

**UNESP – UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“Julio de Mesquita Filho” - Câmpus Araraquara
Instituto de Química
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

FRANCISCO JOSÉ MININEL

Estudo Fitoquímico de extratos polares e infusão das folhas de
Terminalia catappa L. (COMBRETACEAE) e avaliação das
suas atividades antiulcerogênica e mutagênica



Araraquara – SP

2015

FRANCISCO JOSÉ MININEL

“Estudo Fitoquímico de extratos polares e infusão das folhas de *Terminalia catappa* L. (COMBRETACEAE) e avaliação das suas atividades antiulcerogênica e mutagênica”

Tese apresentada ao Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Química.

Orientadora: Profa. Dra. Lourdes Campaner dos Santos

Araraquara
2015

DADOS CURRICULARES

Dados pessoais

Nascimento: 21/02/1966

Filiação: Antenor Mininel e Irene Oratti Mininel

Naturalidade: Fernandópolis-SP

Endereço residencial: Rua Aviador Eduardo Borges de Freitas nº 199, Residencial Terra Verde – Fernandópolis-SP

Telefone: (17) 3462-1418

E-mail: coord.quimica.fer@unicastelo.edu.br

Formação Acadêmica

Ciências com Habilitação em Química

Centro Universitário de Votuporanga-SP.

Ano de conclusão: 1987.

Especialista em Química

Universidade Camilo Castelo Branco (UNICASTELO-SP).

Ano de conclusão: 1996.

Mestre em Ciências Farmacêuticas

Universidade São Francisco (USF) - Bragança Paulista-SP.

Ano de conclusão: 2003.

Mestre em Química

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Brasil.

Ano de conclusão: 2009.

Atuação profissional

Universidade Camilo Castelo Branco - UNICASTELO

Período: 2010-Atual, Vínculo: Celetista, Carga horária: 40, Regime: Dedicção exclusiva.

Faculdades Integradas de Fernandópolis – FIFE

Vínculo institucional

Período: 1997 - 2009

Vínculo: Celetista formal, Enquadramento Funcional: Coordenador/Professor, Carga horária: 40

Fundação Educacional de Santa Fé do Sul, FUNEC, Brasil.

Período: 1996-1999

Vínculo: Celetista formal, Enquadramento Funcional: Professor, Carga horária: 6

Artigos completos publicados em periódicos

MININEL, F.J.; JUNIOR, C.S.L.; ESPANHA, L.G.; RESENDE, F.A.; VARANDA, E.A.; LEITE, C.Q.F.; VILEGAS, W.; SANTOS, L. C. Characterization and Quantification of Compounds in the Hydroalcoholic Extract of Leaves from *Terminalia catappa* Linn. (Combretaceae) and Their Mutagenic Activity. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2014.

Participações em congressos

MININEL, F.J.; JÚNIOR, C.S.L, D.; VILEGAS, W.; SANTOS, L. C. Quantification of punicalagin from the leaves of *Terminalia catappa* (Combretaceae) by HPLC-PAD-DC. In: **4º Brazilian Congress on Natural Products** , Natal-RN, 2013

MININEL, F. J. J Fingerprint dos extratos etanólico e hidroalcoólico das folhas de *Terminalia catappa* L. (COMBRETACEAE) por FIA-ESI-IT-MS. In: 35 Reunião da Sociedade Brasileira de Química, 2012, Águas de Lindóia-SP. Fingerprint dos extratos etanólico e hidroalcoólico das folhas de *Terminalia catappa* L. (COMBRETACEAE) por FIA-ESI-IT-MS.

Orientação de iniciação científica

PEREIRA, J.E. Estudo Fitoquímico dos Extratos Hidroalcoólicos das Folhas e Frutos de *Terminalia catappa* L. (Combretaceae). Início: 2011. Iniciação científica (Graduando em Química) - Universidade Camilo Castelo Branco. (Orientador).

OLIVEIRA, L.E.S. Abordagem Fitoquímica e cromatográfica das folhas e frutos de *Jatropha multifida* L. (Jm). Início: 2011. Iniciação científica (Graduando em Química) - Universidade Camilo Castelo Branco. (Orientador).

OLIVEIRA, A.V.B. Screening Fitoquímico e Análise Morfo-Histológica de *Jatropha curcas* L.. 2008. Iniciação Científica. (Graduando em Farmácia) - Faculdades Integradas de Fernandópolis. Orientador: Francisco Jose Mininel.

BARRETO, L.T.B. Abordagem Fitoquímica de Extratos Fluidos e Atividade Antimicrobiana e Antifúngica de *Euphorbia tirucalli* L.. 2008. Iniciação Científica. (Graduando em Farmácia) - Faculdades Integradas de Fernandópolis. Orientador: Francisco Jose Mininel.

IGLÉSIAS, R. Abordagem Fitoquímica, Morfo-histológica e cromatográfica de *Simaba ferruginea* St. - Hill (Simaroubaceae). 2008. Iniciação Científica. (Graduando em Farmácia) - Faculdades Integradas de Fernandópolis. Orientador: Francisco Jose Mininel.

AGUIAR, R.T. Abordagem Fitoquímica e Atividade Antimicrobiana de *Calotropis procera* (AITON) R.Br (Euphorbiaceae). 2007. Iniciação Científica. (Graduando em Farmácia) - Faculdades Integradas de Fernandópolis. Orientador: Francisco Jose Mininel.

BARRETO, L.T.V. Abordagem Fitoquímica e Atividade Antimicrobiana de *Costus spiralis* Jacq. Roscoe (Zingiberaceae). 2007. Iniciação Científica. (Graduando em Farmácia) - Faculdades Integradas de Fernandópolis. Orientador: Francisco Jose Mininel.

ALVES, A.M. Caracterização Farmacognóstica da Droga *Sapium haematospermum* (MULL. ARG) HUB. e Atividade Antimicrobiana. 2006. Iniciação Científica. (Graduando em Farmácia) - Faculdades Integradas de Fernandópolis. Orientador: Francisco Jose Mininel.

GOMES, C.R. Abordagem Fitoquímica e Análise Antimicrobiana de *Ipomoea carnea* JACQ. (Convolvulaceae). 2006. Iniciação Científica. (Graduando em Farmácia) - Faculdades Integradas de Fernandópolis. Orientador: Francisco Jose Mininel.

ALVES, A.M. Caracterização Farmacognóstica da Droga de *Sapium haematospermum* (Mull. Arg.) Hub. e Atividade Antimicrobiana. 2006. Iniciação Científica. (Graduando em Farmácia) - Faculdades Integradas de Fernandópolis. Orientador: Francisco Jose Mininel.

LIVORATI, A.K.M.; JODAS, F.G. Caracterização Farmacognóstica da droga de *Pyrostegina venusta* Miers. 2005. Iniciação Científica. (Graduando em Farmácia) - Faculdades Integradas de Fernandópolis. Orientador: Francisco Jose Mininel.

LUZ, G.A.; SATURNINO, N. Caracterização Farmacognóstica da *Mabea fistulifera* M.. 2005. Iniciação Científica. (Graduando em Farmácia) - Faculdades Integradas de Fernandópolis. Orientador: Francisco Jose Mininel.

SATURNINO, N. Caracterização Farmacognóstica da Droga de *Cassia fistula* L. (Leguminosae). 2004. Iniciação Científica. (Graduando em Farmácia) - Faculdades Integradas de Fernandópolis. Orientador: Francisco Jose Mininel.

FRANCISCO JOSÉ MININEL

“Estudo Fitoquímico de extratos polares e infusão das folhas de *Terminalia catappa* L. (COMBRETACEAE) e avaliação das suas atividades antiulcerogênica e mutagênica”

Tese apresentada ao Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Química.

Araraquara, 17 de abril de 2015.

BANCA EXAMINADORA

Nome
Instituição

Nome
Instituição

Nome
Instituição

Nome
Instituição

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela força, coragem, alegria, paz e amor e a Nossa Senhora pela intercessão e proteção durante todo esse percurso.

À minha amada esposa Silvana que esteve sempre presente ao meu lado compartilhando alegrias e me incentivando nos momentos difíceis.

À minha querida mãe Irene que muitas vezes me acompanhou nas madrugadas a caminho de Araraquara, principalmente no período em que cursei as disciplinas obrigatórias. Nossas conversas agradáveis não me permitiam dormir durante os 300 Km de trajeto. À minha irmã Rosana e ao meu querido e amado sobrinho e afilhado Guilherme.

Ao meu querido pai Antenor Mininel (*in memoriam*), pois tenho a certeza de que onde estiver esteve sempre me acompanhando e me auxiliando nos momentos de incerteza.

Ao meu amado filho Kauan a quem muitas vezes me solicitava à atenção que na ocasião não podia lhe dar. À minha querida filhinha Maria Clara, um presente de Deus, que está chegando neste momento de finalização do meu trabalho.

Agradeço imensamente à minha querida orientadora profa. Dra. Lourdes Campaner por ter me acolhido em seu laboratório e por ter contribuído decisivamente com sua experiência para a consolidação desse Projeto. Meu reconhecimento e minha infinita gratidão por tudo. Sua missão é iluminar mentes e sei que continuará nesta missão por muitos e muitos anos.

Aos queridos companheiros do Laboratório de Fitoquímica, Daryne, Carlos, Marcelo, Claudinha, Aninha, Felipe, Leonardo, Weslei e Fabiana pelos momentos de amizade e por toda ajuda recebida.

Ao Prof. Dr. Daniel Rinaldo por ter se disposto a vir até Araraquara me ajudar na execução dos experimentos de DC. Sua ajuda foi valiosa.

Ao meu amigo e colaborador Carlos Sérgio. Obrigado por me acompanhar na execução de muitos experimentos no laboratório. Sua colaboração foi essencial para finalização deste trabalho. Grato por tudo.

Às professoras Dra. Clélia Akiko Hiruma Lima e Dra. Eliane Aparecida Varanda pela valiosa contribuição com a parte biológica deste trabalho. Meu profundo reconhecimento e gratidão.

À Universidade Camilo Castelo Branco (UNICASTELO) – Campus Fernandópolis pelo incentivo e apoio durante estes quatro anos de pesquisa.

À FAPESP pelo auxílio concedido a esta pesquisa através do Programa BIOTA-FAPESP.

Ao prof. Dr. Wagner Vilegas por confiar a mim uma das espécies do Projeto Biota-FAPESP.

RESUMO

Terminalia catappa Linn. pertence à Família Combretaceae e é comumente chamada amendoeira-da-praia ou chapéu de sol. A família Combretaceae reúne numerosas espécies que têm sido estudadas por seu uso pela população para fins medicinais. É originária da Malásia, mas, muitas vezes, cultivada e muito característica da costa brasileira. A partir do extrato hidroalcoólico das folhas, foram detectados como constituintes principais a substância majoritária punicalagina (anômeros α e β), o composto punicalina, ácido galágico e ácido elágico. Identificou-se, também, as substâncias 1,2,3-Tri-O-galoil- β -D-glicose e possíveis isômeros, 1,6-Di-O-galoil- β -D-glicose, HHDP-acetilglicosídeo, HHDP-hexosídeo, ácido elágico hexosídeo, ácido galágico e apigenina 8-C-(2''-galoil)- β -D-glicopiranosil. Estes metabolitos foram confirmados por experimentos FIA-ESI-IT-MSⁿ (*Direct Flow Analysis-Electrospray ionization-Ion Trap-Tandem Mass Spectrometry*) and *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) acoplada a arranjo de fotodiodos (PDA). Ácido elágico, ácido gálico e galato de metila foram confirmados por experimentos de co-injeção de padrão. Punicalagina foi detectada e isolada da fração hidrometanólica como uma mistura de anômeros e confirmada por experimentos de RMN ¹H e ¹³C, mono e bidimensionais. O fracionamento da fração acetato proveniente do extrato hidroalcoólico por MPLC (*Medium Pressure Liquid Chromatography*) permitiu o isolamento dos metabólitos ácido galágico e apigenina 8-C-(2''-galoil)- β -D-glicopiranosil. A configuração absoluta dos anômeros da punicalagina e do composto apigenina 8-C-(2''-galoil)- β -D-glicopiranosídeo foi estabelecida por experimentos de dicroísmo circular (DC). A determinação quantitativa dos principais metabolitos secundários foi realizada por HPLC-PDA, possibilitando, assim, a determinação da concentração e teor (%) de metabólitos presentes no extrato hidroalcoólico. Foram quantificados, pela primeira vez em extrato hidroalcoólico desta espécie, os metabólitos: punicalagina, ácido elágico, ácido gálico, galato de metila, ácido galágico e apigenina 8-C-(2''-galoil)- β -D-glicopiranosil. A atividade antiulcerogênica foi avaliada no modelo de úlcera gástrica induzida por etanol absoluto em diferentes doses (25, 50 e 100 mg.Kg⁻¹). A partir do fracionamento do extrato etanólico (IBB-UNESP-Botucatu), obteve-se três frações: hexânica, acetato de etila e aquosa. Foi constatado que as três frações apresentaram redução significativa na área de lesão. A fração aquosa apresentou diminuição significativa na dose de 25 mg.Kg⁻¹ (42,61% de inibição). A atividade mutagênica foi avaliada pelo ensaio de *Salmonella/microsossoma*. Para o extrato hidroalcoólico, foi observada atividade mutagênica nas linhagens TA100 e TA97 de *Salmonella typhimurium* em ausência de ativação metabólica. O extrato hidroalcoólico de *T. catappa* apresentou 81,31 mg.g⁻¹ de fenóis totais, 42,43 mg.g⁻¹ de flavonoides totais e IC₅₀ igual a 76,81 μ g.mL⁻¹, enquanto a infusão das folhas apresentou 56,71 mg.g⁻¹ de infuso de fenóis totais e 26,12 mg.g⁻¹ de infuso de flavonoides totais, com IC₅₀ igual a 156,41 μ g.mL⁻¹. A fração acetato de etila indicou a presença de 60,14 mg.g⁻¹ de fenóis totais, 106,17 mg.g⁻¹ de flavonoides totais e IC₅₀ igual a 101,89 μ g.mL⁻¹. Em relação ao composto majoritário punicalagina, encontrou-se IC₅₀ de 43,22 μ g.mL⁻¹. No caso do ácido galágico, encontrou-se um valor de IC₅₀ superior a 250 μ g.mL⁻¹. Para a apigenina 8-C-(2''-galoil)- β -D-glicopiranosil, encontrou-se IC₅₀ 172,20 μ g.mL⁻¹. Portanto, a partir dos resultados obtidos pode-se concluir que extratos e frações de *Terminalia catappa* podem ser fontes promissoras para o desenvolvimento de fitoterápicos, uma vez que o extrato etanólico mostrou-se efetivo nos mecanismos de gastroproteção. Em contraposição

observou-se que o extrato hidroalcoólico apresentou atividade mutagênica nos testes *in vitro*, em altas concentrações. Estudos *in vivo* posteriores poderão confirmar ou não esta atividade, podendo ainda indicar qual a substância responsável pela ação gastroprotetora ou pela atividade mutagênica apresentada ou se existe um sinergismo entre as substâncias presentes em extratos e frações que provocariam tais atividades.

Palavras-chave: *Terminalia catappa*, padronização de extratos vegetais, taninos elágicos, mutagenicidade

ABSTRACT

Terminalia catappa Linn. belongs to Combretaceae family and is commonly called almond-the-beach or sun hat. The Combretaceae family gathers numerous species that has been studied for its use by the population for medicinal purposes. It is from Malaysia, but often cultivated and very characteristic of the Brazilian coast. From the alcoholic extract of the leaves were detected as main constituents the major substance punicalagin (α and β anomers), the punicalin compound, gallic acid and ellagic acid. It was identified as well, the 1,2,3-Tri-O-galloyl- β -D-glucose substances, and possible isomers, 1,6-Di-O-galloyl- β -D-glucose, HHDP acetilglycoside, HHDP-hesoside, ellagic acid hexoside, gallic acid and apigenin 8-C (2''-galloyl)- β -D-glucopyranosyl. These metabolites were confirmed by FIA-ESI-IT-MSⁿ experiments (Direct Flow Analysis Electrospray ionization-Ion-Trap Tandem Mass Spectrometry) and High Performance Liquid Chromatography (HPLC) coupled with diode array (PDA). Ellagic acid, gallic acid and methyl gallate were confirmed by standard co-injection experiments. Punicalagin was detected and isolated from the hydromethanol fraction as a mixture of anomers experiments and confirmed by ¹H and ¹³C NMR, mono- and bi-dimensional. The ethyl acetate fraction from fractionation of the hydroalcoholic extract by MPLC (Medium Pressure Liquid Chromatography) allowed the isolation of galágico acid metabolites and 8 apigenin-C (2''- galloyl) - β -D-glucopyranosyl. The absolute configuration of anomers of the compound of punicalagin and apigenin 8-C (2''-galloyl) - β -D- glucopyranosyl was established by experiments circular dichroism (CD). Quantitative determination of the main secondary metabolites was performed by HPLC-PDA, thus allowing the determination of concentration and content (%) of metabolites present in the alcoholic extract. They were first quantified in hydroalcoholic extract of this species, the metabolites: punicalagin, ellagic acid, gallic acid, methyl gallate, gallic acid and apigenin 8-C (2''-galloyl) - β -D-glucopyranosyl. The antiulcer activity was evaluated on gastric ulcer model induced by absolute ethanol at different doses (25, 50 and 100 mg.Kg⁻¹). The fractionation of the ethanol extract (IBB-UNESP-Botucatu), three fractions were obtained: hexane, ethyl acetate and water. It was found that the three fractions showed a significant reduction in the lesion area. The aqueous fraction was significantly decreased at a dose of 25 mg.Kg⁻¹ (42.61% inhibition). The mutagenic activity was assessed by the *Salmonella*/microsome assay. For the alcoholic extract was observed mutagenic activity in TA100 and TA97a strains of *Salmonella typhimurium* in the absence of metabolic activation. The alcoholic extract of *T. catappa* (alcoholic extract) showed 81.31 mg.g⁻¹ of total phenols, 42.43 mg.g⁻¹ of total flavonoids and IC₅₀ equal to 76.81 μ g.mL⁻¹, while the infusion of the leaves showed 56.71 mg.g⁻¹ infusion of total phenols and 26.12 mg.g⁻¹ infusion of total flavonoids, with IC₅₀ equal to 156.41 μ g.mL⁻¹. The ethyl acetate fraction, indicated the presence of 60.14 mg.g⁻¹ of total phenols, 106.17 mg.g⁻¹ of total flavonoids and IC₅₀ equal to 101.89 μ g.mL⁻¹. Regarding punicalagin major compound found himself IC₅₀ 43.22 μ g.mL⁻¹ In the case of galagic acid met an IC₅₀ greater than 250 μ g.mL⁻¹. For the 8-C-apigenin (2''- galloyl) - β -D-glucopyranosyl, met IC₅₀ 172.20 μ g.mL⁻¹. Therefore, from the results it could be concluded that *Terminalia catappa* extracts and fractions may be promising sources for the development of plant, since the ethanol extract was effective in gastroprotection mechanisms. In contrast it was found that the hydroalcoholic extract showed mutagenic activity in in vitro tests at high concentrations. In vivo later studies may confirm this activity, and may also indicate the substance responsible for the gastroprotective action or by mutagenic activity

observed or if there is a synergy between substances in extracts and fractions that would cause such activities.

Keywords: *Terminalia catappa*, standardization of plant extracts, ellagitannins, mutagenicity

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Aspecto geral da árvore de *Terminalia catappa* L. (a); folhas e frutos verdes de *Terminalia catappa* L. (b).....31
- Figura 2** - Esquema do Teste de Ames. +S9 e –S9 significam presença e ausência do sistema de ativação metabólica, respectivamente.54
- Figura 3** - Fluxograma geral do processo extrativo e isolamento de metabólitos de *T. catappa*.59
- Figura 4** - Cromatograma do extrato etanólico (A) e do extrato hidroalcoólico (B). Pico (1) e pico (2), anômeros da punicalagina, pico (3) ácido elágico com UVs característicos. Coluna Hydro, fluxo 1 mL/min. em método gradiente, 5-60% MeOH, 60 min. HPLC-PDA (Jasco®), 254 nm.61
- Figura 5** - Sobreposição dos cromatogramas do extrato hidroalcoólico (em preto) e do extrato etanólico (em vermelho). Pico (1) e pico (2), anômeros da punicalagina, pico (3) ácido elágico com UVs característicos. Coluna Hydro, fluxo 1 mL/min. em método gradiente, 5-60% MeOH, 60 min. HPLC-PDA (Jasco®), 254 nm.....61
- Figura 6** - Cromatograma da fração aquosa derivada do extrato hidroalcoólico (A) e do extrato etanólico (B). Pico (1) e pico (2), anômeros da punicalagina com UVs característicos. Coluna Hydro, fluxo 1 mL/min. em método gradiente, 5-60% MeOH, 60 min. HPLC-PDA (Jasco®), 254 nm.62
- Figura 7** - Sobreposição dos cromatogramas da fração aquosa proveniente do extrato hidroalcoólico (em preto) e do extrato etanólico (em vermelho). Pico (1) e pico (2), anômeros da punicalagina, com UVs característicos. Coluna Hydro, fluxo 1 mL/min. em método gradiente, 5-60% MeOH, 60 min. HPLC-PDA (Jasco®), 254 nm.62
- Figura 8** - Cromatograma do extrato hidroalcoólico das folhas de *T. catappa* (A) e cromatograma da infusão das folhas de *T. catappa*(B). Gradiente 5-60% MeOH, 60 min., 270 nm. Picos (1 e 2 = Punicalagina, 6 = ácido elágico) com respectivos UVs.63
- Figura 9** - Cromatograma indicando pico eluindo em t_r 46,3 min., após experimento de co-injeção do padrão ácido elágico (B) (SIGMA®) ao extrato hidroalcoólico (A) das folhas de *T. catappa*. Coluna Hydro, vazão 1 mL/min. em método gradiente, 5-60% MeOH, 60 min. HPLC-PDA (Jasco®), 254 nm.....64
- Figura 10** - Cromatograma da fração acetato de etila (A), antes do experimento de co-injeção de padrões. Pico (1) e pico (2) com UVs característicos do ácido gálico (1) e galato de metila (2). Coluna Hydro, vazão 1 mL/min. em método gradiente, 5-60% MeOH, 60 min. HPLC-PDA (Jasco®), 254 nm.....65
- Figura 11** - Espectro na região de UV (pico 1), eluindo em t_r 8,72 min. característico do ácido gálico (λ_{max} 271 nm), após experimento de co-injeção do padrão ácido gálico (SIGMA®) à fração acetato, (1:1 v/v). Coluna Hydro, fluxo 1 mL/min. em método gradiente, 5-60% MeOH, 60 min. HPLC-PDA (Jasco®), 270 nm. ...66
- Figura 12** - Espectro na região de UV (pico 2), eluindo em t_r 19,62 min. característico do galato de metila (λ_{max} 274 nm), após experimento de co-injeção do padrão galato de metila (SIGMA®) à fração acetato, (1:1 v/v). Coluna Hydro, vazão

1 mL/ min. em método gradiente, 5-60% MeOH, 60 min. HPLC-PDA (Jasco®), 270 nm.	66
Figura 13 - Espectro de massas de primeira-ordem, em modo <i>full-scan</i> (extrato hidroalcoólico) das folhas de <i>T. catappa</i> em modo negativo e ampliações das regiões entre (a) m/z 301,8 a 300,6 Da e (b) 603,0-601,0 Da. Faixa de íons com m/z de 100-2000 Da.....	68
Figura 14 - Espectro de massas de primeira-ordem, em modo <i>full-scan</i> do extrato etanólico das folhas de <i>T. catappa</i> em modo negativo. Faixa de íons com m/z de 100-2000 Da. Ampliação (C) da região entre 600,5 a 602,5.	69
Figura 15 - Espectro de massas de primeira ordem, em modo <i>full-scan</i> , da fração aquosa das folhas de <i>T. Catappa</i> avaliado em modo negativo. Faixa de íons com m/z de 300-1200 Da.....	69
Figura 16 - Punicalagina (Tc1), Punicalina (Tc2), Ácido galágico (Tc3) e Ácido elágico (Tc4).....	70
Figura 17 - Espectro de massas de segunda-ordem do íon precursor de m/z 1083 (Tc1), obtido em modo negativo com energia de colisão de 30% e proposta de fragmentação.	71
Figura 18 - Espectro de massas de segunda-ordem do íon precursor de m/z 781 (Tc2), obtido em modo negativo com energia de colisão de 30%.	72
Figura 19 - Espectro de massas de segunda-ordem do íon precursor de m/z 601 (Tc3), obtido em modo negativo com energia de colisão de 30%.	73
Figura 20 - Espectro de massas de segunda-ordem do íon precursor de m/z 301 (Tc4), obtido em modo negativo com energia de colisão de 30% e proposta de fragmentação.	74
Figura 21 - Espectro de massas de segunda-ordem do íon precursor de m/z 635 (Tc5), representando o isômero (3,4,6-Tri-O-galoil- β -D-glicose), obtido em modo negativo com energia de colisão de 30% e proposta de fragmentação.	78
Figura 22 - Espectro de massas de segunda-ordem do íon precursor de m/z 483 (Tc6) (1,6-Di-O-galoil- β -D-glicose), obtido em modo negativo com energia de colisão de 30% e proposta de fragmentação.	79
Figura 23 - Espectro de massas de segunda-ordem do íon precursor de m/z 339 (Tc7) (derivado do galato de metila), obtido em modo negativo com energia de colisão de 30% e proposta de fragmentação.	80
Figura 24 - Espectro de massas de segunda-ordem do íon precursor de m/z 325 (Tc8) (derivado do galato de metila), obtido em modo negativo com energia de colisão de 30% e proposta de fragmentação.	81
Figura 25 - Espectro de massas de terceira-ordem do íon precursor de m/z 325 (Tc8), obtido em modo negativo com energia de colisão de 30%, indicando o íon com m/z 183 (Tc9), correspondente ao galato de metila.	82
Figura 26 - Espectro de massas de segunda-ordem do íon precursor de m/z 311 (Tc10) (derivado do galato de metila), obtido em modo negativo com energia de colisão de 30% e proposta de fragmentação	82

Figura 27 - Espectro de massas de segunda-ordem do íon precursor de <i>m/z</i> 619 (Tc11) (derivado da apigenina), obtido em modo negativo com energia de colisão de 30%.....	83
Figura 28 - Espectro de massas de terceira-ordem do íon precursor de <i>m/z</i> 619 (derivado da apigenina), <i>m/z</i> 583 (Tc12 = Apigenina 6-C-(2''-galoil)-β-D-glicopiranosil ou Tc13 = Apigenina 8-C-(2''-galoil)-β-D-glicopiranosil), obtido em modo negativo com energia de colisão de 30%.	83
Figura 29 - Espectro de massas de terceira ordem do íon em <i>m/z</i> 541 (Tc14) (MS ²), obtido em modo negativo com energia de colisão de 30% e proposta de fragmentação.	84
Figura 30 - Espectro de massas de segunda-ordem (MS ²) do extrato etanólico das folhas de <i>T. catappa</i> em modo negativo. Faixa de íons com <i>m/z</i> de 100-2000 Da...85	85
Figura 31 - Espectro de massas de segunda ordem (MS ²), do íon precursor de <i>m/z</i> 1083 (Tc1) da fração aquosa do extrato bruto de <i>T. catappa</i> obtido em modo negativo.....	85
Figura 32 - (MS ³) do íon precursor de <i>m/z</i> 1083 (Tc1) presente na fração aquosa de <i>T. catappa</i> obtido em modo negativo.	86
Figura 33 - (MS ³) do íon precursor de <i>m/z</i> 1083 (Tc1) presente na fração aquosa de <i>T. catappa</i> obtido em modo negativo, indicando o íon em <i>m/z</i> 781 (TC2) correspondente ao composto punicalina.....	86
Figura 34 - (MS ³) do íon precursor de <i>m/z</i> 1083 (Tc1) presente na fração aquosa de <i>T. catappa</i> obtido em modo negativo, indicando o íon em <i>m/z</i> 601 (TC3) correspondente ao composto ácido galágico.	86
Figura 35 - (MS ²) do íon precursor de <i>m/z</i> 541 (Tc14), derivado HHDP-acetilglicosídeo, presente na fração aquosa de <i>T. catappa</i> obtido em modo negativo.	87
Figura 36 - (MS ³) do íon precursor de <i>m/z</i> 481 (Tc16), HHDP-hexosídeo, presente na fração aquosa de <i>T. catappa</i> obtido em modo negativo.....	87
Figura 37 - Cromatograma por HPLC-PDA da fração MPLC-1 e respectivo UV. Coluna analítica Phenomenex [®] de C-18 (250 x 4,6 mm, 4µm e pré-coluna (4x3 mm, 5 µm), modelo Synergi Hydro [®] . Gradiente de 5-50% MeOH em 40 min. e isocrático de 50% MeOH por 20 min. Volume injetado 20 µL. Tempo total: 60 min., 270 nm...88	88
Figura 38 - Espectro de massas de primeira-ordem, em modo <i>full-scan</i> , da fração MPLC-1 (<i>m/z</i> 601) (Tc3) isolada da partição acetato de etila a 10 mg/mL da folhas de <i>Terminalia catappa</i> L. em modo negativo. Faixa de íons com <i>m/z</i> de 100-2000 Da. 89	89
Figura 39 - Espectro de massas de segunda-ordem do íon precursor em <i>m/z</i> 601(Tc3) (ácido galágico), obtido em modo negativo com energia de colisão de 30% e proposta de fragmentação.....	90
Figura 40 - Cromatograma por HPLC-PDA da fração MPLC-2 e respectivo UV. Coluna analítica Phenomenex [®] de C-18 (250 x 4,6 mm, 4µm e pré-coluna (4x3 mm, 5 µm), modelo Synergi Hydro [®] . Gradiente de 5-50% MeOH em 40 min. e isocrático de 50% MeOH por 20 min. Volume injetado 20 µL. Tempo total: 60 min., 270 nm...91	91

Figura 41 - Espectro de MS em modo <i>full-scan</i> da fração MPLC-2 (apigenina 8-C glicosilada) (Tc13) obtido em modo negativo. Faixa de íons com <i>m/z</i> de 100-2000 Da.....	92
Figura 42 - Espectro de massas da fração MPLC-2 (<i>full ms²</i>) do composto com <i>m/z</i> 583 (Tc13) em modo negativo e proposta de fragmentação.....	93
Figura 43 - Espectro de massas da fração MPLC-3 (<i>full ms²</i>) do composto com <i>m/z</i> 463 (Tc15) (ácido elágico hexosídeo) em modo negativo.....	94
Figura 44 - Cromatograma da partição H ₂ O: MeOH 8:2 (v/v) a 10,0 mg/mL das folhas de <i>T. catappa</i> indicando (pico 1) eluindo em <i>t_r</i> 18,6 min. e (pico 2) em <i>t_r</i> 24,7 min. e vazão de 1 mL/min. Método gradiente a 5-30% de MeOH durante 30 minutos a um vazão de 1 mL/min. Coluna Hydro. HPLC-PDA (Jasco ®), a 270 nm.	95
Figura 45 - Cromatograma do pico 1 coletado na partição H ₂ O:MeOH 8:2 (v/v) das folhas de <i>T.catappa</i> eluindo em <i>t_r</i> 15,2 min.(1a) e <i>t_r</i> 21,0 min (1b). Vazão de 1 mL/min.método gradiente de 5-30% de MeOH por 40 minutos em coluna Hydro. HPLC-PDA (Jasco ®), a 270 nm. Espectros do pico 1 na região de UV, eluindo em <i>t_r</i> 15,2 min. (1a) e em <i>t_r</i> 21,0 min. (1b), característico de anômeros da α e β punicalagina, respectivamente.	96
Figura 46 - Cromatograma do pico 2 coletado na partição H ₂ O: MeOH 8:2 (v/v) das folhas de <i>T. catappa</i> eluindo em <i>t_r</i> 15,8 min. (2a) e <i>t_r</i> 21,9 min. (2b), fluxo 1 mL/min. Método gradiente a 5-30% de MeOH por 40 minutos em coluna Hydro. HPLC-PDA (Jasco ®), a 270 nm. Espectros na região do UV do pico 2 eluindo em <i>t_r</i> 15,8 min (2a) e <i>t_r</i> 21,9 min (2b), característico de anômeros da α e β punicalagina, respectivamente.	96
Figura 47 - Cromatograma do pico 2 coletado na partição H ₂ O: MeOH 8:2 (v/v) das folhas de <i>T. catappa</i> eluindo em <i>t_r</i> 4,16 min. (2a) e <i>t_r</i> 4,31 min. (2b), vazão 1 mL/min. por LC-MS. Método gradiente MeOH:H ₂ O, coluna cromatográfica <i>Phenomenex C18-Hydro</i> (250 x 4,6 mm, 4 μm) a temperatura ambiente, fluxo de 1 mL. min ⁻¹ , volume de injeção de 10 μL. Espectros na região do UV do pico 2 eluindo em <i>t_r</i> 4,16 min (2a) e <i>t_r</i> 4,31 min (2b), característico de anômeros da α e β punicalagina.....	97
Figura 48 - Análise do pico 1 por LC-MS, obtido em modo negativo. Faixa de ions com <i>m/z</i> de 100-1500 Da.	98
Figura 49 - Análise do pico 2 por LC-MS, obtido em modo negativo. Faixa de ions com <i>m/z</i> de 100-1500 Da.	98
Figura 50 - RMN ¹ H da mistura de α e β-anômeros (pico 2) e ampliação da região dos carbonos anoméricos (11,7 T, CD ₃ OD- _d 4, TMS, δ, 300 MHz).....	103
Figura 51 - Espectro RMN ¹³ C de α e β punicalagina (11,7 T, CD ₃ OD- _d 4, TMS, δ, 300 MHz), (1) ampliação da região dos anoméricos e (2) carbonilas.	104
Figura 52 - Espectro RMN ¹ H na região dos aromáticos (δ = 6,51 – 6,96 ppm) (11,7 T, CD ₃ OD- _d 4, TMS, δ, 300 MHz).....	105
Figura 53 - Experimento gHSQC dos anômeros da punicalagina (11,7 T, CD ₃ OD- _d 4, TMS, δ, 300 MHz).	106
Figura 54 - Experimento gHSQC dos anômeros da punicalagina, expansão na região (F1) δ 3,9 a δ 5,3 (11,7 T, CD ₃ OD- _d 4, TMS, δ, 300 MHz).	107

Figura 55 - Experimento <i>g</i> HMBC dos anômeros da punicalagina (11,7 T, CD ₃ OD-d ₄ , TMS, δ, 300 MHz).....	107
Figura 56 - Experimento <i>g</i> HMBC dos anômeros da punicalagina, expansão da região (F1) δ 6,0 a δ 7,3 (CD ₃ OD, TMS, ppm).....	108
Figura 57 - Experimento <i>g</i> HMBC dos anômeros da punicalagina, expansão da região (F1) δ 4,50 a δ 5,30.....	108
Figura 58 - Correlações <i>g</i> HMBC do grupo HHDP dos hidrogênios aromáticos com carbonos aromáticos e com o grupo carbonila a J^{α} e a J^{β}	111
Figura 59 - Correlações <i>g</i> HMBC dos hidrogênios aromáticos com carbonos aromáticos e carbonílicos no grupo tetrafenila a J^{α} e a J^{β}	111
Figura 60 - Espectro de RMN de ¹ H da substância ácido galágico (MPLC-1) (11,7 T, DMSO-d ₆ , TMS, δ, 300 MHz).....	112
Figura 61 - Espectro <i>g</i> HSQC da substância MPLC-1, ácido galágico, (11,7 T, DMSO-d ₆ , TMS, δ, 300 MHz). Indicação do hidrogênio aromático.....	113
Figura 62 - Espectro de <i>g</i> HMBC da substância MPLC-1, ácido galágico, (11,7 T, DMSO-d ₆ , TMS, δ, 300 MHz). Indicação do hidrogênio aromático.....	113
Figura 63 - Espectro de RMN ¹ H do composto isolado (MPLC-2), apigenina 8-C-(2''-galoil)-β- <i>D</i> -glicopiranosil, (11,7 T, CD ₃ OD-d ₄ , TMS, δ, 300 MHz).....	116
Figura 64 - Mapa de contorno <i>g</i> HSQC (MPLC-2). (11,7 T, CD ₃ OD-d ₄ , TMS, δ, 300 MHz).....	117
Figura 65 - Mapa de contorno <i>g</i> HMBC do composto isolado da fração MPLC-2 (ampliação da região entre 5,22 a 8,6 ppm). (11,7 T, CD ₃ OD-d ₄ , TMS, δ, 300 MHz).....	118
Figura 66 - Constituintes eletrônicos de um detector de DC para HPLC.....	119
Figura 67 - Estruturas de (<i>R</i>)-HHDP e (<i>S</i>)-HHDP.....	122
Figura 68 - Regras de prioridade de Cahn-Ingold-Prelog.....	123
Figura 69 - Espectro de dicroísmo circular (DC) da punicalagina (pico 1).....	126
Figura 70 - Espectro de dicroísmo circular (DC) da punicalagina (pico 2).....	127
Figura 71 - Espectro de dicroísmo circular (DC) do composto isolado da fração MPLC-2.....	128
Figura 72 - Flavonas 6-C e 8-C-glicosiladas.....	130
Figura 73 - Curvas analíticas obtidas pelo método da calibração externa a partir de injeções em triplicata de soluções padrão de ácido elágico e anômeros da punicalagina (picos 1 e 2).....	133
Figura 74 - Curvas analíticas obtidas pelo método da calibração externa a partir de injeções em triplicata de solução padrão de ácido gálico e galato de metila.....	134
Figura 75 - Curvas analíticas obtidas pelo método da calibração externa a partir de injeções em triplicata de solução padrão de ácido galágico e Apigenina.....	134
Figura 76 - Avaliação do efeito gastroprotetor da fração hexânica (Hex) nas doses de 25, 50 e 100 mg/Kg no modelo de úlcera induzida por etanol em ratos. Os resultados estão expressos na forma de média ± erro padrão da média. ANOVA com teste posteriori de Dunnet com * <i>p</i> <0.05 e ** <i>p</i> <0,01.....	143
Figura 77 - Avaliação do efeito gastroprotetor da fração aquosa (Aq) nas doses de 25, 50 e 100 mg/Kg no modelo de úlcera induzida por etanol em ratos. Os resultados	

estão expressos na forma de média ± erro padrão da média. ANOVA com teste posteriori de Dunnet com Dunnet com *p<0.05 e **p<0,01.....	143
Figura 78 - Avaliação do efeito gastroprotetor da fração aquosa (Aq) nas doses de 12,5 e 25 mg/Kg no modelo de úlcera induzida por etanol em ratos. Os resultados estão expressos na forma de média ± erro padrão da média. ANOVA com teste posteriori de Dunnet com *p<0.05 e **p<0,01.	143
Figura 79 - Avaliação do efeito gastroprotetor da fração acetato (Act) nas doses de 25, 50 e 100 mg/Kg no modelo de úlcera induzida por etanol em ratos.....	144
Figura 80 - Avaliação do efeito gastroprotetor da fração acetato na dose de 100 mg/Kg no modelo de úlcera induzida por etanol em ratos. Os resultados estão expressos na forma de média ± erro padrão da média. ANOVA com teste posteriori de Dunnet com **p<0,01.	144
Figura 81 - Reação de redução de DPPH. No detalhe, imagem de uma placa que ilustra a coloração do DPPH antes (violeta) e após a redução (amarelo).	147
Figura 82 - Principais características para a captura de radicais livres.	148
Figura 83 - Anel do flavonóide entra em ressonância para a estabilização do radical livre.....	149
Figura 84 - Porcentagem de inibição de DPPH do extrato bruto, fração acetato de etila, infusão, punicalagina, (MP1) ácido galágico, (MP2) Apigenina 8-C-(2''-galoil)-β-D-glicopiranosil de folhas de <i>T. catappa</i> e dos padrões quercetina e ácido gálico.	150
Figura 85 - Modelo hipotético do mecanismo de captura de hidrogênio radicalar da punicalagina pelo radical DPPH (Adaptado de KULKARNI <i>et al</i> , 2004).	152
Figura 86 - Reação do ácido gálico com molibdênio, componente reagente de <i>Folin-Ciocalteau</i>	153
Figura 87 - Curva de calibração de ácido gálico obtida pelo método de Folin-Ciocalteau.	154
Figura 88 - Formação do complexo Flavonoide-Al, em solução metanólica de cloreto de alumínio.	155
Figura 89 - Curva de calibração de quercetina obtida por reação de complexação com AlCl ₃	155
Figura 90 - Gráficos de colunas comparativos dos teores de fenóis totais, flavonoides totais e IC ₅₀ de extrato Bruto, Fração Acetato, Infusão, Punicalagina, Ácido Galágico e Apigenina de <i>T. catappa</i>	157

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação científica de <i>Terminalia catappa</i> L.	32
Tabela 2 - Substâncias encontradas em extratos hidroalcoólico, etanólico e fração aquosa de folhas de <i>T. catappa</i> em análises por FIA-ESI-IT-MS/MS.	99
Tabela 3 - Deslocamentos químicos (^1H e ^{13}C) de α e β -punicalagina em $\text{CD}_3\text{OD-d}_4$, 300 MHz.	109
Tabela 4 - Dados RMN ^1H e ^{13}C do flavonóide galoilado <i>T. catappa</i> ($\text{CD}_3\text{OD-d}_4$, δ) comparados a dados da literatura (em DMSO-d_6).	115
Tabela 5 - Dados do espectro de dicroísmo circular obtidos para os picos 1 e 2 (anômeros da α e β punicalagina).....	127
Tabela 6 - Efeitos Cottons (EC) do composto Apigenina 8-C-(2''-galoil)- β -D-glicopiranosil.....	128
Tabela 7 - Dados obtidos a partir da regressão linear das curvas de calibração....	135
Tabela 8 - Determinação da exatidão do método (teste de recuperação) para a determinação de cada uma das substâncias quantificadas.	135
Tabela 9 - Determinação da precisão do método (estudos de repetibilidade e precisão intermediárias) para a determinação de cada uma das substâncias quantificadas.	136
Tabela 10 - Concentração (mg.g^{-1}) e teor (%) de substâncias quantificadas no extrato hidroalcoólico, etanólico, infusão e fração aquosa das folhas de <i>T. catappa</i>	137
Tabela 11 - Atividade mutagênica expressa como a média e desvio-padrão do número de revertentes/placa e índice de mutagênico (entre parênteses) em cepas de <i>Salmonella typhimurium</i> TA98, TA100, TA97 e TA102 tratadas com extrato etanólico de <i>T. catappa</i> , em várias doses, com (+ S9) ou sem (-S9) ativação metabólica.....	141
Tabela 12 - Resultados da atividade antirradicalar (IC50) de extratos, infusão e substâncias isoladas de <i>T. catappa</i> e padrões (quercetina e ácido gálico).....	149
Tabela 13 - Teores de fenóis totais no extrato hidroalcoólico, fração acetato de etila e infusão de folhas de <i>T. catappa</i> , acompanhados do desvio padrão relativo.	154
Tabela 14 - Teores de flavonóides em extrato bruto, fração acetato, infusão e substâncias isoladas.	156

LISTA DE QUADROS

Quadro 1- Espécies <i>Terminalia</i> estudadas e suas respectivas atividades biológicas.	29
Quadro 2 - Principais substâncias encontradas em extratos das folhas de <i>T. catappa</i>	35
Quadro 3 - Estudos químicos e biológicos realizados com os extratos de <i>T. catappa</i>	37
Quadro 4 - Posição de grupos HHDP em taninos hidrolizáveis: (1) Carbono do núcleo glicopiranosose ligado ao resíduo HHDP; (2) Conformação.	125

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ACN	Acetonitrila
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
<i>d</i>	Dupleto
<i>dd</i>	Duplo dupleto
DMSO d_6	Dimetilsulfóxido deuterado
DPPH	1,1-difenil-1-picril-hidrazila
DPR	Desvio Padrão Relativo
EtOH	Etanol
FIA-ESI-IT-MS ⁿ	<i>Flow Injection Analysis-Electrospray-Ion Trap-Tandem Mass spectrometry</i>
<i>g</i> HMBC	<i>Gradient heteronuclear multiple bond correlations</i>
<i>g</i> HSQC	<i>Gradient heteronuclear through multiple quantum coherence</i>
HPLC-PDA	<i>High performance liquid chromatography-Diode array detector</i>
HPLC-ESI-IT-MS/MS	<i>High performance liquid chromatography-Electrospray-Ion Trap-Tandem Mass spectrometry</i>
HPLC-ESI-QTRAP-	<i>High performance liquid chromatography-Electrospray-Quadrupole</i>
MPLC	<i>Medium Performance Liquid Chromatography</i>
MS	<i>Mass Spectrometry</i>
<i>J</i>	Constante de acoplamento
LOD	Limite de Detecção
LOQ	Limite de Quantificação
<i>m</i>	Multiplete
<i>m/v</i>	Relação massa/volume
<i>m/z</i>	Relação massa/carga
MeOH	Metanol
PTFE	Polytetrafluoroethylene
RMN de ^{13}C	Ressonância magnética nuclear de carbono-13
RMN de ^1H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
C18	Reverse phase 18
<i>s</i>	Singleto

TFA	Ácido trifluoracético
t_R	Tempo de retenção
UV	Ultravioleta
v/v	Relação volume/volume
Δ	Deslocamento químico
λ	Comprimento de onda

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	25
1.1 A Família Combretaceae.....	28
1.2 <i>Terminalia catappa</i> L. (Combretaceae)	30
1.3 Constituintes químicos em <i>Terminalia catappa</i> L.	32
1.4 Validação de Métodos Analíticos	40
2 OBJETIVOS	43
3 MATERIAIS E MÉTODOS	44
3.1 Material Vegetal	44
3.2 Etapa Farmacognóstica.....	44
3.2.1 Secagem e moagem.....	44
3.2.2 Preparo do extrato hidroalcoólico	44
3.3.2 Preparação do extrato etanólico	45
3.3.3 Preparação da infusão.....	45
3.3.4 Partições.....	45
3.3.5 <i>Clean-up</i> para análises por HPLC e FIA.....	46
3.3.6 <i>Fingerprint</i> do extrato hidroalcoólico, etanólico e frações por HPLC-PDA....	46
3.3.7 Fracionamento da fração acetato de etila por <i>Medium Performance Liquid Chromatography</i> (Cromatografia Líquida de Média Pressão - MPLC)	47
3.3.8 Isolamento dos anômeros da punicalagina por HPLC preparativo	47
3.3.9 Experimento de co-injeção do padrão ácido elágico, ácido gálico e galato de metila	48
3.3.10 Análise dos anômeros da punicalagina por HPLC-ESI-MS	48
3.3.11 Análise do extrato hidroalcoólico, etanólico e frações por FIA-ESI-IT-MS..	48
3.3.12 Identificação das substâncias por Ressonância Magnética Nuclear	49
3.3.13 Análise de substâncias isoladas por dicróismo circular (CD)	49
3.3.14 Quantificação por HPLC-PDA.....	50
3.3.15 Ensaio de Mutagenicidade.....	53
3.3.16 Avaliação atividade antiulcerogênica.....	55
3.3.17 Avaliação do potencial antirradicalar, fenóis totais e flavonoides totais do extrato hidroalcoólico, fração acetato de etila, punicalagina, infusão, ácido galágico e apigenina 8-C-(2''-galoil)- β -D-glicopiranosil das folhas de <i>T. catappa</i>	56

3.3.18 Fluxograma geral da metodologia empregada na análise de extratos e frações das folhas de <i>T. catappa</i>	59
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	60
4.1 Comparações entre os extratos hidroalcoólico, etanólico, frações aquosas e infusão das folhas de <i>T. catappa</i> por HPLC-PDA	60
4.2 Confirmação da presença do ácido elágico, ácido gálico e galato de metila por experimentos de co-injeção de padrão	64
4.3 Análises do extrato hidroalcoólico, etanólico e fração aquosa por FIA-ESI-IT-MS/MS	67
4.4 Análises das frações MPLC-1, MPLC-2 e MPLC-3 por UV e FIA-ESI-IT-MS/MS87	
4.5 Estudo da fração hidrometanólica obtida a partir do extrato hidroalcoólico (partição líquido-líquido – LLE) por HPLC-PDA e análise por HPLC-ESI-MS.....	95
4.6 Análise das substâncias isoladas da fração hidrometanólica proveniente do extrato hidroalcoólico por RMN	100
4.6.1 Análise dos anômeros da punicalagina por RMN ¹ H, RMN ¹³ C, gHSQC e gHMBC	100
4.6.2 Identificação da substância isolada da fração MPLC-1(ácido galágico) por RMN ¹ H, gHSQC e gHMBC	111
4.6.3 Identificação da Substância MPLC-2 (Apigenina 8-C-(2''-galoil)-β-D-glicopiranosil) por RMN.....	114
4.7 Estudo da configuração absoluta de substâncias isoladas do extrato hidroalcoólico das folhas de <i>T. catappa</i> por técnica de dicroísmo circular (DC).	119
4.7.1 Estabelecimento da configuração absoluta dos anômeros da punicalagina.	119
4.7.2 Análise do composto isolado da fração MPLC-2 por Dicroísmo Circular (DC).	128
4.8 Quantificação de substâncias presentes nos extratos hidroalcoólico, etanólico, (frações acetato de etila e aquosa) e infusão das folhas de <i>T. catappa</i> por HPLC-PDA.....	130
4.9 Avaliação da atividade mutagênica do extrato hidroalcoólico	138
4.10 Avaliação da atividade antiulcerogênica do extrato etanólico (EtOH) das folhas de <i>T. catappa</i> L.	142
4.11 Avaliação da Atividade Antirradicalar	147
4.12 Determinação de Fenóis Totais.....	153

4.13 Determinação do Teor de Flavonóides Totais.....	154
5 CONCLUSÕES	158
REFERÊNCIAS.....	160

1 INTRODUÇÃO

Plantas medicinais vêm sendo utilizadas por um público cada vez maior e recebendo incentivo da própria Organização Mundial da Saúde, que recomendou aos países membros que desenvolvessem pesquisas visando o uso da flora com propósitos terapêuticos (CASTRO et al., 2004). Assim, o uso de plantas para fins medicinais tem renovado e provocado interesse pelo conhecimento das características das drogas delas originadas, incluindo sua morfologia, composição química, propriedades farmacológicas, dentre outras (ARGENTA et al., 2011). A ação farmacológica e a eficácia terapêutica de muitas plantas medicinais já foram comprovadas por meio de testes pré-clínicos e clínicos cujos resultados já foram objeto de muitos trabalhos publicados em periódicos especializados (CASTRO et al., 2004).

Dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) indicam que cerca de 80% da população de países em desenvolvimento faz uso de práticas tradicionais na atenção primária à saúde e destes, 85% empregam plantas medicinais para tratamento de diversas enfermidades (ROSA et al., 2011). Esta situação é semelhante no Brasil, sendo que o uso de plantas medicinais, muitas vezes, é o único recurso terapêutico de inúmeras comunidades e grupos étnicos (GONÇALVES et al., 2011).

O Brasil tem quase um terço da flora mundial representada em dez biomas com uma biodiversidade exuberante. No entanto, muito pouco tem sido realizado para transformar este potencial em vantagens visando à inserção social e a proteção e manutenção desses ecossistemas (GOTTLIEB et al., 1996, VILLAS BOAS & GADELHA, 2007; ALMEIDA & SCHEFFER, 2012).

Existe consenso a respeito da insuficiência de estudos científicos acerca da flora nacional, mesmo sendo essa extremamente rica e vastamente utilizada pela população do país. Estima-se que apenas 0,4% das pesquisas científicas envolvam a flora nacional (AMARAL et al., 2006).

O Brasil é um país de dimensões continentais e o uso de plantas medicinais como fonte de medicamentos é uma tradição e uma tendência generalizada na medicina popular das diferentes regiões brasileiras. O consumo de plantas medicinais tem contribuído significativamente também para o uso de medicamentos fitoterápicos. Contudo, o uso de fitopreparações de modo inadequado pode causar sérios danos à saúde. Os conhecimentos acumulados ao longo do tempo demonstram que tais produtos indicam que o mito de que o “natural” não faz mal deve ser reavaliado com cautela. Relatos da literatura mostram que mais de 1,5 bilhões de pessoas no mundo todo fazem uso de plantas medicinais. No entanto, com o crescimento da parcela da população que utiliza essas preparações, tem havido, também, um incremento nos relatos de reações adversas (LI et al., 2011).

As indústrias farmacêuticas utilizam as plantas medicinais como fonte de novos recursos terapêuticos e, a partir dessas, desenvolvem os medicamentos (SCHENKEL et al., 2002). A procura por novos fármacos passou a ser um grande desafio para a indústria farmacêutica. Pesquisas para descoberta de protótipos de fármacos, propiciam além do avanço da pesquisa, o desenvolvimento tecnológico do país (FERREIRA et al., 2011). Deste modo, produtos naturais como fonte de novas moléculas combinados com metodologias sintéticas e manipulação de caminhos biossintéticos continuarão sendo a melhor fonte para a descoberta e desenvolvimento de medicamentos (CRAGG & NEWMAN, 2012).

Centros de pesquisa especializados passaram a isolar e sintetizar as substâncias responsáveis pelos princípios ativos das plantas medicinais de uso popular para produzir novos fármacos. Na procura por estes fármacos, as indústrias farmacêuticas estão investindo maciçamente em sistemas de “screening” de alta escala, em síntese por química combinatória, em inventários automatizados de compostos. A contribuição de estudos de correlação entre estrutura e atividade biológica, seguindo a química medicinal clássica (via modificação estrutural ou síntese de análogos), também pode dar sua contribuição à química medicinal ao determinar quais são os principais fatores envolvidos na atividade de moléculas de interesse (YUNES & CALIXTO, 2001). Porém, é necessário observar que cada planta é constituída de inúmeros princípios ativos que podem agir em sinergia, ou seja, o resultado do conjunto é, muitas vezes, mais potente e com menos efeitos colaterais do que cada princípio ativo isolado. Desse modo, os tratamentos à base

de fitoterápicos têm demonstrado cada vez mais a sua eficácia, mas como qualquer outro tipo de tratamento, requer, antes, uma análise criteriosa da sua composição química, uma vez que muitas das plantas consumidas pela população não possui essas informações, principalmente estudos sobre suas atividades farmacológica e toxicológica (ARCOLINE, 2003).

É importante destacar que mesmo plantas medicinais com atividades biológicas confirmadas através de estudos químico-farmacológicos precisam ser avaliadas quanto a sua segurança e eficácia, incluindo a dosagem que deve ser ingerida dessas fitopreparações. É extremamente importante que o fabricante apresente a concentração do princípio ativo em cada preparação, uma vez que uma dose muito pequena pode não surtir efeito algum ou, pelo contrário, uma dose maior pode induzir interações perigosas com o organismo (LI et al., 2011).

