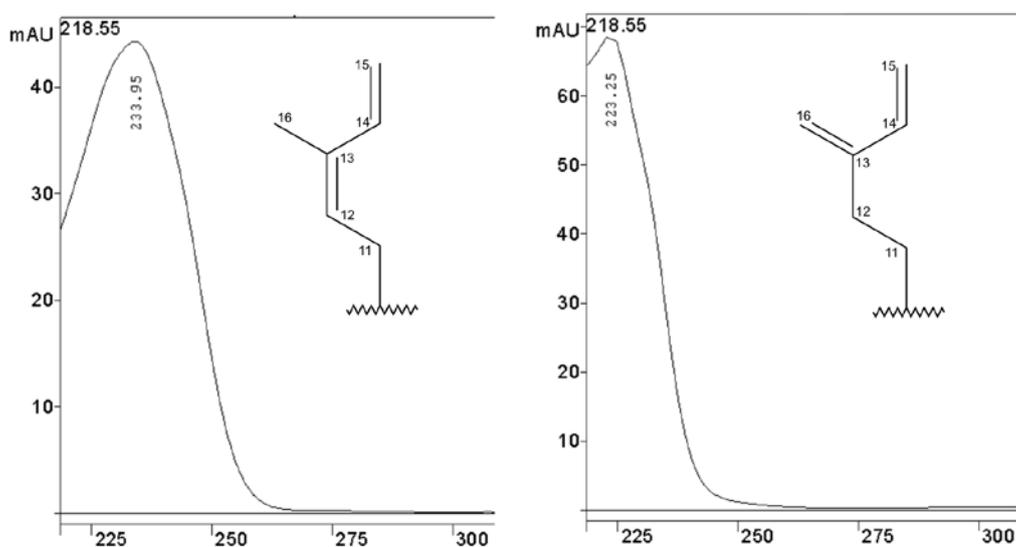


Figura 5: **Esquerda** - espectro no UV do pico relativo à casearina B no cromatograma do extrato etanólico de folhas ( $t_r = 61,485$  min) e modelo diênico com ligações duplas em C12Z e C14. **Direita** - espectro no UV do pico relativo ao diterpeno **1b** no cromatograma do extrato etanólico de raízes ( $t_r = 66,525$  min) e modelo diênico com ligações duplas em C13(16) e C14.

## DISCUSSÃO

De maneira geral, as análises realizadas indicaram a presença de diterpenos clerodânicos típicos de *Casearia* em todos os órgãos avaliados (Tabela 1). Nos métodos cromatográficos foram utilizados padrões, o que conferiu maior confiabilidade aos resultados qualitativos obtidos. Os resultados obtidos em CLAE-DAD e CCD indicaram perfil metabólico mais complexo em folhas e flores. A presença dos diterpenos nos extratos hexânicos mostrou que a extração com etanol nas condições utilizadas não foi exaustiva para estes metabólitos secundários (Tabela 1).

Diterpenos clerodânicos isolados de espécies de *Casearia* possuem um dieno (grupo cromóforo) na cadeia lateral com uma ligação dupla terminal em C14 e outra que pode diferir quanto a posição e a estereoquímica: em C12 *E* ou *Z* ou, ainda, em C13(16) formando uma segunda ligação dupla terminal. Observou-se na literatura (Itokawa et al., 1990; Prakash et al., 2002; Shen et al., 2005) valores de  $\lambda_{\text{máx}}$  de 232-235 nm para o dieno em C12/C14 (ex. casearinas e caseargrewiina F) e de 223-229 nm para o dieno em C13(16)/C14 (ex. **1b**). O deslocamento hipsocrômico da banda de absorção no UV observado para o segundo modelo de dieno é coerente com seu menor grau de substituição. Em *C. arborea* foi verificada a presença de diterpenos clerodânicos (casearborinas A-E) esterificados com ácidos aromáticos que apresentam uma segunda banda de absorção no UV com  $\lambda_{\text{máx}}$  em cerca de 280 nm (Beutler et al., 2000). Desta maneira, utilizando-se CLAE-DAD e considerando-se a relação entre as estruturas químicas dos diterpenos clerodânicos e os valores observados de  $\lambda_{\text{máx}}$ , foi possível sugerir o tipo de diterpeno predominante nos diferentes órgãos analisados.