A fim de garantir a qualidade de um extrato, é necessário isolar um componente desse extrato que seja quantificável, estabelecendo-se, depois, a variação admissível desse componente. Assim, os diversos lotes terão uma composição qualitativa e quantitativa semelhante (RIBEIRO, 2000).

A legislação brasileira exige que, para o registro de um fitoterápico, se faça a padronização dos extratos, procedendo simultaneamente com as análises quali e quantitativa do material vegetal, e que seja especificado o teor de uma substância ou de um grupo de substâncias denominadas marcadores (Anvisa, RDC nº 48, 2004). A fim de atender às exigências atuais, pode-se utilizar técnicas cromatográficas hífenadas, tais como HPLC-PDA e espectrometria de massas em tandem (MS/MS). Essas, por sua vez, permitem uma rápida tipificação da composição da matriz vegetal estudada através dos tempos de retenção e/ou propriedades espectrométricas, todas associadas às características intrínsecas de cada substância, como polaridade, massa molecular, entre outros (SNYDER et al, 2010; ARDREY, 2003; RODRIGUES, 2007).

A identificação e a quantificação de compostos desconhecidos em diferentes matrizes biológicas é uma tarefa desafiadora, por necessitar de uma seleção que abrange, muitas vezes, reagentes tóxicos para alcançar um resultado válido e confiável (BASTOS et al., 2013) . Com essa finalidade, a técnica de HPLC-PDA oferece muitas vantagens em termos de sensibilidade, rapidez, seletividade e

robustez, com uma aplicação versátil e grande potencial quantitativo (LAMBERT et al., 1997).

1.1 A Família Combretaceae

A Família Combretaceae possui distribuição predominantemente pantropical, sendo que, no Brasil, ocorrem cinco gêneros nativos (*Buchenavia*, *Combretum*, *Conocarpus*, *Terminalia* e *Thiloa*), com aproximadamente 60 espécies, e dois exóticos (*Bucida* e *Quisqualis*) (BATISTA, 2011.; SOUZA & LORENZI, 2005).

Essa Família abrange cerca de 20 gêneros e, aproximadamente, 475 espécies difundidas nas regiões tropicais. Essas espécies possuem características evolutivas avançadas, ocorrendo em diversos biomas, incluindo os ambientes especiais, como mangues e regiões áridas (BARROSO, 1991).

Em países dos continentes Africano e Asiático, muitas espécies da Família Combretaceae são usadas na medicina popular para combater diversas doenças, destacando-se o tratamento de dores lombares, dor de cabeça, resfriados, febre, infertilidade feminina, doenças cardíacas, picadas de cobras e escorpiões e para purificação do sistema urinário (MASOKO & ELOFF, 2005b).

Uma das atividades mais estudadas para as espécies do Gênero *Terminalia* é a antifúngica (BABA-MOUSSA et al, 1999). Extratos alcoólicos de folhas de *T. avennioides* e *T. mollis* apresentaram essa atividade. Batawila et al., 2005, estudando os extratos de folhas, raízes e caules de *T. prunioides*, *T. brachystemma*, *T. sericea*, *T. gazensis*, *T. mollis*, *T. sambesica* e Masoko e Eloff (2005b), estudando as folhas de *T. prunioides*, *T. brachystemma*, *T. sericea*, *T. gazensis*, *T. mollis*, *T. sambesica*, verificaram que todos os extratos avaliados mostraram-se ativos frente às cepas testadas.

Estudos revelaram, também, que duas espécies do gênero *Terminalia* (*T. kaiserana*, *T. sericea*) usadas na Tanzânia e em outros países africanos no tratamento de doenças como gonorréia, sífilis, diarreia, hipertensão e câncer demonstraram, também, atividade antibacteriana (FYHRQUIST et al., 2002).

Outras espécies como *T. laxiflora*, *T. glaucescens* e *T. macroptera* são, também, utilizadas pela população togolesa no tratamento de infecções fúngicas,

tais como dermatoses, micoses e também são indicadas contra outros males, como hipertensão, problemas gástricos, malária, eczema, astenia, gonorréia, hanseníase e tuberculose (BATAWILA et al., 2005). No Brasil, *T. brasiliensis* é conhecida popularmente como amêndoa-brava, cerne-amarelo, capitão-do-campo, entre outras e é usada no tratamento de barriga inchada e disenteria (ARAÚJO & CHAVES, 2005). O óleo extraído dos frutos de *Terminalia behuria* foi analisado quanto à potencialidade como óleo comestível e o subproduto (torta) para produção de biofertilizante quando foi detectada a presença de taninos (BERA et al., 2007). Os taninos detectados em *T. brasiliensis* e *T. behuria* possuem atividades antioxidante, antibacteriana e antifúngica, mostrando, assim, a importância desta planta para a indústria alimentícia e para a agricultura. A literatura aponta uma série de outras atividades biológicas para espécies do gênero *Terminalia*, que estão descritas no Quadro 1.

Quadro 1- Espécies de *Terminalia* estudadas e suas respectivas atividades biológicas.

Espécie	Atividade	Referência
<i>T. catappa</i>	Antioxidante; hepatoprotetora; antidiabética; anticâncer	CHYAU; KO; MAU, 2006; KINOSHITA et al., 2007; NAGAPPA et al., 2003, CHU et al., 1993; MANDLOI, 2013.
<i>T. arjuna</i>	Anticâncer; desordens cardiovasculares; citotóxica; antiviral (herpes tipo 2)	KANDIL; NASSAR, 1997; DWIVEDI, 2007; SAXENA et al., 2007; CHENG; LIN; LIN, 2002; EL –AMEEN et al., 2013; MANDLOI, 2013.
<i>T. macroptera</i>	Antimicrobiana, anti helmíntica	CONRAD et al., 1998; SILVA et al., 1997
<i>T. sericea</i>	Antifúngica, antibacteriana e citotóxica; antiinflamatória	MOSHI; MBWAMBO, 2005; ELDEEN et al., 2006; MOCHIZUKI; HASEGAWA, 2007
<i>T. superba</i>	Imunossupressiva	TABOPDA, et al., 2008
<i>T. chebula</i>	Antianafilática	SHIN et al., 2001
<i>T. chebula</i> e <i>T. bellerica</i>	Hipolipidêmica	SARAVANAN et al., 2007
<i>T. avicennioids</i>	Tripanocida	BIZIMANA et al., 2006
<i>T. horrida</i>	Anti-HIV	MEKKAWY et al, 1995
<i>T. mantaly</i>	Antibacteriana	KOKORA et al., 2013
<i>T. littoralis</i>	Redutora LDL	IBEGBULEM et al., 2013.
<i>T. fagifolia</i>	Citotóxica e antioxidante	AYRES et al., 2009
<i>T. brachystemma</i>	Antifúngica	LIU et al., 2009

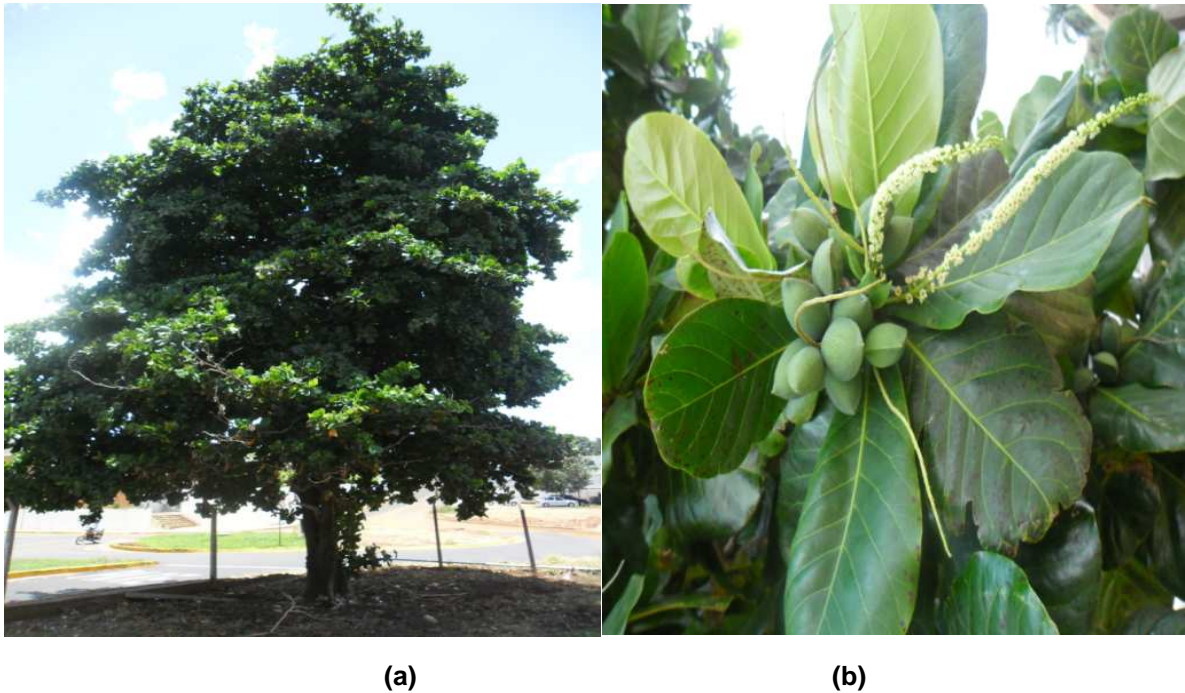
1.2 *Terminalia catappa* L. (Combretaceae)

Terminalia catappa Linn (da Família Combretaceae) cresce em regiões tropicais e subtropicais, particularmente localizadas em áreas costeiras. Essa espécie é nativa de áreas próximas a regiões costeiras do Oceano Índico, na Ásia tropical, e da região que compreende várias ilhas a oeste do Oceano Pacífico, como Malásia, Indonésia e ilhas da região da Melanésia. Como consequência da migração humana, essa árvore foi introduzida e naturalizada, principalmente próximo ao litoral, em muitos países tropicais do mundo, incluindo o Brasil. Suas árvores são bastante conhecidas pela vasta sombra que proporcionam ao longo das praias da costa brasileira (THOMSON & EVANS, 2006).

A espécie *T. catappa*, originária da Índia, já era bastante comum nas praias do Brasil logo após o primeiro século da chegada dos europeus. Supõe-se que suas sementes tenham chegado misturadas às areias tomadas na Ásia e utilizadas como lastro nos navios portugueses. Por ser uma árvore típica de regiões marítimas, suas sementes suportam longos períodos de imersão nas águas da maré, onde permanecem até serem jogadas à beira da praia. Sendo de fácil germinação, essa espécie disseminou-se pela ampla costa brasileira e seu interior também. No Brasil, recebe os seguintes nomes populares: amendoeira, amendoeira-da-praia, amendoeira-da-índia, guarda-sol, chapéu-de-sol e castanhola (THOMSON & EVANS, 2006).

Trata-se de uma árvore decídua, de 6-12 m de altura, podendo chegar até 20 m nas regiões de origem (Figura 1a). Possui copa muito característica em formato piramidal, porém, com os ramos secundários dispostos horizontalmente em verticilos ao longo do tronco principal, dando a impressão de camadas. O tronco é curto e canelado, com casca áspera de cor acinzentada. Apresenta folhas coriáceas (Figura 1b), simples, com nervuras bem visíveis, de 20-30 cm de comprimento, concentradas na extremidade dos ramos e que adquirem coloração amarelada ou avermelhada antes de caírem. Suas flores são pouco vistosas de cor branco-esverdeada, dispostas em inflorescências unissexuais, porém, ambos os sexos são localizadas no mesmo ramo (TEIXEIRA, 2010).

Figura 1 - Aspecto geral da árvore de *Terminalia catappa* L. (a); folhas e frutos verdes de *Terminalia catappa* L. (b)



Fonte: próprio autor.

As árvores perdem totalmente as folhas até duas vezes ao ano em algumas regiões. É uma planta tolerante a ambientes salinos, como praias e restingas, razão pela qual se tornou uma excelente opção de árvore de sombreamento em beira de praias, sendo encontrada de norte a sul do país. Apesar da tolerância à salinidade, é capaz de prosperar com o mesmo vigor em solo argiloso (INSTITUTO PLANTARUM, 2005).

Os frutos (Figura 1b) são drupas elipsóides bi-anguladas, de 3-5 cm de comprimento, de cor amarela quando maduros, com polpa carnosa, contendo em seu interior uma semente (castanha) arredondada e rica em óleo, envolvida por uma casca muito dura (Figura 1b) (INSTITUTO PLANTARUM, 2005). São muito procurados por morcegos, que fazem o papel de disseminadores de suas sementes (INSTITUTO PLANTARUM, 2005).

A classificação científica da planta está indicada na Tabela 1.

Tabela 1 - Classificação científica de *Terminalia catappa* L.

Reino	Plantae
Subreino	Tracheobionta
Superdivisão	Spermatophyta
Divisão	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Subclasse	Asteridae
Ordem	Lamiales
Família	Combretaceae
Gênero	Terminalia
Espécie	<i>Terminalia catappa</i>

Fonte: JAGESSAR & ALLEN, 2012.

1.3 Constituintes químicos em *Terminalia catappa* L.

Punicalagina (anômeros α e β) são os compostos majoritários no extrato EtOH e na infusão das folhas de *T. catappa*. São polifenóis de alta massa molar (MM = 1084) relatados, também, em suco de romã (*Punica granatum* L.) (CHEN et al., 2000).

Taninos são extensivamente usados na medicina por causa de suas propriedades adstringentes; eles reagem com as proteínas das camadas de tecidos, precipitam micro-proteínas no tratamento de úlceras pépticas. Formam uma película protetora que previne a absorção de substâncias tóxicas, promovendo resistência para ação de enzimas proteolíticas, associadas com o metabolismo de *Helicobacter pylori* (VASCONCELOS et al., 2008).

Os taninos punicalagina e punicalina contêm ambos o grupo galagil e foram, primeiramente, isolados de pericarpos de romã, sendo também um componente característico de outras espécies de *Terminalia*. Esse fato indica a hipótese de que Punicaceae é quimiotaxonomicamente próxima a Combretaceae (CRONQUIST, 1988).

O tanino elágico punicalagina tem demonstrado marcantes atividades farmacológicas, tais como atividade antioxidante (LIN et al., 2001 e LIN et al., 1997); (AQIL, 2012), antígeno tóxica (CHEN et al., 2000, CHEN, 2006), antiinflamatória (LIN et al., 1999) e hepatoprotetora (LIN et al., 2001 e LIN et al., 1997), inibição do

vírus da herpes simplex-1 (HSV-1) (LIN et al., 2011), antitumoral (MEET et al., 2005; MATSUURA et al., 1999; ZAHIN et al., 2014, VILADOMIU et al., 2013).

Um estudo da toxicidade de punicalagina revelou que a administração oral de altas doses (6% de punicalagina em suco de romã), repetidas vezes, em ratos (37 dias) mostrou-se não tóxica (CERDA et al., 2003). Um estudo da biodisponibilidade de punicalagina em ratos mostrou que a substância e seus metabólitos foram encontrados nas fezes e urina e também no plasma (CERDA et al., 2003), mas o mecanismo da absorção intestinal de punicalagina não é conhecido.

Estudos demonstram que polifenóis como a punicalagina inibem o crescimento celular e induz a apoptose. Estudos realizados com ratos implantados com linhagem celular (PC-3) de câncer de próstata mostraram que a diminuição do crescimento celular ocorre pela modulação de proteínas que regulam a apoptose (MALIK & MUKHTAR, 2006; MALIK et al., 2005).

Estudos mostraram, também, que extratos aquosos de folhas de *T. catappa* podem, efetivamente, suprimir hepatotoxicidade induzida por CCl_4 (LIN et al., 1997; TANG et al., 2003) e genotoxicidade induzida por bleomicina em células de ovário de hamster Chinês. O efeito anti-mutagênico de punicalagina presente em extratos etanólicos foi testado em relação à bleomicina por tratamento prévio com 0,05, 0,1, 0,5 e $1,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de punicalagina por 24 h. Com o pré-tratamento com $1,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de punicalagina, a frequência de mutação induzida por bleomicina diminuiu significativamente (CHEN et al, 2000).

Outros estudos mostram que o extrato etanólico das folhas de *T. catappa* contém muitos metabólitos ativos (FAN et al., 2004) e alta atividade antiinflamatória, quando comparado com o extrato aquoso (GAO et al., 2004).

YANG (2010) e colaboradores mostraram que o extrato etanólico de *T. catappa* exerceu efeito inibitório em várias etapas da metástase de câncer oral, incluindo invasão celular e migração através da regulação da atividade metastática associada a proteases e seus inibidores naturais. Essas evidências, segundo os autores, indicam que o extrato etanólico pode ser um poderoso candidato para o desenvolvimento de agentes preventivos à metástese (YANG et al., 2010).

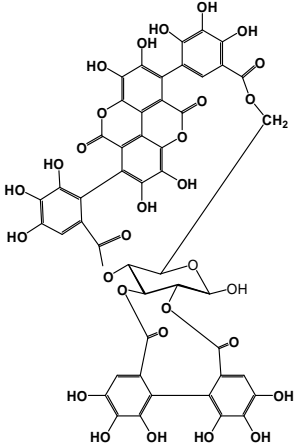
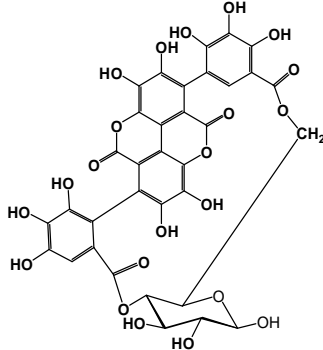
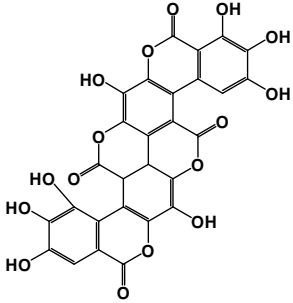
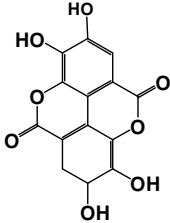
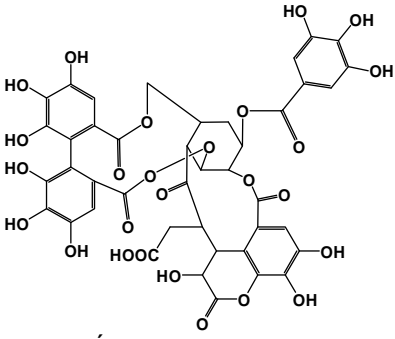
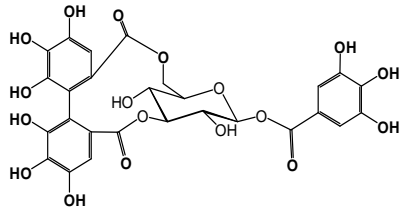
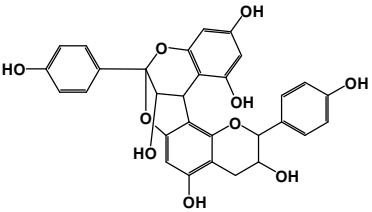
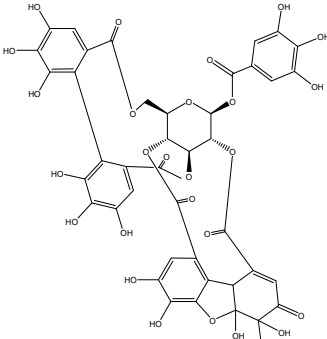
A atividade anti-proliferativa de punicalagina foi avaliada por Aqil (2012) e colaboradores contra várias linhagens de células cancerosas, tais como câncer de pulmão (A 549 e H 1299), câncer de mama (MCF 7) e câncer cervical (CaSKi, Hela e SiHa). Punicalagina demonstrou efeito inibitório contra todas as linhagens de células testadas de maneira dose-dependente. De acordo com esse estudo, as linhagens de câncer pulmonar foram as mais sensíveis à punicalagina. Células de câncer cervical (SiHa) foram mais resistentes. As concentrações inibitórias (IC₅₀) de punicalagina contra várias linhagens de células tumorais seguiram a seguinte ordem ascendente: A 549 (50,1 µg.mL⁻¹), H 1299 (55,8 µg.mL⁻¹), Caski (67,0 µg.mL⁻¹), HeLa (77,0 µg.mL⁻¹), MCF7 (125,6 µg.mL⁻¹) e SiHa (> 200,0 µg.mL⁻¹) (AQIL, 2012).

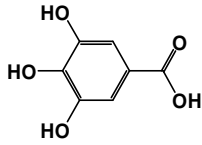
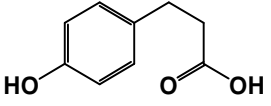
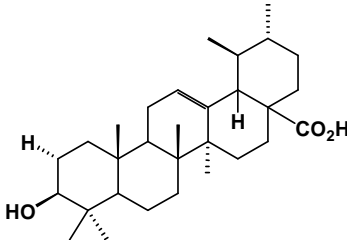
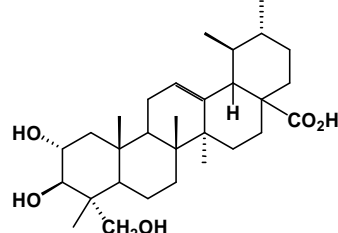
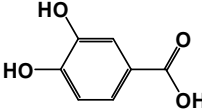
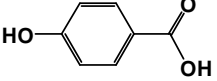
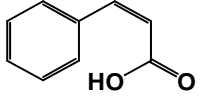
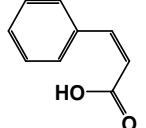
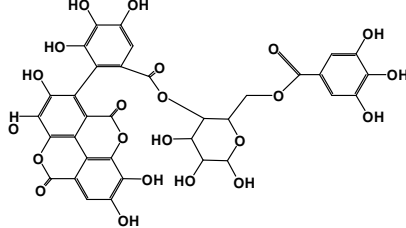
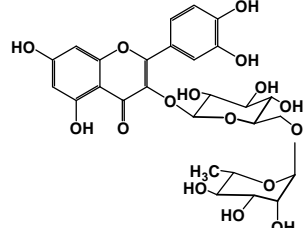
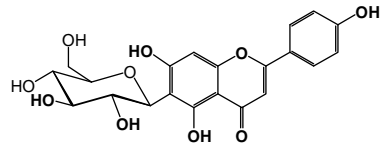
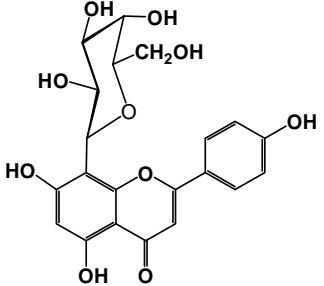
Zahin et al. (2014) isolaram punicalagina do extrato aquoso de *Punica granatum* com 97% de pureza por HPLC-UV e avaliaram a mutagenicidade deste composto. Os resultados indicaram um profundo efeito antiproliferativo em células de câncer pulmonar (ZAHIN et al., 2014).

Além dos anômeros da punicalagina, outras substâncias foram isoladas e identificadas a partir dos extratos de *T. catappa*, tais como alguns ácidos fenólicos, o ácido ursólico, o ácido 2 α ,3 β ,23-triidroxiurs-12-en-28-óico e o derivado do ácido ursólico (CHYAU et al., 2006; FAN et al., 2004), além de flavonoides e seus glicosídeos (LIN et al., 2000).

No Quadro 2 abaixo, encontramos as estruturas dos principais compostos presentes nos extratos das folhas de *T. catappa* L. descritos na literatura (ANGEL et al., 2003; ANNEGOWDA, 2010).

Quadro 2 - Principais substâncias encontradas em extratos das folhas de *T. catappa*.

 <p>Punicalagina</p>	 <p>Punicalina</p>	 <p>Ácido galálgico</p>	 <p>Ácido elágico</p>
 <p>Ácido quebulágico</p>	 <p>Corilagina</p>	 <p>Geranina</p>	 <p>Granatina</p>

 <p>Ácido gálico</p>	 <p>Ácido-4-hidróxifenilpropiónico</p>	 <p>Ácido ursólico</p>	 <p>Ácido-2α-3β-23-trihidróxius-12-en-28-óico</p>
 <p>Ácido-3,4-dihidróxibenzóico</p>	 <p>Ácido-<i>p</i>-hidróxibenzóico</p>	 <p>Ácido-<i>p</i>-cumárico</p>	 <p>Ácido-<i>m</i>-cumárico</p>
 <p>Terflavina</p>	 <p>Rutina</p>	 <p>Isovitexina</p>	 <p>Vitexina</p>

No Quadro 3, estão destacados os principais aspectos estudados a respeito da *T. catappa*, no qual se descrevem os compostos ativos já isolados de diferentes partes da planta e suas atividades biológicas.

No Brasil, poucos trabalhos sobre a planta foram descritos, embora a mesma esteja vastamente distribuída em todo o país.

Quadro 3 - Estudos químicos e biológicos realizados com os extratos de *T. catappa*.

Parte Estudada	Extrato(s)	Atividade Biológica/Nutricional	Compostos Descritos	Análise Cromatográfica	Referência
Sementes	Aquoso	Tolerância para uso nutricional	-	-	OLIVEIRA et al., 2000
	Suspensão a 1% em metil celulose	Inibidor de ejaculação precoce	Alcalóides	-	RATNASOORI YA et al., 2000
Folhas	Aquoso	Proteção contra genotoxicidade em cultura de células de ovário de hamster (atividade antimutagênica)	Punicalagina	-	CHEN et al., 2000
	Aquoso	Anticlastogênica (antitumoral)	Punicalina e punicalagina	-	LIU et al., 1996
	CO ₂ (supercrítico)	Aroma, antioxidante	fitol, terpenos, aldeídos e outros compostos simples.	CG/MS e Olfatometria	MAU et al., 2003
	Óleo essencial	Antioxidante	-	-	WANG et al., 2000
	• Pentano • Diclorometano • Acetato Etila • Metanol	Antioxidante	-	-	CHYAU et al., 2002
	Aquoso	Antioxidante	Ácidos cumáricos, benzóicos e outros	CG/MS	CHYAU et al., 2006
	-	Antioxidante	Punicalagina e punicalina.	-	LIN, HSU e LIN, 2001
	Etanólico	Fração clorofórmica com mais ação antiinflamatória	Triterpenos: ácido ursólico e outros	-	FAN et al., 2004

	<ul style="list-style-type: none"> • Metanólico • Aquoso • Etéreo 	Antidiarréico	-	-	VRUSHABENDRA SWAMY, 2006
	-	Hepatoprotetora	Punicalina e punicalagina	-	LIN et al., 1998 ; LIN et al., 2001
	Clorofórmico	Hepatoprotetora	-	-	TANG et al., 2006
	Aquoso	Hepatoprotetora	-	-	LIN et al., 1997
	Aquoso	Antiinflamatória	Punicalina e punicalagina	-	LIN et al., 1999
	Aquoso	Anti-diabética	Punicalagina e punicalina	-	AHMED et al., 2005
	Aquoso	Antinociceptivo (antiinflamatória, antipirético e analgésico)	-	-	RATNASOORIYA, 2002
	-	-	Taninos hidrolisáveis (Terflavinas A e B, tergalagina, tercataína)	-	TANAKA et al., 1986
	Etanólico	Antibacteriana	Taninos e Flavonóides	-	LADOKUN & OJEZELE, 2011
	Etanólico e Acetona	Antimicrobiana	Taninos	-	CHANDA et al, 2011
	Aquoso	Antibacteriana	Taninos	-	AKHARAIY I, 2011
	Metanólico	Cicatrizante	Taninos hidrolizáveis (punicalagina, punicalina, terflavinas A e B)	-	NEMA, et al., 2013
	Metanólico	Efeito imunomodulatório	Flavonóides	-	SAROJA et al., 2012
	Etanólico	Antimetastática	Taninos	-	YEH et al., 2012
	Etanólico	Atividade antiulcerogênica	Flavonóides	-	BHARATH et al, 2014
	Aquoso	Antidiarréico, antipirético	Punicalagina, punicalina, isovitexina, vitexina, rutina		ARJARIYA et al., 2013
	Acetato de Etila	Antioxidante	Punicalagina, punicalina, ácido elágico, ácido gálico, isovitexina	-	ANNEGOWDA et al., 2010
	Aquoso	Anticolesterol	Taninos	-	IBEGBULEM et al., 2011

	Aquoso e etanólico	Antimicrobiano	Alcalóides e esteróides	-	MUDI et al, 2011
	Metanólico	Antimicrobiana, antioxidante e sinérgica	Taninos	-	CHANDA et al., 2013
	Etanólico	Anti-helmíntico	Taninos	-	NURULAIN et al., 2011
	Metanólico	Eritropoiese	Taninos	-	AIMOLA et al, 2011
	Etanólico	Antibacteriana	Taninos e flavonóides	-	OPARA et al., 2012
	Etanólico	Antipirética	Polissacarídeos	-	M MURTY et al., 2013
	Etanólico	Antitumoral e antioxidante	Flavonóides	-	PANDYA et al., 2013
	Etanólico	Antioxidante	Flavonóides	-	FOGAÇA et al, 2013
	Etanólico e Metanólico	Antifúngica	Taninos	-	MANDLOI et al., 2013
	Etanol, metanol, éter de petróleo e Acetona	Antifúngica e Antialérgica	Quercetina	HPLC	MANDLOI et al., 2013
	Etanólico	Bacteriostática	Punicalagina e punicalina	-	LAWAL et al., 2013
	Etanólico, metanólico e aquoso	Bacteriostática	Taninos	-	NADIRAH et al., 2013
	Aquoso	Eritropoiese	Taninos	-	AIMOLA et al., 2013
	Etanólico	Anticarcinogénica	Taninos	-	YEH et al., 2014
Folhas e sementes	CO ₂ (supercrítico)	Antioxidante	Esqualeno	CG, HPLC	KO et al., 2002
Folhas e cascas	Metanólico	Doenças bacterianas	Flavonóides, taninos gálicos	-	MBENGUI et al., 2013
	Aquoso e Etanólico	Antibacteriana	Taninos	-	NEELAVATHI et al., 2013
Frutos	• Eter de petróleo • Metanol • Aquoso	Todos os 3 extratos com atividade antidiabética	Taninos	-	NAGAPPA et al., 2003
	-	Nutricional	Ácido ascórbico	-	KESHINRO et al., 1985
	Metanólico	Antioxidante e antibacteriana	<i>Cis</i> -9-hexadecenal e compostos heterocíclicos	GC-MS	OLOLADE et al., 2014
	Metanólico	Antitumoral	Taninos	-	SAROJA et al., 2011
	Etanólico	Antioxidante	Taninos	-	METY et al.,

			elágicos		2011
	Éter etílico	Antioxidante	Flavonóides	-	MARQUES et al., 2012
Folhas e Frutos	Etanólico	Alelopática	Ácido-3,4,4'-tri-O- metilelágico e β - sitosterol-3-O- β -D-glicosídeo	HPLC-PDA	BARATELLI et al., 2012
Cascas	Acetona – água (8:2)	-	19 compostos isolados: catapanina A, outros taninos, ác. fenólicos e flavonóis	-	LIN e HSU, 1999
	Aquoso	Antioxidante e Antitumoral	Taninos e flavonóides	-	VENKATALAK SHMI et al., 2014
	Metanólico	Antimicrobiana e antioxidante	Flavonóides e taninos	-	PRAVEENA, 2014

1.4 Validação de Métodos Analíticos

Em vista das inúmeras atividades farmacológicas apresentadas pela espécie *T. catappa* (Quadro 3), torna-se necessário proceder à padronização do extrato hidroalcoólico e validação de métodos analíticos que garantam a detecção e quantificação de metabólitos presentes no extrato.

O objetivo da validação de um procedimento analítico é o de demonstrar que esse é adequado para a sua finalidade, o que inclui as características aplicáveis à identificação, controle de impurezas e testes quantitativos (ICH, 2005). Deve ser utilizada para métodos não normalizados, criados ou desenvolvidos pelo próprio laboratório, ampliações e modificações dos métodos normalizados ou ainda, para métodos normalizados usados fora dos escopos para os quais foram concebidos (ABNT, 2005). A determinação das características de desempenho de um método é somente uma parte do processo de validação e os critérios de aceitação são baseados no seu uso intencional (BARROS, 2002).

De acordo com a ANVISA (Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003), o objetivo de uma validação é demonstrar que o método é apropriado para a finalidade pretendida, ou seja, a determinação qualitativa, semi-quantitativa e/ou quantitativa de fármacos e outras substâncias em produtos farmacêuticos.

O grande progresso na instrumentação analítica nos últimos anos e o desenvolvimento de técnicas de extração mais robustas possibilitaram a detecção e identificação de novos compostos em faixas de concentração mais baixas (SILVA; COLLINS, 2011).

A identificação e a quantificação de compostos desconhecidos em diferentes matrizes biológicas é uma tarefa desafiadora, por necessitar de uma seleção que abrange, muitas vezes, substâncias tóxicas para alcançar um resultado válido e confiável. Com essa finalidade, a técnica de HPLC-PDA oferece muitas vantagens em termos de sensibilidade, rapidez, seletividade e robustez, com uma aplicação versátil e grande potencial quantitativo (LAMBERT et al., 1997; BASTOS et al., 2013).

As agências reguladoras disponibilizam guias para validação de métodos bioanalíticos, sendo que tais documentos, usualmente, sugerem as diretrizes a serem seguidas e são, portanto, abertos a interpretações. Se, por um lado, para alguns analistas, isso é benéfico, pois possibilita a flexibilização das condições analíticas, para outros, tais documentos são vagos no que se refere à forma como alguns experimentos devem ser conduzidos. Assim, alguns artigos publicados apresentam excelentes discussões sobre estratégias e modelos experimentais a serem adotados na validação de métodos bioanalíticos (CASSIANO et al., 2009).

De modo geral, um método analítico a ser validado deve apresentar determinados parâmetros como exatidão, linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, especificidade, intervalo, robustez e precisão, sendo essa última considerada em três níveis: precisão intra-corrída (repetibilidade) e precisão inter-corrídas (intermediária), necessária somente quando não houver comprovação da reprodutibilidade. Estes parâmetros devem ser realizados antes da implementação de um método analítico para quantificação de um fármaco ou metabólito. Adicionalmente, substâncias de referência oficializadas em farmacopéia devem ser utilizadas na validação do método, ou, na inexistência destas, um padrão de trabalho pode ser empregado, desde que a identidade e o teor sejam devidamente comprovados (BRASIL, 2003a).

Como desfecho, embora validar um método analítico seja minucioso e laborioso, é de grande importância na garantia de resultados eficientes e produtivos, pois denotam confiabilidade nos resultados. Além disso, para que o estudo tenha êxito,

também é necessário conhecer as diretrizes da legislação vigente. Dessa forma, é possível obter um processo de qualidade assegurada o qual atenda às necessidades de uma determinada aplicação ou área de aplicação (BRASIL, 2003a; RIBANI et al., 2004).

2 OBJETIVOS

A partir de extratos hidroalcoólico, etanólico e da infusão obtidos das folhas de *Terminalia catappa* L.:

- a) Estabelecer o perfil químico utilizando técnicas hífenadas (HPLC-PDA e FIA-ESI-IT-MSⁿ);
- b) Isolar e caracterizar os constituintes químicos do extrato hidroalcoólico das folhas;
- c) Quantificar os principais metabólitos secundários presentes no extrato hidroalcoólico e na infusão;
- d) Avaliar a atividade mutagênica do extrato hidroalcoólico;
- e) Avaliar a atividade antiulcerogênica do extrato etanólico e das frações acetato de etila e aquosa;
- f) Quantificar os fenóis e flavonóides totais no extrato hidroalcoólico, fração acetato de etila e infusão;
- g) Avaliar as atividades antirradicalar, utilizando o ensaio de DPPH do extrato hidroalcoólico, fração acetato de etila, infusão e das substâncias purificadas do extrato hidroalcoólico.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Material Vegetal

As folhas de *T. catappa* foram coletadas na orla da praia da cidade de Santos-SP, (coordenadas GPS: Latitude: -23.9667 Longitude: -46.35) com autorização da prefeitura, no mês de abril de 2010, identificadas pelo botânico Paulo Salles Pentead, sendo arquivadas e registradas como (M Tomaz 01) no Herbarium da Universidade Santa Cecília (HUSC). Obteve-se autorização do IBAMA (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis) sob o nº33152.

3.2 Etapa Farmacognóstica

3.2.1 Secagem e moagem

As folhas de *T. catappa* coletadas (524,6 g) foram submetidas ao processo de secagem em estufa a 50°C por 6 dias consecutivos. Após secagem, as mesmas foram trituradas e moídas em moinho de facas.

3.2.2 Preparo do extrato hidroalcoólico

O pó obtido foi extraído com etanol 70% por meio de percolação (PRISTA, 1995). O pó foi intumescido com 2 litros de etanol a 70%. Em seguida, o percolador foi empacotado homogeneamente com a mistura (pó + etanol a 70%) e o efluente foi coletado na vazão de 2,0 mL/min/Kg.

Após a extração, o líquido extrator foi concentrado em evaporador rotativo para eliminação do álcool, sob pressão reduzida, em temperatura menor que 45°C. O extrato hidroalcoólico obtido foi congelado e liofilizado até eliminação total da água. Obteve-se 33,1 g de extrato hidroalcoólico (8,7 %).

3.3.2 Preparação do extrato etanólico

Em sequência, o mesmo procedimento de extração foi feito com etanol absoluto com 378,54 g de folhas secas e pulverizadas em um segundo percolador. O pó das folhas foi intumescido com 2 litros de etanol absoluto. Em seguida, o percolador foi empacotado homogeneamente com a mistura (pó + etanol absoluto) e o efluente foi coletado na vazão de 2,0 mL/min/Kg, totalizando 28,4 g de extrato etanólico bruto e 7,50% de rendimento (Figura 3).

3.3.3 Preparação da infusão

As folhas secas pulverizadas (1 g) permaneceram durante 10 minutos em água Milli-Q (20 mL) fervente, num recipiente fechado. O infuso foi preparado na proporção de 10% (m/v). A mistura foi, posteriormente, filtrada em papel de filtro para remover macro-partículas e levada até a temperatura ambiente. O sobrenadante foi filtrado em membrana PTFE (Millex[®]) de 0,45 µm. O rendimento para a infusão de *T. catappa* foi de 1,62%

3.3.4 Partições

Um total de 14 g de extrato hidroalcolólico (7:3, v/v) foi dissolvido em 500 mL de MeOH/H₂O (20: 80, v/v) e particionado sucessivamente com hexano (500mL) e acetato de etila (500 mL), produzindo 0,68 g (4,8%) (fração hexânica), 1,93 g (13,78%) (fração acetato de etila) e fração hidrometanólica (8:2 v/v), 10,15 g (72,5%). A fração hidrometanólica foi utilizada para purificação da mistura de anômeros da punicalagina.

O extrato etanólico seco (10g) foi ressuspenso em MeOH/H₂O (20:80, v/v) e submetido à partição líquido-líquido com hexano e em seguida com acetato de etila, fornecendo, ao final, 3 frações de polaridades: baixa (fração hexânica), média (fração acetato de etila) e alta (fração aquosa). Obtiveram-se os seguintes rendimentos para as frações: fração hexânica, 0,41 g (4,1%), fração acetato, 1,88 g (18,8%) e fração aquosa, 7,43 g (74,3%). As frações provenientes do extrato etanólico foram avaliadas quanto à ação antiulcerogênica e caracterização da fração mais ativa (Figura 3).

3.3.5 *Clean-up* para análises por HPLC e FIA

Cartuchos de extração em fase sólida (SPE) de fase reversa à base de octadecilsilano (RP18) com 500 mg.mL^{-1} ($33 \text{ }\mu\text{m}$, Supelco[®]) foram usados nas etapas de *clean-up* dos extratos e frações, sendo as soluções resultantes filtradas em membranas de PTFE (politetrafluoretileno, teflon[®], Millipore[®]) com poro de $0,22 \text{ }\mu\text{m}$. De modo geral, o processo de *clean-up* foi o seguinte: as amostras dos extratos (hidroalcoólico e etanólico) foram solubilizadas em $\text{H}_2\text{O}:\text{MeOH}$ (7:3, v/v). A fração acetato, entretanto, foi solubilizada em $\text{H}_2\text{O}:\text{MeOH}$ (1:1, v/v); em sequência, o cartucho foi ativado com MeOH e ambientado com H_2O , posteriormente, eluido com a fase móvel respectiva a cada extrato ou fração. A amostra solubilizada foi, então, eluída através do cartucho e, em seguida, filtrada em filtro $0,22 \text{ }\mu\text{m}$. Após secagem em evaporador rotativo, a amostra foi ressuspensa em MeOH até a concentração desejada.

3.3.6 *Fingerprint* do extrato hidroalcoólico, etanólico e frações por HPLC-PDA

As análises cromatográficas por HPLC-PDA foram realizadas em um cromatógrafo líquido de alta eficiência constituído de bomba quaternária modelo PU-2089S Plus (Jasco[®]), detector MD-2018 plus *Photodiode Array Detector* (PDA), e injetor automático modelo AS-2055 Plus e forno de coluna CO-2065 Plus. Software ChromNAV versão 1.18.03. Utilizou-se coluna analítica (Phenomenex[®]) de C-18 ($250 \times 4,6 \text{ mm}$, $4 \text{ }\mu\text{m}$) e pré-coluna ($4 \times 3 \text{ mm}$, $5 \text{ }\mu\text{m}$), modelo Synergi Hydro (fase reversa) de mesmo recheio, C18 AQ, ($2,5 \text{ cm} \times 3 \text{ mm}$) para proteção da coluna. No método analítico, utilizou-se gradiente de 5 – 50% de metanol (MeOH) em 40 minutos e isocrático de 50% de MeOH por 20 minutos. Tempo total de 60 minutos (270 nm) e injeção de $20 \text{ }\mu\text{L}$. A vazão utilizada na análise foi de 1 mL.min^{-1} .

Para purificar as substâncias, utilizou-se um HPLC semipreparativo Jasco[®] equipado com 2 bombas modelo PU-2086, mixer de alta pressão modelo MX-2080-32, detector PDA modelo MD-2018 Plus e injetor manual Rheodyne com loop de $500 \mu\text{L}$. Utilizou-se coluna preparativa (Phenomenex[®]) de C-18 ($250 \times 10 \text{ mm}$, $10 \text{ }\mu\text{m}$) e pré-coluna de C-18, modelo Luna (Fase reversa). Foram realizadas injeções de $0,2 \text{ mL}$ em vazão de 4 mL. min^{-1} . O software utilizado para operação do equipamento e tratamento

de dados foi o ChromNAV versão 1.18.03. Utilizou-se método gradiente de 5 – 50% de MeOH em 40 minutos e isocrático de 50% de MeOH por 10 minutos. Tempo total de 50 minutos a 270 nm.

A infusão (20 μL) foi introduzida por injeção com vazão de $1,0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ diretamente em HPLC-PDA. Condições cromatográficas: gradiente de 5-60% MeOH por 60 minutos e 270 nm.

3.3.7 Fracionamento da fração acetato de etila por *Medium Performance Liquid Chromatography* (Cromatografia Líquida de Média Pressão - MPLC)

A fração acetato de etila, proveniente do extrato hidroalcoólico, foi dissolvida em uma mistura de $\text{H}_2\text{O}:\text{MeOH}$ (1:1 v/v) em uma concentração de $100 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. Após centrifugação, injetou-se o sobrenadante. Foram feitas injeções de 2,0 mL cada, com vazão de 7,5 mL/min. Utilizou-se um sistema de MPLC (*Medium Performance Liquid Chromatography*) da marca Buchi®, composto por uma bomba Gerente C-615 que comporta outras duas bombas módulos C-601. Coluna C-18, 15 cm x 1,5 cm. Foram coletadas 10 frações no total (MPLC-1 a MPLC-10), iniciando-se com fase móvel de 5% de MeOH, acrescentando-se 5% a cada fração até uma proporção de 50% de MeOH. Cada fração foi coletada por 40 minutos. Esse procedimento foi repetido 3 vezes.

3.3.8 Isolamento dos anômeros da punicalagina por HPLC preparativo

A fração hidrometanólica (0,5 g) proveniente do extrato hidroalcoólico foi diluída com $\text{H}_2\text{O}:\text{MeOH}$ (8:2, v/v), até solubilização completa. A solução foi filtrada através de um filtro de $0,22 \mu\text{m}$ e as injeções (200 μL) foram feitas em HPLC preparativo com um fluxo de $17 \text{ mL}/\text{min}$. Coluna preparativa (Phenomenex®) de C-18 (250 x 10 mm, $10 \mu\text{m}$) e pré-coluna de C-18, modelo Luna (Fase reversa). A cada injeção, utilizou-se um gradiente de 5-30% de metanol, em 30 minutos. Os picos correspondentes à mistura de anômeros da punicalagina foram coletados separadamente e analisados por HPLC-PDA e RMN ^1H e ^{13}C .

3.3.9 Experimento de co-injeção do padrão ácido elágico, ácido gálico e galato de metila

O extrato hidroalcoólico (10 mg) foi solubilizado em 1 mL da solução MeOH:H₂O (1:1, v/v). A solução passou por processo de *clean-up* e secagem. Diluiu-se, então, a 10 mg.mL⁻¹. Adicionou-se a esta solução, 2 mg de padrão ácido elágico (SIGMA[®]) e filtrou-se através de filtro 0,22 µm. Após a filtração, 20 µL da solução foram injetados em HPLC. Foi utilizada coluna Hydro com vazão de 1 mL.min⁻¹. em método gradiente, 5 – 60% MeOH por 60 minutos. A detecção foi feita a 254 nm. O mesmo procedimento foi realizado para confirmação da presença dos compostos ácido gálico (SIGMA[®]) e galato de metila (SIGMA[®]).

3.3.10 Análise dos anômeros da punicalagina por HPLC-ESI-MS

Os anômeros da punicalagina isolados foram analisados através de um cromatógrafo *Shimadzu* CBM-20 com um detector de arranjos de fotodiodos (*Shimadzu* SPD-M20A), bombas de alta pressão (*Shimadzu* LC-20AD), desgaseificador (*Shimadzu* DGU-20A-5) e bomba de infusão *Cole Parmer* acoplado ao Espectrômetro de Massas de Alta Resolução ultrOTOF (Brucker Daltonics, Billirica, MA, EUA), com ionização por *electrospray* (ESI), analisador do tipo QqTOF (analisadores tipo quadrupolo, tempo de vôo em sequência), vazão de 300 µL. h⁻¹ e modo de ionização negativo. Como gás nebulizador, foi utilizado nitrogênio a 180°C, 4 bar e fluxo de 8 mL. min⁻¹.

3.3.11 Análise do extrato hidroalcoólico, etanólico e frações por FIA-ESI-IT-MS

Os experimentos de massas foram feitos em equipamento LCQ Fleet (Thermo Scientific[®]), equipado com um dispositivo de inserção direta da amostra via análise por injeção em vazão (FIA). A matriz estudada foi analisada por ionização por *electrospray* (ESI) e a fragmentação em múltiplos estágios (MSⁿ) foi feita em interface do tipo *ion-trap* (IT). O modo negativo foi escolhido para a geração e análise dos espectros de massas em primeira ordem (MS), e para os demais experimentos, em múltiplos estágios, nas seguintes condições: voltagem capilar de -25V, a tensão de pulverização -5kV, temperatura do capilar 275° C, gás de arraste (N₂) com um vazão de 60

(unidades arbitrárias). A faixa de aquisição foi m/z 100-2000. O software Xcalibur versão 1.3 (Thermo Finigan®) foi utilizado para adquirir e processar dados.

O extrato hidroalcoólico seco (1 mg) foi dissolvido em 1 mL de metanol grau HPLC, aplicado em cartucho SPE (C-18) e filtrado através de membrana PTFE 0,45 μm (POOLE et al., 2000). A eluição do suporte RP18 foi feita com a mistura $\text{H}_2\text{O}:\text{MeOH}$, 8:2, v/v. O filtrado foi introduzido diretamente na fonte ESI através de uma seringa de vidro impulsionada por meio de um sistema de bombeamento em fluxo de 10 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$. O mesmo procedimento foi realizado com o extrato etanólico e, posteriormente, com a fração aquosa proveniente do extrato em etanol absoluto.

3.3.12 Identificação das substâncias por Ressonância Magnética Nuclear

As análises de RMN de 1D: ^1H e 2D: $g\text{HSQC}$ e $g\text{HMBC}$ foram realizadas em espectrofotômetros de Ressonância Magnética Nuclear de 300 MHz (11,7 T) (Varian® Inova). As substâncias foram dissolvidas em dimetilsulfoxido deuterado (DMSO-d_6) ou metanol deuterado ($\text{CD}_3\text{OD-d}_4$) usando tetrametilsilano (TMS) como padrão interno.

3.3.13 Análise de substâncias isoladas por dicroísmo circular (CD)

Os experimentos de dicroísmo circular (CD) foram feitos utilizando-se um Cromatógrafo líquido de alta eficiência (Jasco®, HPLC-PDA-CD):

- a) Bomba de quatro canais e degaseificador on-line, modelo PU-2089;
- b) Detector de arranjo de fotodiodos (PDA), modelo MD-2010;
- c) Detector de dicroísmo circular (CD), modelo CD-2095;
- d) Injetor automático com estante para 50 amostras, modelo, AS-2055.
- e) Software EZ Chrome (Jasco) e Spectra Manager (para CD);
- f) Coluna analítica (Phenomenex®) de C18 (250 x 4,5 mm, 4 μm) e pré-coluna (4 x 3 mm, 5 μm), modelo Synergi Hydro (fase reversa).

A amostra (punicalagina) e o composto apigenina 8-C-(2''-galoil)- β -D-glicopiranosil isolados foram dissolvidos em H₂O:MeOH (1:1 v/v) em uma concentração de 1 mg.L⁻¹. Foi feita injeção de 10 μ L em método gradiente de 5-30% de MeOH por 20 minutos a 270 nm. O topo dos picos foram retidos na cela do equipamento e analisados e tratados pelo software EZ Chrome (Jasco) e Spectra Manager (para CD), obtendo-se o espectro de dicroísmo. A fase móvel também foi retida e analisada como branco.

3.3.14 Quantificação por HPLC-PDA

A quantificação dos analitos foi realizada utilizando calibração com padrão externo (RIBANI et al., 2004; ROBARDS, 2003; BASTOS et al., 2013). As curvas foram construídas usando padrão comercial de ácido elágico (SIGMA[®]) e anômeros da punicalagina isolados da fração hidrometanólica. Obteve-se uma solução estoque de 1000 μ g.mL⁻¹ do padrão ácido elágico, dissolvido em DMSO 100%. A partir dessa solução estoque, foram feitas diluições com DMSO 100% em balões volumétricos a 500, 250, 125, 62,5, 15,625, 7,8125 e 3,90625 μ g.mL⁻¹. A partir da somatória das áreas dos picos referentes ao anômero α e ao anômero β nas diferentes concentrações, obteve-se a equação da reta da ***punicalagina total***. Este procedimento foi adotado uma vez que punicalagina é encontrada naturalmente como anômeros reversíveis. Considerando este aspecto, anômeros α e β da punicalagina, em separado, são difíceis de serem quantificados. Portanto, a concentração de punicalagina total (anômeros α + β) em folhas de *T.catappa* foi avaliada a partir deste procedimento, já descrito na literatura (LU et al., 2007). Os anômeros da punicalagina foram diluídos em uma mistura (MeOH: H₂O 1:1 v/v) e preparou-se uma solução estoque de 4000 μ g.mL⁻¹ a partir da junção dos picos 1 e 2, em vista dos resultado obtidos da análise de ambos por HPLC-PDA (ítem 4.5, pág. 95). A partir da solução estoque, foram feitas diluições seriadas a (2000, 1000, 500, 250, 125, 62,50, 31,25 μ g.mL⁻¹). Cada nível de concentração foi analisado em triplicata. As áreas médias dos picos cromatográficos obtidos foram interpoladas em função da concentração utilizando regressão linear e foram obtidas as curvas de calibração. A partir das curvas de calibração, foram obtidos os coeficientes lineares (a), angulares (b), o coeficiente de correlação (r^2) e os limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) para os picos 1 e 2, correspondentes aos anômeros da α e β da punicalagina e demais substâncias quantificadas (μ g. mL⁻¹). A exatidão do método foi estimada a partir dos ensaios de recuperação.

Os anômeros da punicalagina (mistura de $\alpha + \beta$) foram quantificados no extrato hidroalcoólico; então os ensaios de recuperação foram feitos com a adição de concentrações conhecidas destes padrões neste mesmo extrato. Adicionou-se concentrações conhecidas (baixa, média e alta) do padrão de referência ácido elágico (15,60 e 250 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) e anômeros da punicalagina isolados (250, 500 e 2000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). Em seguida, foram analisadas em triplicata e os resultados foram apresentados como média e desvio-padrão das porcentagens recuperadas (INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION, 2005, SNYDER; KIRKLAND & DOLAN, 2010, COUTO, 2011). O valor médio de recuperação foi calculado utilizando a seguinte fórmula: Recuperação (%) = $[(C_f/C_{nf} + C_{pd})] \times 100$, onde (C_f) corresponde à concentração fortificada, (C_{nf}) corresponde à concentração não fortificada e (C_{pd}) corresponde à concentração do padrão adicionado.

Variações intra e inter-dia foram feitas para determinar a precisão do método desenvolvido. O desvio-padrão relativo (DPR) foi tomado como uma medida da precisão. Repetibilidade intra e inter-dia foi determinada em seis repetições dentro da faixa encontrada no extrato em um dia e em três dias consecutivos, respectivamente.

À infusão, extrato em etanol absoluto e fração aquosa derivada do etanol absoluto foram injetados a 1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, em triplicata e nas mesmas condições do extrato hidroalcoólico, para quantificação da punicalagina, obtendo-se as áreas dos picos dos anômero α e do anômero β . Essas áreas foram inseridas na equação da reta de cada um dos anômeros e encontrou-se a concentração dos anômeros α e β (punicalagina total).

Os metabólitos ácido gálico, galato de metila, ácido galágico e o flavonóide apigenina 8-C-(2''-galoil)- β -D-glicopiranosil foram diluídos em MeOH:H₂O (1:1 v/v) em balões volumétricos, e foram quantificados na fração acetato de etila a 10 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. Esse procedimento foi adotado porque os picos correspondentes a esses compostos não apareceram no extrato hidroalcoólico, pois, possivelmente, são suprimidos pelas substâncias majoritárias, que são as punicalaginas e seus derivados. Tais substâncias, porém, estavam presentes na fração acetato de etila proveniente deste extrato. A proporção de 1,93 g de fração acetato de etila em 14 g de extrato hidroalcoólico, conforme descrito no item 3.3.4 foi utilizada para a transposição de dados da fração acetato de etila para o extrato hidroalcoólico. A concentração de 10 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ foi determinada para que a faixa de concentração ficasse na região mediana da faixa

linear. Para quantificação dos metabólitos ácido gálico e galato de metila, foram feitas seis diluições sucessivas das soluções estoque dos padrões ácido gálico ($1000 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) e galato de metila ($250 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$), reduzindo-se a concentração à metade a cada diluição. Para o ácido gálico: D1: $500 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, D2: $250 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, D3: $125 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, D4: $62,5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, D5: $31,25 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, D6: $15,625 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, totalizando sete amostras. Para o galato de metila: D1: $125 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, D2: $62,5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, D3: $31,25 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, D4: $15,625 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, D5: $7,8125 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, D6: $3,90625 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$. Cada nível de concentração foi analisado em triplicata.

Metabólitos isolados das frações provenientes do fracionamento por MPLC (ácido galálgico e Apigenina 8-C-(2''-galoil)- β -D-glicopiranosil foram também quantificados. Foram feitas oito diluições sucessivas das soluções estoques dos padrões isolados, reduzindo-se a concentração à metade. Para o composto Apigenina 8-C-(2''-galoil)- β -D-glicopiranosil, preparou-se uma solução a $1000 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ e diluiu-se a D1: $500 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, D2: $250 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, D3: $125 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, D4: $62,5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, D5: $31,25 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, D6: $15,625 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, D7: $7,8125 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ e D8: $3,90625 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$. Cada nível de concentração foi analisado em triplicata.

O teor (%) dos compostos quantificados foi calculado através da seguinte equação:

$$(\text{teor})\% = [\mu\text{g}/\text{mL}] \times \frac{\text{volume da diluição (mL)}}{\text{massa amostra (g)} \times 10^6} \times 100$$

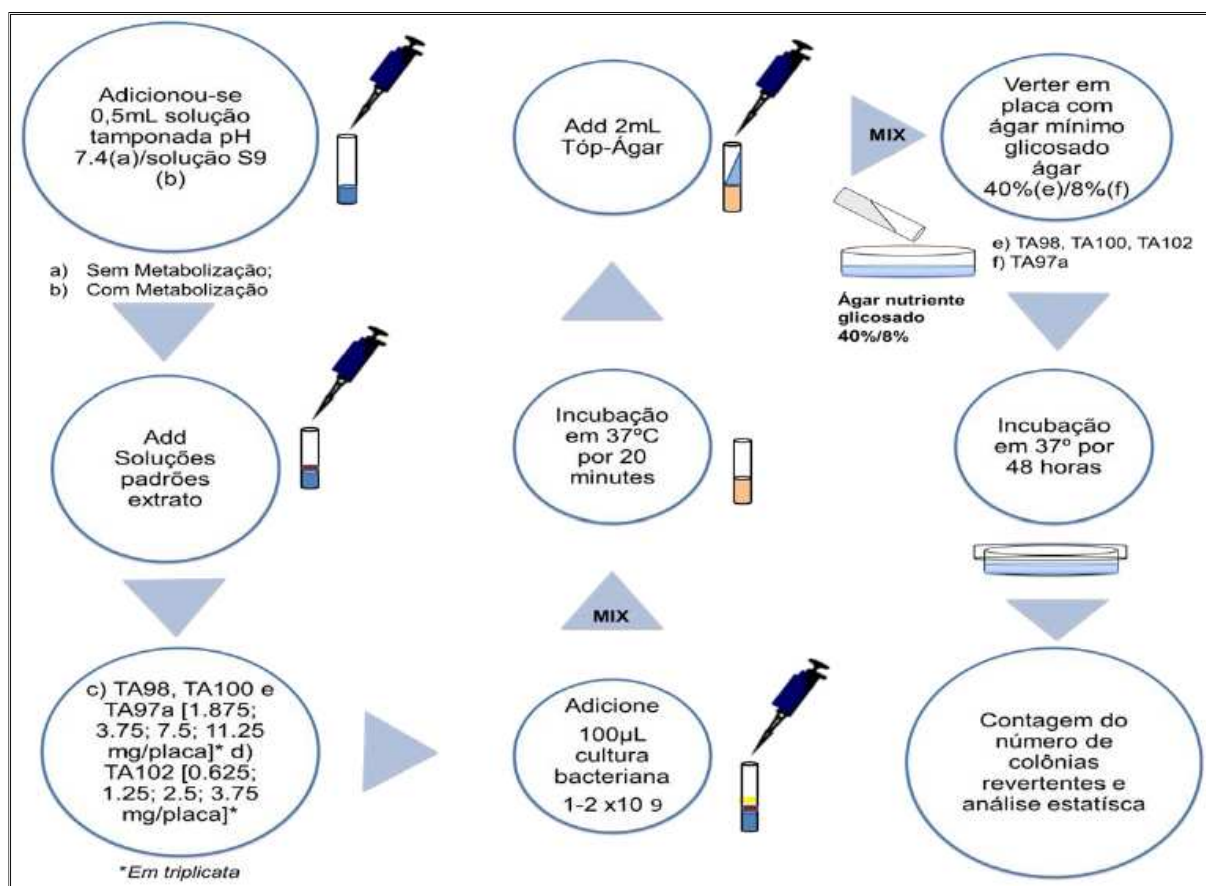
A conversão do teor de metabólitos quantificados na fração acetato para concentração e o teor dos mesmos no extrato hidroalcoólico foi feita calculando-se, primeiramente, o teor de cada metabólito na fração acetato. Estabeleceu-se, então, a relação do total de metabólitos ($x \text{ mg}$) em 100 mg da fração. Em seguida, a partir de regra de três simples, calculou-se o total ($y \text{ mg}$) dos metabólitos em $1,93 \times 10^3 \text{ mg}$ da fração acetato (item 3.3.4, pág. 34). O valor ($y \text{ mg}$) encontrado está diretamente relacionado às $14 \times 10^3 \text{ mg}$ do extrato (massa de onde foi obtida $1,93 \times 10^3 \text{ mg}$ da fração). A partir de 100 mg do extrato, obteve-se o teor (%) de cada metabólito no extrato hidroalcoólico.

3.3.15 Ensaio de Mutagenicidade

A atividade mutagênica foi avaliada pelo ensaio de *Salmonella*/microsossoma, utilizando as estirpes *Salmonella typhimurium* TA98, TA97 e TA100, TA102, que foram gentilmente cedidas pelo Dr. BN Ames (Berkeley, CA, EUA), com (+ S9) e sem (- S9) ativação metabólica, utilizando o método de pré-incubação (MARON & AMES, 1983) (Figura 2). Os testes foram realizados pela aluna Flávia Aparecida Rezende, sob supervisão da professora Dra. Eliana Aparecida Varanda da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara. As cepas foram cultivadas durante a noite e congeladas por 12-14 h em Oxoid Nutrient Broth N° 2. A mistura de ativação metabólica (fração S9) foi preparada a partir de fígados de ratos *Sprague-Dawley* tratados com a mistura de bifenilos policlorados Aroclor 1254 (500 mg/kg), adquirido a partir de Molecular Toxicology Inc. (Boone, NC, EUA) e preparada antes de cada ensaio. O sistema de ativação metabólica consistiu de 4% da fração S9, 1% de MgCl₂ 0,4 M, 1% de KCl 1,65 M, 0,5% de D-glicose-6-fosfato dissódica 1 M e 4% de NADP 0,1 M, 50% de tampão fosfato 0,2 M e 39,5 % de água destilada estéril. Para a determinação da atividade mutagênica, cinco concentrações diferentes de extrato hidroalcoólico (1,56 - 22,24 mg/placa), diluídas em DMSO, foram ensaiadas. As concentrações da amostra foram selecionadas a partir de um teste de toxicidade preliminar. Em todos os ensaios seguintes, o limite superior do intervalo de dose foi testado, tanto a dose mais alta não tóxica quanto a menor dose tóxica, determinado neste ensaio preliminar. A toxicidade foi detectada quer como uma redução no número de revertentes de histidina (His⁺), ou como uma diminuição da espessura do fundo auxotrófico, isto é, fundo relvado. As várias concentrações de extrato a serem testadas foram adicionadas a 0,5 mL de tampão fosfato 0,2 M, ou 0,5 mL da mistura S9 a 4%, com 0,1 mL de cultura bacteriana e em seguida incubadas a 37°C durante 20-30 min. A seguir, 2 mL de agar de topo foi adicionado e a mistura vertida sobre uma placa de agar mínima. As placas foram incubadas a 37°C durante 48 horas e as colônias de revertentes His⁺ foram contadas manualmente. Todas as experiências foram analisadas em triplicata. Os resultados foram analisados com auxílio do software estatístico *Salanal* 1.0 (EUA Agência de Proteção Ambiental, Monitoramento Laboratory Systems, Las Vegas, NV, of Research Triangle Institute, RTP, NC, EUA). Os dados (revertentes/placa) foram avaliados por análise de variância (ANOVA), seguido de uma regressão linear. O índice mutagênico (IM) também foi calculado para cada concentração testada, sendo o número médio de

revertentes por placa, com o composto em teste, dividido pelo número médio de revertentes por placa como controle negativo (solvente). Uma amostra foi considerada mutagênica quando uma relação dose-resposta foi detectada, observado um aumento de duas vezes no número de mutantes ($IM \geq 2$) por pelo menos uma das concentrações (MORTELMANS & ZEIGER, 2000). Os agentes mutagênicos padrão usados como controles positivos em experimentos sem a mistura S9 foram 4-nitro-o-fenilenodiamina (10,0 mg/placa - TA98); Azida de sódio (1,25 mg/placa - TA100); mitomicina (0,5 mg/placa - TA102) e 2-antramina (1,25 μ g/placa - TA98, TA100), 2-aminofluoreno (10,0 μ g/placa - TA102), na presença de S9. DMSO serviu como controle negativo (solvente).

Figura 2 - Esquema do Teste de Ames. +S9 e -S9 significam presença e ausência do sistema de ativação metabólica, respectivamente.



Fonte: modificado de Copyright © 2006 Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings; ZANUTTO, 2013.

3.3.16 Avaliação atividade antiulcerogênica

Os testes da ação antiulcerogênica foram realizados com o extrato etanólico no Laboratório de Ensaio Biológicos com Produtos Naturais no Campus da UNESP em Botucatu pela mestrandia Laísa Pinheiro da Silva, sob a orientação da professora Dra. Clélia Akiko Hiruma Lima.

3.3.16.1 Animais

Foram utilizados ratos “Wistar” (150 a 200 g), provenientes do Biotério Central da UNESP-Botucatu, aclimatados às condições do biotério setorial por pelo menos sete dias antes da manipulação experimental, sob temperatura ($23 \pm 2^\circ\text{C}$) e ciclo claro-escuro de 12 horas controlado. Os animais foram alimentados com ração Guabi[®] e água *ad libitum*. Todos os experimentos obedeceram a protocolos experimentais submetidos à Comissão de Ética na Experimentação Animal do Instituto de Biociências da UNESP – Botucatu através do protocolo n. 18/05 – CEEA.

3.3.16.2 Soluções

O veículo utilizado para a preparação das frações acetato e aquosa foi solução de NaCl (0,9%). Utilizou-se tween 80 a 8% para a fração hexânica.

3.3.16.3 Úlcera gástrica induzida por etanol em ratos (MORIMOTO et al., 1991)

Ratos Wistar foram divididos em grupos (n=7) e tratados, após 24 h de jejum, com as frações hexânica, acetato de etila e aquosa, nas doses de 25, 50 e 100 mg.Kg⁻¹, com 100 mg.Kg⁻¹ de carbenoxolona ou 10 mL.Kg⁻¹ de veículo (controle negativo, solução de NaCl (0,9%)) para os animais tratados com a fração acetato e aquosa, e tween 80 a 8% para os animais tratados com a fração hexânica), uma hora antes da indução de lesão gástrica pela administração, também por via oral, de 1 mL de etanol absoluto. Após 1 h da indução, os animais foram mortos e os estômagos retirados para contagem das lesões. Para a quantificação das lesões, os estômagos foram colocados em placa de vidro, as

quais foram escaneadas para realização da quantificação, através do aplicativo AVSoft[®], que apresenta os resultados na forma de área (mm²).

3.3.16.4 Análise estatística

Os resultados apresentados estão expressos na forma de média \pm erro padrão da média e submetidos à análise de variância de uma via (ANOVA) e seguidos pelo teste de Dunnet com nível de significância de * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

3.3.17 Avaliação do potencial antirradicalar, fenóis totais e flavonoides totais do extrato hidroalcoólico, fração acetato de etila, punicalagina, infusão, ácido galágico e apigenina 8-C-(2''-galoil)- β -D-glicopiranosil das folhas de *T. catappa*

O extrato hidroalcoólico (denominado aqui de extrato bruto), infusão e fração acetato de etila proveniente do extrato hidroalcoólico das folhas de *T. catappa* foram analisadas quanto ao teor de fenóis e flavonoides totais. Estes mesmos extratos, frações e as demais substâncias purificadas a partir do extrato hidroalcoólico das folhas de *T. catappa* (punicalagina, infusão, ácido galágico e apigenina 8-C-(2''-galoil)- β -D-glicopiranosil) foram analisadas também para determinação de seu potencial antirradicalar, utilizando o ensaio de DPPH.

3.3.17.1 Avaliação do potencial antirradicalar

O potencial antirradicalar do extrato hidroalcoólico (extrato bruto), fração acetato, infusão e substâncias isoladas foi avaliado por meio de um ensaio espectrofotométrico, de acordo com metodologia descrita por Pauletti et al., (2003) e Brand-Williams et al., (1995), utilizando-se uma solução de DPPH 0,004 % em metanol, o que foi misturado à solução da amostra em análise. Soluções estoque foram preparadas a partir de 1 mg da amostra teste em 1 mL de metanol. Em seguida, foram realizadas diluições até as concentrações de 250; 125; 62,5; 31,25; 15,625 e 7,8125 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ para extratos e, para os padrões, foram utilizadas diluições específicas de modo a obter diluições na escala μM . A cada 100 μL da amostra, foram adicionados 200 μL da solução de DPPH. Após 30 minutos de reação, as absorbâncias das soluções foram medidas a 517 nm. A

solução referência foi constituída de 100 μL de metanol acrescido de 200 μL da solução de DPPH. Utilizamos padrões de quercetina e ácido gálico, os quais foram submetidos ao mesmo procedimento experimental.

Este teste avalia a capacidade que uma substância tem de seqüestrar o radical livre estável DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) e está baseado na redução da solução de DPPH (cor violeta) quando ocorre a adição de substâncias que podem ceder uma espécie radicalar (hidrogênio radicalar), formando um complexo de coloração amarela (BRAND-WILLIANS et al., 1995; MOURA, 2011).

3.3.17.2 Determinação do Teor de Fenóis Totais

A concentração de fenóis totais foi determinada colorimetricamente conforme o procedimento padrão de *Folin-Ciocalteu* (KÄHKÖNEN et al., 1999; GHASEMZADEH et al., 2010). Para o mesmo, utilizou-se: 1mg da substância teste (dissolvidos em 10 mL de MeOH = [100 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$]), 10 mL solução de *Folin-Ciocalteu* (9,333 mL água destilada + 0,667 mL *Folin-Ciocalteu*), 5 mL de solução de Na_2CO_3 saturada (200 $\text{g}.\text{L}^{-1}$), 2,5 mg de Ácido Gálico (Sigma[®]), utilizado como padrão (solubilizados em 10 mL de MeOH = [250 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$]).

Primeiramente, procedeu-se às diluições para a curva de calibração do ácido gálico nas concentrações de 6,25; 12,5; 25,0; 50,0; 100,0 e 200,0 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$, adicionou-se em placa de 96 poços, 150 μL da solução de *Folin-Ciocalteu* e 50 μL de amostra e diluições padrões, aguardou-se 3 minutos e adicionou-se 50 μL de solução de Na_2CO_3 saturada, aguardou-se 2 horas e após isso, realizou-se leitura em espectrofotômetro UV/Visível (ELISA) a λ 750 nm. Todo o procedimento foi realizado em triplicata.

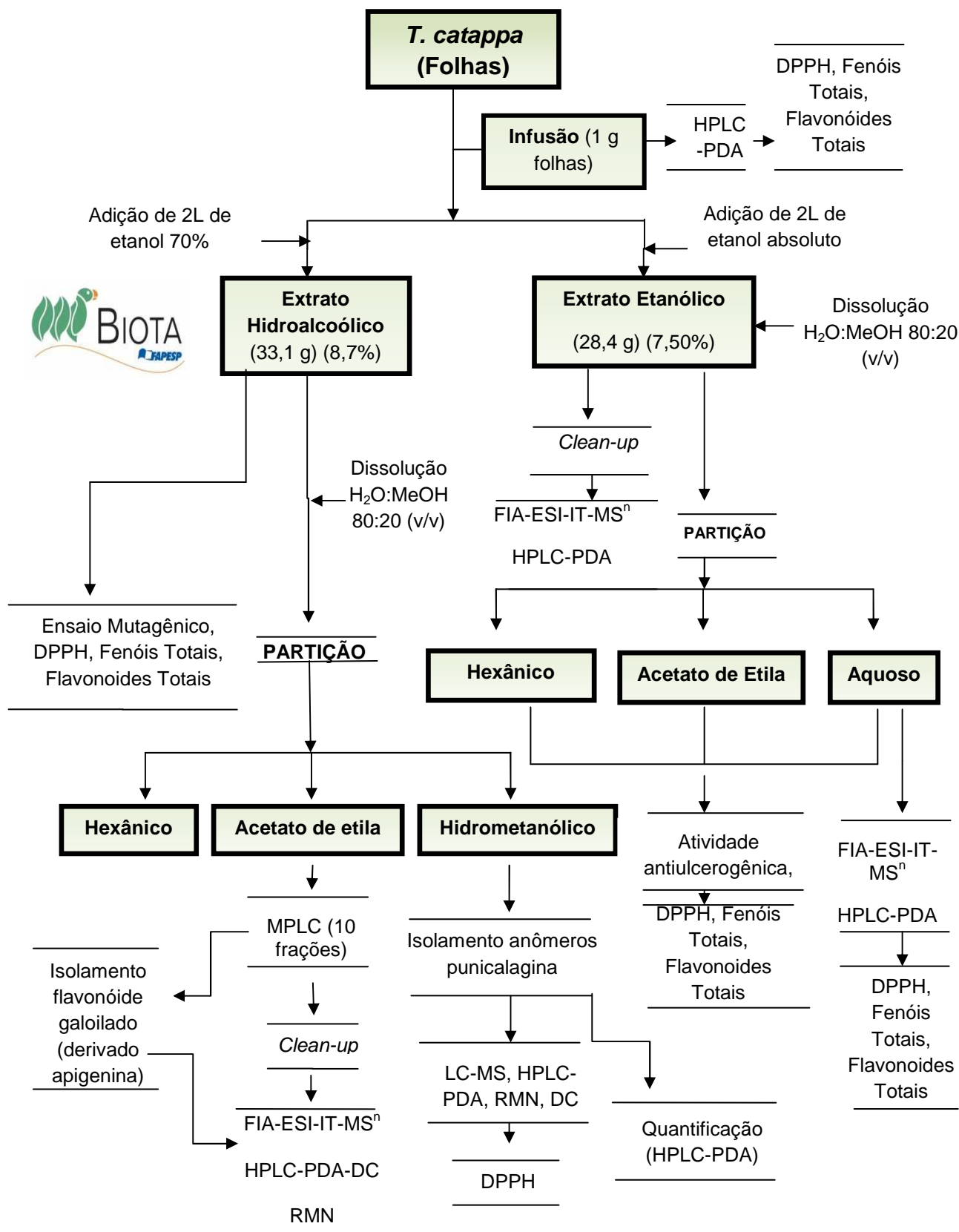
3.3.17.3 Determinação do Teor de Flavonoides Totais

Foi realizada a partir do método colorimétrico no qual ocorre a complexação dos flavonoides com cloreto de alumínio, de acordo com metodologia padrão de Peixoto Sobrinho et al., (2010) e Jurd & Geissman (1956) modificado, em que a quercetina foi utilizada como padrão, em solução de cloreto de alumínio. Para este experimento, preparou-se 1mg da substância teste (dissolvidos em 10 mL de MeOH = [100 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$]); 2,5 mg de quercetina (Sigma) (solubilizados em 10 mL de MeOH = [250 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$]) e 200 mg de AlCl_3 solubilizados em 10mL de MeOH:H₂O (8:2) obtendo solução de cloreto de alumínio (AlCl_3) a 2%. Primeiramente, procedeu-se às diluições para a curva de

calibração da quercetina nas concentrações de 6,25; 12,5; 25,0; 50,0; 100,0 e 200,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Adicionou-se em placa de 96 poços 100 μL de solução de AlCl_3 2%. Em seguida, adicionou-se 100 μL da amostra ou diluições da solução padrão de quercetina e aguardou-se 1 hora. Após isso, realizou-se leitura em espectrofotômetro UV/Visível (ELISA) a $\lambda = 415 \text{ nm}$.

3.3.18 Fluxograma geral da metodologia empregada na análise de extratos e frações das folhas de *T. catappa*.

Figura 3 - Fluxograma geral do processo extrativo e isolamento de metabólitos de *T. catappa*.



4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Comparações entre os extratos hidroalcoólico, etanólico, frações aquosas e infusão das folhas de *T. catappa* por HPLC-PDA

Optou-se pelo desenvolvimento de uma metodologia baseada na análise por HPLC-PDA na tentativa de realizar a identificação direta dos metabólitos secundários presentes na matriz estudada. O perfil cromatográfico traçado por HPLC-PDA vem sendo de grande utilidade no estudo de extratos polares, pois, com o perfil, é possível não só determinar a classe de substâncias, mas também identificar substâncias conhecidas através da comparação do tempo de retenção (t_r) e espectro no UV com padrões autênticos (comerciais ou já isolados em nosso laboratório).

Em vista da utilização do extrato etanólico no protocolo experimental para verificação da atividade antiulcerogênica, investigou-se, também, o perfil químico deste extrato e da fração aquosa proveniente do extrato etanólico, estabelecendo, portanto, a comparação entre os diferentes extratos e a fração aquosa. A Figura 4 indica a comparação entre o extrato hidroalcoólico (A) e o extrato etanólico (B). Observa-se que os extratos apresentam perfis cromatográficos semelhantes, destacando a presença dos anômeros da punicalagina com tempos de retenção semelhantes (α -punicalagina: t_r 14,8 min.) e (β -punicalagina: t_r 19,5 min.). Destaca-se, também, em ambos os extratos, a presença do ácido elágico em t_r 47,5 min. Os anômeros da punicalagina e o ácido elágico apresentaram λ max 218, 260 e 379 nm e ácido elágico, λ max 250, 306 e 368 nm, respectivamente. A sobreposição dos cromatogramas está indicada na Figura 5. Os dados obtidos corroboram os resultados encontrados na literatura, uma vez que estudos fitoquímicos de extratos alcoólicos de folhas e frações provenientes destes extratos indicam a presença, principalmente, de taninos hidrolizáveis como a punicalagina, flavonoides, ácido elágico e seus derivados (ANGEL et al., 2003; SEERAM et al., 2005, LADOKUN e OJEZELE, 2011; SAROJA et al., 2012; CHANDA et al., 2013; ZAHIN et al., 2014).

Muitos estudos relatam que os compostos fenólicos têm um grande papel como sequestradores de radicais livres e, por isso, se tornam importantes para a prevenção e terapia de doenças, como o câncer, doenças degenerativas e inflamatórias. Os ácidos gálico e elágico são potentes antioxidantes naturais, diminuem a peroxidação lipídica e

são conhecidos compostos antiulcerogênicos e anticarcinogênicos (RAO et al., 2008; SAROJA et al., 2012; MBENGUI et al., 2013, OLOLADE, 2014).

Figura 4 - Cromatograma do extrato etanólico (A) e do extrato hidroalcoólico (B). Pico (1) e pico (2), anômeros da punicalagina, pico (3) ácido elágico com UVs característicos. Coluna Hydro, vazão de 1 mL.min⁻¹ em método gradiente, 5-60% MeOH, 60 min. HPLC-PDA (Jasco®), 254 nm.

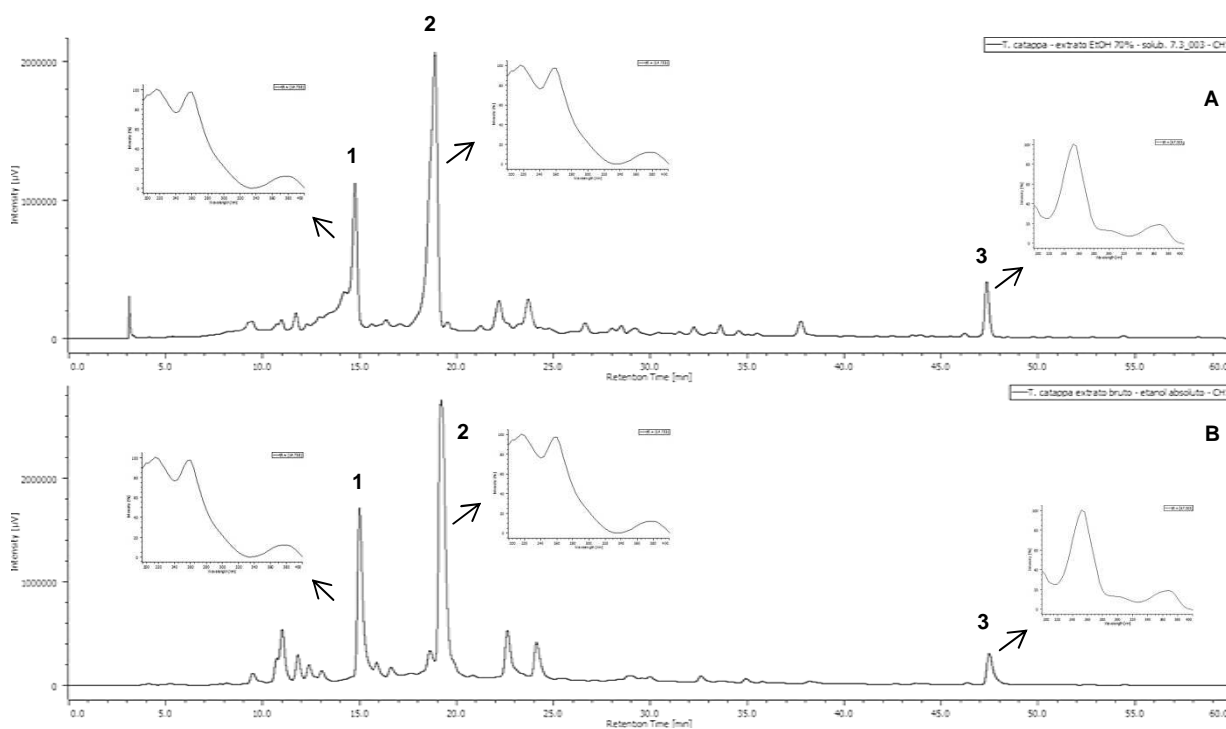
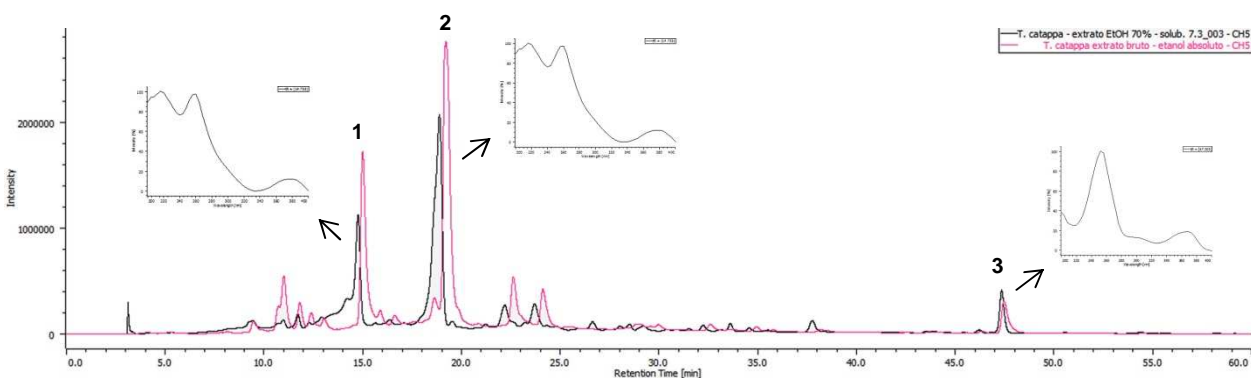


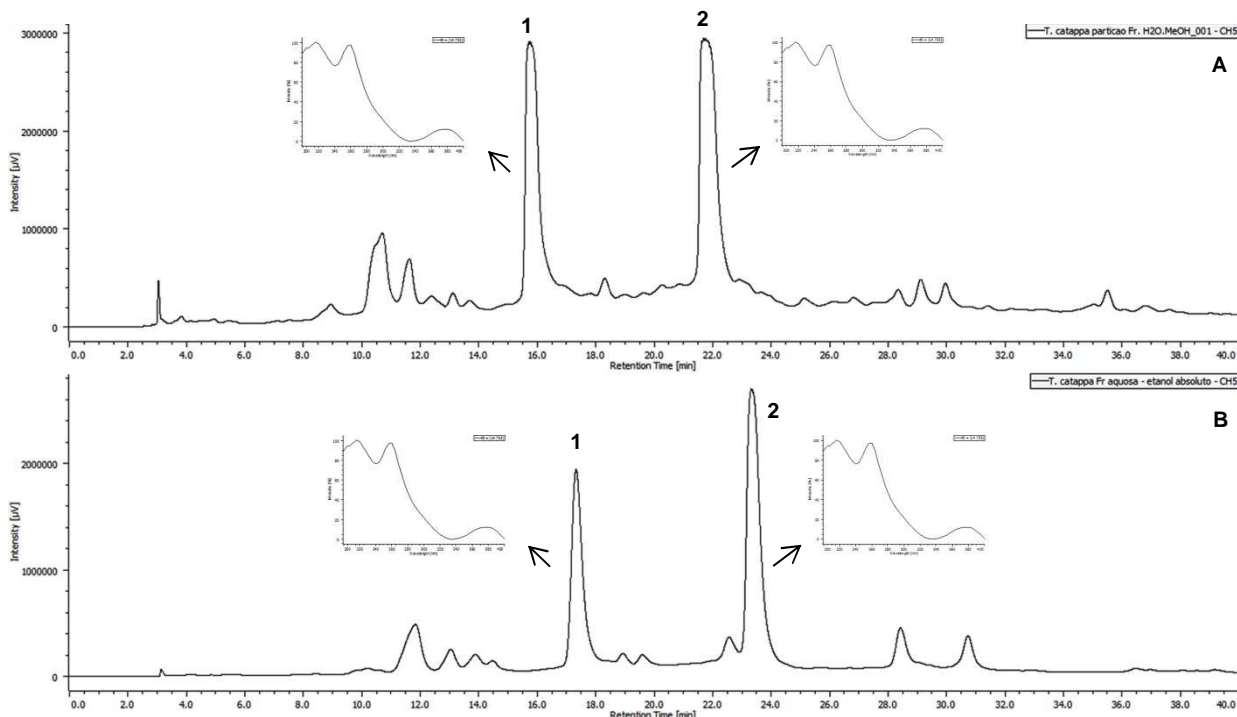
Figura 5 - Sobreposição dos cromatogramas do extrato hidroalcoólico (em preto) e do extrato etanólico (em vermelho). Pico (1) e pico (2), anômeros da punicalagina, pico (3) ácido elágico com UVs característicos. Coluna Hydro, vazão de 1 mL.min⁻¹ em método gradiente, 5-60% MeOH, 60 min. HPLC-PDA (Jasco®), 254 nm.



No caso das frações aquosas derivadas dos extratos hidroalcoólico e etanólico, podemos constatar a presença dos anômeros da punicalagina (substância majoritária) nos dois cromatogramas, porém, com tempos de retenção ligeiramente diferentes, conforme indicado na Figura 6. Os espectros de UV dos anômeros da punicalagina

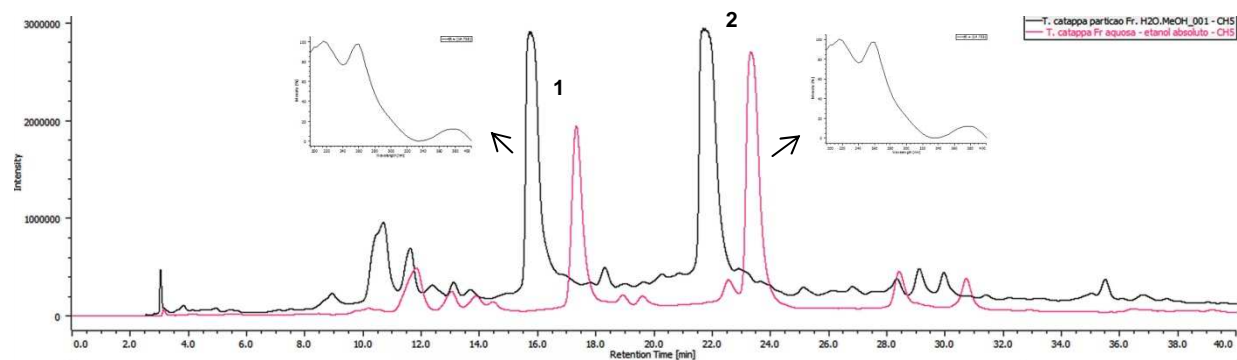
apresentam λ max 218, 260 e 379 nm. Esses valores são característicos de um cromóforo galagil (MACHADO et al., 2002; SEERAM et al., 2005).

Figura 6 - Cromatograma da fração aquosa derivada do extrato hidroalcoólico (A) e do extrato etanólico (B). Pico (1) e pico (2), anômeros da punicalagina com UVs característicos. Coluna Hydro, vazão de 1 mL.min⁻¹ em método gradiente, 5-60% MeOH, 60 min. HPLC-PDA (Jasco®), 254 nm.



A sobreposição dos cromatogramas das frações aquosas provenientes dos extratos hidroalcoólico e etanólico está indicada na Figura 7.

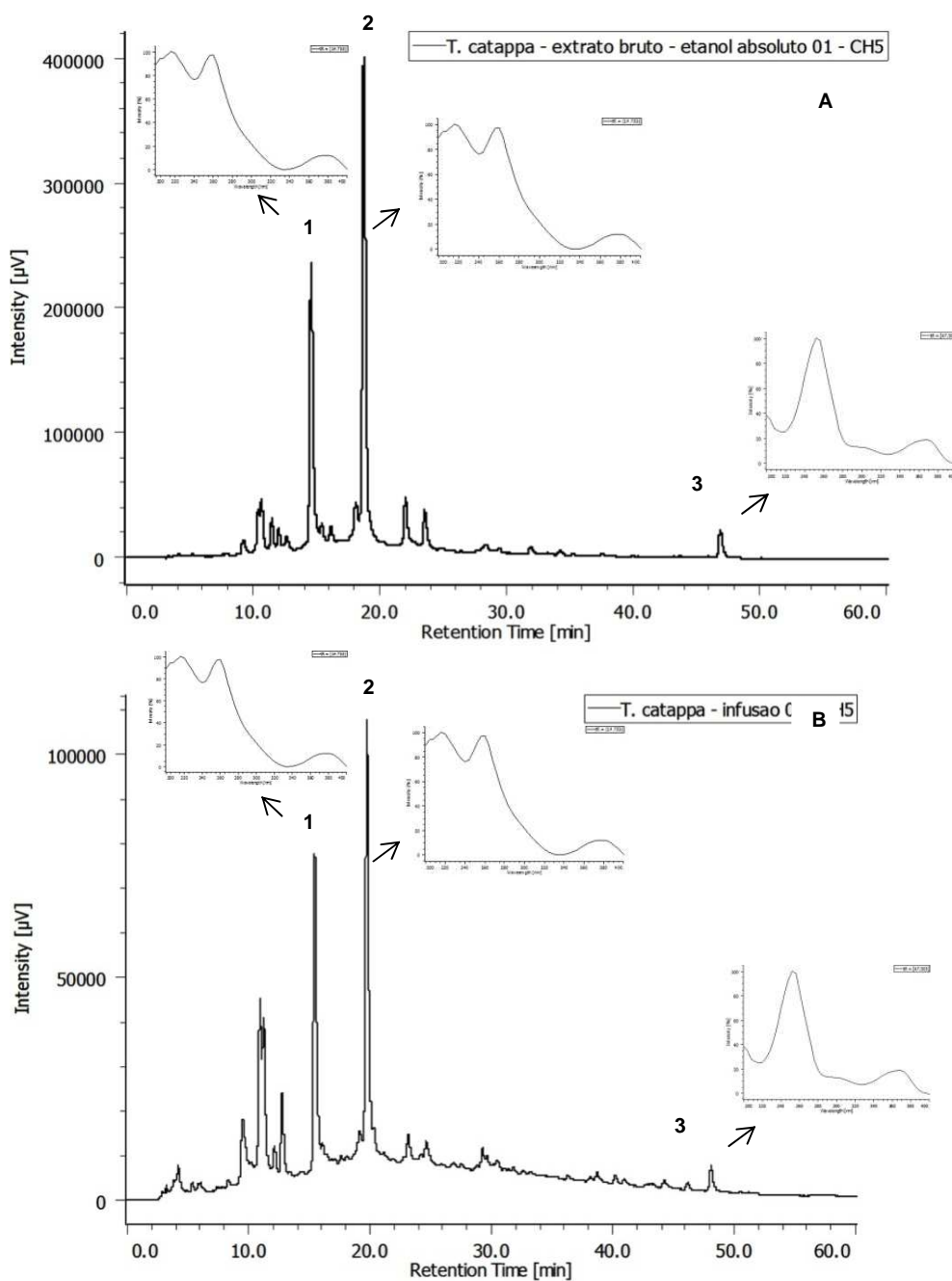
Figura 7 - Sobreposição dos cromatogramas da fração aquosa proveniente do extrato hidroalcoólico (em preto) e do extrato etanólico (em vermelho). Pico (1) e pico (2), anômeros da punicalagina, com UVs característicos. Coluna Hydro, vazão de 1 mL.min⁻¹ em método gradiente, 5-60% MeOH, 60 min. HPLC-PDA (Jasco®), 254 nm.



Levantamento etnofarmacológico indicou o uso popular de *T. catappa* para o tratamento de úlceras gástricas na forma de infusão (CHEN et al., 2000; FAN et al., 2004). Dessa forma, fez-se uma investigação sobre a composição química da infusão

das folhas de *T. catappa* a fim de comparar com o extrato etanólico. O cromatograma da infusão de folhas de *T. catappa* (Figura 8) confirmou, também, a presença de uma mistura de de anômeros da punicalagina (t_r 15,8), λ max 218, 260 e 379 nm e (t_r 21,7), λ max 218, 260 e 379 nm, (picos 1 e 2), respectivamente, e indicou a presença de ácido elágico (t_r 45,7), λ max 250, 306 e 368 nm (pico 3).

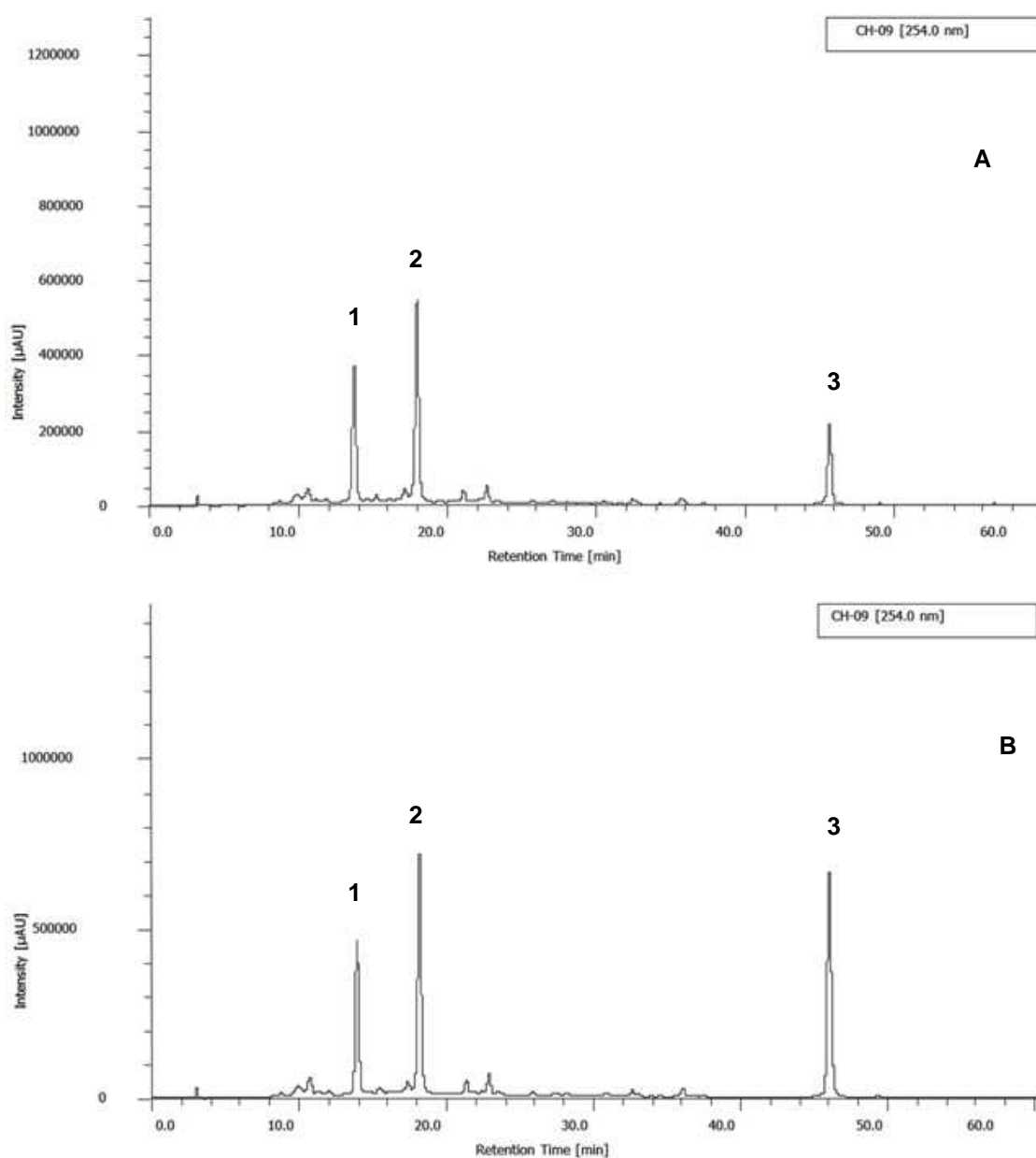
Figura 8 - Cromatograma do extrato etanólico das folhas de *T. catappa* (A) e cromatograma da infusão das folhas de *T. catappa* (B). Gradiente 5-60% MeOH, 60 min., 270 nm. Picos (1 e 2 = Punicalagina, 6 = ácido elágico) com respectivos UVs.



4.2 Confirmação da presença do ácido elágico, ácido gálico e galato de metila por experimentos de co-injeção de padrão

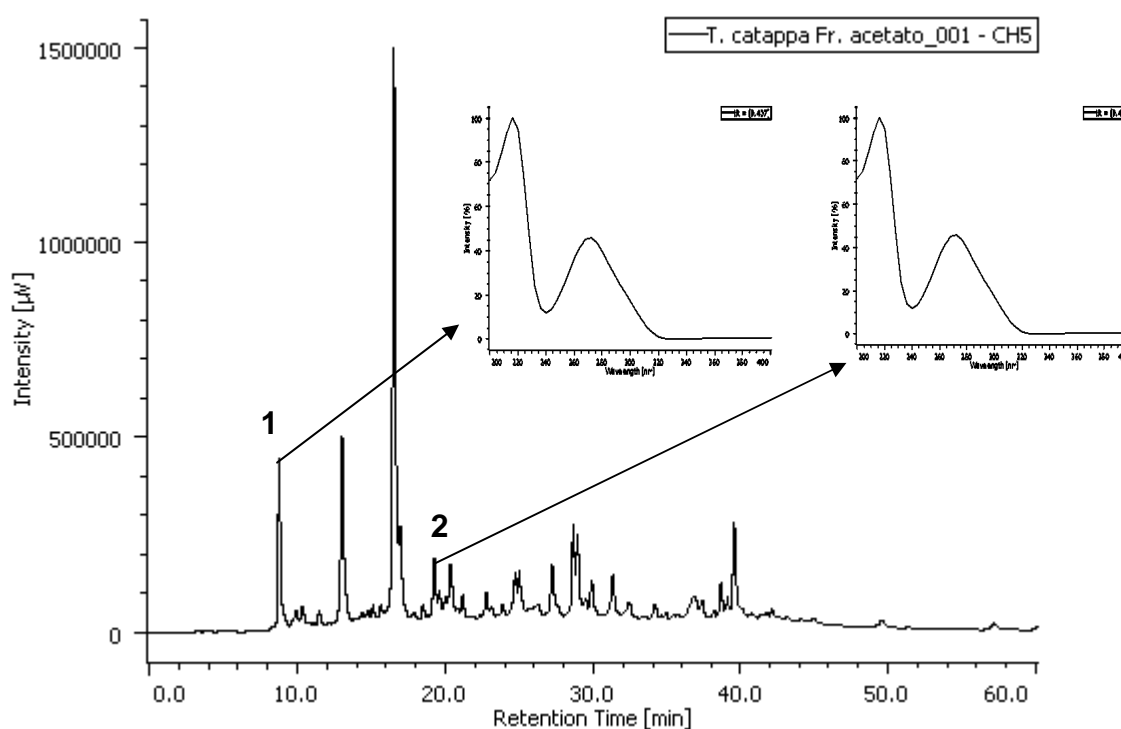
Substâncias comuns podem ser identificadas sem necessariamente serem isoladas, através de experimentos de co-injeção da amostra com padrão da substância. Após injeção do padrão, observou-se aumento considerável do pico eluindo em t_r 47,3 min. (pico 3), confirmando a presença do ácido elágico no extrato hidroalcoólico (Figuras 9 A e 9 B).

Figura 9 - Cromatograma indicando pico eluindo em t_r 46,3 min., após experimento de co-injeção do padrão ácido elágico (**B**) (SIGMA®) ao extrato hidroalcoólico (**A**) das folhas de *T. catappa*. Coluna Hydro, vazão de $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$. em método gradiente, 5-60% MeOH, 60 min. HPLC-PDA (Jasco®), 254 nm.



A fração acetato de etila proveniente do extrato hidroalcoólico (7:3, v/v) foi analisada a fim de se detectar a presença de ácido gálico e galato de etila. A análise dos espectros de UV dos picos em t_r 8,72 min. e do em t_r 19,22 min. apresentaram espectros de UV característicos dos ácidos gálico e galato de metila, respectivamente (MOURA et al., 2011). O pico 1 apresentou espectro de UV com absorções máximas em (λ_{\max} 271 nm), indicando a presença do ácido gálico. O pico 2 apresentou absorções máximas em torno de (λ_{\max} 274 nm), indicando a possível presença do galato de metila, conforme indicado nos espectros da Figura 10.

Figura 10 - Cromatograma da fração acetato de etila, antes do experimento de co-injeção de padrões. Pico (1) e pico (2) com UVs característicos do ácido gálico (1) e galato de metila (2). Coluna Hydro, vazão de 1 mL.min⁻¹. em método gradiente, 5-60% MeOH, 60 min. HPLC-PDA (Jasco®), 254 nm.



Após a adição dos padrões de ácido gálico e galato de metila (SIGMA®), verificou-se aumento considerável dos picos (1) e (2) com tempos de retenção parecidos, conforme indicado na Figura 11 e 12, respectivamente.

Figura 11 - Espectro na região de UV (pico 1), eluindo em t_r 8,72 min. característico do ácido gálico (λ_{\max} 271 nm), após experimento de co-injeção do padrão ácido gálico (SIGMA®) à fração acetato, (1:1 v/v). Coluna Hydro, fluxo 1 mL.min⁻¹. em método gradiente, 5-60% MeOH, 60 min. HPLC-PDA (Jasco®), 270 nm.

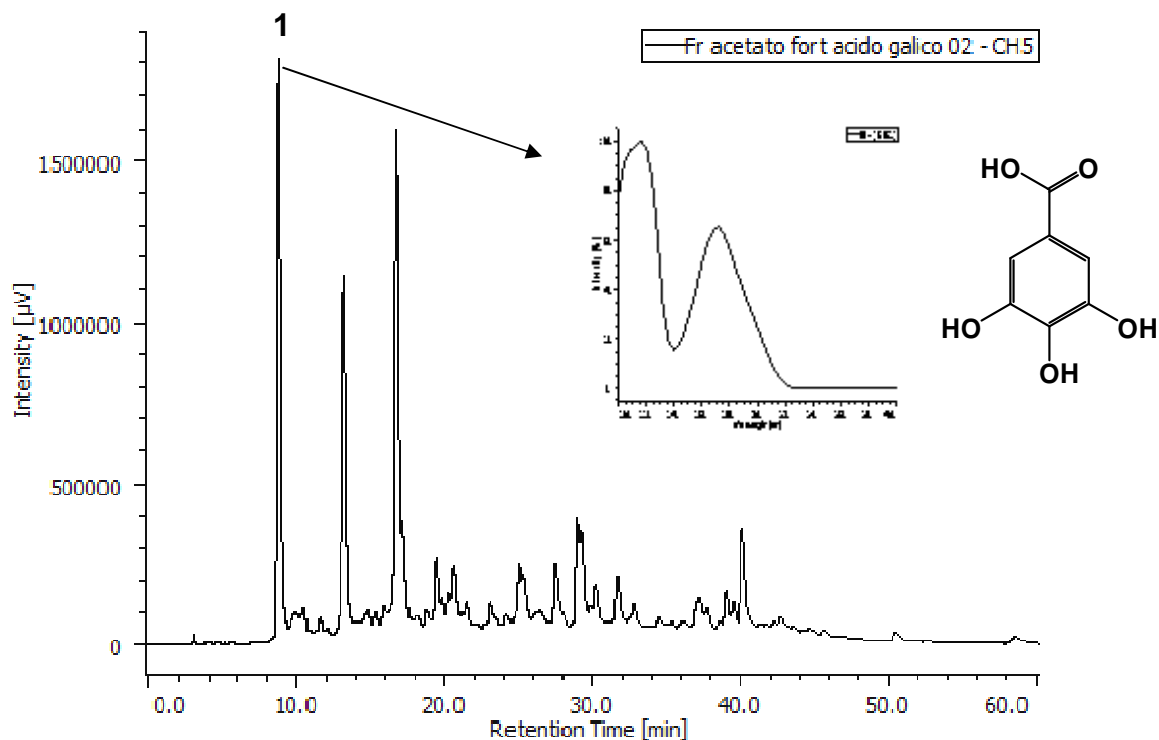
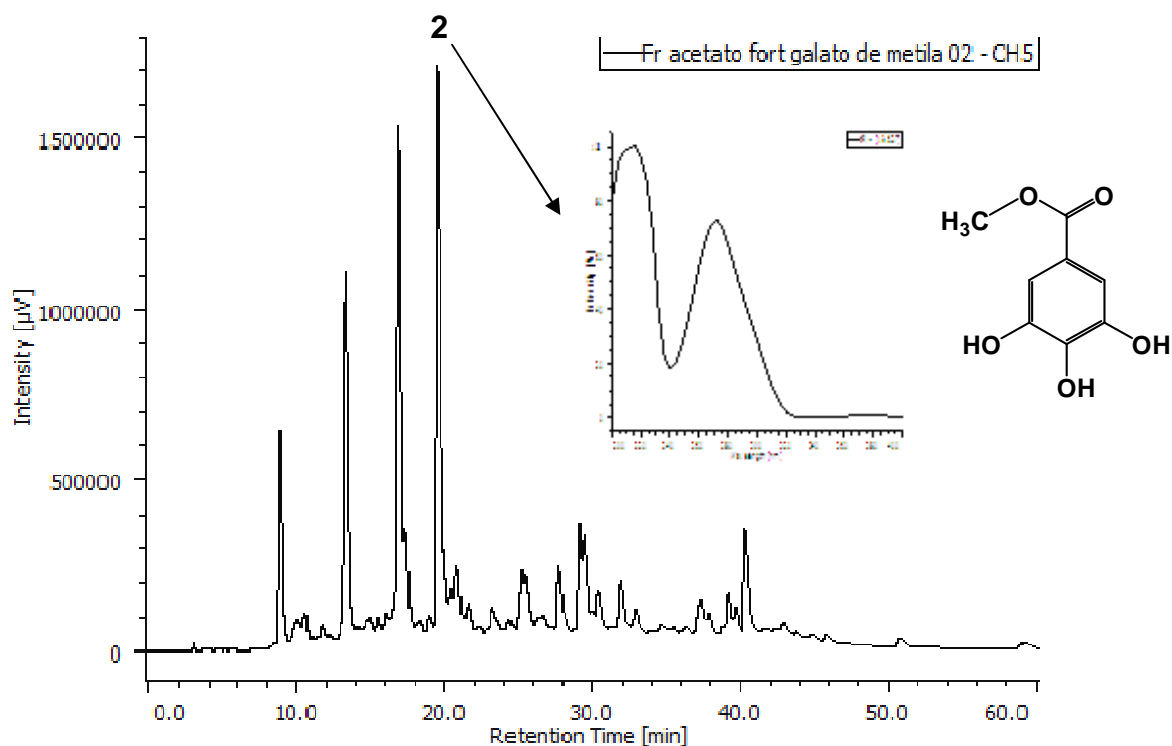


Figura 12 - Espectro na região de UV (pico 2), eluindo em t_r 19,62 min. característico do galato de metila (λ_{\max} 274 nm), após experimento de co-injeção do padrão galato de metila (SIGMA®) à fração acetato, (1:1 v/v). Coluna Hydro, vazão de 1 mL.min⁻¹. em método gradiente, 5-60% MeOH, 60 min. HPLC-PDA (Jasco®), 270 nm.