Nas análises por CLAE-DAD foram identificadas casearinas ou a caseargrewiina F em folhas, flores e madeira do caule. Já o diterpeno **1b** foi identificado na madeira e na casca do caule e na raiz. Os cromatogramas dos extratos

de folhas, flores e madeira do caule apresentaram picos com espectro no UV com  $\lambda_{\text{máx}}$  232-235 nm, sendo que em folhas o predomínio destes picos foi evidente (20 picos). Com exceção das folhas, todos os órgãos analisados apresentaram em seus cromatogramas maior número de picos com  $\lambda_{\text{máx}}$  223-229 nm do que com  $\lambda_{\text{máx}}$  232-235 nm. Estes resultados sugerem o predomínio de diterpenos clerodânicos em caules, flores e raízes com padrão diênico diferente daqueles obtidos de folhas de *C. sylvestris*. Além disso, os cromatogramas dos extratos hexânicos, com exceção do extrato de flores, apresentaram picos com 2 bandas de absorção no UV com  $\lambda_{\text{máx}}$  de cerca de 225 e 280 nm, o que pode indicar a presença de diterpenos com o modelo diênico de **1b**, mas com substituinte éster aromático (ex. p-hidroxibenzoato).

A avaliação química das diferentes partes vegetais de *C. sylvestris* confirmou a possibilidade da ocorrência de casearinas ou outros diterpenos clerodânicos em toda a planta. Foram obtidos perfis fitoquímicos de todos os órgãos, os quais podem ser utilizados na obtenção de substâncias de interesse relacionadas a propriedades farmacológicas exibidas pelos extratos da planta.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelos auxílios concedidos ao projeto, incluindo bolsas de iniciação científica para Elisângela S. de Carvalho (FAPESP) e de doutorado para André G. dos Santos (CNPq).

## ABSTRACT

*Identification of clerodane diterpenes in different organs of Casearia sylvestris Swartz*

***Casearia sylvestris* Swartz (*Salicaceae*) is a tree or shrub distributed widely in Brazil, where it is used in popular medicine. Several bioactive clerodane diterpenes typical of *Casearia* have been isolated from this species (e.g. casearins and casearvestrins). The main objective of this study was to identify clerodane diterpenes in various organs of *C. sylvestris*, using chromatographic and spectroscopic analytical techniques. The extracts of the different plant parts were analyzed by thin layer chromatography, high performance liquid chromatography with diode array detector and <sup>1</sup>H nuclear magnetic resonance. In the chromatographic analysis, clerodane diterpenes isolated from *C. sylvestris* were used as standards, including *rel*-19*S*-acetóxi-18*R*-butanoilóxi-18,19-epóxi-6*S*-hidróxi-2*R*-(2-metilbutanoilóxi)-5*S*, 8*R*, 9*R*, 10*S*-cleroda-3,13(16),14-triene, isolated for the first time from the stems. Phytochemical profiles of the organs were produced, which indicated the presence of clerodane diterpenes in all parts of the plant, notably in the leaves. The results also suggest that the main clerodane diterpenes in the stems, flowers and roots had conjugated double-bond patterns that differed from those found in the leaves.**