4.3 Análises do extrato hidroalcoólico, etanólico e fração aquosa por FIA-ESI-IT-MS/MS

O desenvolvimento de métodos analíticos que combinam menor tempo de análise, maior sensibilidade e seletividade, simplicidade de manuseio, baixo custo e potencialidade adequada para automação constitui-se num campo de pesquisa amplo e em constante expansão na área de Química Analítica. Nesse contexto, a análise por injeção em fluxo, FIA - *Flow Injection Analysis* tem sido explorada com sucesso na análise de grande diversidade de substâncias, proporcionando várias vantagens, tais como uso de instrumentação versátil, baixo custo dos componentes do sistema, elevada frequência de amostragem, consumo reduzido de reagentes e amostras e, conseqüentemente, redução na geração de resíduos (DANET et al., 2001; RUZICKA & HANSEN, 2008; CATALDI et al., 2008; PACIFICO et al., 2011; LANÇAS, 2013). Além disso, o sistema FIA pode ser automatizado, minimizando os riscos de intoxicação do analista devido a uma menor exposição aos reagentes e amostras em comparação aos procedimentos manuais.

Nos últimos anos, vários trabalhos vêm demonstrando que análises por MS usando o modo de inserção direta da amostra (FIA), sem a necessidade de complexas etapas de preparação e *clean up*, resguardando somente as etapas mais simples que envolvem filtração, diluição e/ou adição de um modificador para auxiliar a ionização estão sendo usadas. Este método tem se destacado como uma forma mais representativa e rápida de estabelecer a composição química de uma determinada matriz e esta abordagem tem sido empregada no controle de qualidade e na verificação da autenticidade de diversos tipos de amostras, incluindo bebidas, alimentos e até mesmo extratos de plantas (MAURI & PIETTA, 2000; GOODACRE et al., 2002; CATHARINO et al., 2006; PACIFICO et al., 2011; LANÇAS, 2013, COSTA, 2014; WYREPKOWSKI, 2014).

Em vista do exposto e conhecendo, em parte, a composição química da planta, foi realizada, nesta etapa do estudo, a caracterização dos metabólitos secundários presentes no extrato hidroalcoólico, etanólico e da fração aquosa proveniente do extrato etanólico das folhas de *T. catappa* por FIA-ESI-IT-MSⁿ.

O primeiro evento foi uma varredura completa (*full-scan*) do espectro de massas para adquirir os dados dos íons na faixa *m/z* estabelecida. A partir dos dados da

primeira varredura, obtiveram-se os próximos eventos (experimentos MSⁿ) para íons precursores pré-selecionados com energia de colisão entre 25 e 30% da energia total do instrumento. Utilizou-se o software *Xcalibur* versão 1.3 (Thermo Finnigan®) durante a aquisição e processamento dos dados espectrométricos. As Figuras 13, 14 e 15 mostram os espectros de massas em modo *full-scan*, apresentando os íons precursores das moléculas desprotonadas ([M – H]⁻) do extrato hidroalcoólico, etanólico e da fração aquosa proveniente do extrato etanólico das folhas de *T. catappa*.

Figura 13 - Espectro de massas de primeira-ordem, em modo *full-scan* (extrato hidroalcoólico) das folhas de *T. catappa* em modo negativo e ampliações das regiões entre (a) m/z 301,8 a 300,6 Da e (b) 603,0-601,0 Da. Faixa de íons com m/z de 100-2000 Da.

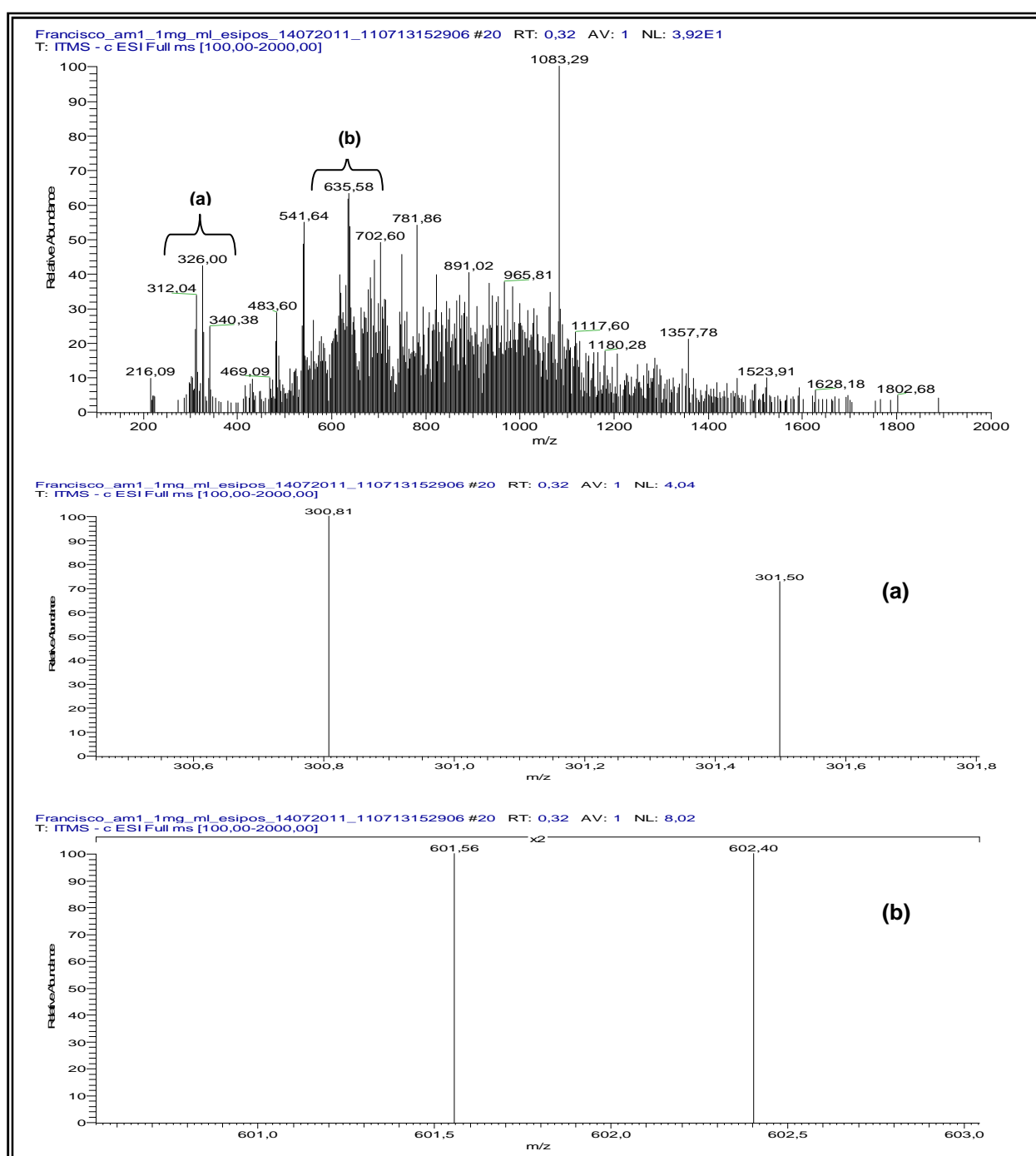


Figura 14 - Espectro de massas de primeira-ordem, em modo *full-scan* do extrato etanólico das folhas de *T. catappa* em modo negativo. Faixa de íons com m/z de 100-2000 Da. Ampliação (C) da região entre 600,5 a 602,5.

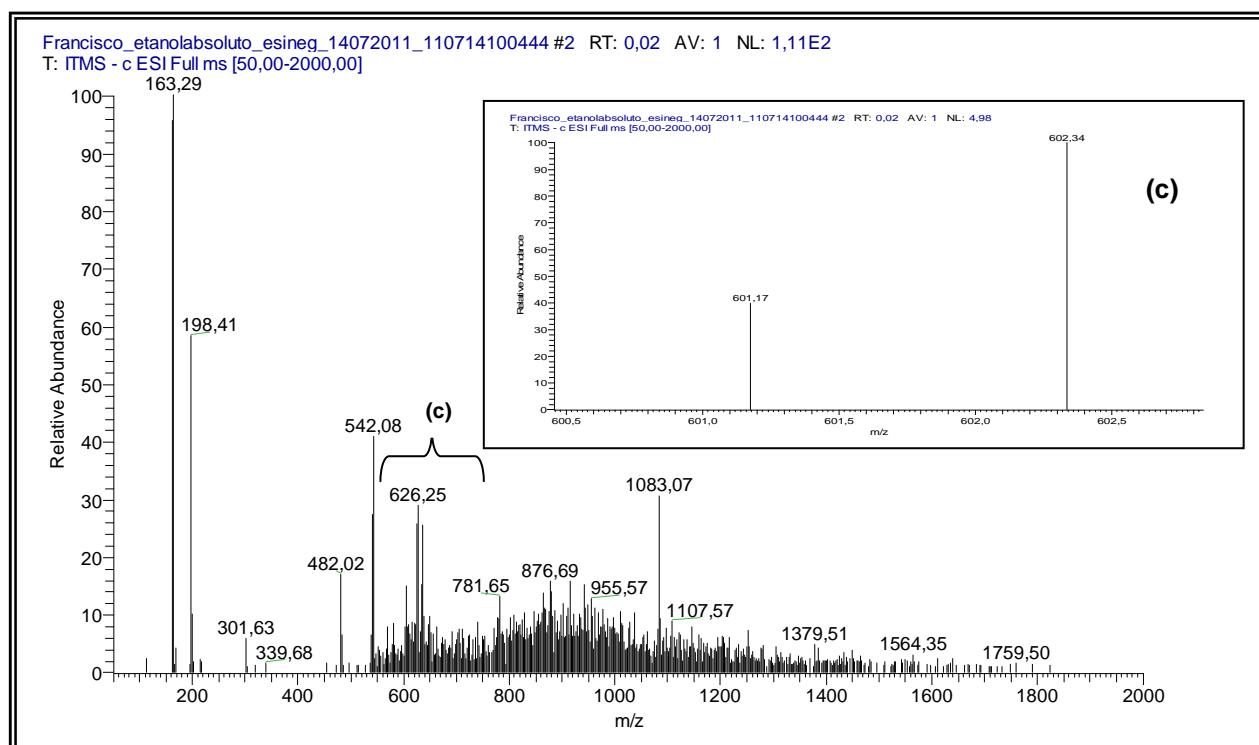
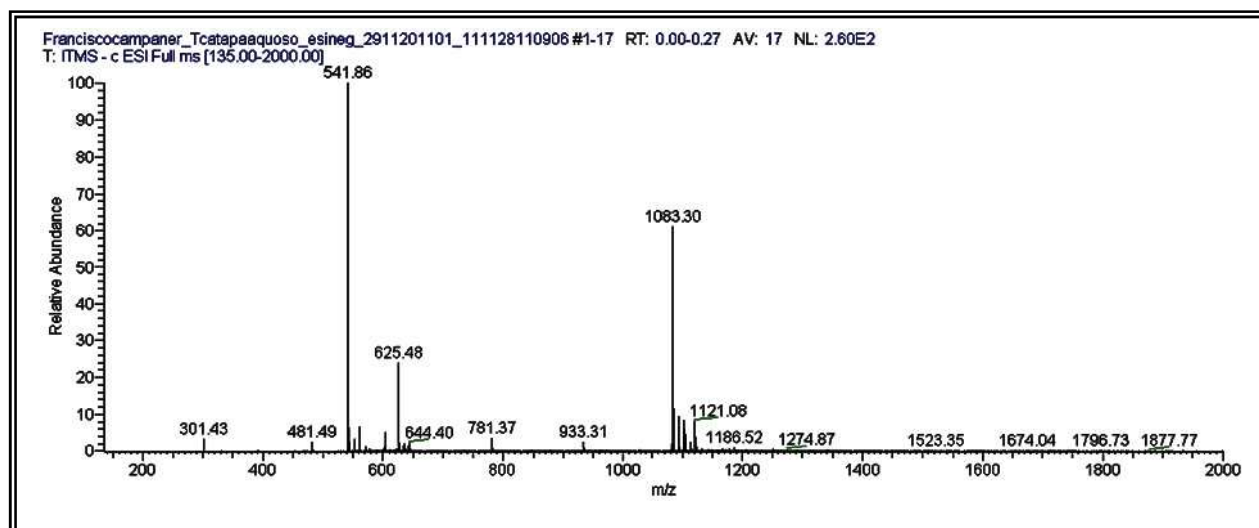


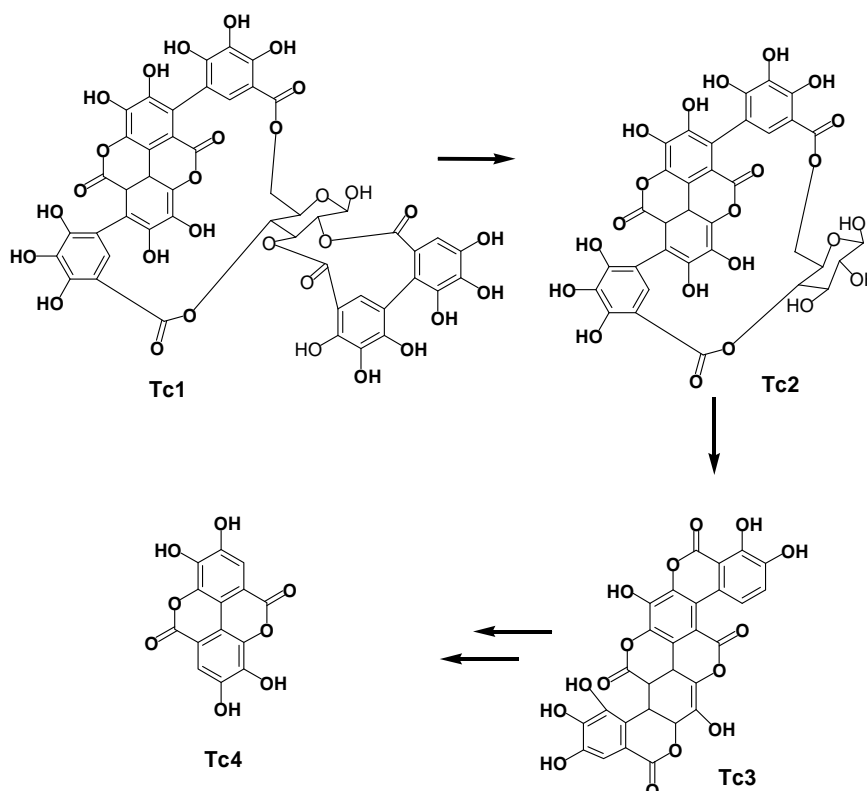
Figura 15 - Espectro de massas de primeira ordem, em modo *full-scan*, da fração aquosa das folhas de *T. catappa* avaliado em modo negativo. Faixa de íons com m/z de 300-1200 Da.



Na análise dos espectros de massas em *full-scan* do extrato hidroalcoólico e etanólico (Figuras 13 e 14), destacaram-se os íons precursores $[(M - H)^-]$ m/z 1083 (**Tc1**) (Punicagina), m/z 781 (**Tc2**) (Punicalina), m/z 601 (**Tc3**) (Ácido Galágico) e m/z 301 (**Tc4**) (Ácido Elágico). Seeram et al., 2005, estudando suco industrializado de romã (*Punica grantum* L.), identificaram esses mesmos íons precursores e fragmentações

semelhantes, como demonstrados nas discussões a seguir. As ampliações do espectro em modo *full scan* das Figuras 13 e 14 mostram a presença dos íons em m/z 601 (**Tc3**) indicando, provavelmente, a presença do ácido galágico. Na literatura, os esquemas de fragmentações destas substâncias já são propostos. Os autores argumentam que a presença de punicalina e ácido galágico no espectro de massas é indicativa de que podem ser produtos da degradação da punicalagina devido à alta energia usada na análise. Este fato é consistente com outros trabalhos publicados (SEERAM, 2005), onde análise MS/MS de punicalagina resultou na conversão parcial em punicalina (**Tc2**) (M-H m/z 781), ácido galágico (**Tc3**) (M-H m/z 601) e ácido elágico (**Tc4**) (M-H m/z 301), conforme indicado na Figura 16.

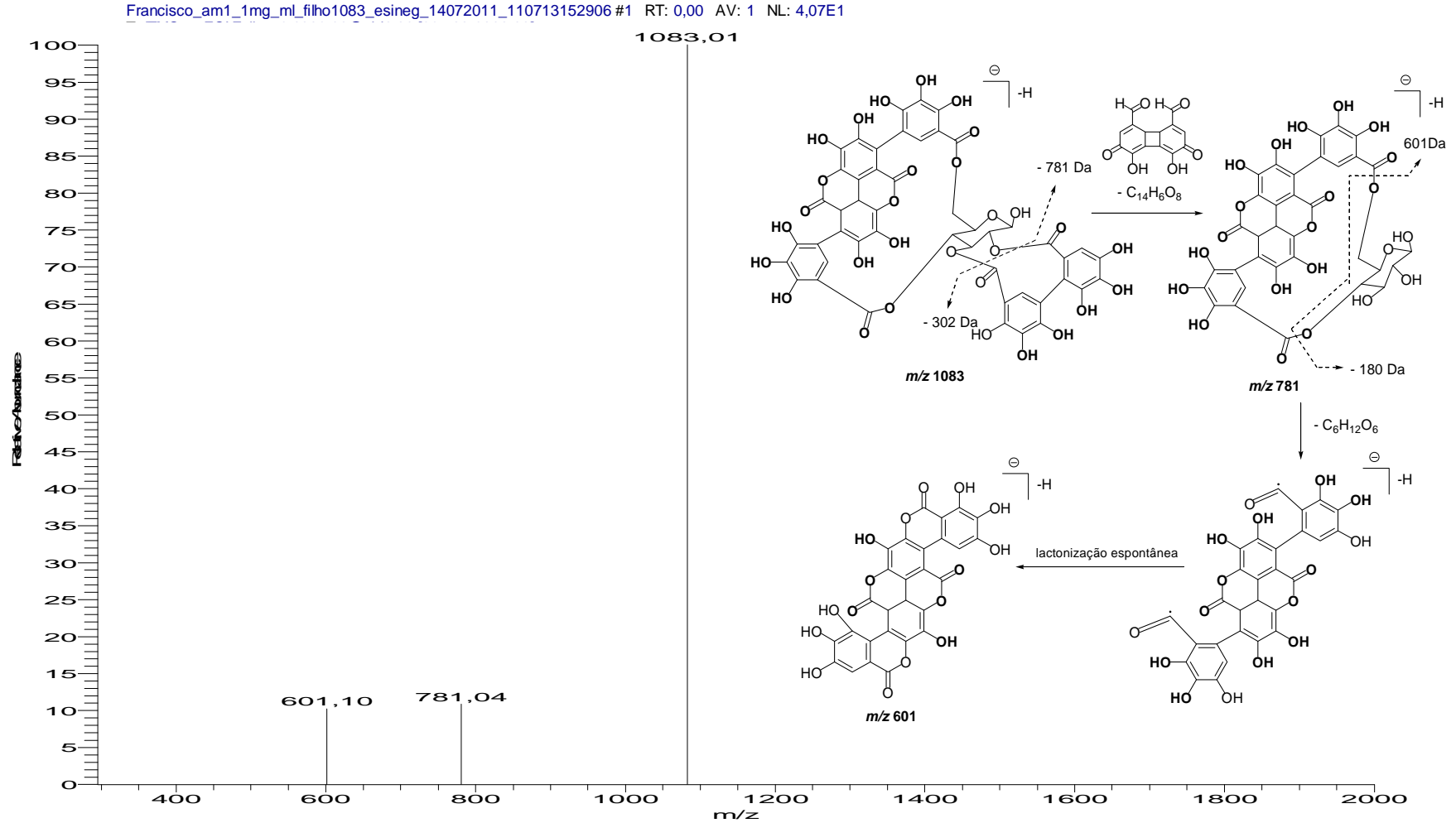
Figura 16 - Punicalagina (**Tc1**), Punicalina (**Tc2**), Ácido galágico (**Tc3**) e Ácido elágico (**Tc4**).



Fonte: Adaptado de SEERAM et al, 2005.

Assim, como demonstrado no esquema da Figura 16, as análises das fragmentações nos espectros de segunda-ordem (MS/MS) dos extratos hidroalcoólico, etanólico e da fração aquosa (Figuras 17, 18, 19 e 20) possibilitaram confirmar a presença qualitativa dos metabólitos **Tc1**, **Tc2**, **Tc3** e **Tc4**, respectivamente.

Figura 17 - Espectro de massas de segunda-ordem do íon precursor de m/z 1083 (**Tc1**), obtido em modo negativo com energia de colisão de 30% e proposta de fragmentação.



O íon precursor com m/z 1083 (Figura 17) corresponde à molécula desprotonada da punicalagina. MS/MS deste íon levou ao íon produto de m/z 781 da punicalina (**Tc2**) a partir da perda da unidade hexahidroxidifenoíla (HHDP) [M-H-302]. A perda de um resíduo de açúcar leva ao fragmento em m/z 601 (**Tc3**) correspondente ao ácido galágico.

Fragmentação em segunda e terceira ordem do íon precursor de m/z 781 (Figura 18) sugeriu a presença do ácido galágico em m/z 601 (Figura 19), conforme descrito anteriormente. Analisando a fragmentação de segunda-ordem do íon precursor em m/z 601 (Figura 19), verifica-se a formação de um fragmento em m/z 299 provavelmente devido à perda de duas unidades galoila [M-H-152-152]. Os fragmentos com m/z 271 e m/z 243 surgem a partir da perda de duas moléculas de monóxido de carbono (m/z 28), respectivamente (PFUNDSTEIN, 2010; QING, 2012). A identificação do ácido elágico também pode ser confirmada pela análise do esquema de fragmentação do íon precursor m/z 301 (Figura 20). Observa-se, também, perda de dióxido de carbono (CO_2) com a formação do íon produto com m/z 257. Perda de monóxido de carbono (CO) forma o fragmento com m/z 229.

Figura 18 - Espectro de massas de segunda-ordem do íon precursor de m/z 781 (**Tc2**), obtido em modo negativo com energia de colisão de 30%.

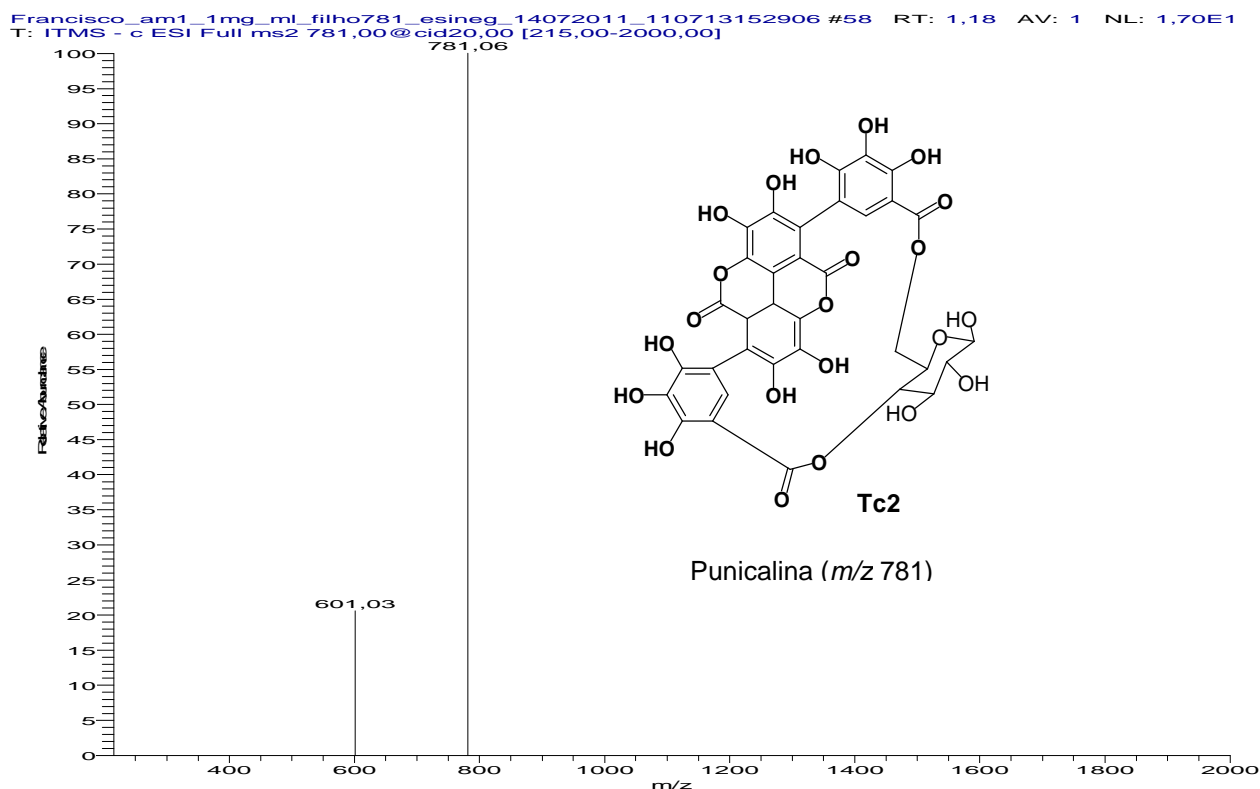


Figura 19 - Espectro de massas de segunda-ordem do íon precursor de m/z 601 (**Tc3**), obtido em modo negativo com energia de colisão de 30%.

Francisco_am1_1mg_ml_filho601_esineg_14072011_110713152906 #23 RT: 0,45 AV: 1 NL: 1,18
T: ITMS - c ESI Full ms2 601,00@cid24,00 [165,00-2000,00]

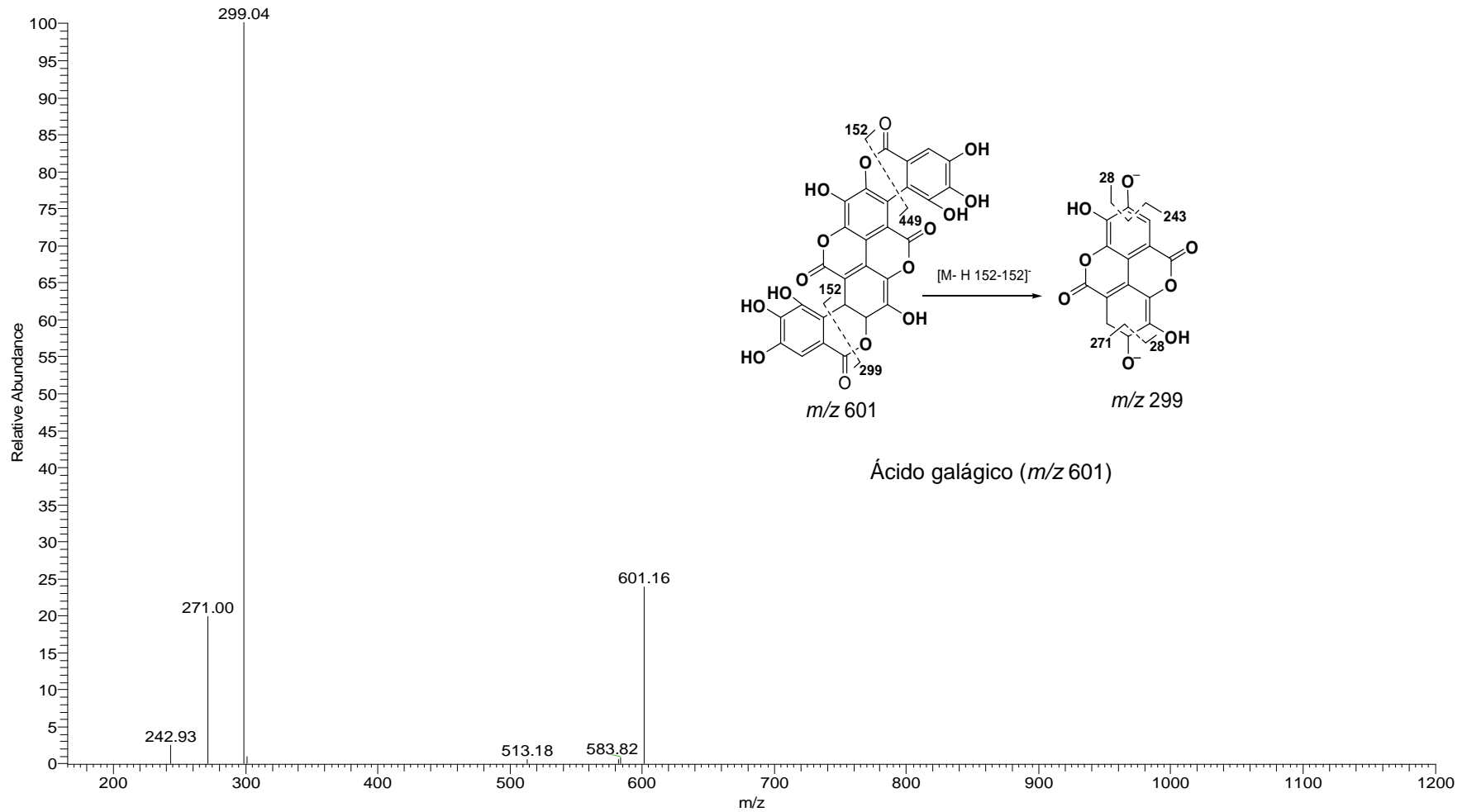
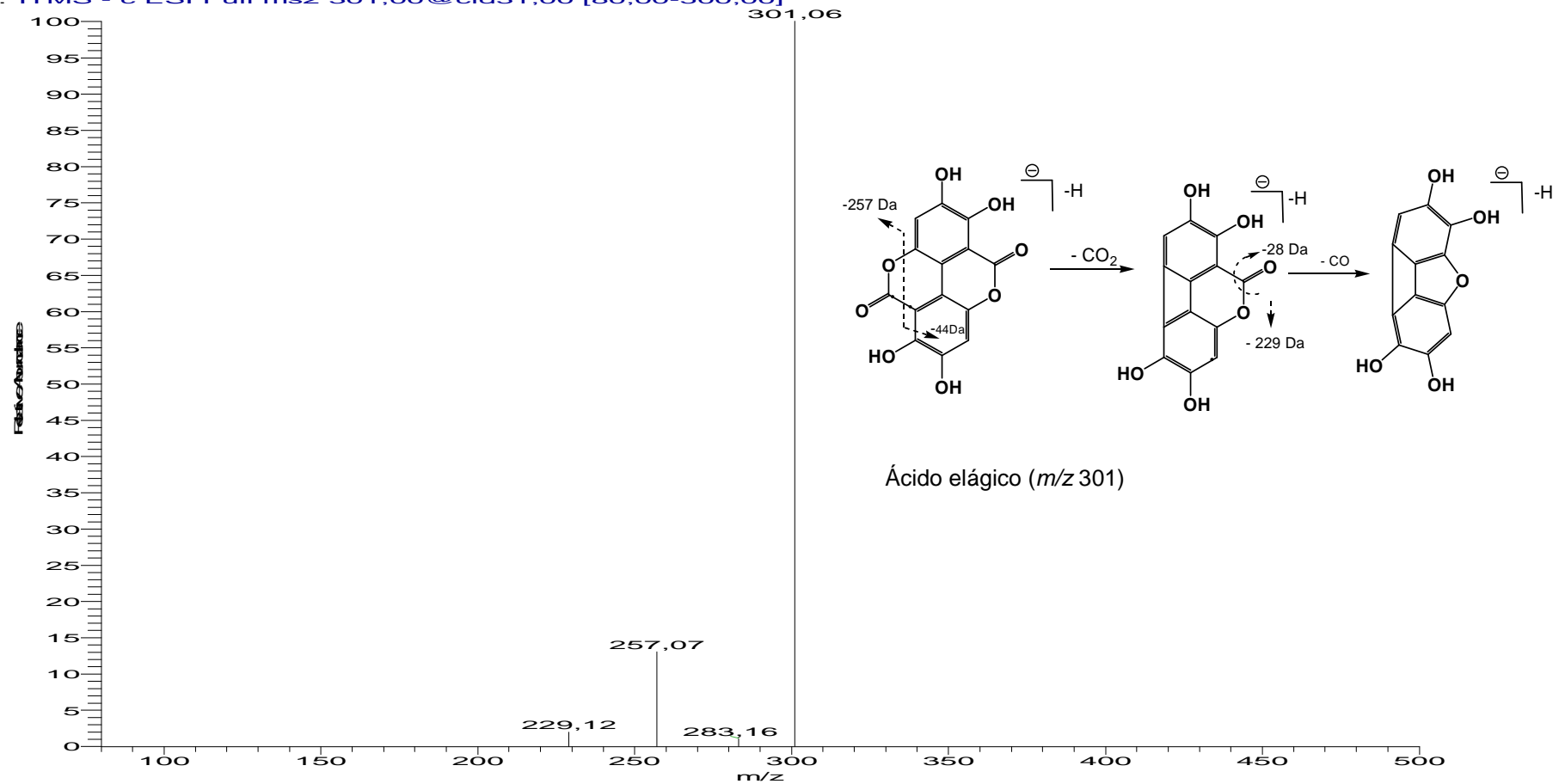


Figura 20 - Espectro de massas de segunda-ordem do íon precursor de m/z 301 (**Tc4**), obtido em modo negativo com energia de colisão de 30% e proposta de fragmentação.

Francisco_am1_1mg_ml_filho301_esineg_14072011_110713152906 #2-27 RT: 0,00-0,36 AV: 26 NL:
T: ITMS - c ESI Full ms2 301,00@cid31,00 [80,00-500,00]



A partir da análise do extrato hidroalcoólico de *T. catappa* por FIA-ESI-IT-MSⁿ, foi possível, também, a identificação de outras substâncias. As Figuras de 21 a 29 apresentam as estruturas das substâncias identificadas por esta técnica e, na sequência, a discussão do esquema e propostas de fragmentações.

O espectro de massas do íon com m/z 635 (**Tc5**) (Figura 21) sugere a fórmula molecular $C_{27}H_{24}O_{18}$. Essa substância pode existir, possivelmente, na forma de isômeros: 1,2,3-Tri-O-galoil- β -D-glicose, 1,2,4-Tri-O-galoil- β -D-glicose, 1,2,6-Tri-O-galoil- β -D-glicose, 1,4,6-Tri-O-galoil- β -D-glicose, 1,3,4-Tri-O-galoil- β -D-glicose ou 3,4,6-Tri-O-galoil- β -D-glicose. Esta molécula apresentou fragmentos majoritários com m/z 483 e 465 correspondentes à perda de uma unidade galoila e subsequente perda de uma molécula de H_2O [M-152-18-H]⁻, conforme indicado na Figura 21. O mesmo padrão de fragmentação para a substância 3,4,6-Tri-O-galoil- β -D-glicose foi encontrado nas espécies *Terminalia bellerica*, *Terminalia chebula* e *Terminalia horrida* (PFUNDSTEIN, 2010).

Destaca-se, também, o íon em m/z 483 (**Tc6**) com fórmula molecular $C_{20}H_{19}O_{14}$, correspondente ao composto 1,6-Di-O-galoil- β -D-glicose ou isômeros. MS/MS deste íon leva aos fragmentos principais com m/z 439 a partir da perda de uma molécula de dióxido de carbono [M-H-44]⁻, produzindo o íon produto com fórmula molecular $C_{19}H_{19}O_{12}$ ⁻. Perda de fragmento com fórmula molecular $C_6H_6O_3$ ⁻ leva ao íon com m/z 313 (rota A, Figura 22). Outra possibilidade de fragmentação está indicada na (rota B, Figura 22), em que a perda de uma unidade de ácido gálico (-170 Da) conduz igualmente ao íon produto com m/z 313. Uma terceira possibilidade de fragmentação (rota C) conduz ao íon produto com m/z 271 a partir da perda do fragmento $C_7H_4O_5$ ⁻ (PFUNDSTEIN, 2010), conforme indicado na Figura 22.

A análise dos espectros das Figuras 23, 24 e 26 indicou a presença dos íons com m/z 339 (**Tc7**), m/z 325 (**Tc8**) e m/z 311 (**Tc10**). MS² e MS³ desses íons produziram, igualmente, pico base com m/z 183 (**Tc9**), atribuído ao galato de metila (Figura 25), proveniente da perda de fragmentos com m/z 142 [M-H-142]⁻ e m/z 128 [M-H-128]⁻, respectivamente. Os compostos com m/z 339, 325 e 311, portanto, foram caracterizados como derivados do éster metildigalato. A diferença de massas observada entre os íons com 325 e m/z 311 é devida à perda de um grupo $-CH_2$ (m/z 14). O mesmo padrão de fragmentação foi encontrado na literatura (AL-RAWAHI et al., 2014; HVATTUM, 2002).

O íon com m/z 619 (**Tc11**) pode ser caracterizado, provavelmente, como um derivado da apigenina: (**Tc12**) 6-C-(2''-galoil)- β -D-glicopiranosil ou (**Tc13**) 8-C-(2''-galoil)- β -D-glicopiranosil, conforme esquema de fragmentação indicado na Figura 28. (LIN et al., 2000) (Figuras 27 e 28). Fragmentações (MS^2) deste íon originaram íon produto com m/z 583 [M-H]⁻. Fragmentação de terceira-ordem (MS^3) do íon com m/z 619 produz o íon com m/z 431, devido à perda de uma unidade galoíla [M-H-152]⁻.

O íon de m/z 541(**Tc14**) pode ser considerado como um derivado HHDP-acetilglicosídeo, conforme relatos da literatura (AL-RAWAHI et al., 2014). Esse íon tem como precursores a própria punicalagina e punicalina. Punicalina perde a unidade de açúcar [M-H-180]⁻, produzindo a forma não lactonizada do ácido galágico. Esse composto sofre lactonização espontânea, produzindo o íon de m/z 601. Perda de um fragmento com m/z 60 Da produz um pico intenso (pico base) em m/z 541. Em sequência, perda de um fragmento de m/z 240 Da produz o íon em m/z 301, correspondente à molécula desprotonada do ácido elágico (Figura 29).

Tendo em vista que o modelo de gastroproteção utilizado no Laboratório de Ensaio Biológicos com Produtos Naturais do IBB-UNESP/Botucatu foi realizado a partir do extrato etanólico e frações provenientes das partições deste extrato, buscou-se analisar o mesmo por FIA-ESI-IT- MS^n , cujo espectro de massas em modo *full scan* está demonstrado na Figura 14, na página 69.

Experimentos MS/MS (Figura 30) dos principais íons encontrados no extrato etanólico revelaram que os fragmentos são iguais aos detectados nos espectros do extrato hidroalcoólico, confirmando, mais uma vez, a presença da punicalagina, m/z 1083 (**Tc1**), punicalina, m/z 781 (**Tc2**) e do ácido galágico, m/z 601 (**Tc3**).

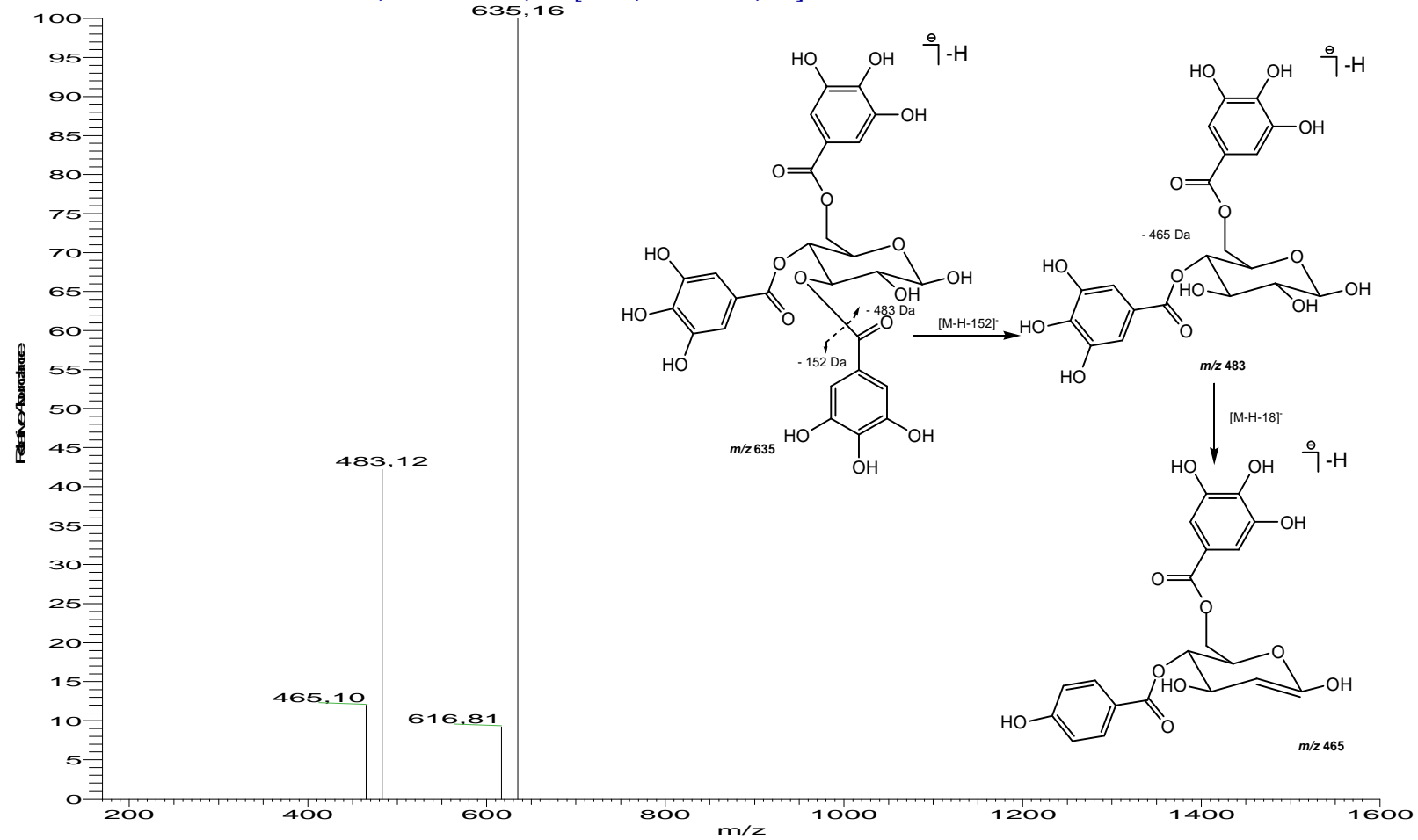
Fica evidente, pela análise do espectro de massas da fração aquosa (Figura 15, página 67), a existência de praticamente os mesmos compostos anteriormente detectados nos extratos hidroalcoólico e etanólico: punicalagina, m/z 1083 (**Tc1**); punicalina, m/z 781 (**Tc2**); e do ácido galágico, m/z 601 (**Tc3**). Angel et al., (2003) também relata, para espécie *T. catappa*, a presença de taninos hidrolisáveis como compostos majoritários. Estes dados foram relevantes para explicar o pronunciado efeito gastroprotetor apresentado pela fração aquosa (item 4.10, pág. 142) que pode ser devido ao efeito sinérgico entre os diferentes compostos presentes na fração. Isso, provavelmente, se deve à maior presença de compostos polifenólicos, como os

taninos, que já são conhecidos pela literatura quanto a sua ação antiulcerogênica (ANDREO et al., 2006).

A partir dos dados obtidos por FIA-ESI-IT-MSⁿ, pode-se concluir, então, que os metabólitos punicalagina, punicalina, ácido galágico estão presentes indistintamente nos diferentes tipos de extrato (hidroalcoólico, etanólico e fração aquosa), porém em diferentes concentrações nos extratos e frações. Os resultados dos experimentos MS² e MS³ de íons presentes na fração aquosa proveniente do extrato etanólico das folhas de *T. catappa* estão indicados nas Figuras 31, 32, 33, 34, 35 e 36. A Figura 36 mostra a fragmentação (MS²) do íon com m/z 481, indicando a presença do composto HHDP-hexosídeo (**T16**), pela primeira vez detectado em *T. catappa*. Esse mesmo composto foi encontrado por Calani et al (2013) ao estudar sucos de *Punica granatum* L e por Al-Rawahi et al., (2014) a partir do estudo de cascas dos frutos de *Punica granatum*.

Figura 21 - Espectro de massas de segunda-ordem do íon precursor de m/z 635 (**Tc5**), representando o isômero (3,4,6-Tri-O-galoi- β -D-glicose), obtido em modo negativo com energia de colisão de 30% e proposta de fragmentação.

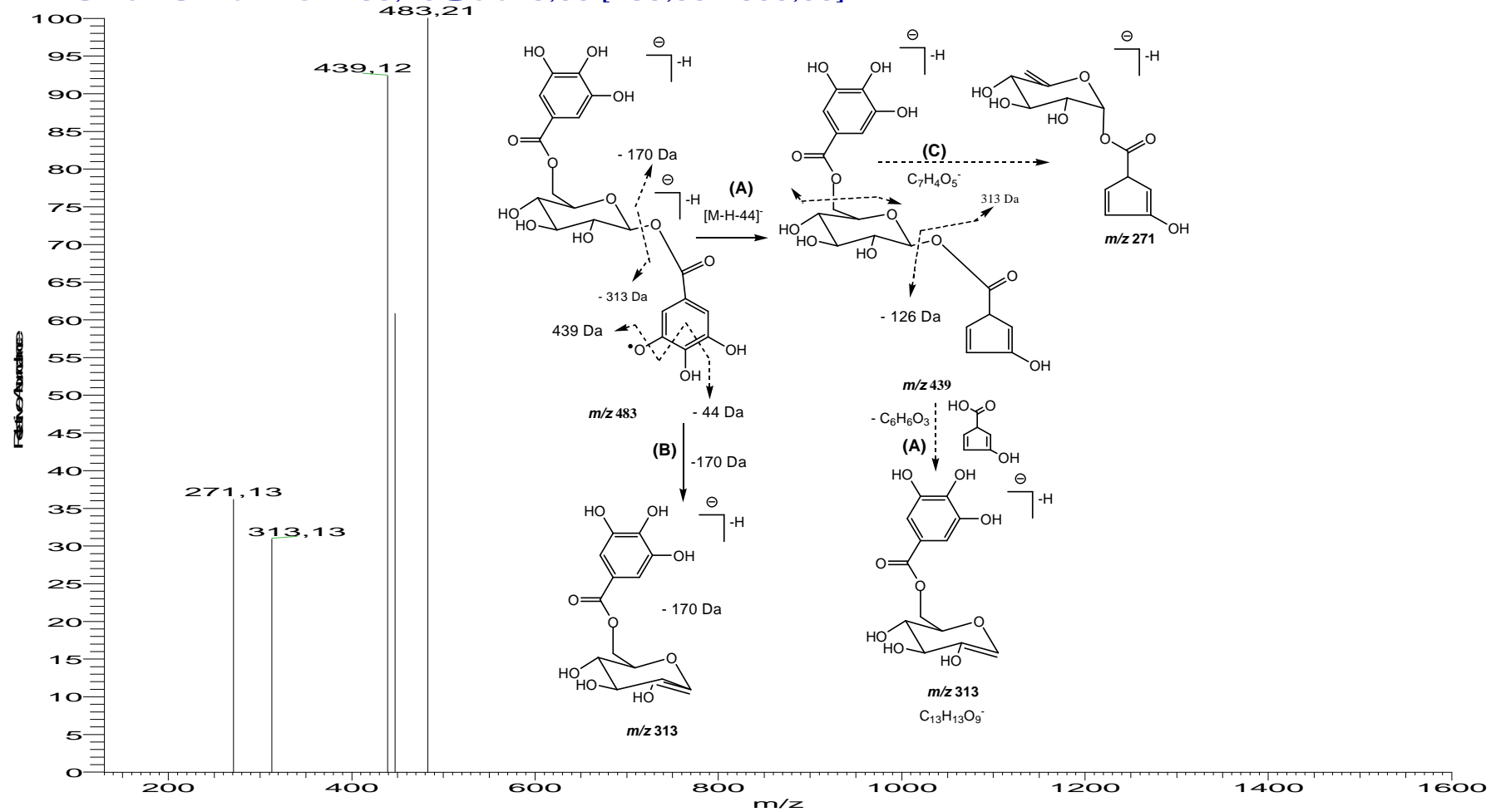
Francisco_am1_1mg_ml_filho635_esineg_14072011_110713152906 #15 RT: 0,25 AV: 1 NL: 1,38E1
T: ITMS - c ESI Full ms2 635,00@cid25,00 [170,00-1600,00]



Fonte: PFUNDSTEIN, 2010.

Figura 22 - Espectro de massas de segunda-ordem do íon precursor de m/z 483 (**Tc6**) (1,6-Di-O-galoil- β -D-glicose), obtido em modo negativo com energia de colisão de 30% e proposta de fragmentação.

Francisco_am1_1mg_ml_filho483_esineg_14072011_110713152906 #50 RT: 1,01 AV: 1 NL: 9,55
T: ITMS - c ESI Full ms2 483,40@cid25,00 [130,00-1600,00]

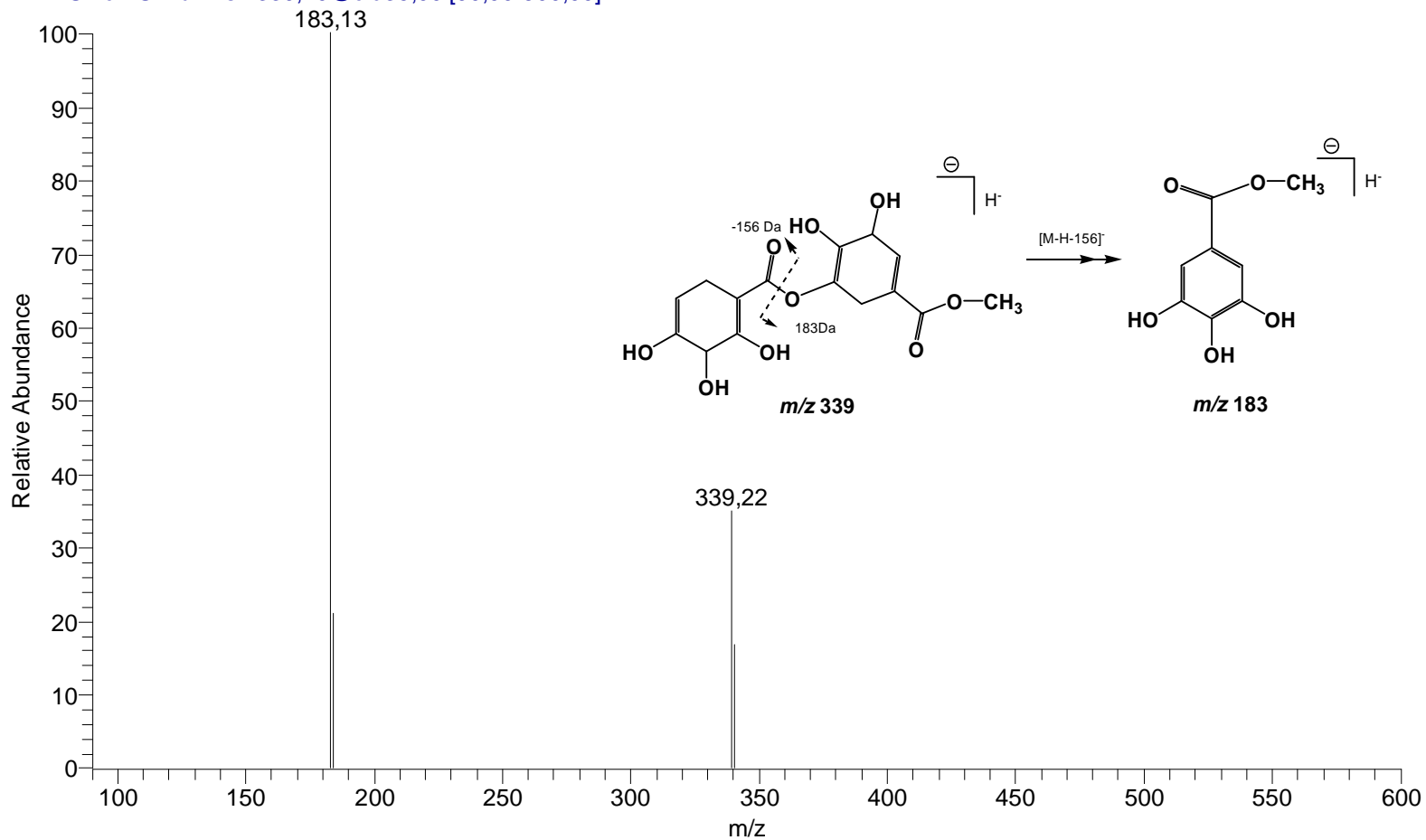


Fonte: PFUNDSTEIN, 2010.

Figura 23 - Espectro de massas de segunda-ordem do íon precursor de m/z 339 (**Tc7**) (derivado do galato de metila), obtido em modo negativo com energia de colisão de 30% e proposta de fragmentação.

Francisco_am1_1mg_ml_filho339_esineg_14072011_110713152906 #58 RT: 0,88 AV: 1 NL: 6,22

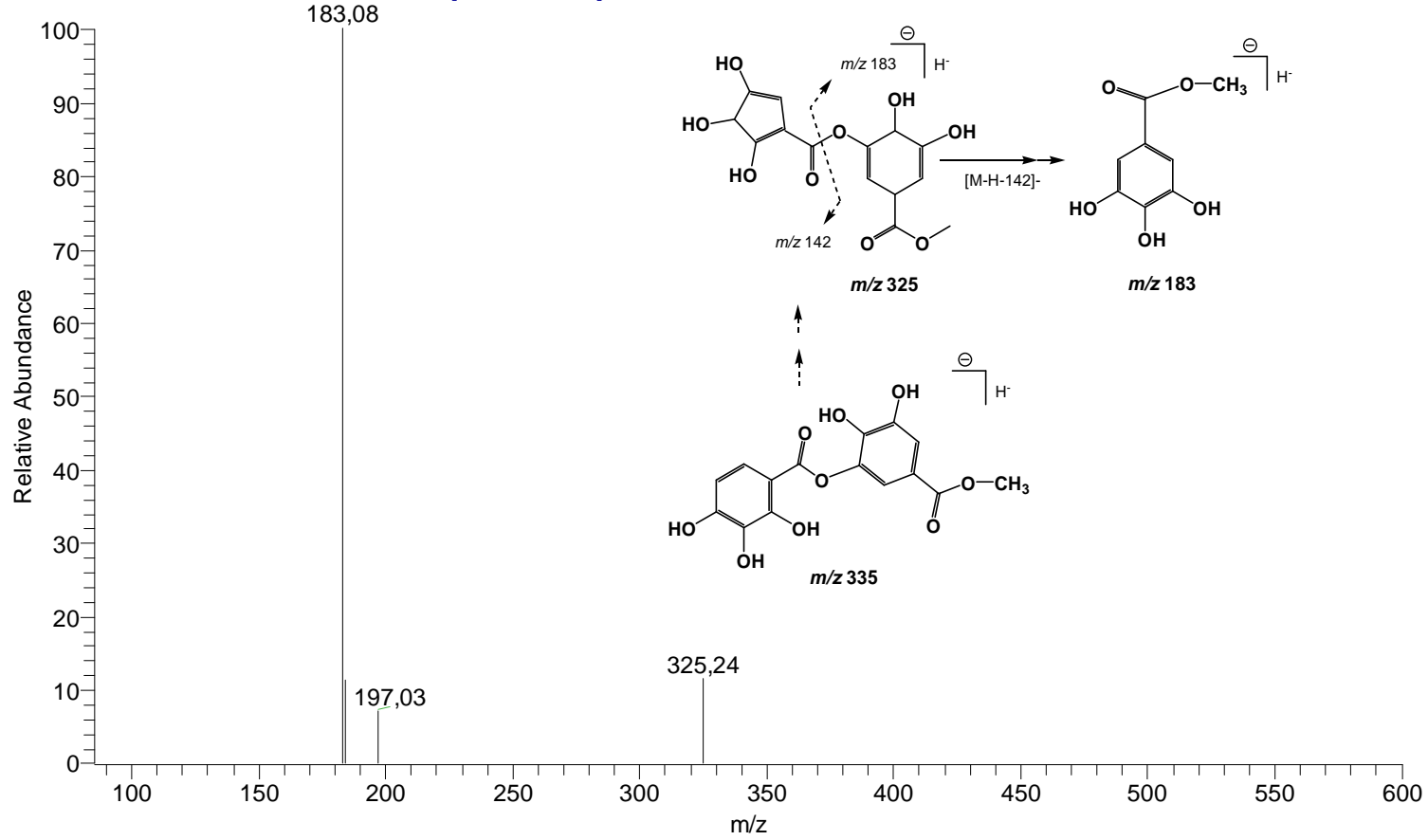
T: ITMS - c ESI Full ms2 339,70@cid35,00 [90,00-600,00]



Fonte: HVATTUM, 2002.