**Keywords:** *Casearia sylvestris*. Clerodane diterpenes. *Salicaceae*. *Flacourtiaceae*. Chromatography.

## REFERÊNCIAS

- Basile AC, Sertiè JAA, Pannizza S, Oshiro TT, Azzolini CA. Pharmacological assay of *Casearia sylvestris*. I: Preventive anti-ulcer activity and toxicity of the leaf crude extract. *J Ethnopharmacol.* 1990; 30:185-97.
- Beutler JA, McCall KL, Herbert K, Herald DL, Pettit GR, Johnson T, Shoemaker RH, Boyd MR. Novel cytotoxic diterpenes from *Casearia arborea*. *J Nat Prod.* 2000; 63(5):657-61.
- Borges MH, Soares AM, Rodrigues VM, Andrião-Escarso SH, Diniz H, Hamaguchi A, Quintero A, Lizano S, Gutiérrez JM, Giglio JR, Homs-Brandeburgo MI. Effects of aqueous extract of *Casearia sylvestris* (*Flacourtiaceae*) on actions of snake and bee venoms and on activity of phospholipases A2. *Comp Biochem Physiol Biochem Mol Biol.* 2000; 127B:21-30.
- Carvalho PRF, Furlan M, Young MCM, Kingston DGI, Bolzani VS. Acetylated DNA-damage clerodane diterpenes from *Casearia sylvestris*. *Phytochemistry* 1998; 49(6):1659-62.
- Chase MW. When in doubt, put in *Flacourtiaceae*: a molecular phylogenetic analysis based on plastid *rbcl* DNA sequences. *Kew Bull.* 2002; 57:141-81.
- Correa MP. Dicionário das plantas úteis do Brasil e das espécies cultivadas. Brasília: Ministério da Agricultura/IBDF; 1975. p.514-6.
- Espindola LS, Vasconcelos Junior JR, Mesquita ML, Marquie P, Paula JE, Mambu L, Santana JM. Trypanocidal activity of a new diterpene from *Casearia sylvestris* var. *lingua*. *Planta Med.* 2004; 70(11):1093-5.
- Gibbons S, Gray AI, Waterman PG. Clerodane diterpenes from the bark of *Casearia tremula*. *Phytochemistry* 1996; 41(2):565-70.
- Gomes CLN, Maciel MCG, Guerra RNM, Abreu-Silva AL, Nascimento FRF. Avaliação do efeito cicatrizante da *Casearia sylvestris* (guaçatonga) em camundongos. *J Bras Fitom.* 2005; 3(2):48-55.
- Hoehne FC. Plantas e substâncias vegetais tóxicas e medicinais. São Paulo: Graphicars; 1939. p.196-9.
- Itokawa H, Totsuka N, Morita H, Takeya K, Iitaka Y, Schenkel EP, Motidome M. Antitumor principles from *Casearia sylvestris* Sw. (*Flacourtiaceae*), structure elucidation of new clerodane diterpenes by 2-D NMR spectroscopy. *Chem Pharm Bull.* 1990; 38(12):3384-8.
- Junges MJ, Schenkel EP, Simões CMO. Flavonóides da *Casearia sylvestris* Sw. (erva de bugre). *Cad Farm.* 1985; 1(2): 95-101.
- Maistro EL, Carvalho JC, Mantovani MS. Evaluation of the genotoxic potential of the *Casearia sylvestris* extract on HTC and V79 cells by the comet assay. *Toxicol In Vitro* 2004; 18(3):337-42.
- Marquete R. Reserva ecológica do IBGE (Brasília-DF): *Flacourtiaceae*. *Rodriguésia* 2001; 52(80):5-16.
- Mesquita ML, Desrivot J, Borjes C, Fournet A, Paula JE, Grellier P, Espindola LS. Antileishmanial and trypanocidal activity of Brazilian Cerrado plants. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2005; 100(7):783-7.
- Morita H, Nakayama M, Kojima H, Takeya K, Itokawa H, Schenkel EP, Motidome M. Structures and cytotoxic activity relationship of casearins, new clerodane diterpenes from *Casearia sylvestris* Sw. *Chem Pharm Bull.* 1991; 39(3):693-7.
- Oberlies NH, Burgess JP, Navarro HA, Pinos RE, Fairchild CR, Peterson RW, Soejarto DD, Farnsworth NR, Kinghorn AD, Wani MC, Wall ME. Novel bioactive clerodane diterpenoids from the leaves and twigs of *Casearia sylvestris*. *J Nat Prod.* 2002; 65(2):95-9.
- Oshima-Franco Y, Alves CMV, Andréo Filho N, Gerenutti M, Cintra ACO, Leite GB, Rodrigues-Simioni L, Silva MG. Neutralization of the neuromuscular activity of bothropstoxin-I, a myotoxin from *Bothrops jararacussu* snake venom, by a hydroalcoholic extract of *Casearia sylvestris* Sw. (guaçatonga). *J Venom Anim Toxins incl Trop Dis.* 2005; 11(4):465-78.
- Prakash CVS, Hoch JM, Kingston DGI. Structure and stereochemistry of new cytotoxic clerodane diterpenoids from the bark of *Casearia lucida* from the Madagascar rainforest. *J Nat Prod.* 2002; 65(2):100-7.
- Santos AG, Ferreira PMP, Vieira Júnior GM, Perez CC, Tininis AG, Silva GH, Bolzani VS, Costa-Lotufu LV, Pessoa C do Ó, Cavalheiro AJ. Casearin X, its degradation product and other clerodane diterpenes from leaves of *Casearia sylvestris*: evaluation of cytotoxicity against normal and tumor human cells. *Chem Biodiversity* 2010; 7(1):205-15.

Santos AG. *Identificação dos princípios ativos antiulcerogênicos das folhas de Casearia sylvestris: contribuição para o desenvolvimento de um fitoterápico.* [Tese] Araraquara: Instituto de Química, UNESP; 2008.

Santos AG, Perez CC, Tininis AG, Bolzani VS, Cavalheiro AJ. Clerodane diterpenes from leaves of *Casearia sylvestris* Swartz. *Quím Nova* 2007; 30(5):1100-3.

Sertié JAA, Carvalho JCT, Panizza S. Antiulcer activity of the crude extract from the leaves of *Casearia sylvestris*. *Pharml Biol.* 2000; 38(2):112-9.

Shen Ya-Ching, Lee CL, Khalil AT, Cheng Yuan-Bin, Chien Ching-Te, Kuo Yao-Haur. New clerodane diterpenoids from *Casearia membranacea*. *Helv Chim Acta* 2005; 88(1):68-77.

Silva FB, Almeida JM, Sousa SM. Natural medicaments in endodontics – a comparative study of the anti-inflammatory action. *Pesq Odontol Bras.* 2004; 18(2):174-9.

Torres RB, Yamamoto K. Taxonomia das espécies de *Casearia* Jacq. (*Flacourtiaceae*) do Estado de São Paulo. *Rev Bras Bot.* 1986; 9: 239-58.

Wang W, Zhao J, Wang Y-H, Smillie TA, Li X-C, Khan IA. Diterpenoids from *Casearia sylvestris*. *Planta Med.* 2009; 75: 1436-41.