Figura 24 - Espectro de massas de segunda-ordem do íon precursor de m/z 325 (**Tc8**) (derivado do galato de metila), obtido em modo negativo com energia de colisão de 30% e proposta de fragmentação.

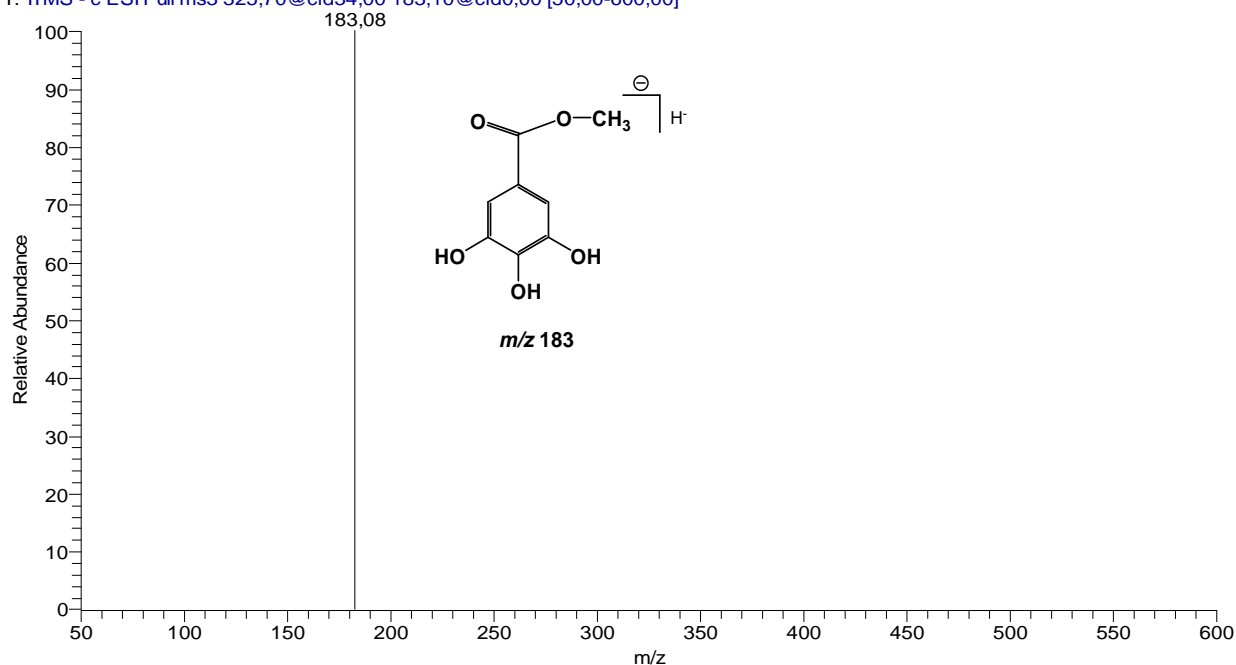
Francisco_am1_1mg_ml_filho325_esineg_14072011_110713152906 #36 RT: 0,53 AV: 1 NL: 1,50E1
T: ITMS - c ESI Full ms2 325,70@cid34,00 [85,00-600,00]



Fonte: AL-RAWAHI, 2014.

Figura 25 - Espectro de massas de terceira-ordem do íon precursor de m/z 325 (**Tc8**), obtido em modo negativo com energia de colisão de 30%, indicando o íon com m/z 183 (**Tc9**), correspondente ao galato de metila.

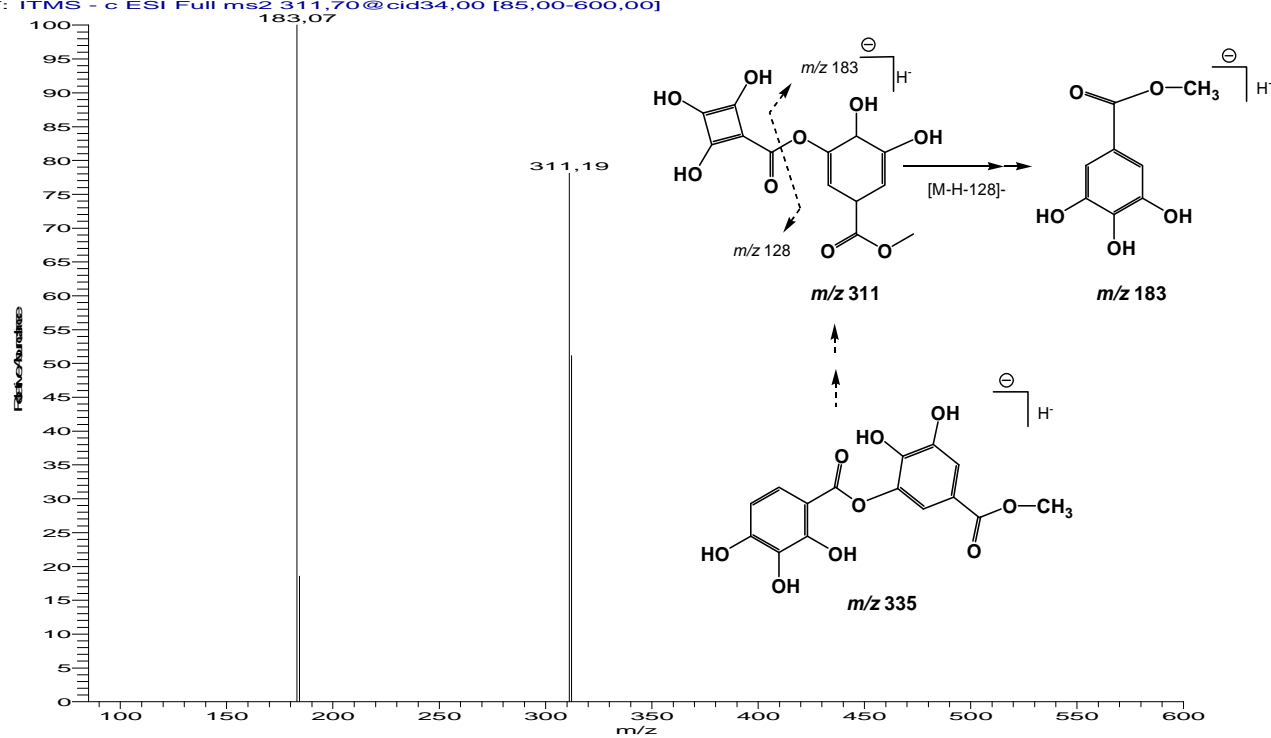
Francisco_am1_1mg_ml_filho325_esineg_14072011_110713152906 #45 RT: 0,67 AV: 1 NL: 1,75E1
T: ITMS - c ESI Full ms3 325,70@cid34,00 183,10@cid0,00 [50,00-600,00]



Fonte: AL-RAWAHI, 2014.

Figura 26 - Espectro de massas de segunda-ordem do íon precursor de m/z 311 (Tc10) (derivado do galato de metila), obtido em modo negativo com energia de colisão de 30% e proposta de fragmentação.

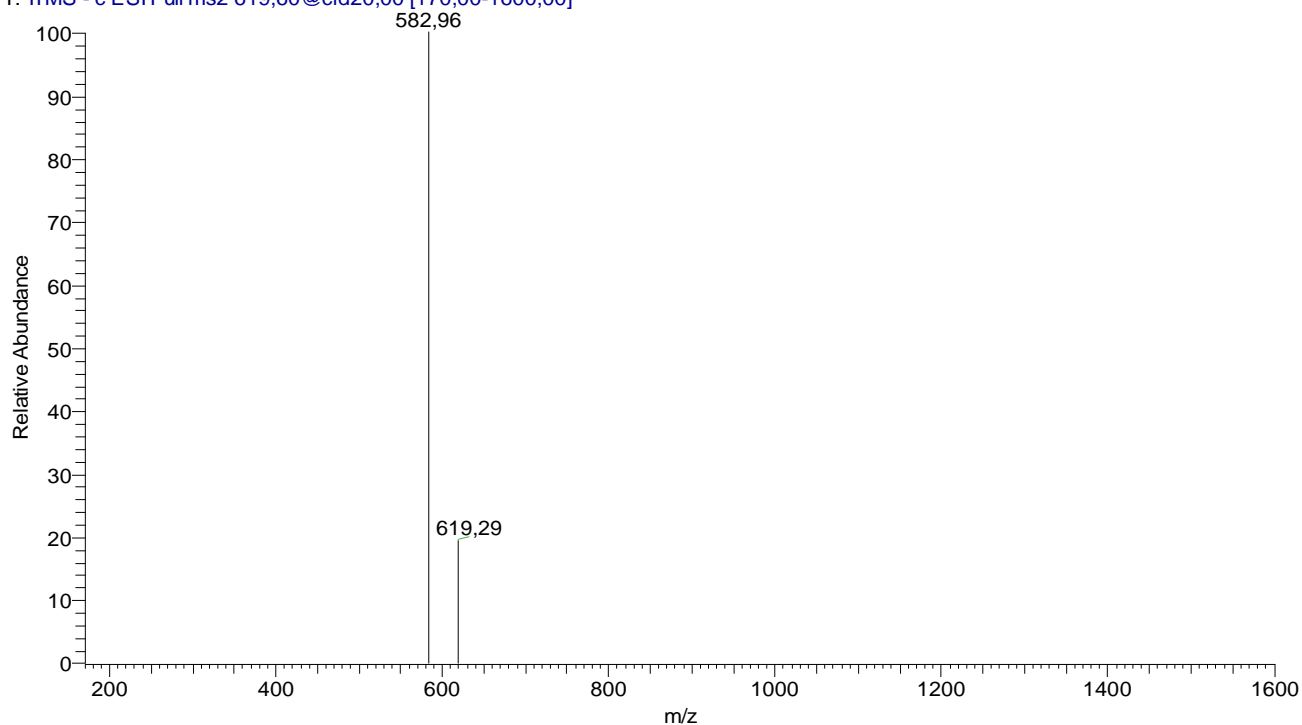
Francisco_am1_1mg_ml_filho311_esineg_14072011_110713152906 #34 RT: 0,49 AV: 1 NL: 1,15E1
T: ITMS - c ESI Full ms2 311,70@cid34,00 [85,00-600,00]



Fonte: AL-RAWAHI, 2014.

Figura 27 - Espectro de massas de segunda-ordem do íon precursor de m/z 619 (**Tc11**) (derivado da apigenina), obtido em modo negativo com energia de colisão de 30%.

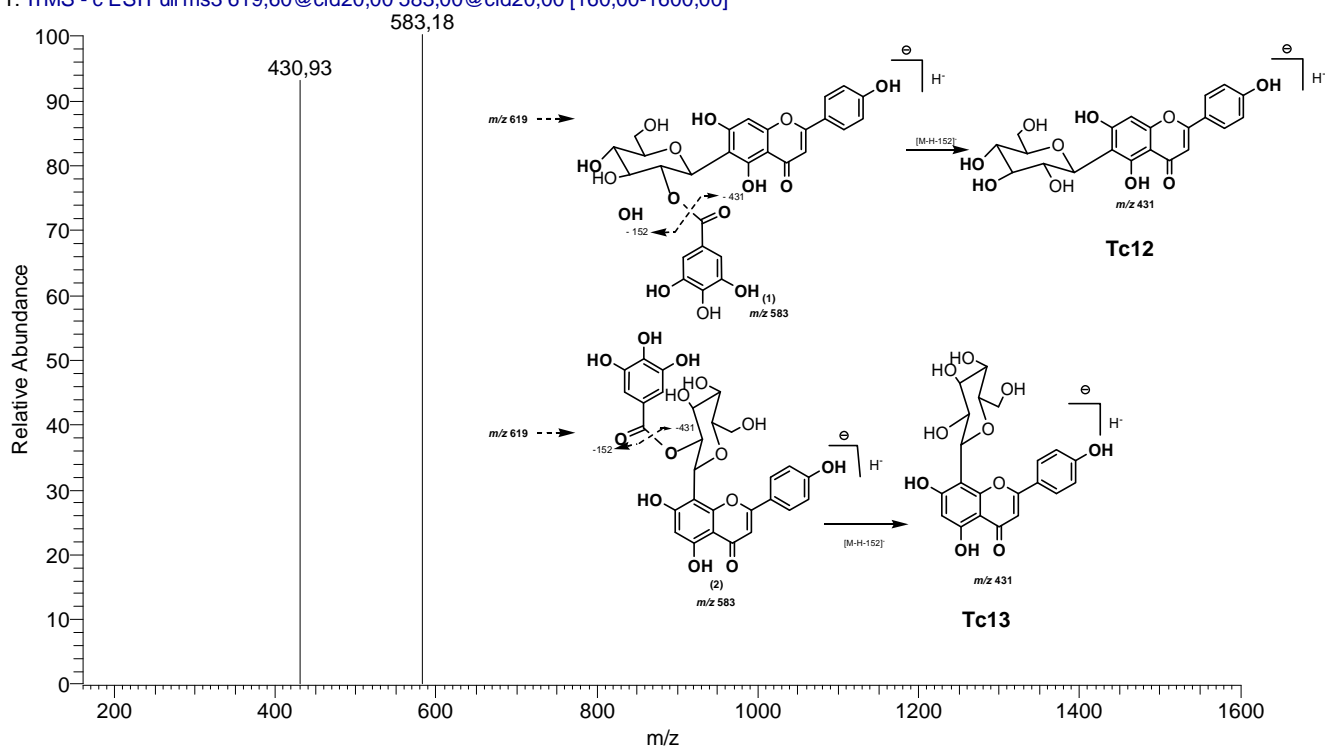
Francisco_am1_1mg_ml_filho619_esineg_14072011_110713152906 #10 RT: 0,16 AV: 1 NL: 2,23E1
T: ITMS - c ESI Full ms2 619,60@cid20,00 [170,00-1600,00]



Fonte: LIN et al., 2000.

Figura 28 - Espectro de massas de terceira-ordem do íon precursor de m/z 619 (derivado da apigenina), m/z 583 (**Tc12** = Apigenina 6-C-(2''-galoil)- β -D-glicopiranosil ou **Tc13** = Apigenina 8-C-(2''-galoil)- β -D-glicopiranosil), obtido em modo negativo com energia de colisão de 30%.

Francisco_am1_1mg_ml_filho619_esineg_14072011_110713152906 #18 RT: 0,32 AV: 1 NL: 1,46
T: ITMS - c ESI Full ms3 619,60@cid20,00 583,00@cid20,00 [160,00-1600,00]

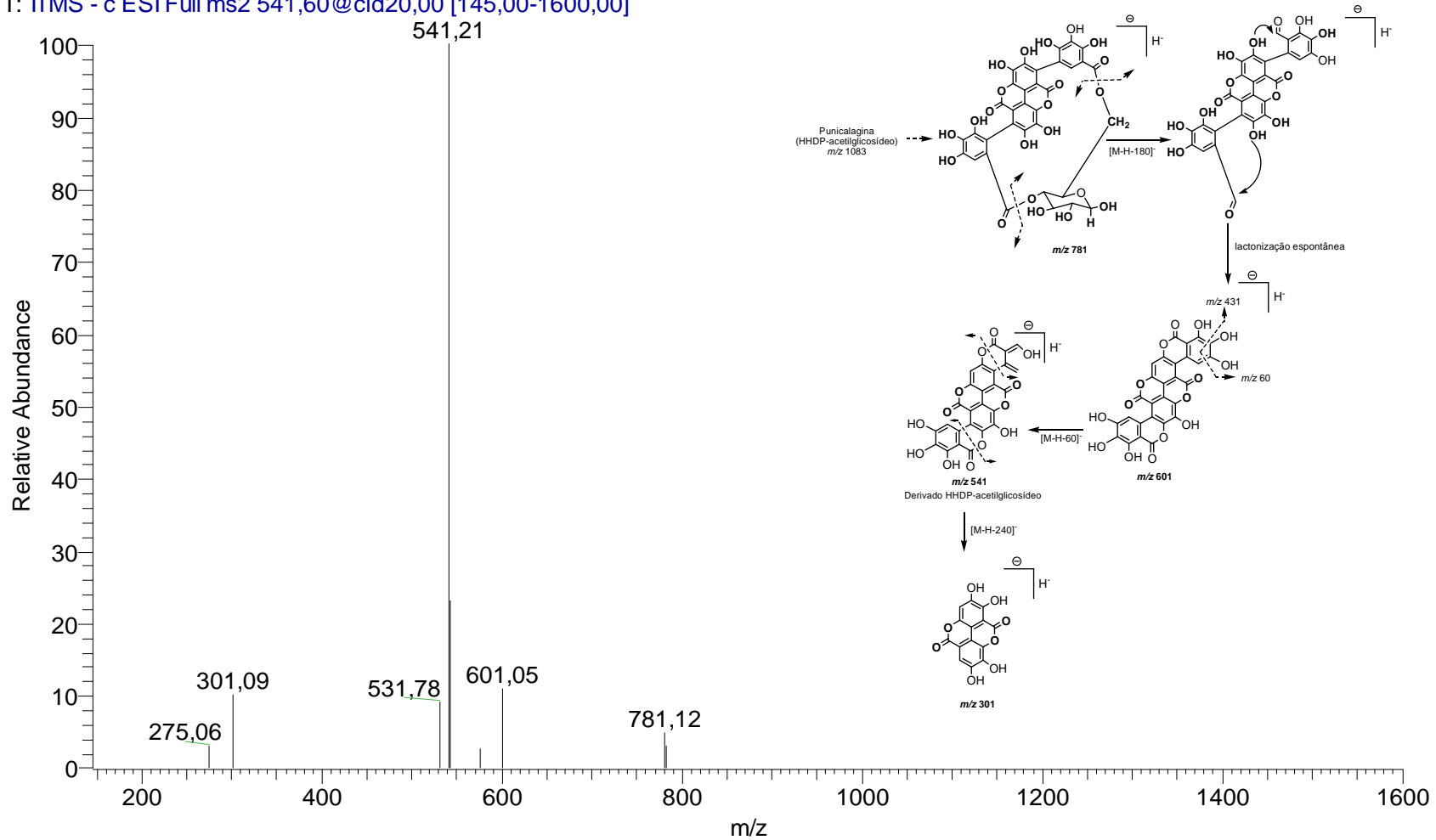


Fonte: LIN et al., 2000.

Figura 29 - Espectro de massas de terceira ordem do íon em m/z 541 (**Tc14**) (MS^2), obtido em modo negativo com energia de colisão de 30% e proposta de fragmentação.

Francisco_am1_1mg_ml_filho541_esineg_14072011_110713152906 #5 RT: 0,07 AV: 1 NL: 4,68E1

T: ITMS - c ESI Full ms2 541,60@cid20,00 [145,00-1600,00]



Fonte: AL-RAWAHI et al., 2014.

Figura 30 - Espectro de massas de segunda-ordem (MS^2) do extrato etanólico das folhas de *T. catappa* em modo negativo. Faixa de íons com m/z de 100-2000 Da.

Francisco_etanolabsoluto_filhos1083_esineg_14072011_110714100444 #34 RT: 0,70 AV: 1 NL: 1,43
T: ITMS - c ESI Full ms2 1083,00@cid23,00 [295,00-2000,00]

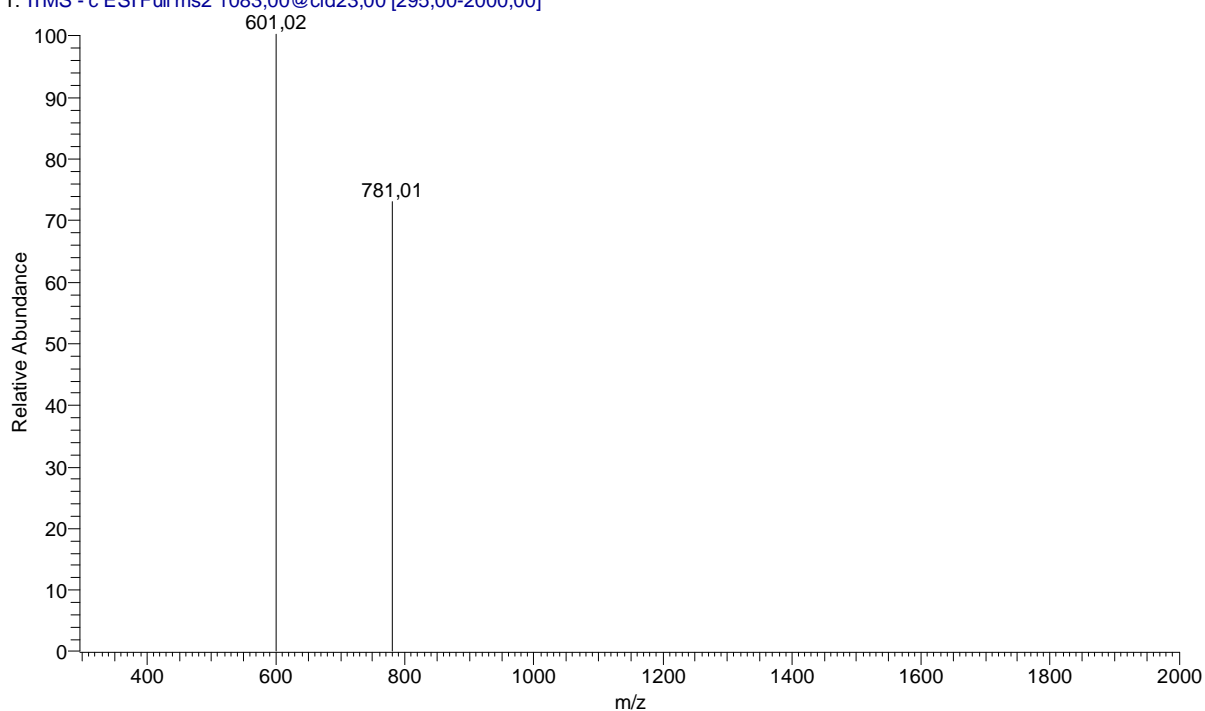


Figura 31 - Espectro de massas de segunda ordem (MS^2), do íon precursor de m/z 1083 (**Tc1**) da fração aquosa do extrato bruto de *T. catappa* obtido em modo negativo.

T_130129165016 #1-1000 RT: 0.60-0.96 AV: 70 NL: 2.71E2
F: ITMS - c ESI Full ms2 1083.00@cid30.00 [295.00-1200.00]

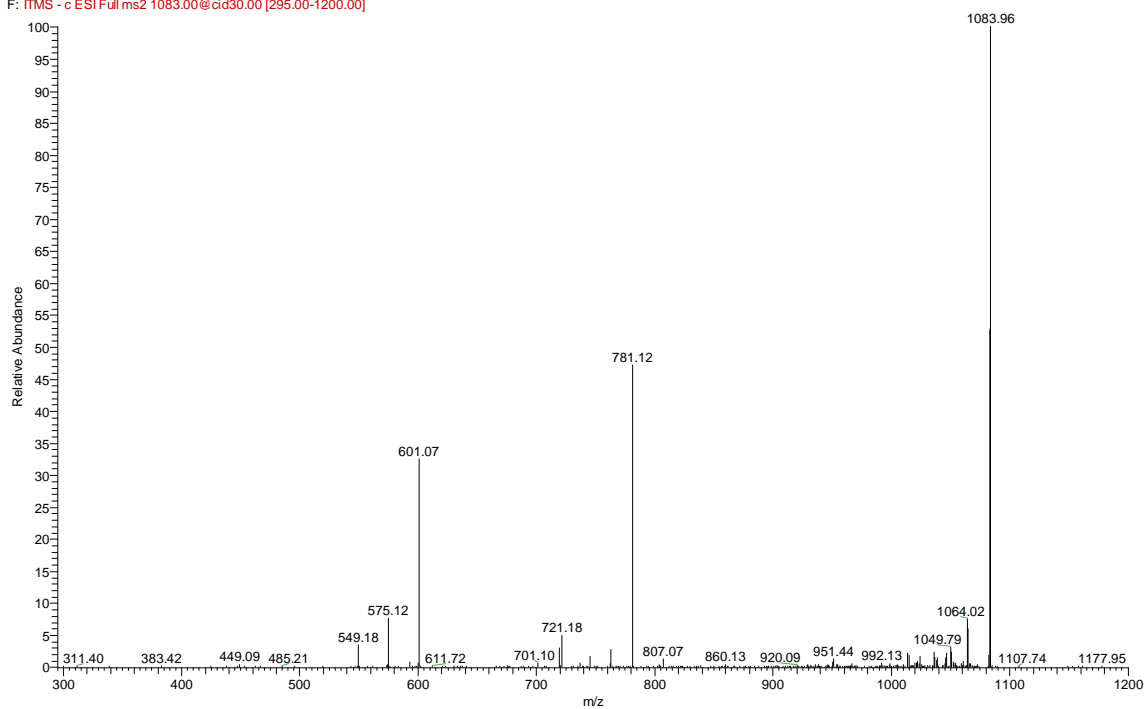


Figura 32 - (MS³) do íon precursor de m/z 1083 (**Tc1**) presente na fração aquosa de *T. catappa* obtido em modo negativo.

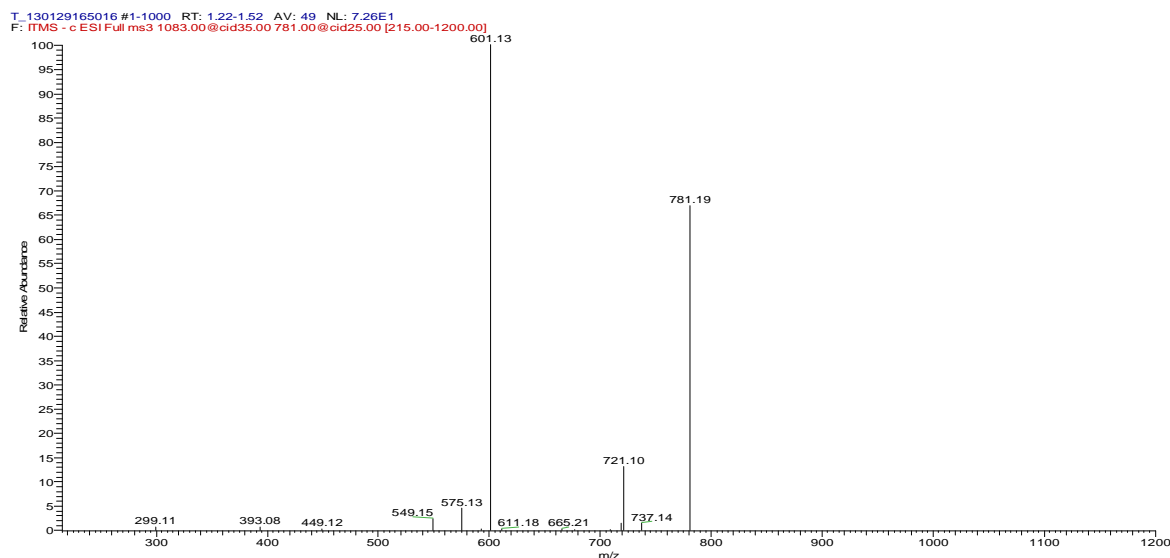


Figura 33 - (MS³) do íon precursor de m/z 1083 (**Tc1**) presente na fração aquosa de *T. catappa* obtido em modo negativo, indicando o íon em m/z 781 (**Tc2**) correspondente ao composto punicalina.

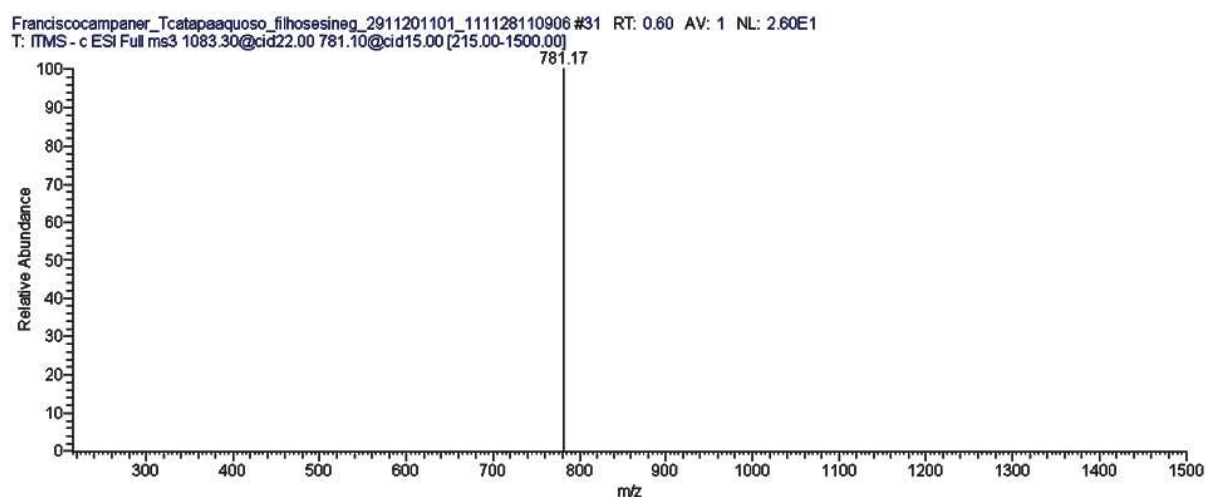


Figura 34 - (MS³) do íon precursor de m/z 1083 (**Tc1**) presente na fração aquosa de *T. catappa* obtido em modo negativo, indicando o íon em m/z 601 (**Tc3**) correspondente ao composto ácido galágico.

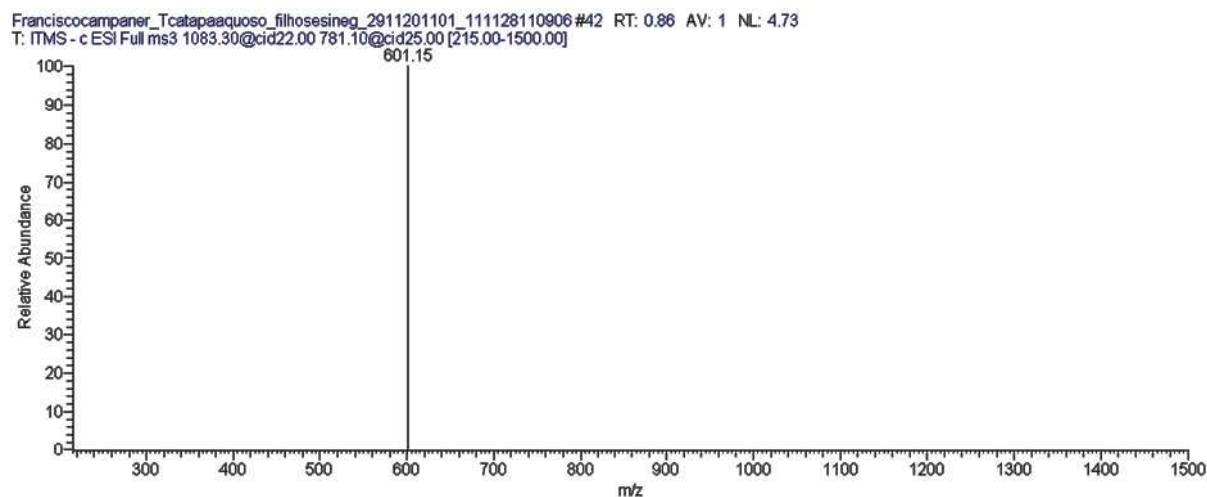


Figura 35 - (MS²) do íon precursor de m/z 541 (**Tc14**), derivado HHDP-acetilglicosídeo, presente na fração aquosa de *T. catappa* obtido em modo negativo.

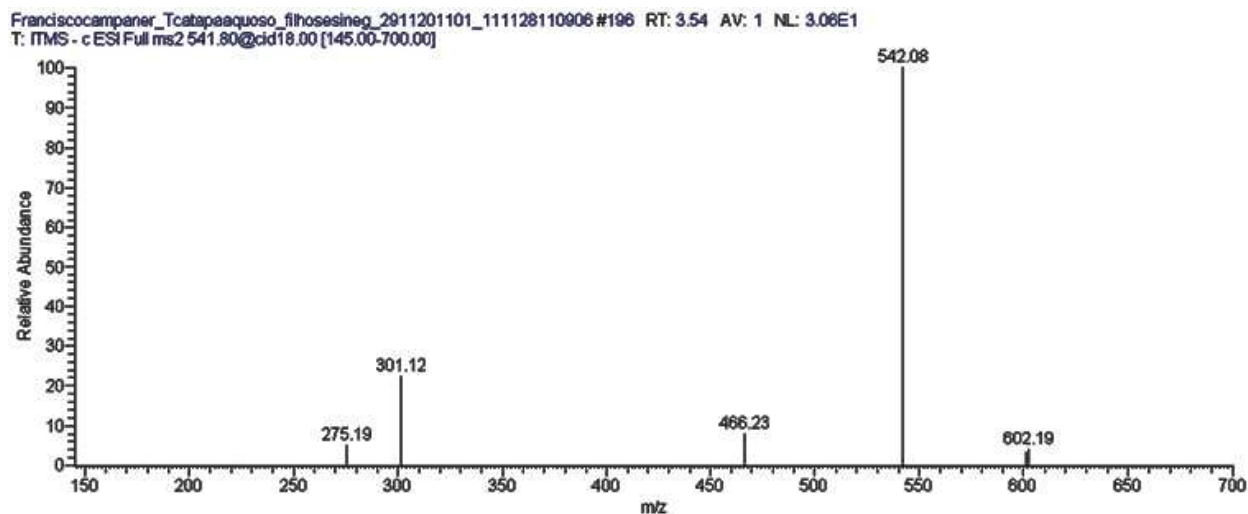
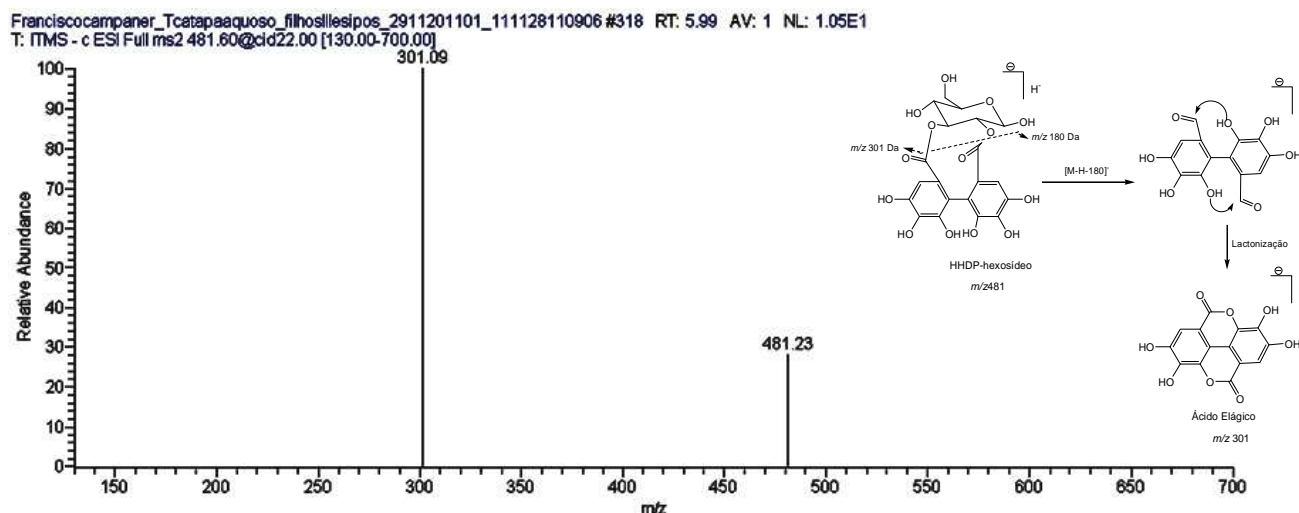


Figura 36 - (MS³) do íon precursor de m/z 481 (**Tc16**), HHDP-hexosídeo, presente na fração aquosa de *T. catappa* obtido em modo negativo.



4.4 Análises das frações MPLC-1, MPLC-2 e MPLC-3 por UV e FIA-ESI-IT-MS/MS

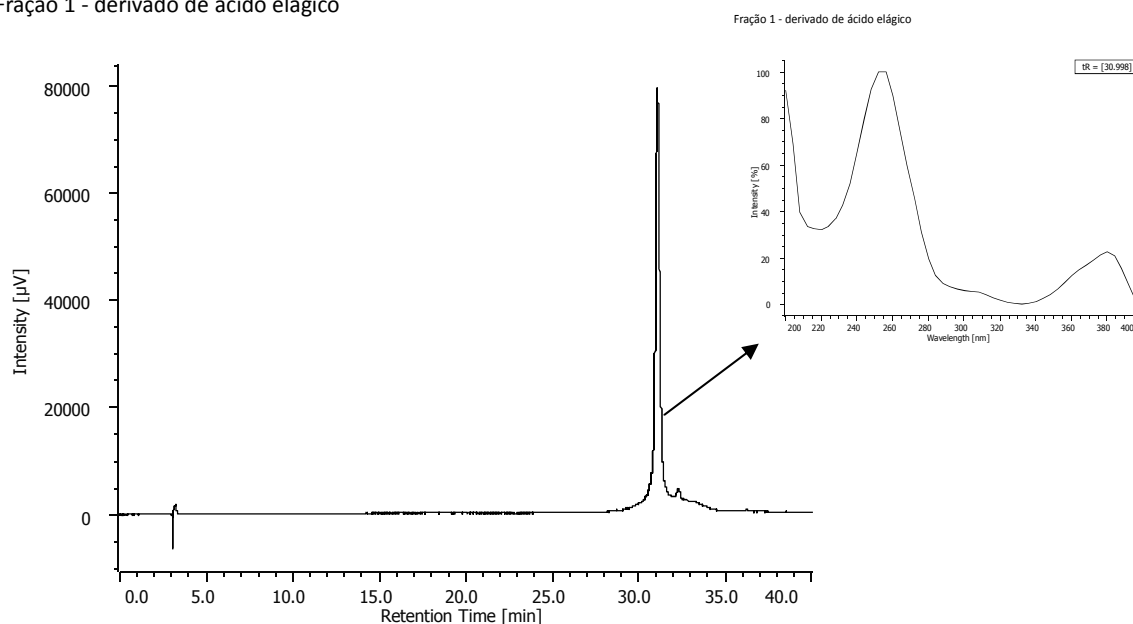
A fração acetato de etila proveniente do do extrato hidroalcoólico foi fracionada por MPLC (*Medium Performance Liquid Chromatography*). As frações denominadas MPLC-1, MPLC-2, foram purificadas por HPLC-preparativo (item 3.3.7, pág. 48) e também foram analisadas por FIA-ESI-IT-MSⁿ. A fração MPLC-3 foi analisada diretamente por massas sem purificação prévia. Cabe destacar que não foram isoladas da fração MPLC-3 nenhuma substância.

Para confirmação das estruturas, foram registrados, então, os espectros de UV (Figuras 37 e 40), RMN mono e bidimensionais que estão descritos nos itens 3.3.12, pág. 50.

A análise do cromatograma por HPLC-PDA da fração isolada por MPLC, denominada (MPLC-1), apresentou pico com t_r 30,99 minutos (Figura 37). O espectro no UV desta substância (Figura 33) apresentou máximos de absorção em λ_{\max} 250, 306 e 368 nm, sugerindo que essa substância é um derivado ácido elágico (DHOOGHE, 2010).

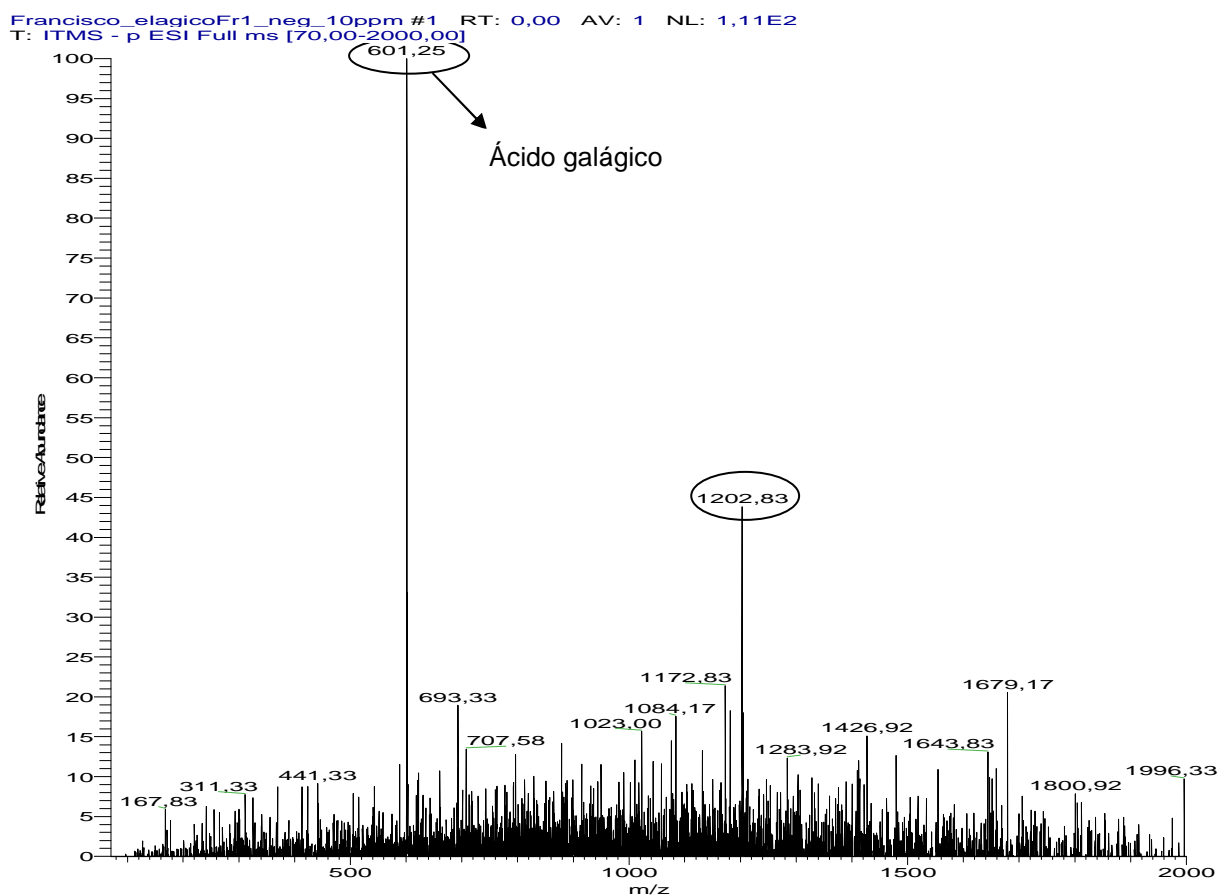
Figura 37 - Cromatograma por HPLC-PDA da fração MPLC-1e respectivo UV. Coluna analítica Phenomenex® de C-18 (250 x 4,6 mm, 4 μ m e pré-coluna (4x3 mm, 5 μ m), modelo Synergi Hydro®.Gradiente de 5-50% MeOH em 40 min. e isocrático de 50% MeOH por 20 min. Volume injetado 20 μ L. Tempo total: 60 min., 270 nm.

Fração 1 - derivado de ácido elágico



O espectro de massas em modo *full-scan* da fração MPLC-1 (Figura 38) revela a presença de picos em m/z 1202, indicando, possivelmente, um dímero do ácido galálgico. O pico base em m/z 601 (**Tc3**) indica a presença do ácido galálgico em sua forma lactonizada (PFUNDSTEIN et al., 2010).

Figura 38 - Espectro de massas de primeira-ordem, em modo *full-scan*, da fração MPLC-1 (m/z 601) (**Tc3**) isolada da partição acetato de etila a 10 mg/mL da folhas de *Terminalia catappa* L. em modo negativo. Faixa de íons com m/z de 100-2000 Da.

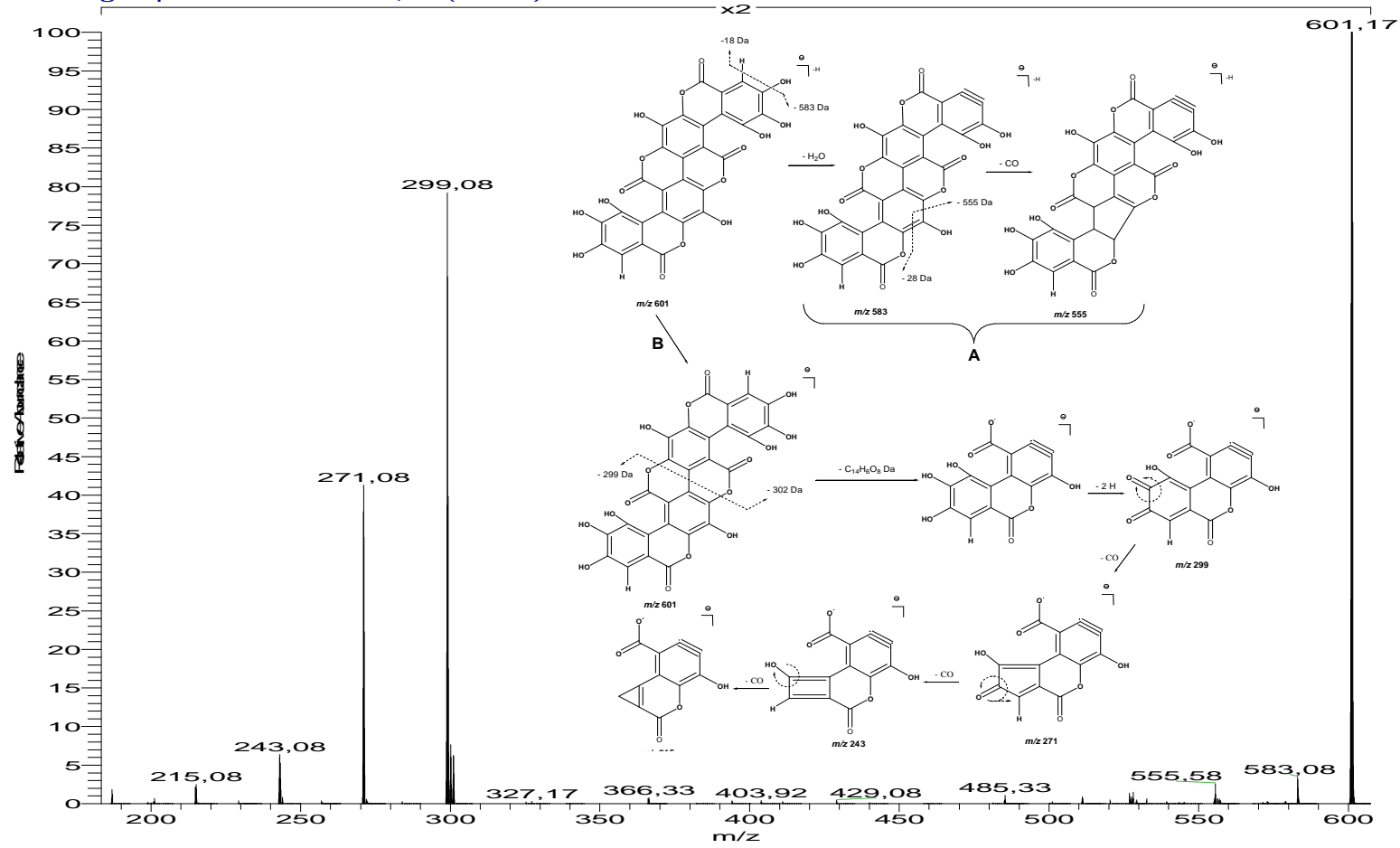


Fragmentações de segunda-ordem do íon precursor em m/z 601 (MS/MS) forneceram os íons produtos em m/z 583, devido à perda de uma molécula de água [M-H-18]. O íon com m/z 555 foi atribuído à perda de uma molécula de monóxido de carbono [M-H-28] (**proposta A**). Numa segunda proposta (**proposta B**), partindo-se do íon em m/z 601 (molécula desprotonada do ácido galágico), observa-se perda da unidade ($C_{14}H_6O_8$), [M-H-302]. O fragmento gerado perde hidrogênios, gerando um íon com m/z 299. Perdas subsequentes de monóxido de carbono (CO) formam os íons com m/z 271, 243 e 215, conforme indicado na proposta de fragmentação da Figura 39. O mesmo padrão de fragmentação foi publicado por Pfundstein (2010) e colaboradores ao trabalhar com as espécies *Terminalia bellerica*, *Terminalia chebula* e *Terminalia horrida*.

Os fragmentos em m/z 299 e m/z 271 foram encontrados também por Qing *et al* (2012) ao analisar o MS/MS do ácido galágico (m/z 601) em seus trabalhos com inibidores enzimáticos e nanopartículas em *Punica granatum*.

Figura 39 - Espectro de massas de segunda-ordem do íon precursor em m/z 601(**Tc3**) (ácido galágico), obtido em modo negativo com energia de colisão de 30% e proposta de fragmentação.

Francisco_elagicoFr1_neg_10ppm #76-84 RT: 0,48-0,65 AV: 9 NL: 9,56E1
T: Average spectrum MS2 601,00 (76-84)

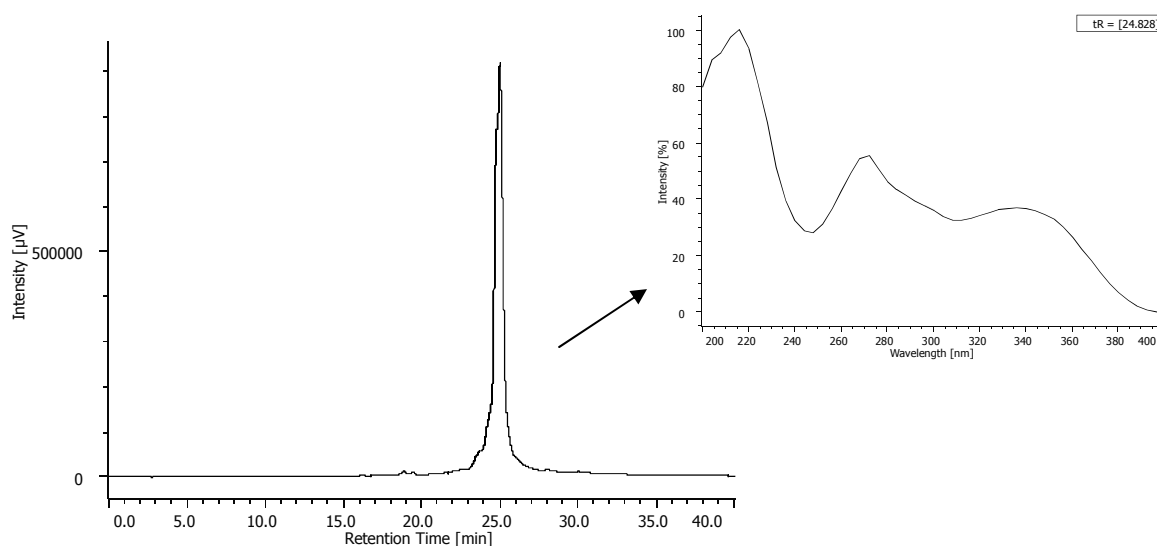


Fonte: PFUNDSTEIN, 2010.

O espectro no UV da substância MPLC-2 com tempo de retenção em $t_r = 24,82$ min. obtido por HPLC-PDA (Figura 40) apresentou máximos de absorção em 250 e 346 nm típicos de flavonóides (MABRY *et. al.*,1970), com duas bandas de absorção, uma na faixa de 240-280 nm (banda II) e outra na faixa de 300-400 nm (banda I). Em geral, a banda II pode ser atribuída ao anel A do sistema benzoíla e a banda I ao anel B, do sistema cinamoíla (MABRY *et. al.*,1970).

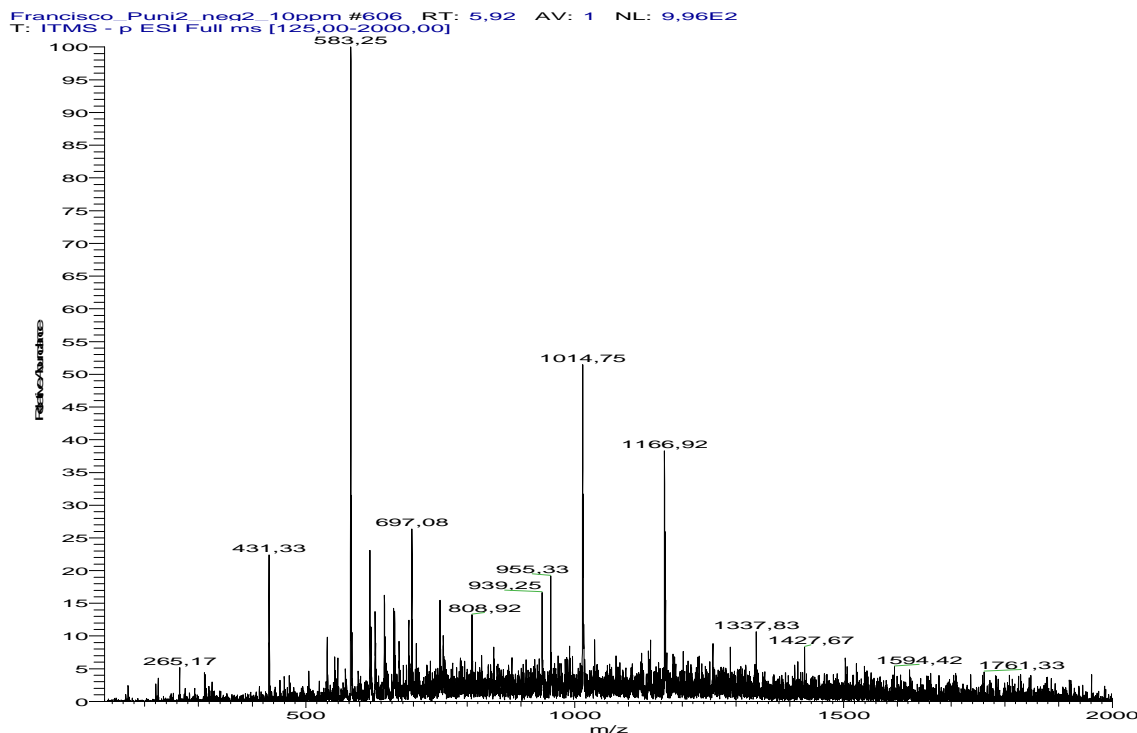
A partir da investigação do espectro de UV para o pico eluído no cromatograma da Figura 40, pode-se inferir que a substância MPLC-2 seja, provavelmente, um flavonóide exibindo um ombro na região de 299 nm, além de duas bandas referentes aos anéis A e B do núcleo flavonoídico. Esse perfil espectral é compatível com o de flavonóides esterificados (MERKEN & BEECHER, 2000).

Figura 40 - Cromatograma por HPLC-PDA da fração MPLC-2 e respectivo UV. Coluna analítica Phenomenex® de C-18 (250 x 4,6 mm, 4 μ m e pré-coluna (4x3 mm, 5 μ m), modelo Synergi Hydro®. Gradiente de 5-50% MeOH em 40 min. e isocrático de 50% MeOH por 20 min. Volume injetado 20 μ L. Tempo total: 60 min., 270 nm.



A partir da análise dos dados obtidos por FIA-ESI-IT-MS do composto isolado da fração MPLC-2, constatou-se que o mesmo apresenta íon molecular $[M-H]^-$ com m/z 583 (**Tc13**), corresponde à fórmula molecular $C_{28}H_{24}O_{14}$. Outro pico foi observado no espectro de massas com m/z 1166,92, que pode ser, provavelmente, devido à dimerização do íon m/z 583 na fonte do aparelho (Figura 41).

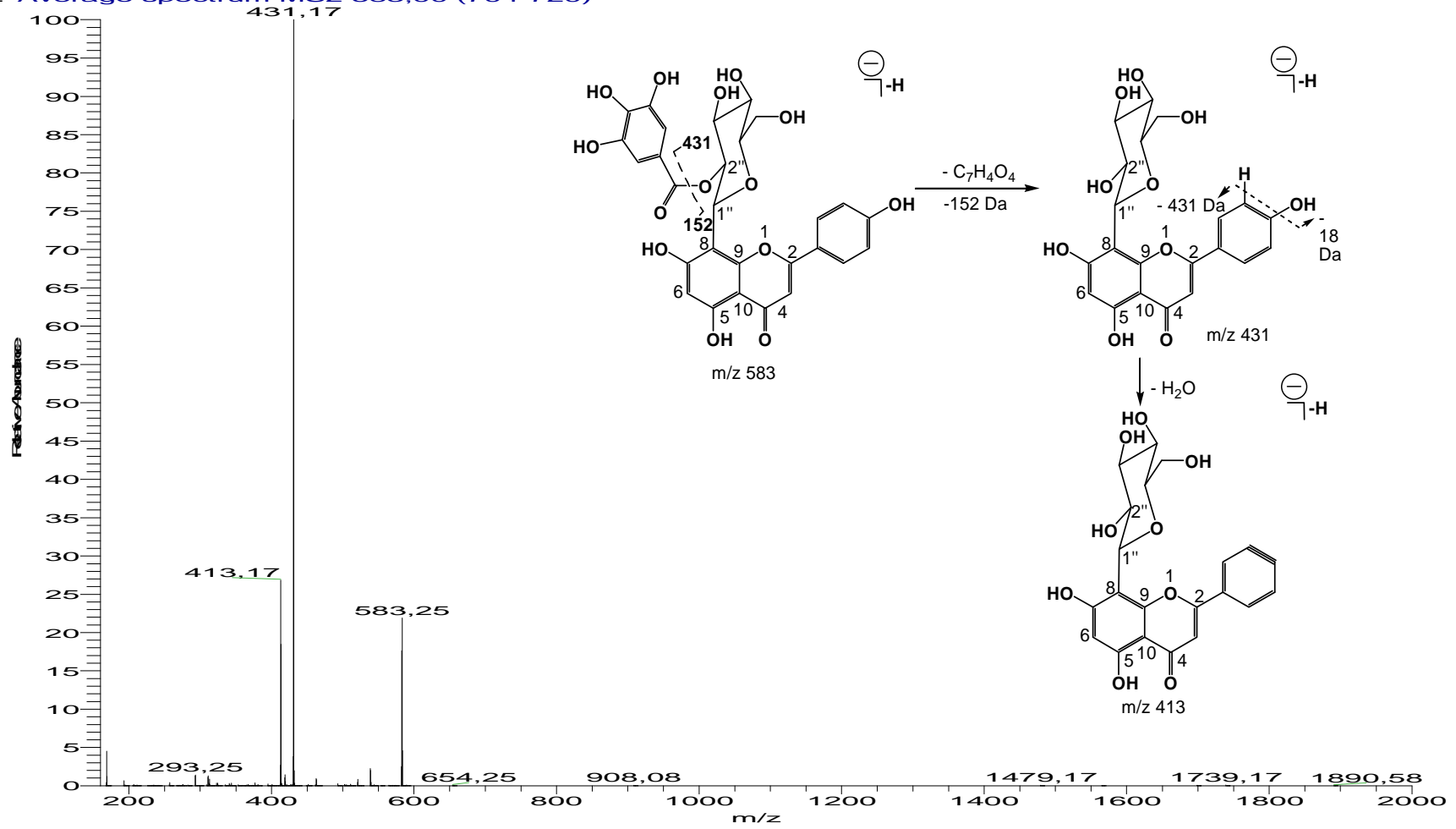
Figura 41 - Espectro de MS em modo *full-scan* da fração MPLC-2 (apigenina 8-C glicosilada) (**Tc13**) obtido em modo negativo. Faixa de íons com m/z de 100-2000 Da.



Fragmentação MS/MS (Figura 42) do íon precursor de (m/z 583), sugere a perda de uma unidade galoila [$M - 152-H$]⁻, fornecendo o íon fragmento em m/z 431. Perda de uma molécula de água conduz ao fragmento com m/z 413, [$M-152- 18 - H$]⁻. Experimentos posteriores de RMN ¹H mono e bidimensionais e dicroísmo circular (DC) indicaram que a substância isolada corresponde a uma apigenina 8-C glicosilada, conforme descrito na seção 4.6.3, página 115.

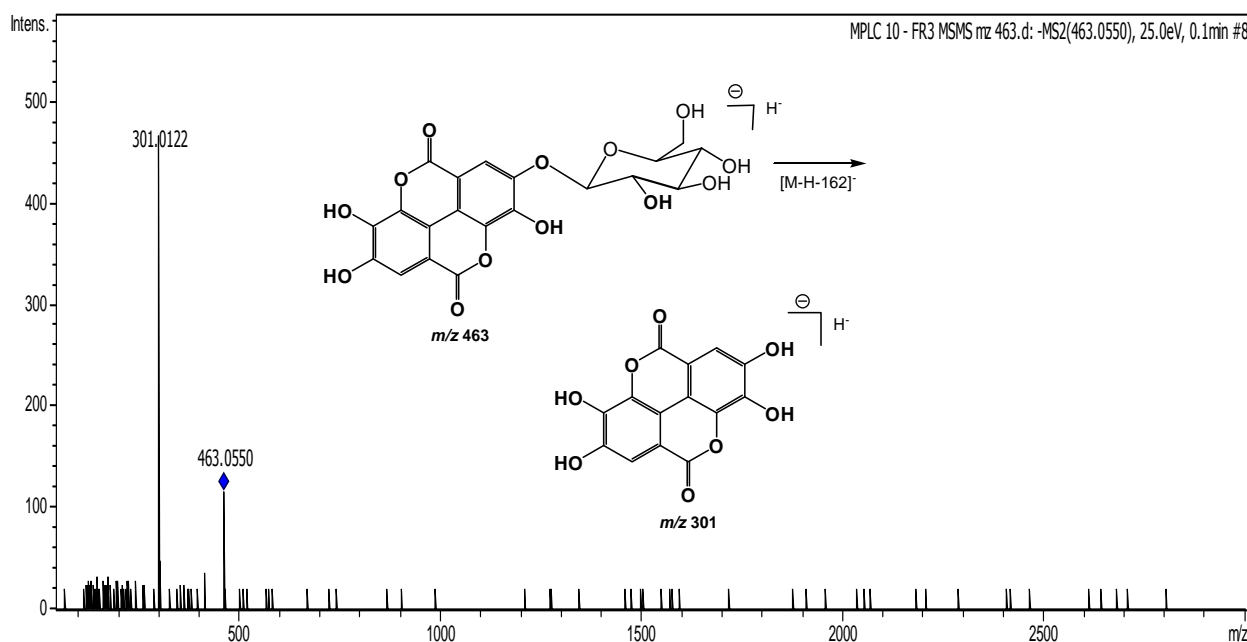
Figura 42 - Espectro de massas da fração MPLC-2 (*full ms*²) do composto com *m/z* 583 (**Tc13**) em modo negativo e proposta de fragmentação.

Francisco_Puni2_neg_10ppm #704-720 RT: 7,38-7,71 AV: 17 NL: 8,92E1
T: Average spectrum MS2 583,00 (704-720)



A fração MPLC-3 foi analisada em modo negativo. Cabe destacar, aqui, que a fração MPLC-3 foi analisada por injeção direta. Observou-se, na fração MPLC-3, a presença do íon de m/z 463 (**Tc15**), correspondente à molécula desprotonada $[M-H]^-$. Pelo esquema de fragmentação proposta na Figura 43, sugere-se para uma das substâncias em mistura a estrutura do ácido elágico hexosídeo. Esse composto não havia sido detectado quando da análise por injeção direta do extrato hidroalcoólico. MS/MS desse íon levou ao íon produto de m/z 301 (Figura 43) devido à perda de hexose. Esses mesmos fragmentos foram observados por FISCHER, (2011), no estudo de cascas de *Punica granatum* L.

Figura 43 - Espectro de massas da fração MPLC-3 (*full ms²*) do composto com m/z 463 (**Tc15**) (ácido elágico hexosídeo) em modo negativo.



4.5 Estudo da fração hidrometanólica obtida a partir do extrato hidroalcoólico (partição líquido-líquido – LLE) por HPLC-PDA e análise por HPLC-ESI-MS.

O cromatograma da Figura 44 apresenta dois picos com t_r 18,5 (pico 1) e t_r 24,7 min. (pico 2) com espectros no UV semelhantes. Após purificação por HPLC-PDA semipreparativo de cada pico (item 3.3.8, pag. 48), verificou-se que os picos 1 e 2 exibem comportamento interessante, abrindo-se em dois picos com tempos de retenção diferentes quando analisados por HPLC-PDA. No caso do pico 1, a análise por HPLC-PDA mostra a presença de dois picos (1a) e (1b), com tempos de retenção t_r 15,2 min. e t_r 21,0 min., respectivamente (Figura 45).

A Figura 46 indica, para o pico 2, comportamento similar ao pico 1 em relação ao espectro na região de UV. Esse apresenta um máximo de absorção λ_{max} 218nm, 260 nm e 379 nm, característicos do cromóforo galagil. Esse fato indica que os compostos são isolados sob a forma de anômeros (punicalaginas α e β).

Figura 44 - Cromatograma da partição H₂O: MeOH 8:2 (v/v) a 10,0 mg.mL⁻¹ das folhas de *T. catappa* indicando (pico 1) eluindo em t_r 18,6 min. e (pico 2) em t_r 24,7 min. e vazão de 1 mL.min⁻¹. Método gradiente a 5-30% de MeOH durante 30 minutos a um vazão de 1 mL.min⁻¹. Coluna Hydro. HPLC-PDA (Jasco ®), a 270 nm.

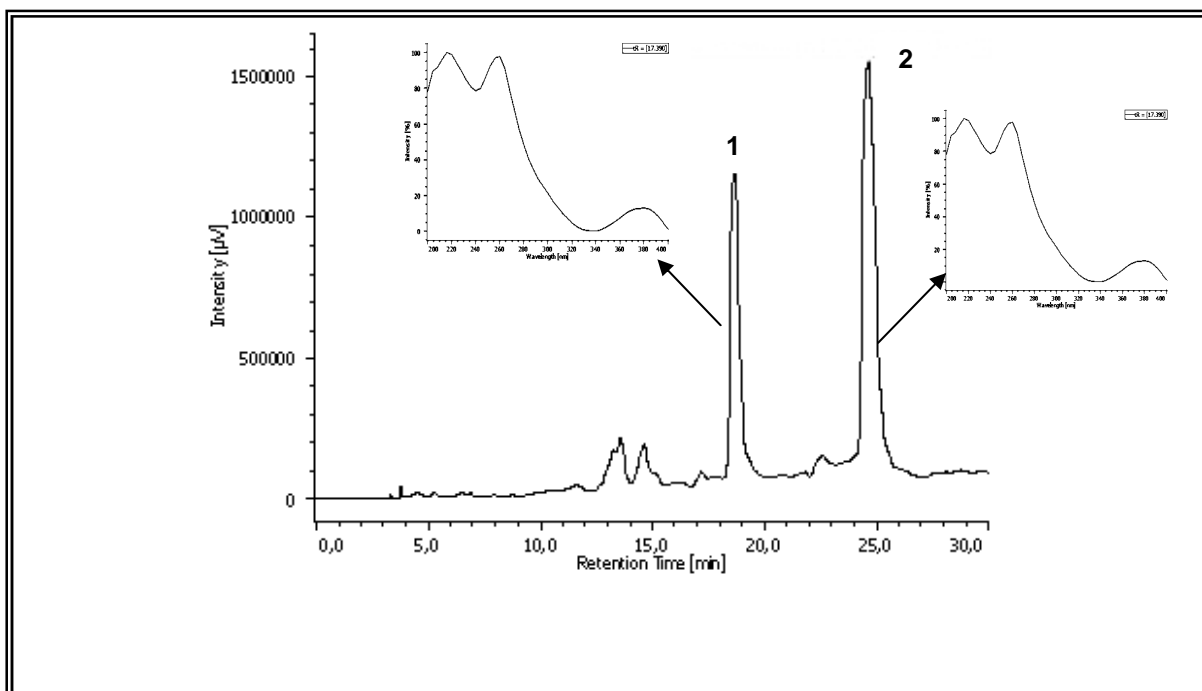


Figura 45 - Cromatograma do pico 1 coletado na partição H₂O:MeOH 8:2 (v/v) das folhas de *T. catappa* eluindo em t_r 15,2 min. (1a) e t_r 21,0 min (1b). Vazão de 1 mL.min⁻¹, método gradiente de 5-30% de MeOH por 40 minutos em coluna Hydro. HPLC-PDA (Jasco ®), a 270 nm. Espectros do pico 1 na região de UV, eluindo em t_r 15,2 min. (1a) e em t_r 21,0 min. (1b), característico de anômeros da α e β punicalagina, respectivamente.

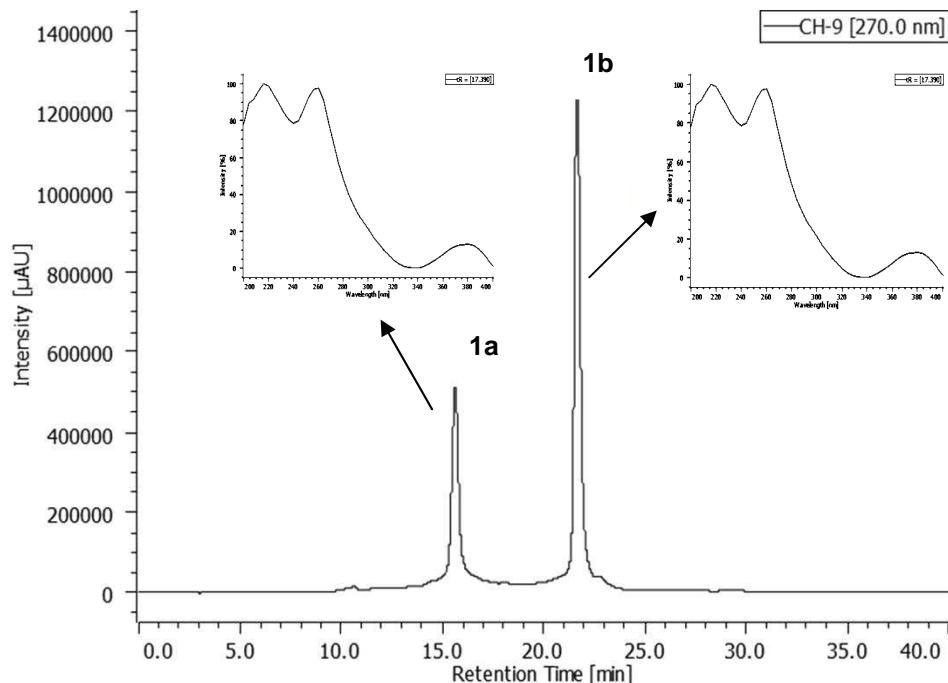
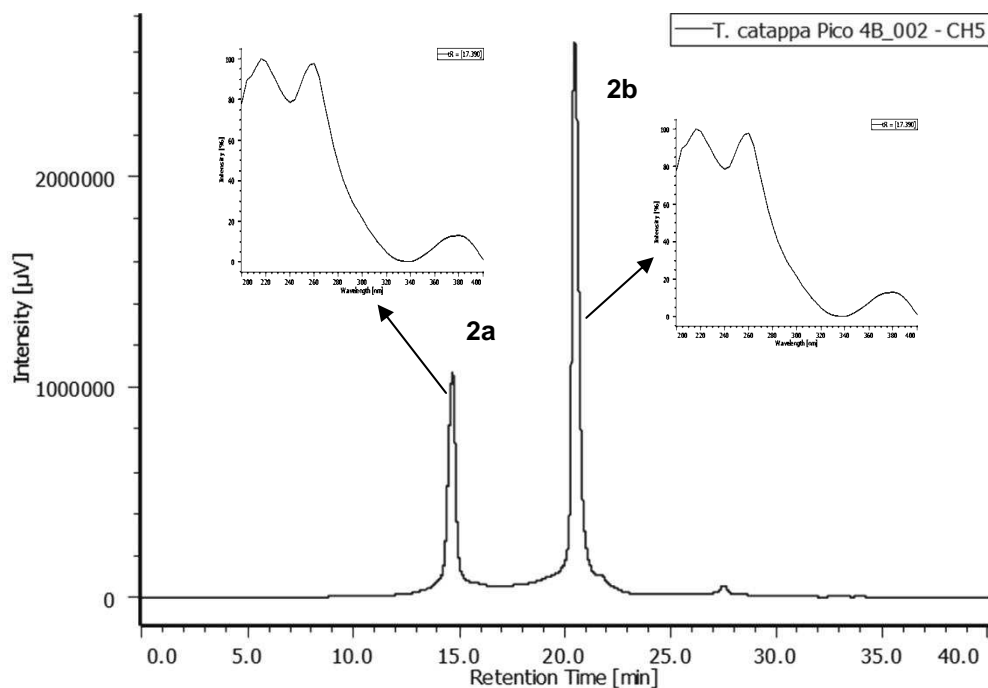
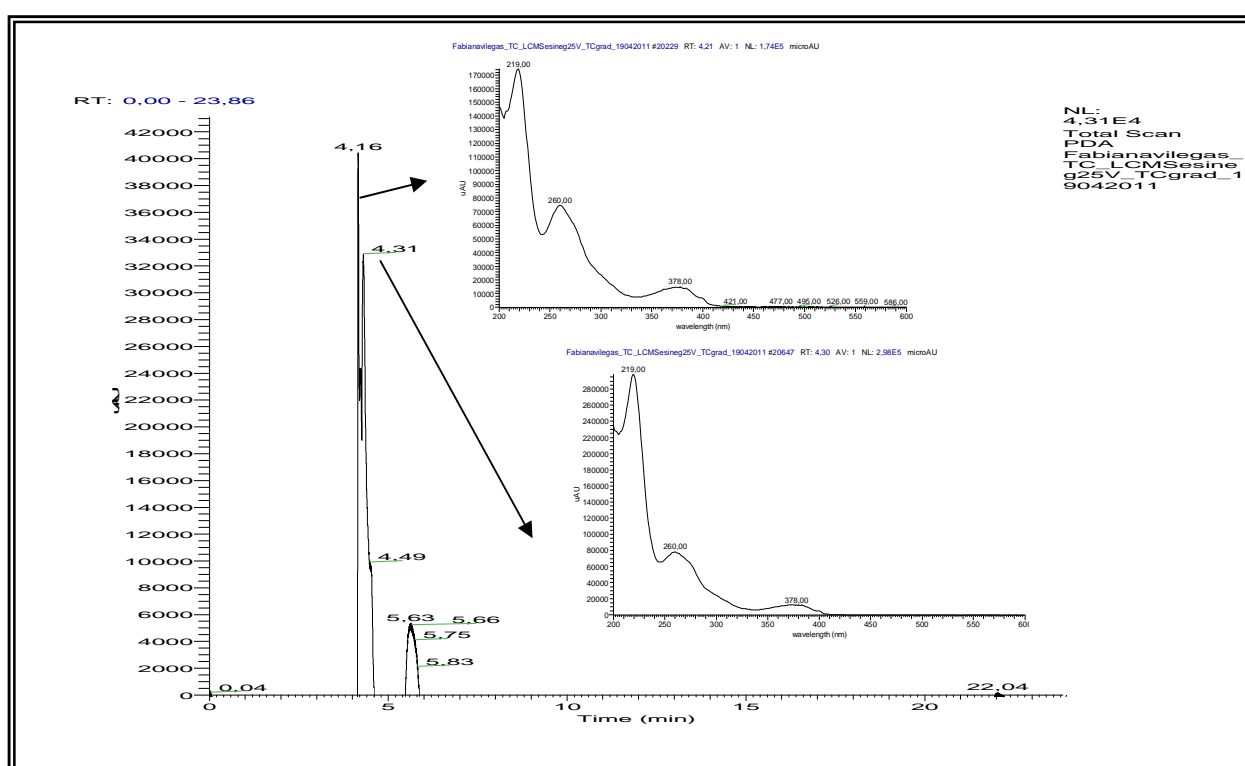


Figura 46 - Cromatograma do pico 2 coletado na partição H₂O: MeOH 8:2 (v/v) das folhas de *T. catappa* eluindo em t_r 15,8 min. (2a) e t_r 21,9 min. (2b), vazão de 1 mL/min. Método gradiente a 5-30% de MeOH por 40 minutos em coluna Hydro. HPLC-PDA (Jasco ®), a 270 nm. Espectros na região do UV do pico 2 eluindo em t_r 15,8 min (2a) e t_r 21,9 min (2b), característico de anômeros da α e β punicalagina, respectivamente.



Os isômeros da punicalagina isolados da fração hidrometanólica foram analisados por HPLC-ESI-MS. O cromatograma indicado na Figura 47 mostra a presença de dois picos com t_r 4,16 e t_r 4,31 correspondentes aos anômeros α e β . Os espectros de UV/VIS mostram a presença de anômeros da punicalagina com máximos de absorção em 219, 260 e 378 nm (MACHADO et al., 2002).

Figura 47 - Cromatograma do pico 2 coletado na partição H₂O: MeOH 8:2 (v/v) das folhas de *T. catappa* eluindo em t_r 4,16 min. (2a) e t_r 4,31 min. (2b), vazão de 1 mL.min⁻¹. por LC-MS. Método gradiente MeOH:H₂O, coluna cromatográfica *Phenomenex C18-Hydro* (250 x 4,6 mm, 4 μ m) a temperatura ambiente, vazão de 1 mL.min⁻¹, volume de injeção de 10 μ L. Espectros na região do UV do pico 2 eluindo em t_r 4,16 min (2a) e t_r 4,31 min (2b), característico de anômeros da α e β punicalagina.



A análise por massas indica que o composto isolado corresponde à fórmula molecular C₄₈H₂₈O₃₀, anômeros α e β . Experimentos em modo negativo geraram íons duplamente carregados [M-2H]²⁻ em MS/MS, sendo observados, também, no modo full MS. A análise dos isômeros da punicalagina levou a íons com m/z 1083 e 541, correspondentes a íons isoméricos da punicalagina mono [M-H]⁻ e duplamente carregados [M-2H]²⁻ (MENA,2012). No caso do pico 1, a análise indica a presença do pico base com m/z 1083,66 [M-H]⁻ (100,00%), correspondendo à molécula desprotonada da punicalagina (**Tc1**). Destaca-se, também, o íon com m/z 541,35 [M-2H]²⁻ (81,26%), conforme indicado na Figura 44. A análise do pico 2, revela igualmente a presença dos íons em m/z 1083,71 [M-H]⁻ e 541,19 [M-2H]²⁻, porém, agora, com

79,26% e 100,00%, respectivamente. A predominância de íon molecular mono-carregado (m/z 1083,71) e duplamente carregado (m/z 541,19) é característico do modo de ionização da punicalagina (Figuras 48 e 49) (MENA, 2012).

Figura 48 - Análise do pico 1 por LC-MS, obtido em modo negativo. Faixa de íons com m/z de 100-1500 Da.

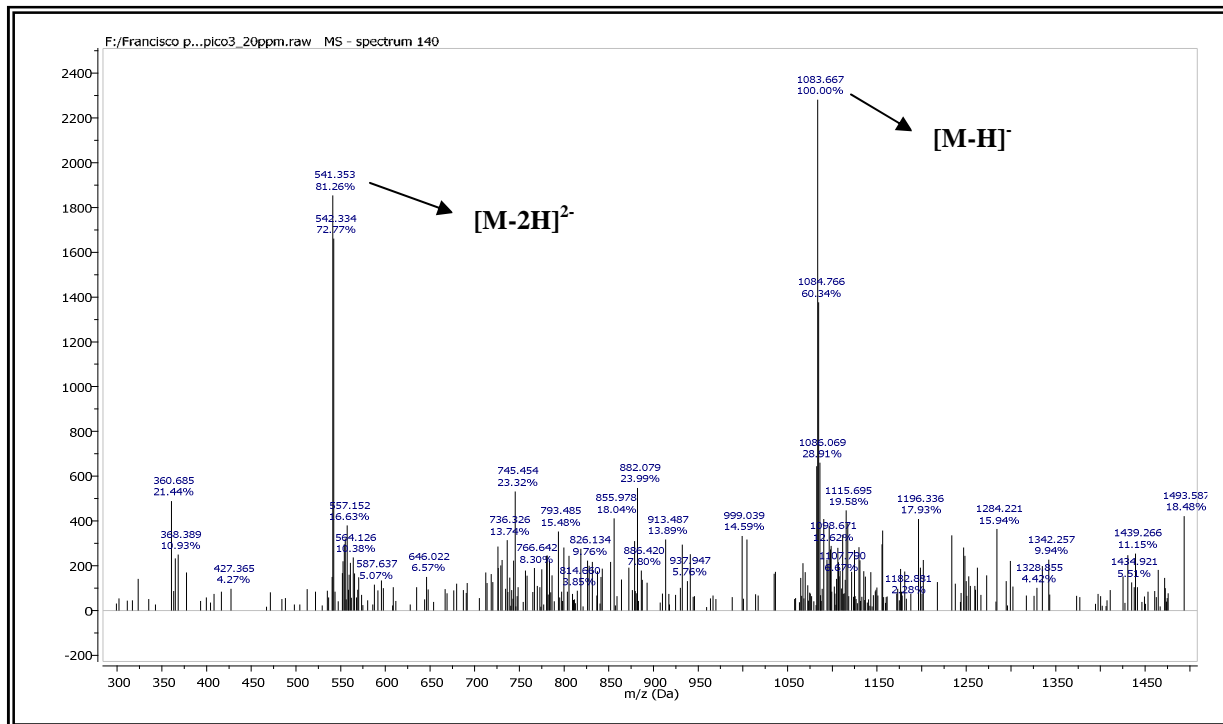
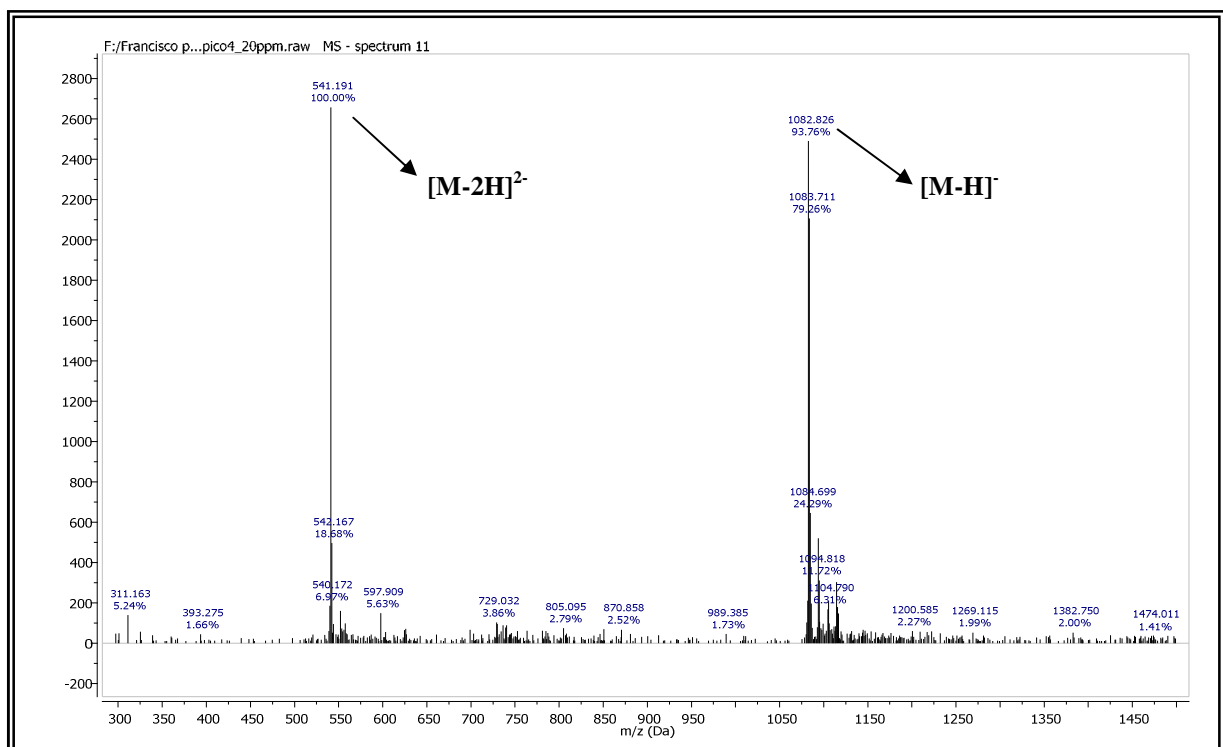


Figura 49 - Análise do pico 2 por LC-MS, obtido em modo negativo. Faixa de íons com m/z de 100-1500 Da.



A Tabela 2 sumariza as substâncias encontradas nas análises por espectrometria de massas nos extratos hidroalcoólico, etanólico e fração aquosa de folhas de *T. catappa*.

Tabela 2 - Substâncias encontradas em extratos hidroalcoólico, etanólico e fração aquosa de folhas de *T. catappa* em análises por FIA-ESI-IT-MS/MS.

Substância	Identificação parcial	[M-H]⁻	Principais fragmentos
Tc1	Punicalagina	1083	MS ² [1083]: 781, 601
Tc2	Punicalina	781	MS ² [781]: 601
Tc3	Ácido galágico	601	MS ² [601]: 299, 271, 242
Tc4	Ácido elágico	301	MS ² [301]: 257, 229
Tc5	3,4,6-Tri-O-galoil-β-D-glicose	635	MS ² [635]: 616, 483, 465
Tc6	1,6-Di-O-galoil-β-D-glicose	483	MS ² [483]: 439, 313, 271
Tc7	Derivado do éster metil digalato	339	MS ² [339]: 183
Tc8	Derivado do éster metil digalato	325	MS ² [325]: 197, 183
Tc9	Ácido gálico	183	MS ³ [183]: 183
Tc10	Derivado do éster metil digalato	311	MS ² [311]: 183
Tc11	Derivado galoilado da apígenina	619	MS ² [619]: 583
Tc12	Apigenina 6-C-(2''-galoil)-β-D-glicopiranosil	583	MS ³ [619]: 583, 431
Tc13	Apígenina 8-C-(2''-galoil)-β-D-glicopiranosil	583	MS ³ [619]: 583, 431
Tc14	Derivado HHDP-acetilglicosídeo	541	MS ² [541]: 275, 301
Tc15	Ácido elágico hexosídeo	463	MS ² [463]: 301
Tc16	HHDP-hexosídeo	481	MS ² [481]: 301

4.6 Análise das substâncias isoladas da fração hidrometanólica proveniente do extrato hidroalcoólico por RMN

4.6.1 Análise dos anômeros da punicalagina por RMN ¹H, RMN ¹³C, gHSQC e gHMBC

Em vista dos picos 1 e 2 apresentarem comportamentos semelhantes e espectros no UV semelhantes (Figuras 45 e 46, página 97), foram registrados os espectros de RMN ¹H (Figura 50) e RMN ¹³C (Figura 51) da substância referente ao pico 2.

O espectro de RMN ¹³C revela a presença de dois carbonos anoméricos em δ 89,87 e δ 93,77, correspondentes a α e β punicalaginas, respectivamente (Figura 51). Revela, ainda, a presença de oito carbonos correspondentes a carbonilas de ésteres entre δ 169,5 – 170,7 incluindo carbonos aromáticos e dois sinais de carbonos anoméricos, identificados como α e β açúcares. A análise do espectro de RMN ¹³C, sugere que se trata de uma mistura de dois compostos (α e β punicalaginas).

O espectro de RMN de ¹H da Figura 50 e os dados sumarizados na Tabela 3 mostraram oito singletos de hidrogênios aromáticos em δ (6,97; 6,94; 6,77; 6,73; 6,68; 6,66; 6,54; 6,52), conforme indicado na ampliação da Figura 52, idênticos aos identificados por Kraszni e colaboradores em punicalagina isolada de extratos de *Punica granatum* (KRASZNI et al., 2013). Foram observados, também, sinais de hidrogênios anoméricos na região δ 5,08 ($J = 3,6$) e δ 4,69 ($J = 8,1$) (Figura 50). As constantes de acoplamento dos hidrogênios anoméricos puderam sugerir as configurações destes açúcares como α e β , respectivamente.

Estudos realizados por LU et al., (2007) descrevem que os hidrogênios anoméricos da punicalagina em solução, interconvertem-se rapidamente nos anômeros α e β . A estereoquímica para o hidrogênio anomérico pode ser facilmente determinada pela análise da constante de acoplamento entre o hidrogênio anomérico H-1 e o hidrogênio adjacente H-2. Uma constante de acoplamento ($J_{H-1,H-2} > 5$ Hz), geralmente, indica a configuração de um β -glicosídeo (substituinte com uma orientação equatorial). Uma constante de acoplamento ($J_{H-1,H-2} = 0 - 5$ Hz) indica um α glicosídeo (substituinte com uma orientação axial).

A análise dos mapas de contorno *g*HSQC (Figuras 53 e 54) possibilitou atribuir os hidrogênios aos seus respectivos carbonos (Tabela 3).

O mapa de contorno *g*HMBC (Figuras 55, 56 e 57) ainda informou as correlações existentes entre os hidrogênios e os carbonos à 2J e a 3J , possibilitando atribuir os hidrogênios HHDP, tetrafenila e os anoméricos.

As ligações interglicosídicas foram estabelecidas indicando que o hidrogênio do anômero α (δ 5,08) apresenta correlação a 3J com o C-2 em δ 73,5. Com esta correlação, foi possível verificar que o hidrogênio da posição C-3 (δ 5,20) correlacionava-se com o carbono da carbonila em δ 168,6 (Tabela 3), além das correlações com os carbonos das posições C-3 e C-4 (δ 76,0 e 70,2), respectivamente.

O mapa de contorno *g*HMBC (Figura 55) possibilitou, ainda, estabelecer as correlações existentes entre o hidrogênio da posição C-3 (δ 5,20) com o carbono da carbonila δ (169,0). A ligação da carbonila na posição C-4 (δ 168,9) foi estabelecida pela correlação existente com o hidrogênio com deslocamento químico em δ 4,78 e, finalmente, os hidrogênios metilênicos (δ 2,10, H-6a e δ 4,09, H6b) mostraram correlação com a carbonila com deslocamento químico em 167,9, evidenciando, assim, que as unidades galoílas estavam ligadas nas posições C-2, C-3, C-4 e C-6 da unidade glicosídica.

Para estabelecer as ligações dos hidrogênios aromáticos, foram observadas as correlações existentes entre o hidrogênio em δ 6,77 com o carbono da carbonila em δ 168,9 e com os carbonos aromáticos C-25 e C-27 em δ (137,5 e 108,1), respectivamente (Tabela 4). Para estabelecer as ligações dos demais hidrogênios aromáticos, procedeu-se às observações dos deslocamentos químicos existentes entre os hidrogênios δ 6,94 com a carbonila em δ 168,6 e com os carbonos C-42 e C-44 (δ 137,0 e 125,12) e do hidrogênio em δ 6,52 com o carbono da carbonila em δ (168,7) e com os carbonos em C-11 e C-13 (δ 137,0 e 109,7), respectivamente. Finalmente, o hidrogênio em δ 6,66 apresentou correlação com o carbono da carbonila em δ (169,5) e com os carbonos em C-14 e C-16 (δ 115,3 e 145,84), conforme indicado nas Figuras 55 e 56.

Para estabelecimento da estrutura do anômero β , verificaram-se diferenças significativas nos deslocamentos químicos de H-2 (δ 4,87), H-3 (δ 5,20) mais blindados que do anômero α , enquanto o H-4 (δ 4,78) apresentou-se menos blindado que o hidrogênio do anômero α .

Observa-se, ainda, o deslocamento químico (mais blindado) para o H-6a do anômero β (δ 4,05), enquanto, para o anômero α , o H6a apresenta deslocamento químico em (δ 2,10). Essa diferença pode ser explicada devido à ligação de hidrogênio intramolecular existente entre o H-1 e H6a do anômero β .

Nas Figuras 58 e 59, indica-se uma série de correlações em experimentos HMBC, onde os prótons aromáticos estão correlacionados a J^2 e a J^3 ligações com os carbonos carbonílicos do éster. Observa-se, também, a correlação entre o carbono C-6 da glicose com o carbono carbonílico da unidade tetrafenila. Portanto, com esta técnica foi possível a determinação estrutural do composto punicalagina.

Figura 50 - RMN ^1H da mistura de α e β -anômeros (pico 2) e ampliação da região dos carbonos anoméricos (11,7 T, $\text{CD}_3\text{OD}-d_4$, TMS, δ , 300 MHz).

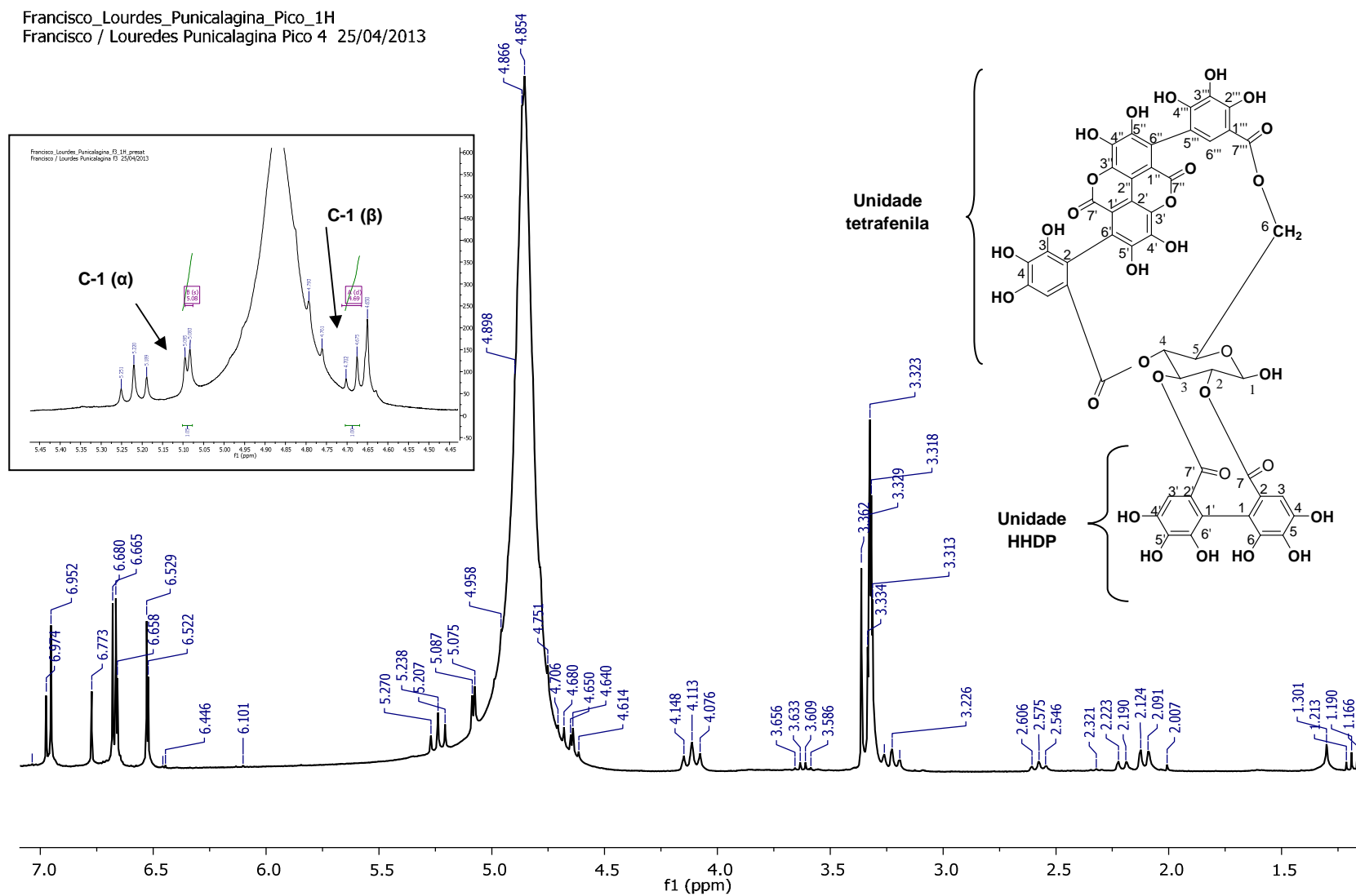


Figura 51 - Espectro RMN ^{13}C de α e β punicalagina (11,7 T, $\text{CD}_3\text{OD}-d_4$, TMS, δ , 300 MHz), (1) ampliação da região dos anoméricos e (2) carbonilas.

Francisco_Lourdes_Punicalagina_f3_13C
Francisco / Lourdes Punicalagina f3 25/04/2013

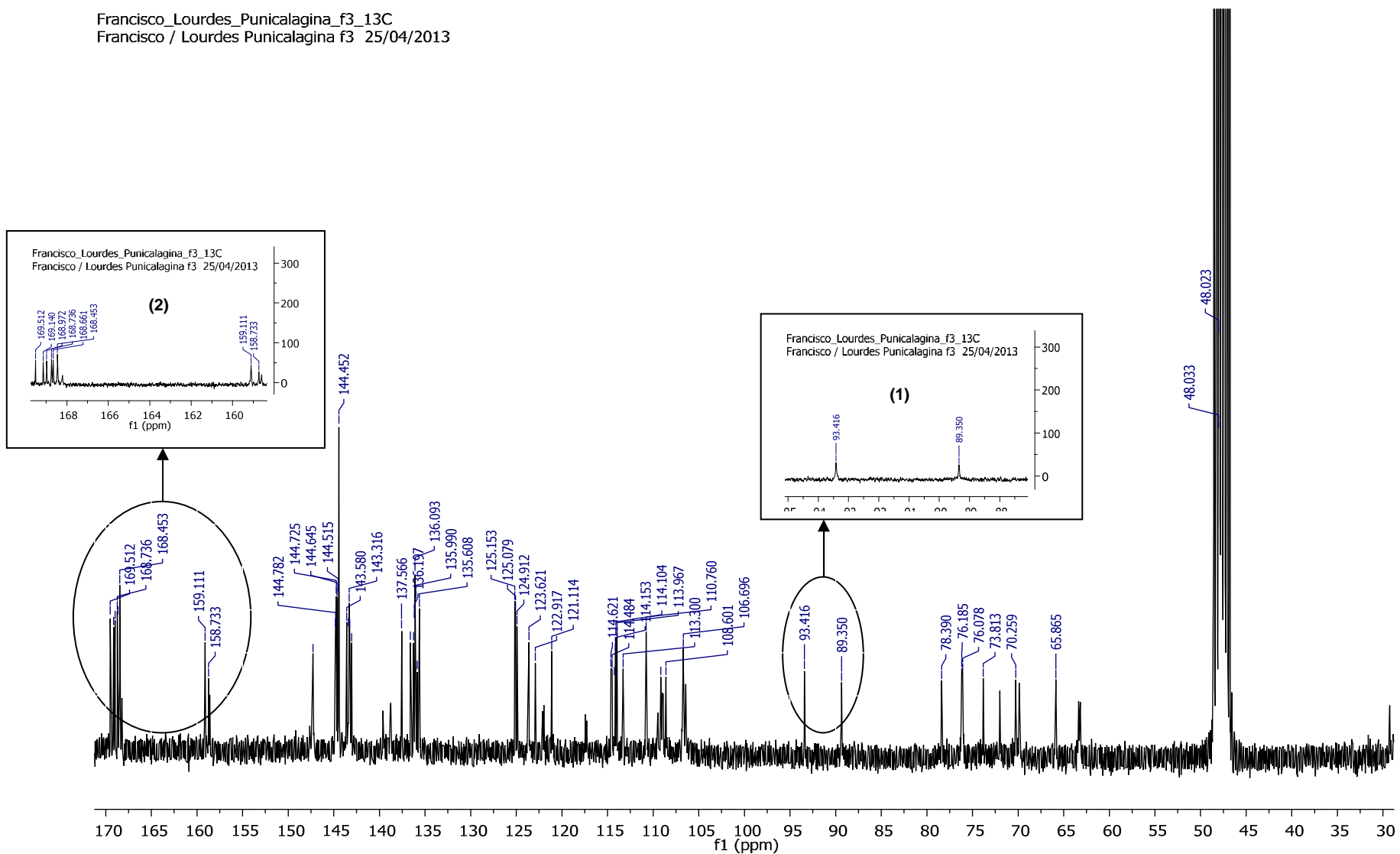


Figura 52 - Espectro RMN ^1H na região dos aromáticos ($\delta = 6,51 - 6,96$ ppm) (11,7 T, $\text{CD}_3\text{OD}_{-d_4}$, TMS, δ , 300 MHz).

Francisco_Lourdes_Punicalagina_Pico_1H
Francisco / Louredes Punicalagina Pico 4 25/04/2013

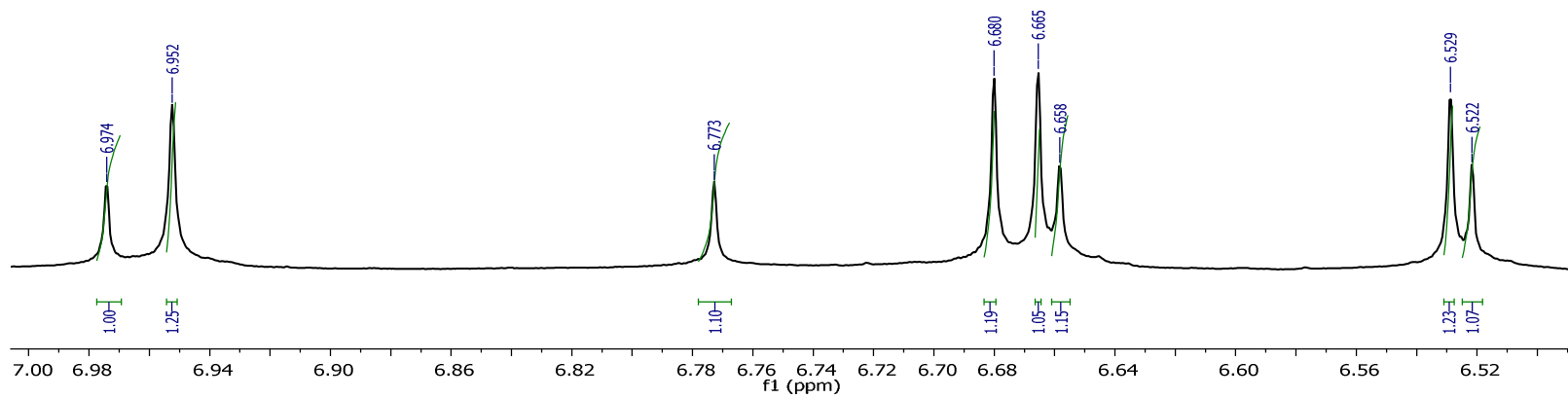


Figura 53 - Experimento gHSQC dos anômeros da punicalagina (11,7 T, $\text{CD}_3\text{OD-d}_4$, TMS, δ , 300 MHz).

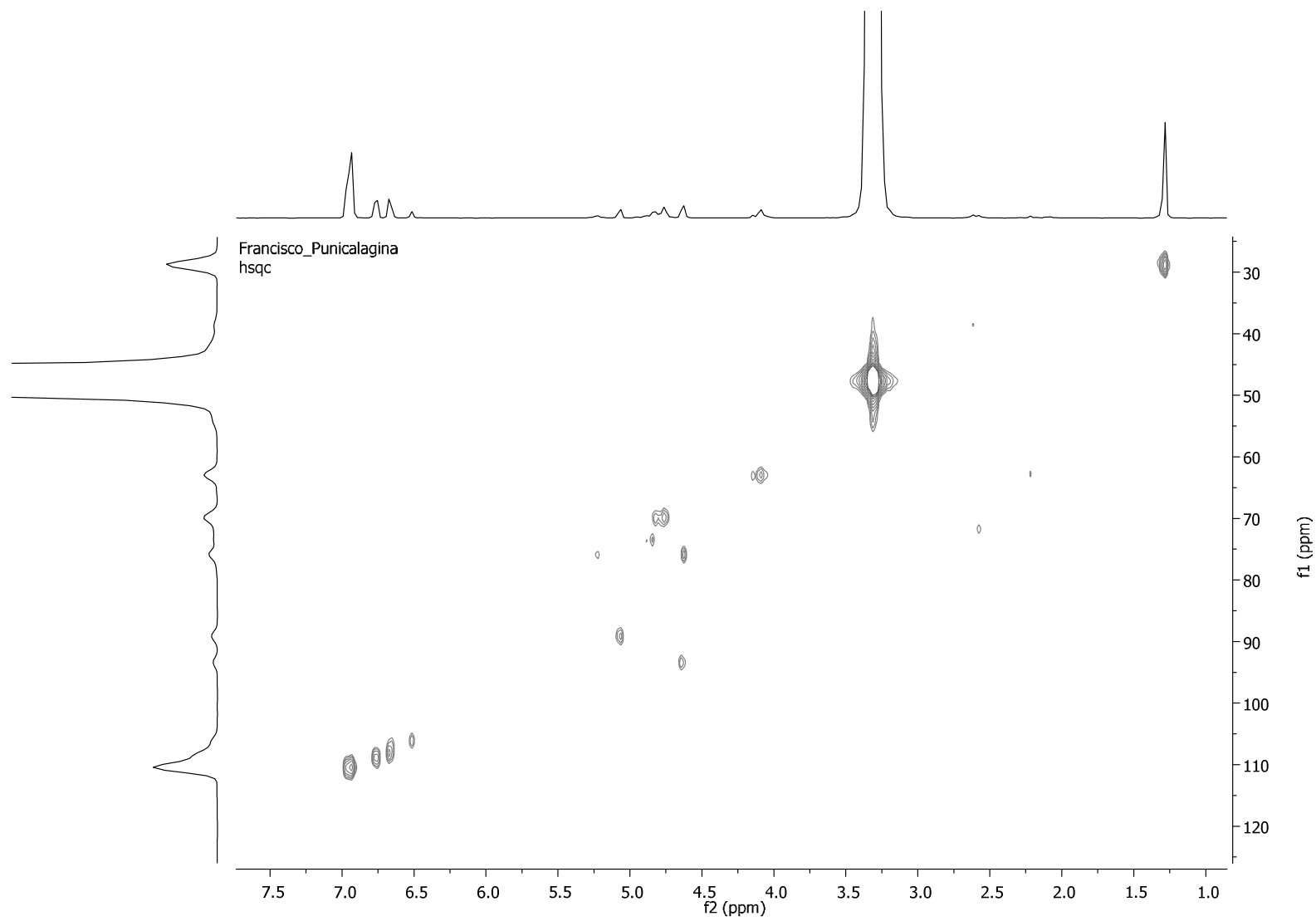


Figura 54 - Experimento *g*HSQC dos anômeros da punicalagina, expansão na região (F1) δ 3,9 a δ 5,3 (11,7 T, $\text{CD}_3\text{OD-d}_4$, TMS, δ , 300 MHz).

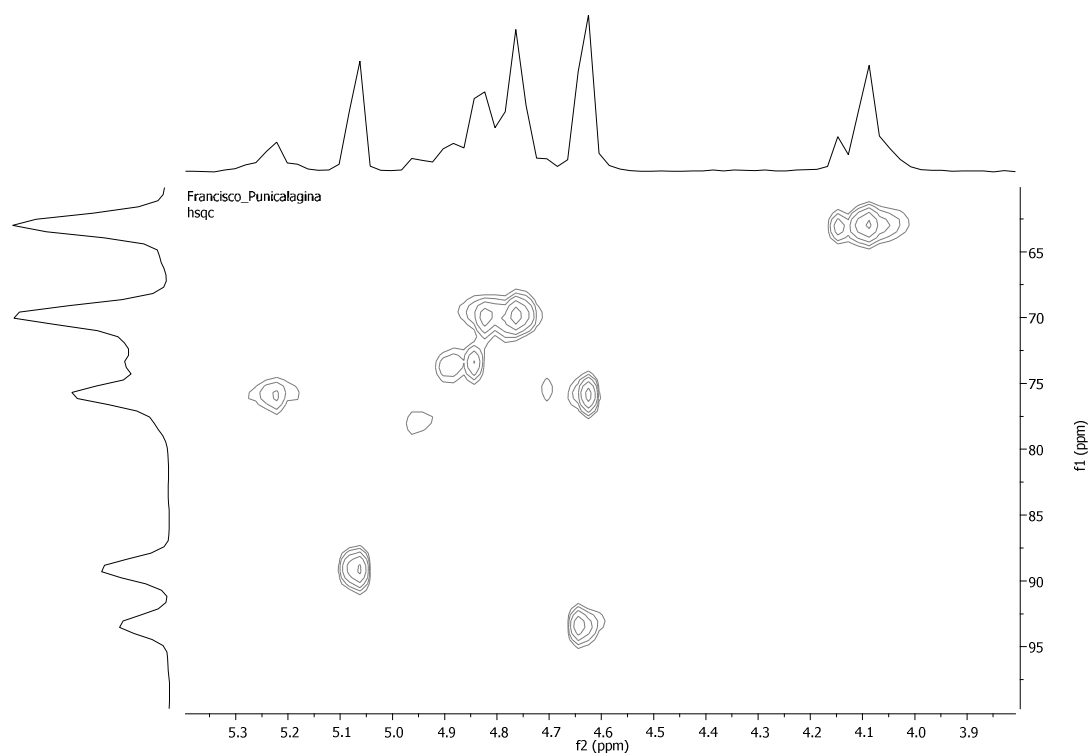


Figura 55 - Experimento *g*HMBC dos anômeros da punicalagina (11,7 T, $\text{CD}_3\text{OD-d}_4$, TMS, δ , 300 MHz).

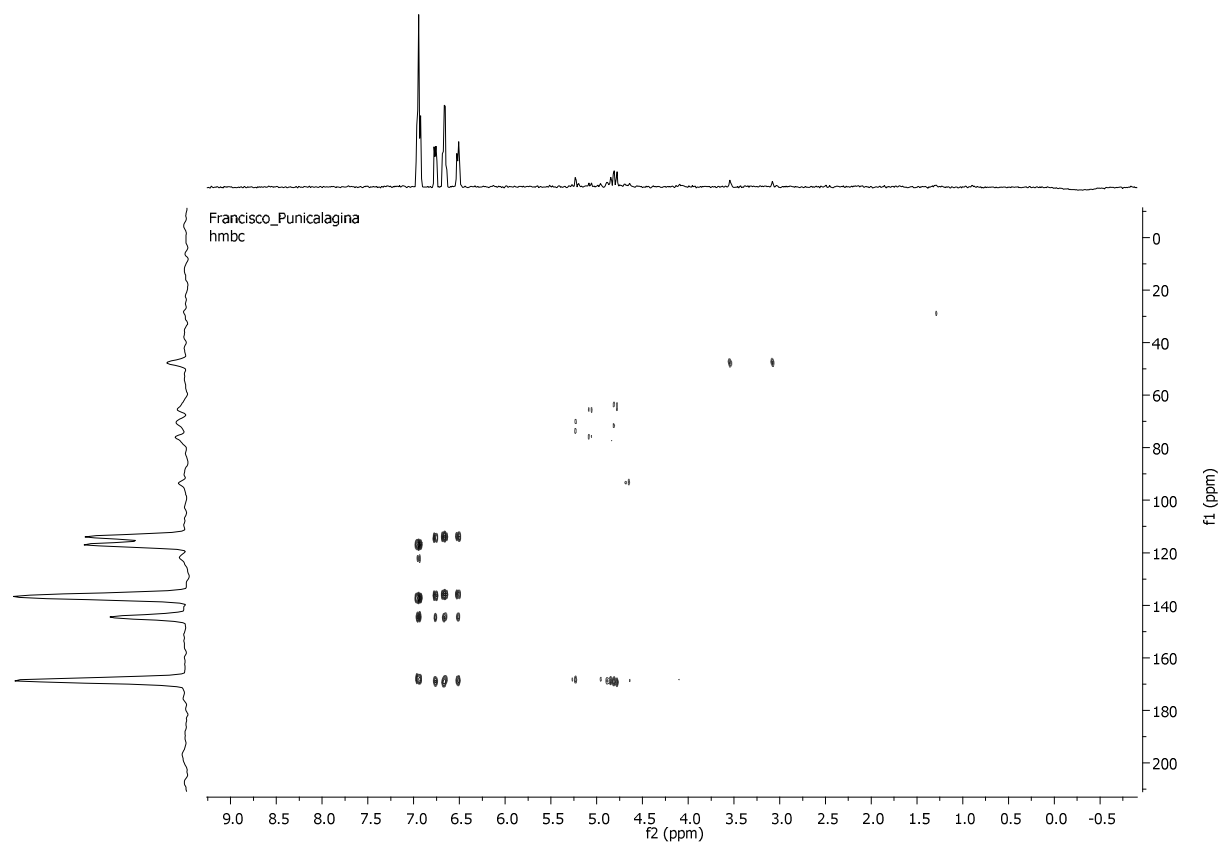


Figura 56 - Experimento gHMBC dos anômeros da punicalagina, expansão da região (F1) δ 6,0 a δ 7,3 (CD₃OD, TMS, ppm).

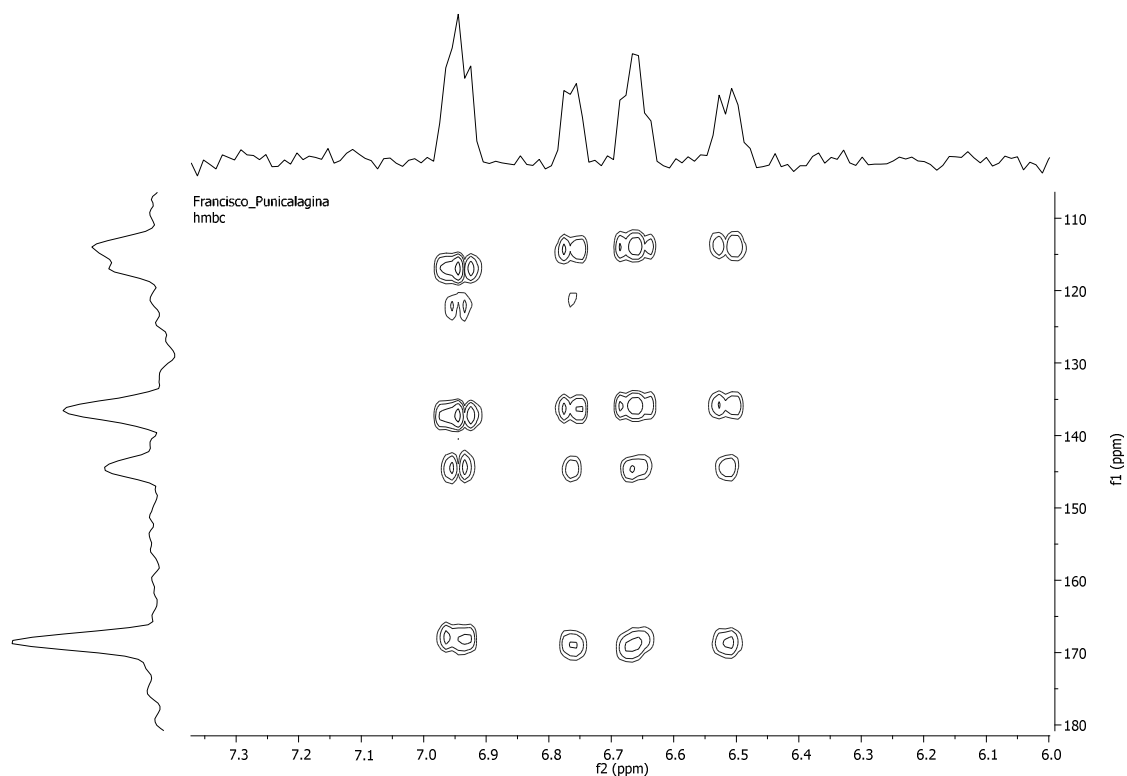


Figura 57 - Experimento gHMBC dos anômeros da punicalagina, expansão da região (F1) δ 4,50 a δ 5,30.

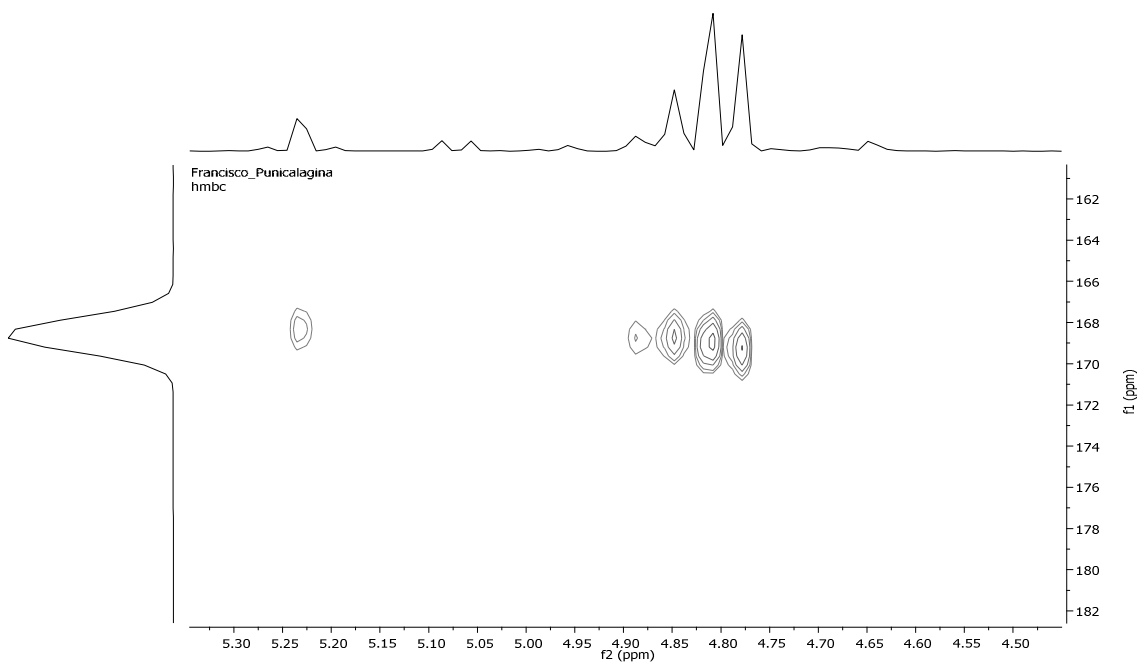


Tabela 3 - Deslocamentos químicos (^1H e ^{13}C) de α e β -punicalagina em $\text{CD}_3\text{OD}_{-d_4}$, 300 MHz.

Posição	α -punicalagina			β -punicalagina		
	δ (^1H)	Multiplicidade (Hz)	δ (^{13}C)	δ (^1H)	Multiplicidade (Hz)	δ (^{13}C)
α-glicose				β-glicose		
1	5,08	<i>d</i> (3,6)	89,8	4,69	<i>d</i> (8,1)	93,77
2	4,87	<i>dd</i> (3,0; 8,0)	73,5	4,62	<i>dd</i> (3,0; 8,1)	75,48
3	5,20	<i>t</i> (9,3)	76,0	4,92	<i>t</i> (10,0)	78,78
4	4,78	<i>t</i> (9,0)	70,2	4,85	<i>t</i> (10,0)	74,88
5	3,23	<i>t</i> (9,0)	66,3	2,57	<i>dd</i> (9,9, 11,0)	71,5
6 ^a	2,10	<i>d</i> (9,9)	63,6	4,05	<i>d</i> (9,9)	63,0
6 ^b	4,09	<i>dd</i> (7,0,7,0)	63,6	4,10	<i>d</i> (7,8)	63,0
HHDP						
1			115,3			115,4
2			126,5			126,5
3	6,66	<i>s</i>	135,9	6,68	<i>s</i>	144,6
4			145,7			145,8
5			136,9			137,2
6			144,9			144,6
7			169,5			169,6
1'			118,5			118,4
2'			126,5			126,5
3'	6,52	<i>s</i>	113,8	6,54	<i>s</i>	144,4
4'			146,2			146,1
5'			137,0			137,2
6'			145,7			145,0
7'			168,7			168,0
			Unidade Tetrafenila			
1			124,3			123,3

2			125,1			125,1
3			145,8			146,0
4			137,0			137,2
5			145,8			146,0
6	6,94	s	137,3	6,97	s	137,2
7			168,6			168,5
1´			109,7			110,4
2´			115,3			115,3
3´			137,2			137,3
4´			139,6			139,5
5´			146,1			146,1
6´			126,3			126,4
7´			159,5			159,6
1´´			115,4			115,5
2´´			114,4			114,5
3´´			139,5			139,6
4´´			144,3			144,3
5´´			148,6			148,3
6´´			110,4			110,7
7´´			159,5			159,6
1´´´			122,6			122,7
2´´´			144,9			144,6
3´´´			137,5			137,4
4´´´			137,5			137,5
5´´´			144,6			138,8
6´´´	6,73	s	1	6,77	s	136,3
7´´´			168,9			169,8

Figura 58 - Correlações $gHMBC$ do grupo HHDP dos hidrogênios aromáticos com carbonos aromáticos e com o grupo carbonila a J^2 e a J^3 .

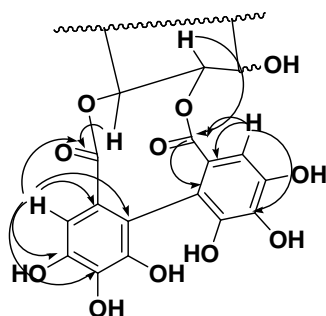
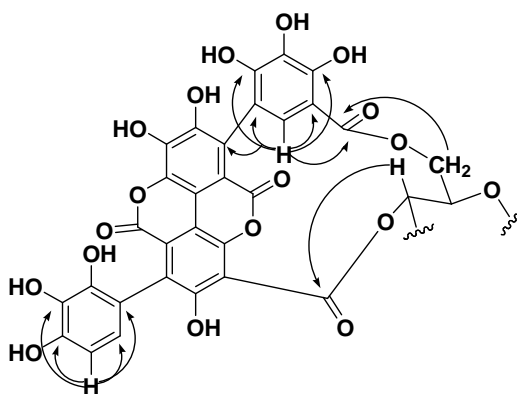


Figura 59 - Correlações $gHMBC$ dos hidrogênios aromáticos com carbonos aromáticos e carbonílicos no grupo tetrafenila a J^2 e a J^3 .



4.6.2 Identificação da substância isolada da fração MPLC-1(ácido galágico) por RMN 1H , $gHSQC$ e $gHMBC$

Os espectros de RMN 1H (Figura 60) da substância obtida da fração MPLC-1 evidenciou um singlete em δ 7,39. No experimento de mapa de contorno $gHSQC$ (Figura 61), observa-se que esse hidrogênio aromático apresenta correlações com o carbono com deslocamento químico em δ 109,91 atribuídos aos C-3 e C-26 respectivamente. Esse mesmo hidrogênio mostra acoplamento a 2J com o carbono C-2 em δ 113,3 no experimento $gHMBC$ (Figura 62).

Portanto, os dados de MS e os de RMN desta substância, comparados com os da literatura, possibilitaram identificar essa substância como sendo o ácido galágico, conforme demonstrado no espectro da Figura 60 (PFUNDSTEIN, 2010; QING, 2012).

Essa substância foi isolada pela primeira vez neste trabalho a partir da fração acetato de etila proveniente do extrato hidroalcoólico (7:3 v/v).

Figura 60 - Espectro de RMN de ^1H da substância ácido galágico (MPLC-1) (11,7 T, DMSO-d_6 , TMS, δ , 300 MHz).

Francisco_MPLC_Fr_1
1H

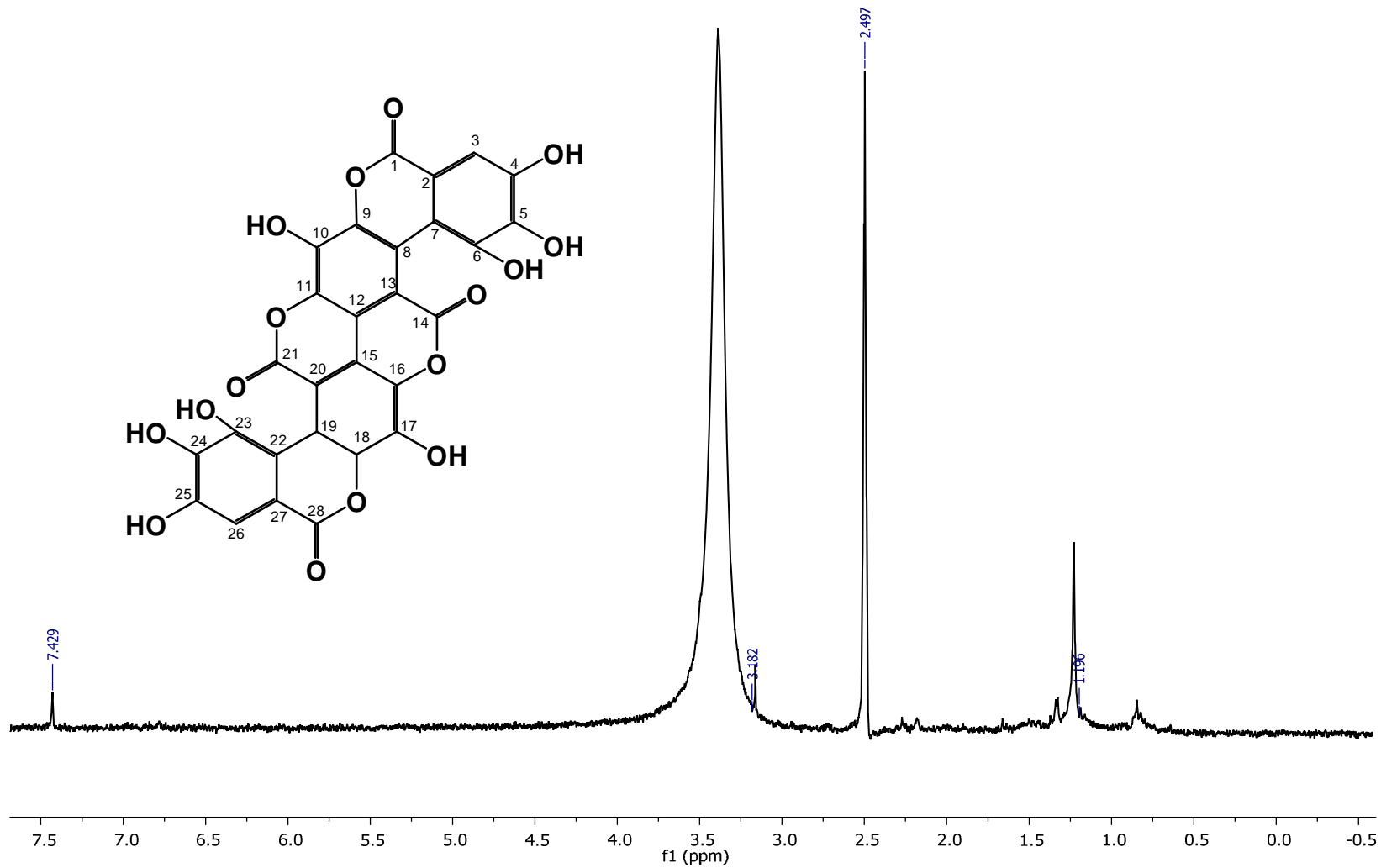


Figura 61 - Espectro gHSQC da substância MPLC-1, ácido galágico, (11,7 T, DMSO-d₆, TMS, δ, 300 MHz). Indicação do hidrogênio aromático.

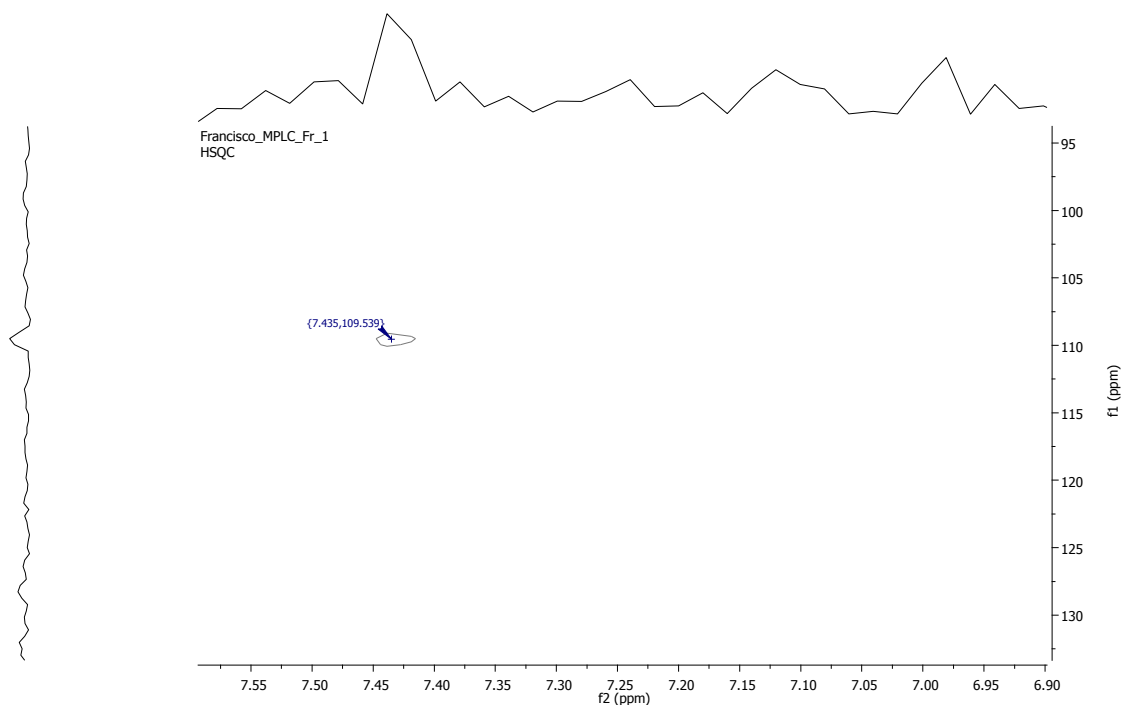
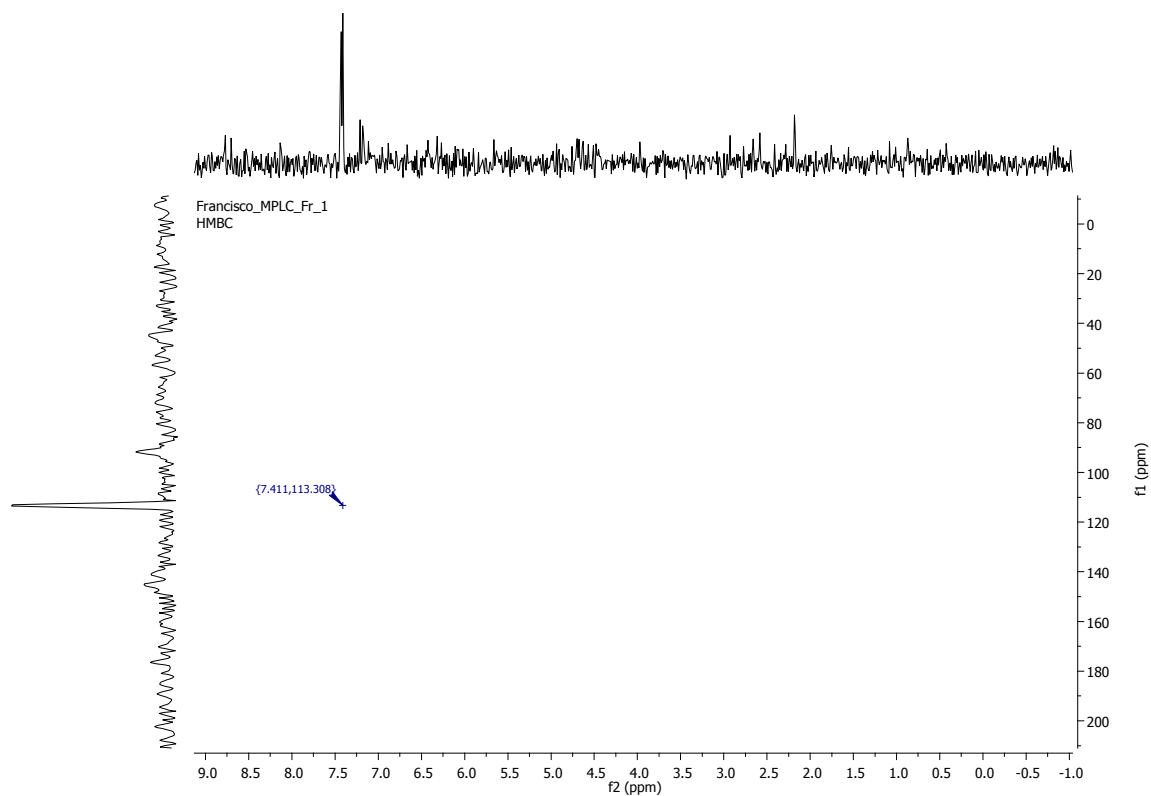


Figura 62 - Espectro de gHMBC da substância MPLC-1, ácido galágico, (11,7 T, DMSO-d₆, TMS, δ, 300 MHz). Indicação do hidrogênio aromático.



4.6.3 Identificação da Substância MPLC-2 (Apigenina 8-C-(2''-galoil)- β -D-glicopiranosil) por RMN

O espectro de RMN de ^1H (Figura 63) da substância MPLC-2 apresentou sinais característicos de uma flavona (HARBORNE, 1986). Os sinais dos hidrogênios do anel A do núcleo da flavona foram observados em δ 6,63 (1H, s), 6,09 (1H, s). Esses sinais apresentaram correlações no mapa de contorno gHSQC com os carbonos em 102,25 e 97,30, respectivamente (Figura 64). A ausência do duplete em meta evidencia que uma das posições (C-6 ou C-8) está substituída.

Os sinais de deslocamentos químicos dos hidrogênios referentes ao anel B foram observados em δ 8,07 (2H, *dd*, $J = 2,0$ e 8,0 Hz) e 6,97 (2H, *dd*, $J = 2,0$ e 8,0 Hz), confirmando que o anel B está dissustituído, sendo, portanto, um derivado de uma apigenina (HARBORNE, 1986). A análise do experimento de mapa de contorno gHSQC (Figura 64) confirma que esses sinais fazem correlações à 1J com os carbonos 128,40 e 115,52 ppm, respectivamente.

Ainda na região de hidrogênios aromáticos, foi observado um sinal em 6,90 (sL, 2H). Esse hidrogênio apresentou correlação no mapa de contorno gHSQC (Figura 64) com o carbono em $\delta_{\text{C}}109,04$, sugerindo a existência de uma unidade galoíla na molécula (LIN et al., 2000).

Observou-se, também, a presença de um hidrogênio anomérico em $\delta_{\text{H}} 5,21$ (Figura 63) com constante de acoplamento (*d*, $J = 9,9$ Hz). Essa constante de acoplamento é típica de um C-glicosídeo uma configuração β (HARBORNE, 1986).

As ligações dos substituintes foram confirmadas pela análise do espectro de mapa de contorno gHMBC (Figura 65). O hidrogênio com deslocamento químico em $\delta_{\text{H}} 6,09$ (C-6) apresentou correlação com um carbono em $\delta_{\text{C}}102,72$, sugerindo que a posição glicosilada é a correspondente ao C-8. Analisando também a correlação do hidrogênio anomérico (C-1'') em δ 5,22, observou-se a correlação à 3J com o carbono δ 102,1 (C-8), confirmando, portanto, a posição glicosídica (Figura 63).

Para estabelecer a ligação do grupo galoíla, observou-se, no experimento de mapa de contorno gHMBC (Figura 65), que o hidrogênio da posição C-2'' δ 6,63 do açúcar apresentava correlação à 3J com a carbonila em δ 182,54.

Portanto, os dados obtidos de MS (item 4.4, pág. 92) e os dados da Tabela 4, em comparação com dados da literatura, permitiram concluir que o composto isolado na fração MPLC-2 corresponde a apigenina 8-C-(2''-galoil)- β -D-glicopiranosil. Essa substância foi anteriormente identificada em extrato etanólico de folhas de *T. catappa* por Lin e colaboradores (LIN et al, 2000).

Tabela 4 - Dados RMN ^1H e ^{13}C do flavonóide galoilado *T. catappa* ($\text{CD}_3\text{OD-d}_4$, δ) comparados a dados da literatura (em DMSO-d_6).

Posição H	δ (ppm)	RMN ^{13}C	Literatura (LIN et al., 2000)	Literatura (LIN et al., 2000)
3	6,63 s	105,6	6,73 s	102,8
6	6,09 s	97,3	6,09 s	98,1
8	-	104,0	-	104,1
2'	8,07 d ($J=8,7$ Hz)	127,6	8,09 d ($J=8,7$ Hz)	129,3
3'	6,93 d ($J=8,7$ Hz)	115,5	6,92 d ($J=8,7$ Hz)	116,0
5'	6,93 d ($J=8,7$ Hz)	115,4	6,93 d ($J=8,7$ Hz)	116,2
6'	8,07 d ($J=8,7$ Hz)	128,7	8,09 d ($J=8,7$ Hz)	129,3
1''	5,22 d ($J=9,97$ Hz)	75,4	4,94 d ($J=10,2$ Hz)	71,4
2''	5,38 dd ($J=10,2$ e 9,3Hz)	91,4	5,48 dd ($J=10,2$ e 9,3Hz)	90,5
H-galoil	6,64 s (2H)	106,5	6,67 s	108,9

Figura 63 - Espectro de RMN ^1H do composto isolado (MPLC-2), apigenina 8-C-(2''-galoil)- β -D-glicopiranosil, (11,7 T, $\text{CD}_3\text{OD-d}_4$, TMS, δ , 300 MHz).

Francisco_MPLC_Fr_2
1H

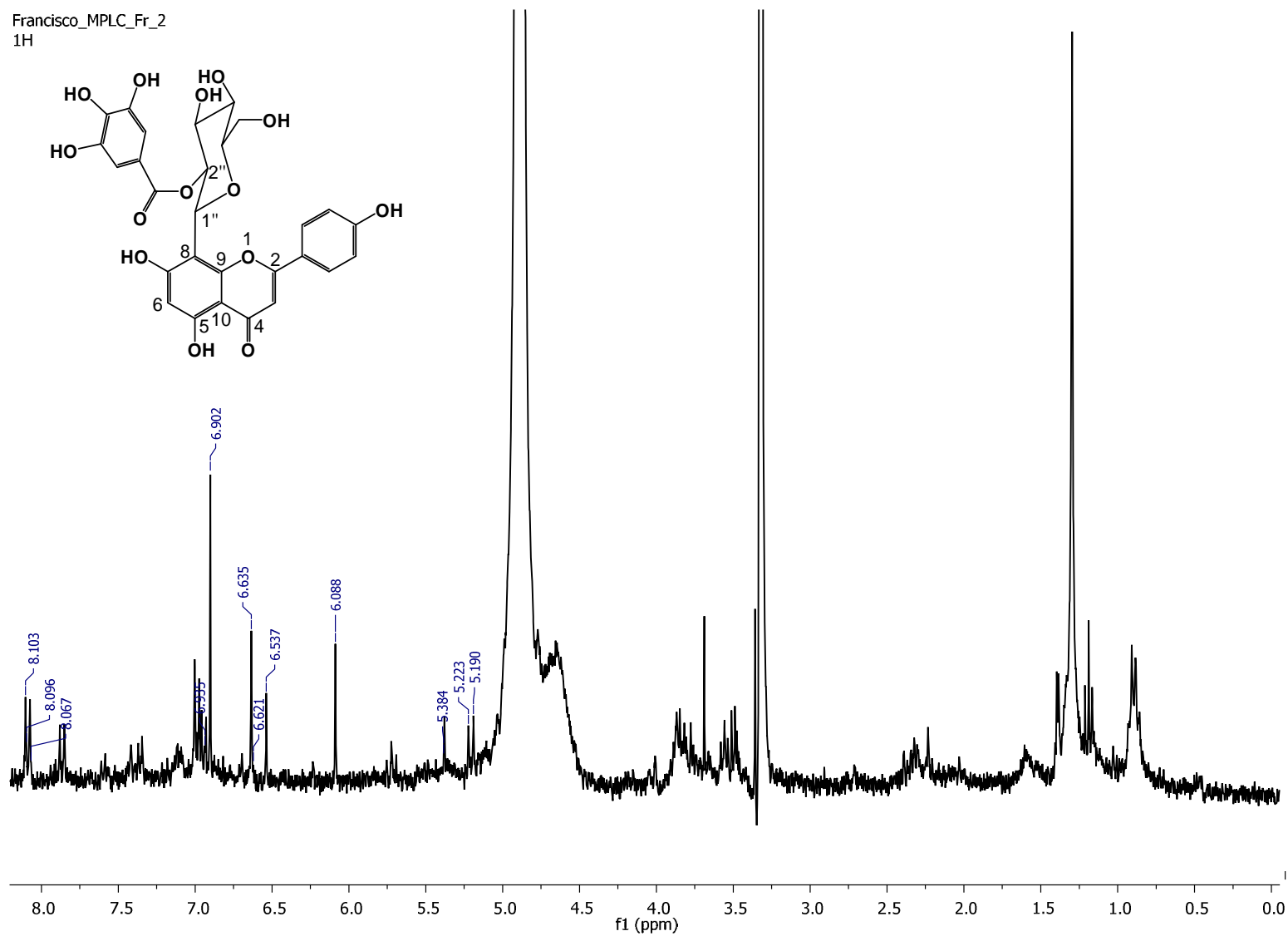


Figura 64 - Mapa de contorno gHSQC (MPLC-2). (11,7 T, CD₃OD-d₄, TMS, δ, 300 MHz).

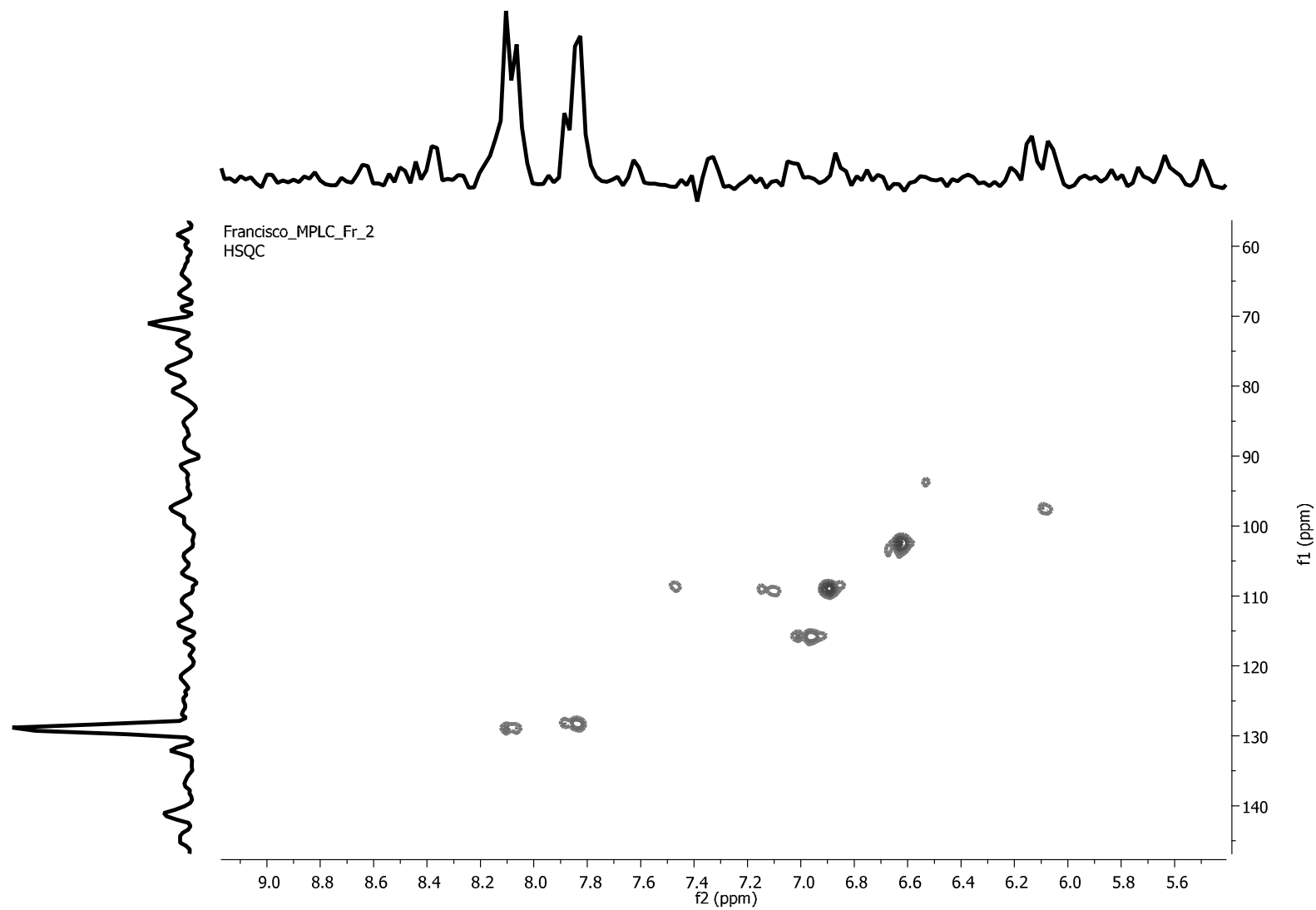
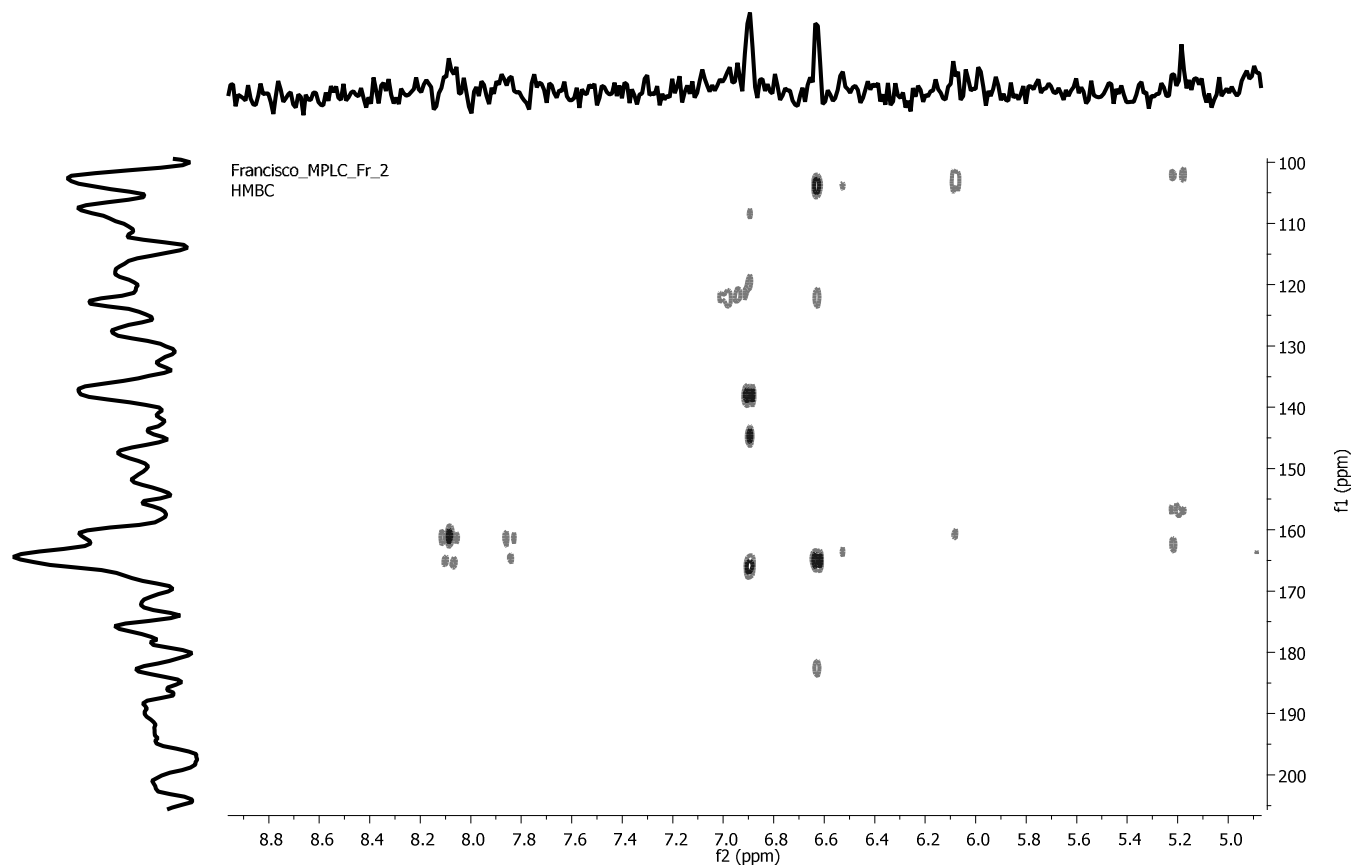


Figura 65 - Mapa de contorno gHMBC do composto isolado da fração MPLC-2 (ampliação da região entre 5,22 a 8,6 ppm). (11,7 T, CD₃OD-d₄, TMS, δ , 300 MHz).



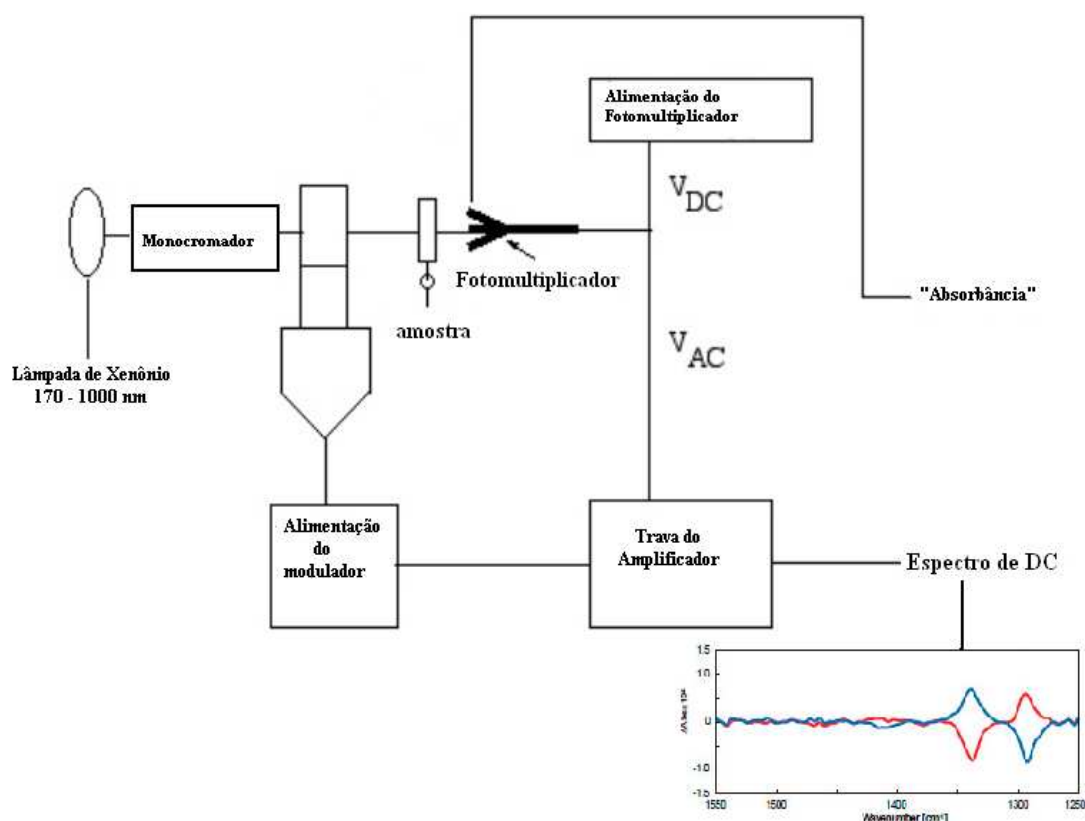
4.7 Estudo da configuração absoluta de substâncias isoladas do extrato hidroalcoólico das folhas de *T. catappa* por técnica de dicroísmo circular (DC).

4.7.1 Estabelecimento da configuração absoluta dos anômeros da punicalagina.

Para estabelecimento da configuração absoluta, procedeu-se com a análise de dicroísmo circular da mistura de anômeros.

O detector de DC acoplado a um sistema de HPLC possui constituintes eletrônicos semelhantes aos de um detector UV (Figura 66).

Figura 66 - Constituintes eletrônicos de um detector de DC para HPLC.



Fonte: adaptado BEROVA et al., 2007.

Na configuração mais comum, há um dispositivo entre o monocromador e o compartimento de amostra, chamado modulador fotoelástico (PEM), que, em alternativa, fornece a luz circularmente polarizada à esquerda e à direita (CPL). Baseia-se em um cristal de quartzo oscilante tipicamente com uma frequência da ordem de 50

kHz: no decurso de cada ciclo, ocorrem alterações na polarização de luz, enquanto a intensidade permanece constante.

Depois de passar através de uma amostra quiral (não racêmica), os dois componentes da luz circularmente polarizada (CPL) são absorvidos em uma extensão diferente, a luz atinge o detector com a mesma frequência que o modulador fotoelástico (PEM). A amplificação de bloqueio de fase desse sinal pode proporcionar, simultaneamente, a absorbância (relacionada com a componente DC), e dicroísmo circular (componente AC). Teoricamente, uma correção de linha de base não é necessária para DC, uma vez que a linha de base deverá ser de 0 (Figura 66). Na prática, ao contrário, é altamente recomendável que qualquer espectro de DC seja corrigido pela subtração da linha de base obtida a partir de uma medição ideal da mistura racêmica com a mesma concentração e na mesma célula; uma alternativa comum seria utilizar um branco com o mesmo solvente, o que proporciona resultados aceitáveis (BEROVA et al., 2007).

A facilidade do acoplamento HPLC-DC possibilita o uso em série com outros detectores, como PDA, índice de refração (IR), espectrometria de massas (EM), RMN etc.

O DC acoplado em série com outros detectores por HPLC permite realizar análises rápidas e confiáveis de moléculas com aplicação em Bioquímica, em Farmacologia, na síntese orgânica e de complexos organometálicos (BEROVA et al., 1994).

Nesse contexto, o acoplamento HPLC-PDA-DC fornece maior segurança na identificação dessas moléculas, mesmo com baixa resolução. Com o PDA, é possível conhecer a classe de metabólitos pela análise dos espectros UV; com o DC, é possível estabelecer a estereoquímica absoluta pela análise de seus espectros de DC, permitindo, assim, a identificação de cada diastereoisômero de catequinas, por exemplo, numa única corrida cromatográfica (RINALDO, 2010).

Os enantiômeros possuem a propriedade de absorver de forma diferenciada a luz circularmente polarizada à esquerda e a luz circularmente polarizada à direita. O valor de (DC) é calculado pela diferença de absorção entre a luz circularmente polarizada à esquerda (AE) e a circularmente polarizada à direita (AD) em certo comprimento de onda (Equação 2; ZHANG et al., 2004).

Equação 2. Diferença de absorção da luz circularmente polarizada – Dicroísmo circular (DC).

$$\Delta A = A_E - A_D$$

$$\Delta \varepsilon = \varepsilon_e - \varepsilon_d = \Delta A / c \cdot l$$

Onde:

A = absorvância

ε = Absortividade molar;

c = concentração molar da amostra (mol.L⁻¹)

l = comprimento do caminho ótico da cela (cm)

A partir da Equação 2, podemos dizer que DC pode ser medido somente em correspondência às bandas de absorção. As bandas máximas e mínimas de absorção são conhecidas como Efeito Cotton (BEROVA et al., 2000).

O primeiro e crucial passo que deve preceder qualquer tentativa de análise de um espectro de DC requer um reconhecimento correto da unidade cromófora pertinente. O cromóforo é uma molécula ou grupo responsável por uma ou mais transições eletrônicas, aliadas às bandas de absorção no UV. No contexto da Química Orgânica, é usualmente um grupo funcional ou uma combinação de vários grupos com elétrons π (BEROVA et al., 2007).

OKUDA e colaboradores (1982 a,b) analisaram o Efeito Cotton de vinte taninos hidrolisáveis e derivados, correlacionando o efeito observado com a estereoquímica de elagitaninos e galotaninos. Dentre esses compostos, foram analisados por esta técnica os compostos, corilagina, pedunculagina, telimagrandina I e II, estricitinina, casuariina, casuarinina, potentilina, agrimoniina, (R)-dimetil-hexahidroxi-difenato, (S)-dimetil-hexahidroxi-difenato. Esses compostos apresentaram Efeito Cotton por volta de 235, 265 e 285 nm.

Elagitaninos são caracterizados pela presença de uma ou mais unidades hexahidroxi-difenóis (HHDP) ligadas à glicopiranosose (NIEMETZ & GROSS, 2005). O grupo HHDP é formado biossinteticamente através de acoplamento oxidativo (C-C) entre grupos galoil vizinhos em grupos HHDP ligados à glicopiranosose (YOSHIDA et al., 2010). Eles são facilmente hidrolisados, quer por via enzimática ou com ácido, para liberar um ácido elágico estável como uma dilactona na forma de ácido hexahidroxi-difenico. Em adição ao grupo HHDP, outras unidades acila em elagitaninos

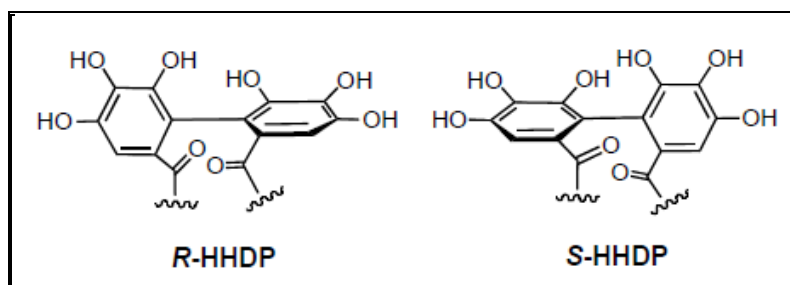
podem incluir um grupo galoil e metabolitos de HHDP como valoneoil, deidrohexahidroxiidifenol (DHHDP) e os grupos quebuloil. Variações no número e posição dessas unidades acila no núcleo glicose fornecem uma variedade de análogos, tais como a telimagrandina I e II, pedunculagina, casuarictina, ácido quebulágico e ácido quebulínico (YOSHIDA et al., 2010).

De acordo com TAKECHI e colaboradores (1985), a atividade anti-herpes de taninos hidrolisáveis é dependente do número de grupos HHDP ou galoil, ligados ao açúcar nesses compostos. Estruturas contendo unidades HHDP constituem valiosos farmacóforos para inibição enzimática do vírus HIV (COS et al., 2008).

Até 1982, a quiralidade axial de grupos biarila de unidades HHDP era determinada por meio de degradação química, iniciados a partir de etapas de metilação usando dimetilsulfato e carbonato de potássio. As unidades biarilas metiladas foram clivadas no núcleo glicopiranosose por metanólise utilizando-se metóxido de sódio em metanol. A quiralidade do ácido hexahidroxiidifênico liberado na sua forma atropoisomérica original foi determinada por comparação com padrões puros atropoisoméricos. A principal desvantagem desse método era a degradação das amostras (TANAKA et al., 1986; YOSHIDA et al., 2000).

Contudo, desde 1982, uma forma mais adequada e não destrutiva tem sido desenvolvida utilizando a espectroscopia de dicroísmo circular (DC) para estabelecer a estereoquímica absoluta de unidades HHDP (Figura 67) ligadas a piranosose de elagitaninos (OKUDA et al., 1982 a,b).

Figura 67 - Estruturas de (*R*)-HHDP e (*S*)-HHDP.



Fonte: Adaptado de Bringmann & G. *Angew. Chem. I.E.* 2005, 44, 5384-5427.

O atropoisomerismo de grupos bifênica em moléculas quirais pode ser diretamente determinado sem qualquer tipo de reação de degradação através de espectroscopia de dicroísmo circular (CD), na qual um Efeito Cotton positivo ou

negativo, apresentando uma banda por volta de 230 nm, caracteriza configurações (*S*) ou (*R*), respectivamente (OKUDA et al., 1982).

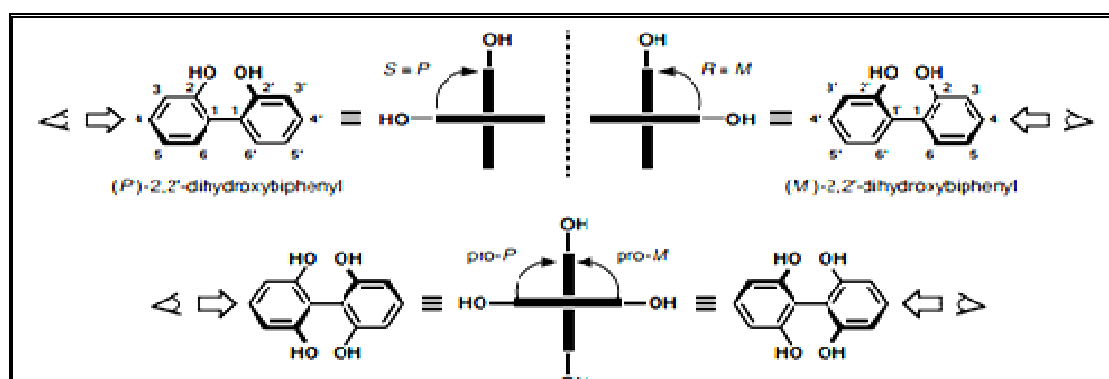
Atropoisomerismo (do grego *atropos*: sem rotação) é um fenômeno atribuído a um tipo de estereoisomerismo em que a rotação livre em torno de uma ligação simples é impedida, produzindo uma barreira energética bastante elevada, de modo a permitir o isolamento ou, simplesmente, a detecção dos diferentes rotâmeros, neste caso, chamados atropoisômeros (CLAYDEN et al., 2006).

A quiralidade dos grupos HHDP deve-se, portanto, ao atropoisomerismo, resultando no impedimento da rotação da ligação simples C-C, em que a tensão estérica é uma barreira alta o suficiente para impedir o isolamento dos dois conformeros (CLAYDEN et al., 2006).

A estabilidade dos diferentes atropoisômeros está diretamente ligada ao grau de bloqueio estérico promovido pelos grupos em torno do eixo quiral (ELIEL, 1994).

Esta isomeria axial é caracterizada pela atividade ótica promovida por um eixo de ligação, e não pela presença de um carbono assimétrico, como elemento de quiralidade. O fenômeno foi observado pela primeira vez pelos pesquisadores Christie e Kenner (CHRISTIE & KENNER, 1992), após a identificação dos atropoisômeros do ácido 6,6'-dinitro-2,2'-difênico, que não se mostraram interconvertíveis à temperatura ambiente. A nomenclatura dos atropoisômeros pela aplicação das regras de prioridade de Cahn-Ingold-Prelog (Figura 68) pode ser atribuída como *R* ou *S* (WILLIAMS & GIRALT, 2001).

Figura 68 - Regras de prioridade de Cahn-Ingold-Prelog.



Fonte: Adaptado de Bringmann & G. Angew. Chem.I.E. 2005, 44, 5384-5427.

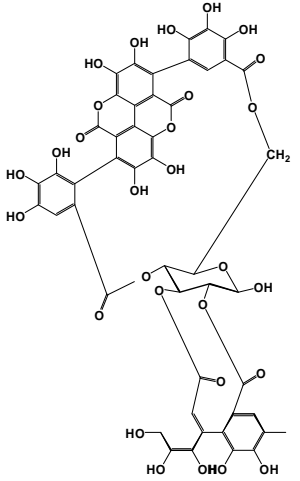
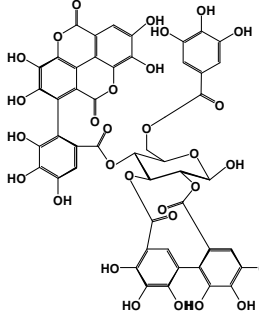
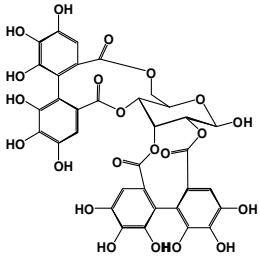
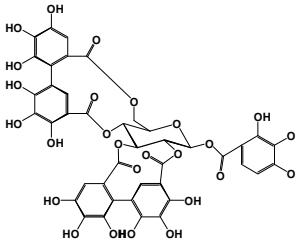
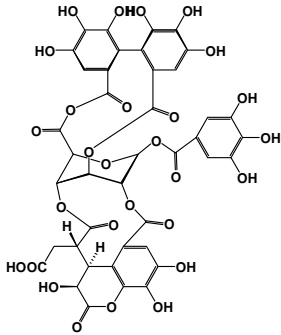
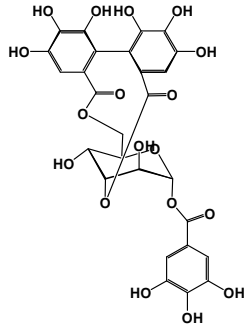
A partir da projeção da estrutura vista na direção do eixo de ligação do sistema bifenílico, deve-se definir a ordem de prioridade dos grupos funcionais, iniciando por aqueles mais próximos ao observador e, em seguida, atribuir a configuração absoluta *R* ou *S* (Figura 68) com base no sentido da rotação produzida quando se caminha do substituinte de maior prioridade para o de menor prioridade. De maneira alternativa, os compostos atropoisoméricos podem ser vistos como hélices e suas configurações descritas como *P* ("Plus"), referentes à rotação no sentido horário, ou *M* ("Minus"), referentes à rotação no sentido anti-horário (ELIEL & WILEN, 2003).

O fenômeno de atropoisomerismo é comumente encontrado em sistemas onde o eixo de quiralidade é formado por sistemas sp^2 - sp^2 , principalmente em sistemas do tipo biarila com substituições nas posições *orto* (ELIEL et al., 1994).

De acordo com dados da literatura, unidades HHDP ligadas a elagitaninos nas posições 2,3 ou 4,6 de um núcleo C₁-glicopirranose ou nas posições 1,6 de um núcleo C₄-glicopirranose são, predominantemente e, em larga extensão, configurações (*S*), enquanto aqueles ligados às posições 2,4 ou 3,6 de um C₄-glicopirranose estão sempre numa configuração (*R*) (QUIDEAU & FELDMAN, 1997).

No Quadro 4, encontramos uma série de taninos hidrolisáveis e variações no número e posições dos radicais HHDP ligados ao resíduo de açúcar (YOSHIDA et al., 2010).

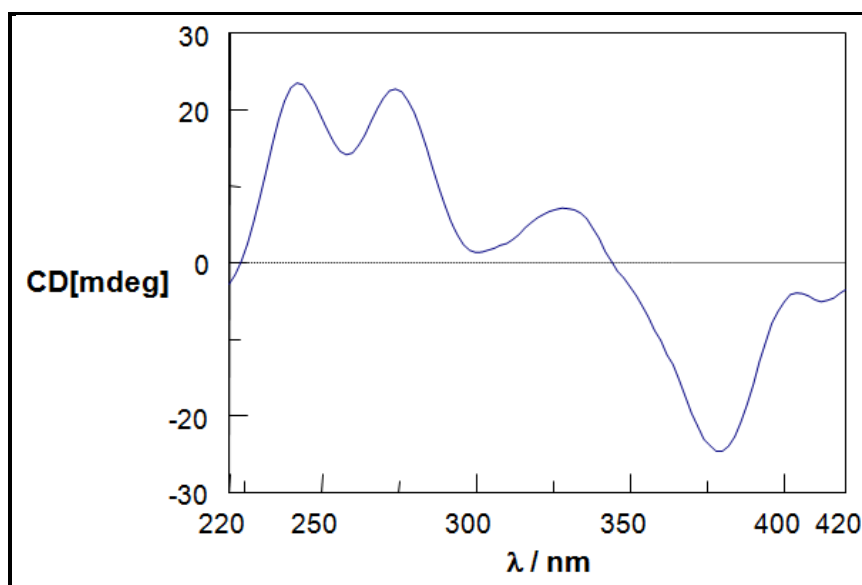
Quadro 4 - Posição de grupos HHDP em taninos hidrolizáveis: (1) Carbono do núcleo glicopirranose ligado ao resíduo HHDP; (2) Conformação.

					
<p>(1) 2,3 (2) (S)-HHDP Punicalagina</p>	<p>(1) 2,3 (2) (S)-HHDP Terflavina A</p>	<p>(1) 4,6 (2) (S)-HHDP Pedunculagina</p>	<p>(1) 4,6 (2) (S)-HHDP Casuarictina</p>	<p>(1) 3,6 (2) (R)-HHDP Ácido quabulágico</p>	<p>(1) 3,6 (2) (R)-HHDP Corilagina</p>

No caso do tanino elágico punicalagina (Quadro 4), temos o grupo HHDP ligado às posições 2,3 de um núcleo C₁-glicopiranosose na conformação (S) (TANAKA et al., 1986).

O espectro de DC dos anômeros da punicalagina evidencia um Efeito Cotton positivo pronunciado em cerca de 244 nm e outro em aproximadamente 274 nm (Figura 69). Pode ser observado, também, um Efeito Cotton positivo, menos intenso em 330 nm, devido à presença de grupos galoil e grupos hexahidroxidifenoíla (HHDP). O Efeito Cotton em cerca de 330 nm é devido, provavelmente, aos grupos galoil ligados aos anéis B e D da punicalagina e esterificados às hidroxilas dos carbonos C-3 e C-6 do resíduo de açúcar (Quadro 4) (OKUDA, 1982 a,b). O composto punicalagina apresenta, portanto, a seguinte nomenclatura: 2,3-(S)-hexahidroxidifenoil-4,6-(S,S)-galagil-D-glicose.

Figura 69 - Espectro de dicroísmo circular (DC) da punicalagina (pico 1).



A Figura 70 corresponde a análise do pico 2. O Efeito Cotton em 244 e 274 nm (Tabela 4) estão relacionados com a determinação da configuração absoluta dos grupos HHDP nos taninos que possuem grupos HHDP e grupos galoil ligados à glicopiranosose. O Efeito Cotton em 244 nm é, portanto, diagnóstico de uma configuração absoluta dos grupos HHDP em taninos desta classe. O Efeito Cotton positivo indica uma configuração (S) e um Efeito Cotton negativo é indicativo de uma configuração (R). Esta correlação existe independente da presença ou ausência do grupo galoil e também da conformação do resíduo de açúcar.

O efeito Cotton negativo em aproximadamente 380 nm pode estar relacionado ao volume do sacarídeo (STICZAY et al., 1975).

Figura 70 - Espectro de dicroísmo circular (DC) da punicalagina (pico 2).

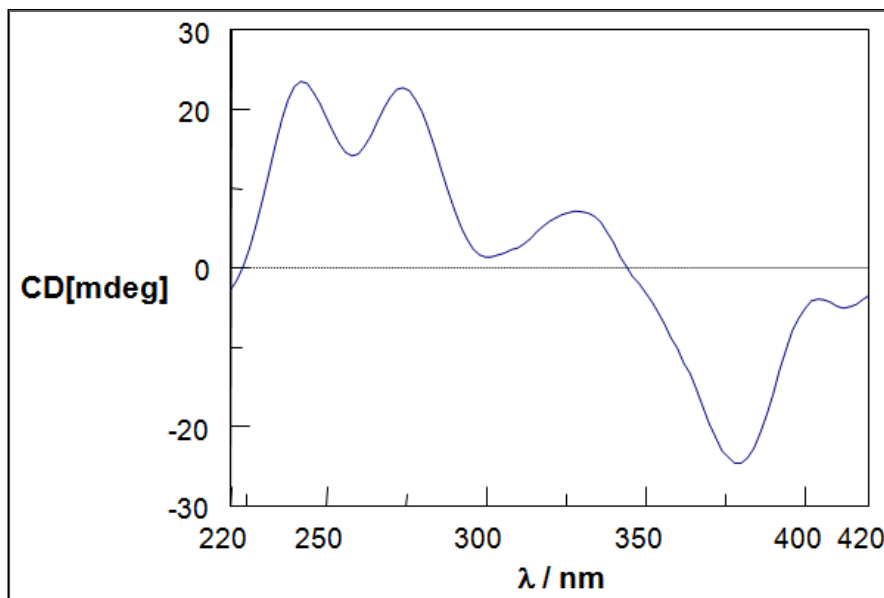


Tabela 5 - Dados do espectro de dicroísmo circular obtidos para os picos 1 e 2 (anômeros da α e β punicalagina)

Picos	λ (nm)	$\Delta\epsilon$
Pico 1	244	+ 26
	274	+ 25
	330	+ 10
	380	- 29,8
Pico 2	244	+ 26
	274	+ 25
	330	+ 10
	380	- 29,8

Estudos mostraram que a unidade HHDP de elagitaninos apresenta estrutura globular muito organizada que os tornam capazes de interagir de uma forma específica com o alvo biológico definido como, por exemplo, algumas proteínas envolvidas na replicação do DNA (QUIDEAU & FELDMAN, 1997; QUIDEAU et al., 2005)

De acordo com dados da literatura, o composto punicalagina isolado de *Terminalia chebula* Retz. com grupo (S)-HHDP (ligação às posições 2,3 do resíduo de glicose) possui a capacidade para inibir o vírus da Herpes Simplex tipo-1 (HSV-1) e HIV-1, ressaltando o seu valor potencial no tratamento de pacientes com AIDS, que também apresentam sintomas HSV-1 (WEAVER, 1992).

4.7.2 Análise do composto isolado da fração MPLC-2 por Dicroísmo Circular (DC).

Para estabelecer a configuração absoluta da substância MPLC-2, realizamos experimentos de dicroísmo circular (DC).

O composto isolado da fração MPLC-2 apresentou o espectro de dicroísmo circular (DC) indicado na Figura 71, (Tabela 5).

Figura 71 - Espectro de dicroísmo circular (DC) do composto isolado da fração MPLC-2.

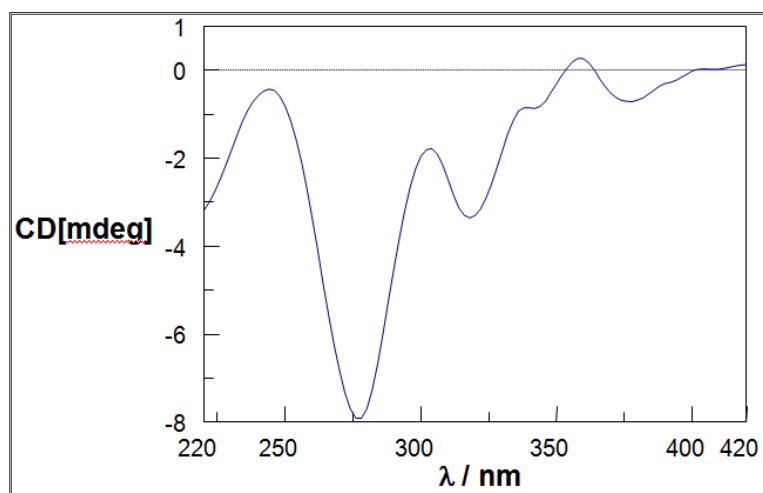


Tabela 6 - Efeitos Cottons (EC) do composto Apigenina 8-C-(2''-galoil)-β-D-glicopiranosil.

Composto	$\pi \rightarrow \pi^*$	$\Delta\epsilon$	$n \rightarrow \pi^*$	$\Delta\epsilon$
Apigenina 8-C-(2''-galoil)-β-D-glicosídeo	270 nm	- 8,0	320 nm	- 4,2

Anéis aromáticos e grupos carbonila são cromóforos comuns em compostos naturais. As bandas de absorção de aromáticos correspondem a $\pi\text{-}\pi^*$ e encontram-se na faixa de UV de 200-290 nm e os grupos carbonila apresentam transições $n\text{-}\pi^*$ entre 280 e 340 nm. A intensidade de absorção poderá ser intensificada devido à conjugação. Os grupos arila e carbonila são cromóforos aquirais e, por conseguinte, a quiralidade tem que ser induzida por uma associação com um centro quiral. A atividade

de DC observável em um composto depende da localização do cromóforo e do centro quiral. A atribuição da configuração absoluta de um composto a partir de dados de DC pode ser obtida a partir de regras de excitação do centro de quiralidade e modelos de acoplamento (SMITH, 1998). A utilização desses modelos requer que a conformação de uma molécula seja conhecida (PURDIE, 1994).

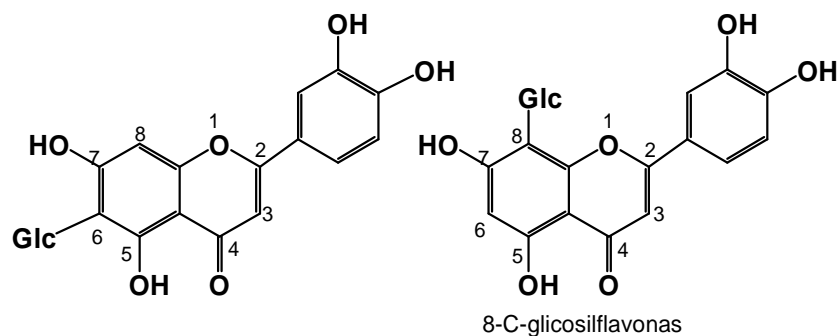
Goto et al (1990) e Goto e Kondo (1991), ao trabalharem com síntese de flavonas glicosiladas em solução aquosa, observaram um intenso efeito Cotton negativo no espectro de DC derivado da quiralidade dos resíduos *D*-glicosilados (GOTO et al, 1990; GOTO & KONDO, 1991).

Os espectros de DC de 6 e 8-glicosilflavonas (Figura 72) foram investigados por Lévai (1998). Os resultados mostram que o sinal do efeito Cotton entre 250-275 nm depende da posição do resíduo C-glicosilado na flavona. Indica também se o açúcar pertence à série *D* e forma a ligação glicosídica em β . Nessa região, as flavonas 6-C-glicosiladas exibem efeito Cotton positivo e as flavonas 8-C-glicosiladas, um Efeito Cotton negativo. Baseado nesta regra, a espectroscopia de DC mostra-se um método sensível para a diferenciação das flavonas 6-C e 8-C-glicosiladas (LÉVAI,1998).

O efeito Cotton negativo na região entre 311-345 nm é característico da ligação do sacarídeo à aglicona. Esses efeitos Cottons podem ser devidos a transições proibidas $n \rightarrow \pi^*$, não registradas no espectro de UV, uma vez que foram sobrepostas por fortes transições $\pi \rightarrow \pi^*$ vizinhas. Quando o centro quiral é afastado do cromóforo, a rotação em torno da ligação β -glicosídica é possível. Efeitos Cottons entre 332-374 nm podem ter diferentes intensidades dependendo do volume do sacarídeo (STICZAY et al., 1975).

A partir dos dados obtidos por dicroísmo circular (DC), pode-se concluir que o método foi bastante sensível e uma importante ferramenta para elucidação estrutural do composto isolado da fração MPLC-2, indicando a ligação do sacarídeo nas posições 8 da aglicona, semelhante ao identificado por Gaffield e colaboradores (LÉVAI,1998).

Figura 72 - Flavonas 6-C e 8-C-glicosiladas.



4.8 Quantificação de substâncias presentes nos extratos hidroalcoólico, etanólico, (frações acetato de etila e aquosa) e infusão das folhas de *T. catappa* por HPLC- PDA.

A quantificação das substâncias dos extratos hidroalcoólico, etanólico, frações acetato de etila e aquosa e da infusão das folhas de *T. catappa* foi realizada utilizando calibração com padrão externo. A equação linear da curva analítica é dada pela Equação 3:

$$y = ax + b \quad (3)$$

onde **a** é o coeficiente angular e **b** é a intersecção com o eixo y. Pelo método dos mínimos quadrados, obtiveram-se os valores de **a** e **b** apresentados na Tabela 7, que também traz o coeficiente de correlação obtido da análise da regressão linear, cujo valor indica a linearidade do método.

As curvas analíticas foram construídas utilizando padrão comercial do ácido elágico, ácido gálico, galato de metila, e das substâncias isoladas (anômeros α e β da punicalagina, ácido galágico e apigenina 8-C-(2''-galoil)- β -D-glicopiranosil) do extrato hidroalcoólico das folhas de *T. catappa*. Cabe destacar que, na literatura, não consta a quantificação destes metabólitos secundários em extratos hidroalcoólicos de folhas de *T. catappa*, sendo, portanto, descritos aqui pela primeira vez. Esse fato torna-se relevante uma vez que inúmeros trabalhos descrevem que folhas e mesmo outras partes de *T. catappa* são extensivamente usadas pela população como medicamento. A literatura indica, também, diversos estudos que comprovaram suas propriedades farmacológicas, conforme indicado no Quadro 3, pág.37. A análise por regressão linear

das respostas da área dos picos (y) em relação à concentração de injeção (x) produziu as seguintes equações: $y = 71514x + 21753$ para o ácido elágico e para a punicalagina total, $y = 28691x - 74335$. Essa equação foi utilizada para o cálculo das concentrações e teores de punicalagina total no extrato hidroalcoólico, extrato etanólico, infusão e fração aquosa, bem como para determinação da exatidão do método (testes de recuperação) e precisão do método (estudos de repetibilidade e precisão intermediárias). Lu et al., (2008) utilizou metodologia semelhante ao quantificar os anômeros da punicalagina provenientes do extrato etanólico de cascas da romã (*Punica granatum* L.).

A partir das curvas de calibração, foram obtidos os coeficientes linear (a) e angular (b), o coeficiente de correlação (r^2) e os limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ). Os gráficos das *concentrações x áreas* de cada padrão comercial utilizado e dos metabólitos isolados estão demonstrados a seguir (Figuras 73, 74 e 75).

Os coeficientes de correlação (r^2) e os limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ), para os padrões comerciais e para os metabólitos isolados estão demonstrados na Tabela 7.

O limite de detecção (LOD) foi determinado como o sinal equivalente a 3,3 vezes o valor entre a razão do (a) coeficiente linear pelo (b) coeficiente angular ($3,3 \times a/b$), obtidos pela equação da reta da curva analítica de calibração. O limite de quantificação (LOQ) foi dado como 10 vezes o valor desta razão (RIBANI et al., 2004). Usando esta relação, foram obtidos LOD de $1,003 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ e LOQ de $3,04 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ para o ácido elágico. Para o anômero da α -punicalagina (pico 1), foram obtidos LOD de $10,38 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ e LOQ de $31,46 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$. Para o anômero da β -punicalagina (pico 2), foram obtidos LOD de $8,77 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ e LOQ de $26,59 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$. Para punicalagina total ($\alpha + \beta$), obteve-se LOD de $9,44 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ e LOQ de $28,61 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ (Tabela 7).

As curvas analíticas (Figuras 73, 74 e 75) apresentaram, no intervalo de concentração estudado, coeficientes de correlação (r^2) com valores superiores a 0,99, o que indica uma boa correlação entre as áreas e as concentrações estudadas. Esse parâmetro pode ser demonstrado pelo coeficiente de correlação do gráfico analítico, que não deve ser estatisticamente diferente de 1 (BRITO, 2001; STUBBERUD & ASTROM, 1998).

Porcentagens de recuperação (exatidão) estão demonstradas na Tabela 8. A exatidão é definida como a concordância entre o valor real do analito na amostra e o estimado pelo processo analítico, constitui-se, portanto, a chave para o propósito da validação (FRANCOTTE et al., 1996). Reflete a quantidade de determinado analito recuperado no processo em relação à quantidade real presente na amostra. A exatidão é expressa como erro sistemático percentual, inerente ao processo (GONZÁLEZ et al., 1999). O erro sistemático ocorre por perda da substância devido à baixa recuperação da extração, medidas volumétricas imprecisas ou substâncias interferentes na amostra (entre outros). Os resultados foram apresentados como média e desvio-padrão das porcentagens recuperadas.

Os desvios-padrão relativos (DPRs) para os testes de repetibilidade intra e interdia estão demonstrados na Tabela 9. O resultado está apresentado na forma de desvio-padrão relativo em relação à média. Esse parâmetro avalia a proximidade entre as várias medidas efetuadas na mesma amostra e é denominado “precisão do processo analítico”. Usualmente, a precisão é expressa como desvio-padrão, variância ou coeficiente de variação (CV) ou (desvio-padrão relativo) de diversas medidas. O CV é dado pela seguinte equação 4:

$$CV\% = \frac{s}{M} \times 100$$

Onde: s = desvio-padrão das recuperações e M = média das recuperações.

O valor máximo aceitável deve ser definido de acordo com a metodologia empregada, a concentração do analito na amostra, o tipo de matriz e a finalidade do método, não se admitindo valores superiores a 5% (ANVISA, 2003). Os 5% preconizados pela Resolução 899, de 29 de maio de 2003, é definido para **precisão** e não **exatidão**. Quanto ao nível de recuperação (exatidão), o valor de (CV) ou DPR (%) dependerá da concentração do analito na amostra analisada (Workshop Validação de Métodos Analíticos: ANVISA, 2013).

Figura 73 - Curvas analíticas obtidas pelo método da calibração externa a partir de injeções em triplicata de soluções padrão de ácido elágico e anômeros da punicalagina (punicalagina total).

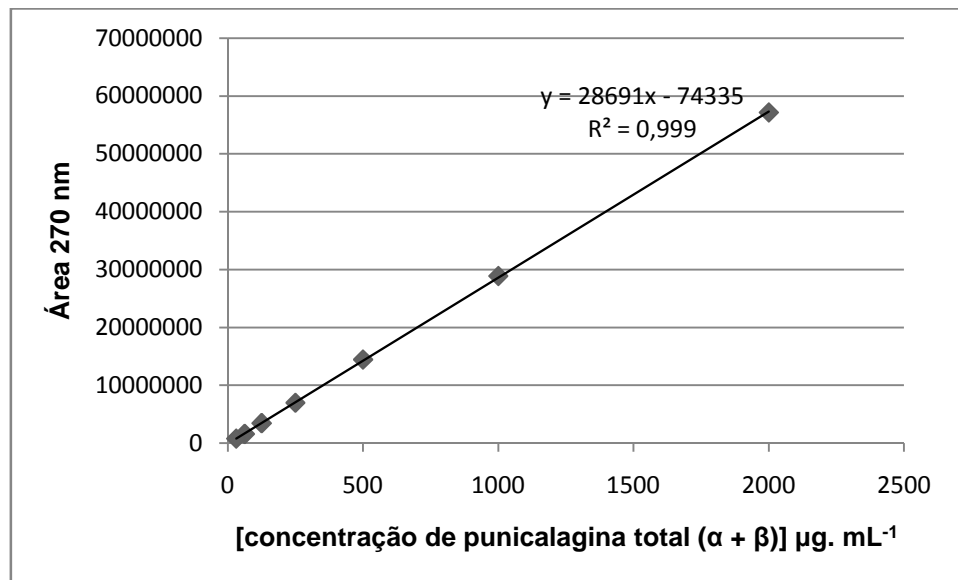
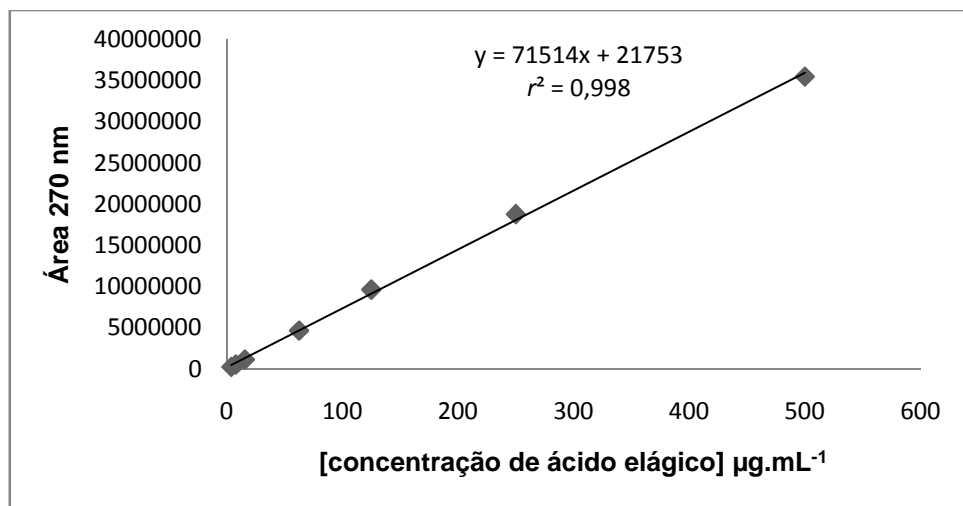


Figura 74 - Curvas analíticas obtidas pelo método da calibração externa a partir de injeções em triplicata de solução padrão de ácido gálico e galato de metila.

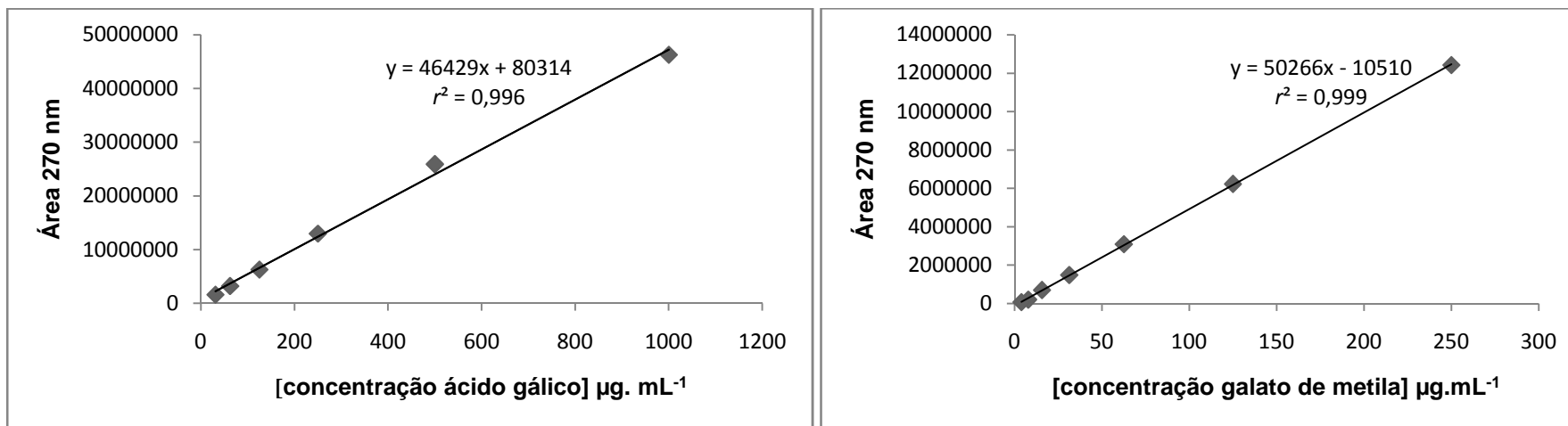


Figura 75 - Curvas analíticas obtidas pelo método da calibração externa a partir de injeções em triplicata de solução padrão de ácido galálgico e Apigenina.

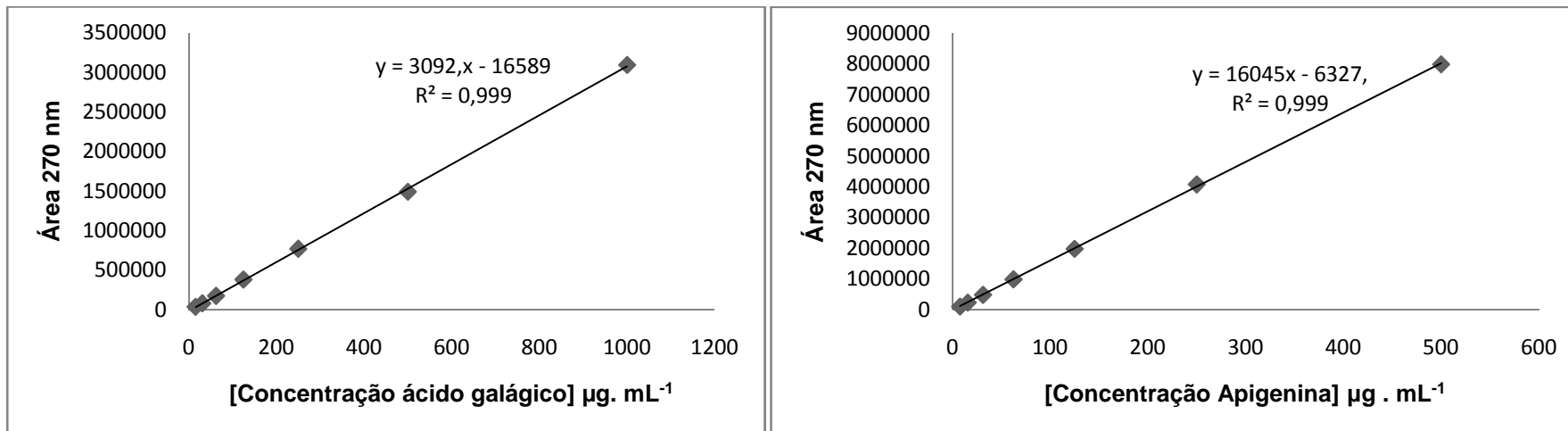


Tabela 7 - Dados obtidos a partir da regressão linear das curvas de calibração.

Substâncias analisadas	Coefficiente angular (a)	Coefficiente linear (b)	Coefficiente de correlação	LOD ($\mu\text{g. mL}^{-1}$)	LOQ ($\mu\text{g. mL}^{-1}$)
<i>Ácido Elágico</i>	71514	21753	0,998	1,003	3,04
<i>Punicalagina Total</i>	28691	74335	0,999	1,27	3,85
<i>Ácido Gálico</i>	80314	46429	0,996	5,70	5,82
<i>Galato de Metila</i>	50266	10510	0,999	0,68	17,29
<i>Ácido Galágico</i>	3092	16589	0,999	17,70	53,65
<i>Apigenina 8-C-(2''-galoil)-β-D-glicopiranosil</i>	16045	6327	0,999	1,30	3,94

Tabela 8 - Determinação da exatidão do método (teste de recuperação) para a determinação de cada uma das substâncias quantificadas.

Substâncias investigadas	Recuperação (%)			Média	DP	DPR (%)
	1	2	3			
<i>Ácido Elágico</i>	90,4	87,75	84,52	87,56	2,94	3,35
<i>Punicalagina Total</i>	86,9	86,26	85,86	86,34	0,52	0,60
<i>Ácido Gálico</i>	82,58	82,36	75,35	80,09	4,11	5,13
<i>Galato de metila</i>	71,86	76,52	69,05	72,47	3,77	5,20
<i>Ácido Galágico</i>	76,33	69,34	72,32	72,66	3,5	4,8
<i>Apigenina 8-C-(2''-galoil)-β-D-glicopiranosil</i>	78,30	79,92	72,15	76,79	4,09	5,33

DPR (%) = DPR: Desvio-padrão relativo (100 x DP/média)

Tabela 9 - Determinação da precisão do método (estudos de repetibilidade e precisão intermediárias) para a determinação de cada uma das substâncias quantificadas.

Substâncias Investigadas	Intradia (n=6)			Interdia (n= 6)		
	Média (%)	DP	DPR (%)	Média (%)	DP	DPR (%)
<i>Ácido Elágico</i>	87,44	0,12	0,13	87,53	0,19	0,217
<i>Punicalagina Total</i>	86,34	0,19	0,22	86,19	0,17	0,197
<i>Ácido gálico</i>	80,11	2,25	2,80	80,00	1,72	2,15
<i>Galato de metila</i>	72,54	1,97	2,44	72,54	1,99	2,74
<i>Ácido galágico</i>	73,82	2,5	3,38	73,80	2,5	3,38
Apigenina 8-C-(2''-galoil)- β -D-glicopiranosil	76,78	3,78	4,92	76,78	3,03	3,03

DPR (%) = DPR:Desvio padrão relativo (100 x DP/média)

As concentrações e teores (%) de ácido elágico, anômeros da punicalagina no extrato hidroalcoólico, etanólico e fração aquosa proveniente do extrato etanólico, infusão de folhas, ácido gálico, galato de metila, ácido galágico e apigenina 8-C-(2''-galoil)- β -D-glicopiranosil estão expressas na Tabela 10.

Os resultados indicaram uma concentração menor (mg.g^{-1}) de punicalagina total na infusão em relação à concentração dessa substância no extrato hidroalcoólico.

Investigou-se a concentração e o teor (%) de punicalagina total no extrato etanólico e na fração aquosa proveniente do extrato etanólico tendo em vista que a literatura aponta diversas propriedades biológicas para ambos, porém, não se discute dados de quantificação da punicalagina (metabólito majoritário) (LADOKUN et al., 2011; MBENGUI et al., 2013; ARJARIYA et al., 2013; LAWAL, 2013; VENKATALAKSHMI et al., 2014).

Tabela 10 - Concentração (mg.g⁻¹) e teor (%) de substâncias quantificadas no extrato hidroalcoólico, etanólico, infusão e fração aquosa das folhas de *T. catappa*.

Substância	Concentração (mg.g⁻¹) ± SD	Teor (%)
<i>Ácido Elágico (extrato hidroalcoólico)</i>	5,4 ± 0,09	0,54
<i>Punicalagina total (extrato hidroalcoólico)</i>	493,53 ± 0,06	49,35
<i>Punicalagina total (extrato etanólico)</i>	754,60 ± 0,02	75,46
<i>Punicalagina total (infusão de folhas)</i>	198,70 ± 1,01	19,87
<i>Punicalagina total (fração aquosa)</i>	998,54 ± 0,82	99,85
<i>Ácido Gálico (fração acetato de etila)</i>	1,22 ± 0,05	0,122
<i>Galato de Metila (fração acetato de etila)</i>	0,39 ± 0,03	0,039
<i>Ácido Galágico (fração acetato de etila)</i>	5,44 ± 0,10	0,544
<i>Apigenina 8-C-(2''-galoil)-β-D-glicopiranosil (fração acetato de etila)</i>	0,70 ± 0,02	0,0706

Os dados obtidos corroboram os resultados encontrados por Ladokun e Ojezele (2011) ao investigar a atividade antibacteriana de folhas de *T. catappa*. Esses pesquisadores observaram que o extrato etanólico de folhas apresentou uma potente atividade antibiótica em relação à infusão das folhas, indicando a possível relação entre a atividade biológica observada e a concentração de compostos fenólicos extraídos (LADOKUN & OJEZELE, 2011; OPARA et al., 2012).

Lawal (2013) e colaboradores também encontraram uma relação de dependência entre concentração de compostos fenólicos no extrato etanólico e infusão e a atividade bacteriostática (LAWAL et al., 2013).

A metodologia desenvolvida foi comparada com as normas da ANVISA, 2003 e (INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION, 2005, SNYDER; KIRKLAND

& DOLAN, 2010), mostrando que os resultados obtidos são consistentes e podem ser utilizados na garantia da qualidade e natureza dos compostos presentes no extrato hidroalcoólico de *T. catappa*. Entretanto, deve-se ressaltar que o método de validação não foi total e sim parcial, uma vez que não envolveu estudos interlaboratoriais.

Os valores de recuperação para os compostos analisados (punicalagina total, ácido elágico, ácido gálico, galato de metila, ácido galágico e apigenina 8-C-(2''-galoil)- β -D-glicopiranosil) entre 70 e 120% são aceitáveis segundo os limites propostos (ICH, 1996).

Os desvios-padrão relativos (RSDs) inerentes às análises intra e inter-dia não foram maiores que 5% em nenhuma das análises realizadas (punicalagina total, ácido elágico, ácido gálico, galato de metila, ácido galágico e apigenina 8-C-(2''-galoil)- β -D-glicopiranosil), sugerindo que o método desenvolvido foi preciso (ANVISA, 2003).

O método proposto mostrou-se simples, rápido, seletivo e sensível para as substâncias analisadas, podendo ser aplicado para a padronização de extratos polares do gênero *Terminalia*.

4.9 Avaliação da atividade mutagênica do extrato hidroalcoólico

O teste para a avaliação da mutagenicidade com *Salmonella typhimurium*, também conhecido como *Salmonella*/microssomo, ou Teste de Ames, é amplamente aceito pela comunidade científica e pelas agências e corporações governamentais como um ensaio utilizado para identificar substâncias puras, em misturas e em amostras ambientais que podem produzir danos genéticos que levam a mutações gênicas (MORTELMANS & ZEIGER, 2000; ZEIGER, 2001).

O método emprega linhagens de *S. typhimurium* derivadas da parental LT2, auxotróficas para histidina (His-), apresentando diferentes mutações no operon deste aminoácido, sendo desenvolvidas para detectar mutações do tipo deslocamento do quadro de leitura (*frameshift*) ou substituições de bases no DNA (MARON & AMES, 1983; MORTELMANS & ZEIGER, 2000).

Essas linhagens são incapazes de sintetizar o aminoácido histidina (histidina-dependentes), e, portanto, são incapazes de crescer na ausência de histidina e formar

colônias na sua ausência. Novas mutações no local dessas mutações pré-existentes, ou nas proximidades dos genes, podem restaurar a função do gene e permitir que as células sintetizem histidina. Essas células recém-mutadas podem crescer na ausência de histidina e formar colônias. Por essa razão, o teste é, muitas vezes, referido como um “ensaio de reversão”. O número de revertentes é facilmente medido pela contagem de uma população de bactérias à amostra a ser testada (MORTELMANS & ZEIGER, 2000; ZEIGER, 2001). As linhagens bacterianas não apresentam enzimas de metabolização, o que impossibilita sua capacidade para identificação de agentes mutagênicos de ação indireta. Para superar essa dificuldade, adiciona-se às culturas, durante os ensaios, a chamada fração S9, que contém enzimas de metabolização de xenobióticos e é obtida a partir do fígado de ratos (MARON & AMES, 1983). Todas essas características conferem ao teste de Ames uma grande capacidade de identificação e caracterização de diferentes agentes mutagênicos, com grande eficiência e sensibilidade (SANTOS et al., 2006).

O potencial mutagênico do extrato hidroalcoólico de *T. catappa* é mostrado na Tabela 11. A atividade mutagênica foi induzida em linhagens TA100 e TA97, na ausência de S9. Na estirpe TA102 (+S9 e -S9), foi observado um aumento significativo do número de revertentes, mas os valores de MI ficaram por volta de 2. Essa linhagem detecta compostos oxidativos mutagênicos e cross-linking. Provavelmente, no extrato, esses compostos estão numa concentração não suficiente para induzir um efeito mutagênico significativo como o observado em TA100 e TA97. Isso nos permite afirmar que esse extrato tem compostos mutagênicos diretos que atuam pelo mecanismo de *frameshift* (TA97) e substituição de pares de bases (TA100). A literatura relata que concentrações elevadas de taninos (15 e 60 mM) causaram danos no DNA, sendo que esses dados confirmam as observações de GUPTA et al., 2002, segundo o qual todos os polifenóis produzem toxicidade em concentrações mais elevadas (LABIENIEC-GABRYELAK, 2004). No extrato hidroalcoólico de *T. catappa*, observou-se a presença de taninos como os compostos mais abundantes, sendo os anômeros da punicalagina os compostos principais.

É interessante destacar que os resultados obtidos em nosso trabalho foram citados por Ikhwanuddin et al., (2014) a fim de justificar a alta mortalidade das larvas de camarão tigre quando submetidos a altas concentrações de extrato aquoso de folhas de *T. catappa*, possivelmente, segundo nossos dados, causada por efeitos

mutagênicos em altas concentrações dos compostos fenólicos existentes neste extrato (IKHWANUDDIN et al., 2014).

Esses resultados são úteis para uma melhor compreensão das atividades farmacológicas de *T. catappa*. Considerando-se o efeito mutagênico observado para *T. catappa*, deve-se ressaltar que o uso dessa planta medicinal deve ser feito com cautela.

Diante dos resultados obtidos faz-se necessário a continuidade dos estudos em modelos *in vivo* para confirmação ou não da atividade mutagênica apresentada.

Tabela 11 - Atividade mutagênica expressa como a média e desvio-padrão do número de revertentes/placa e índice de mutagênico (entre parênteses) em cepas de *Salmonella typhimurium* TA98, TA100, TA97 e TA102 tratadas com extrato etanólico de *T. catappa*, em várias doses, com (+ S9) ou sem (-S9) ativação metabólica.

Tratamento (mg/placa)	TA98		TA100		TA97a		TA102				
	- S9	+ S9	- S9	+ S9	- S9	+ S9	- S9	+ S9			
0^a	16±3	68±1	0^a	93±6	87 ±4	0^a	172 ±2	99 ±1	0^a	352 ±30	435±43
2.78	17±6 (1.1)	75±7 (1.1)	1.56	91±2(1.0)	nd	1.56	223±3**(1.3)	127±3** (1.3)	1.56	461±11* (1.3)	481±23(1.1)
5.56	21±3 (1.3)	75±7 (1.1)	3.12	188±19**(2.0)	90±6 (1.0)	3.12	252±12** (1.5)	102±7 (1.0)	3.12	514±16* (1.5)	668±75*(1.5)
11.12	18±5 (1.1)	57±1 (0.8)	6.25	210±24**(2.3)	91±6 (1.0)	6.25	287±14** (1.7)	95±12 (1.0)	6.25	653±22** (1.9)	689±57*(1.6)
16.68	14±3 (0.9)	75±4 (1.1)	9.38	40±4(0.4)	95±1 (1.1)	9.38	337±19** (2.0)	93±10 (0.9)	9.38	563±32*(1.6)	728±28**(1.7)
22.24	2±1 (0.1)	68±10 (1.0)	12.5	0±0(0)	88±4 (1.0)	12.5	397±19** (2.3)	83±2 (0.8)	12.5	648±32**(1.8)	621±23**(1.4)
Controle+	720±63	500±57	Controle+	1225±75	700 ±80	Controle +	1426 ±67	700 ±45	Controle +	1143 ±53	1309 ±38

4.10 Avaliação da atividade antiulcerogênica do extrato etanólico (EtOH) das folhas de *T. catappa* L.

Todos os resultados descritos a seguir referem-se à atividade gastroprotetora das frações obtidas a partir do extrato etanólico bruto das folhas de *Terminalia catappa* Linn no modelo de úlcera gástrica induzida por etanol absoluto em ratos.

A Figura 76 mostra a atividade da fração hexânica testada nas doses de 25, 50 e 100 mg.Kg⁻¹. Os resultados indicam que houve redução significativa da área de lesão dos animais do grupo controle positivo e do grupo de animais tratados com a fração hexânica na dose de 100 mg.Kg⁻¹, quando comparados ao controle negativo, com redução das lesões em 97,03% e de 52,14%, respectivamente.

Observa-se na Figura 77, o efeito da fração aquosa nas doses de 25, 50 e 100 mg.Kg⁻¹. Os resultados expressam a redução significativa da lesão gástrica dos animais tratados somente com a carbenoxolona. A redução da área de lesão dos animais tratados com 25 mg.Kg⁻¹ (42% de redução) e 100 mg.Kg⁻¹ (31,64% de redução) é notada, porém, não é significativa. Para caracterizar melhor os efeitos, foi realizado novo experimento, incluindo a dose de 12,5 mg.Kg⁻¹, resultados mostrados na Figura 78. Foi observada significativa atividade gastroprotetora nos animais tratados com a carbenoxolona e também com a fração na dose de 25 mg.Kg⁻¹, sendo a porcentagem de inibição de lesões do grupo controle positivo de 92,08% e da fração de 42,61%.

Figura 76 - Avaliação do efeito gastroprotetor da fração hexânica (Hex) nas doses de 25, 50 e 100 mg/Kg no modelo de úlcera induzida por etanol em ratos. Os resultados estão expressos na forma de média \pm erro padrão da média. ANOVA com teste posteriori de Dunnet com $*p<0,05$ e $**p<0,01$.

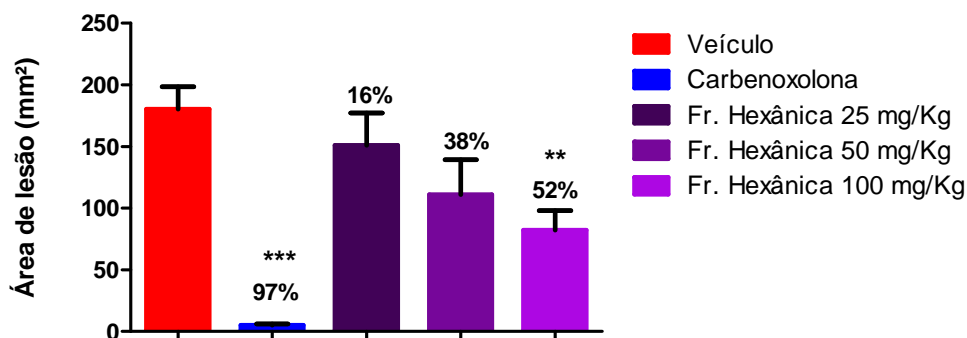


Figura 77 - Avaliação do efeito gastroprotetor da fração aquosa (Aq) nas doses de 25, 50 e 100 mg/Kg no modelo de úlcera induzida por etanol em ratos. Os resultados estão expressos na forma de média \pm erro padrão da média. ANOVA com teste posteriori de Dunnet com Dunnet com $*p<0,05$ e $**p<0,01$.

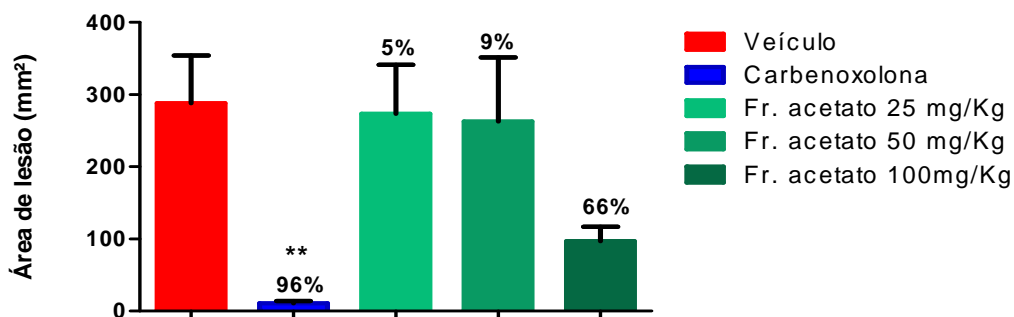
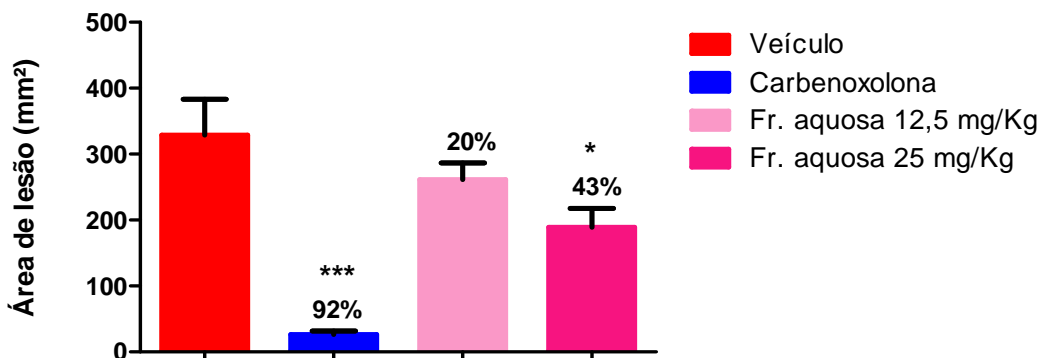


Figura 78 - Avaliação do efeito gastroprotetor da fração aquosa (Aq) nas doses de 12,5 e 25 mg/Kg no modelo de úlcera induzida por etanol em ratos. Os resultados estão expressos na forma de média \pm erro padrão da média. ANOVA com teste posteriori de Dunnet com $*p<0,05$ e $**p<0,01$.



Na Figura 79, indica-se a atividade da fração acetato nas doses de 25, 50 e 100 mg.Kg⁻¹, tendo sido significativa a redução das lesões apenas do grupo tratado com carbenoxolona. Mas, apesar de não ter diminuído de forma significativa as lesões, a fração na dose de 100 mg.Kg⁻¹ mostrou redução das lesões (66,41%), sendo, então, feito um novo experimento repetindo-se essa dose, da qual os dados foram expressos na Figura 80. Foi observada, nesse novo experimento, uma redução significativa da área de lesão, 92,07% do grupo tratado com carbenoxolona e 50% do grupo tratado com a fração, em relação ao controle negativo.

Figura 79 - Avaliação do efeito gastroprotetor da fração acetato (Act) nas doses de 25, 50 e 100 mg/Kg no modelo de úlcera induzida por etanol em ratos.

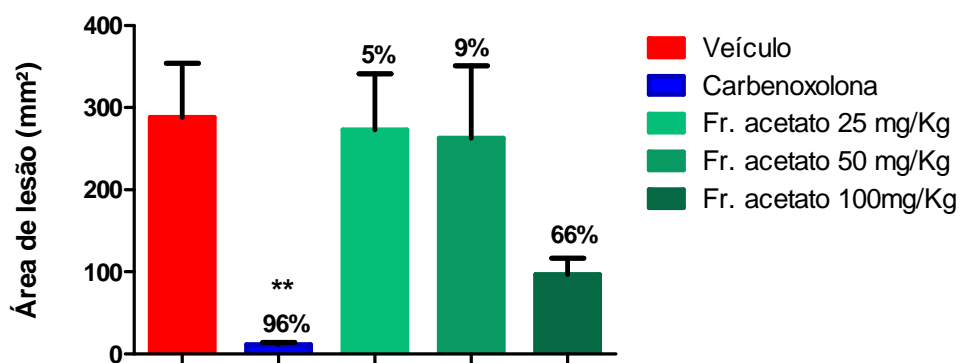
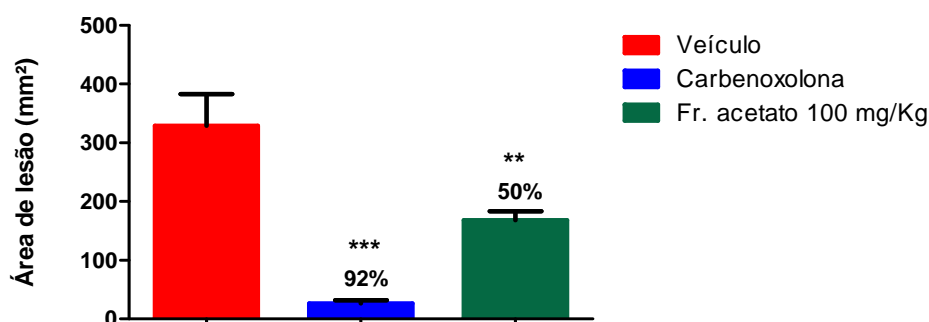


Figura 80 - Avaliação do efeito gastroprotetor da fração acetato na dose de 100 mg/Kg no modelo de úlcera induzida por etanol em ratos. Os resultados estão expressos na forma de média \pm erro padrão da média. ANOVA com teste posteriori de Dunnet com ** $p < 0,01$.



O etanol afeta a barreira de muco encontrada na parede gástrica, com isso, tornando o epitélio gástrico mais sensível ao ataque do ácido produzido pelo estômago (WALLACE, 2001). Quando esse agente lesivo alcança o epitélio da mucosa, através do rompimento da barreira muco-bicarbonato, atua nas células, provocando ruptura da parede dos vasos sangüíneos, sendo as hemorragias e os focos hiperêmicos a consequência das lesões gástricas observadas neste experimento (MINCIS et al., 1995). O etanol também induz estresse oxidativo, danos ao DNA e diminuição dos grupamentos sulfidrílicos não-protéicos (GSH) das células, que é um dos mais importantes fatores de proteção da mucosa gástrica (REPETTO & LLESUY, 2002).

Devido ao fato do modelo de úlcera gástrica induzida por etanol absoluto causar lesões severas, e de forma aguda, é utilizado para uma triagem inicial tanto de substâncias com propriedades farmacológicas, quanto para a busca da relação dose-resposta da mesma. Em vista disso, foram testadas as três frações obtidas, em diferentes doses (25, 50 e 100 mg.Kg⁻¹), para que, a partir disso, se possa estabelecer a fração e a dose que se mostraram eficazes para a continuidade do estudo.

De acordo com os resultados apresentados, as três frações mostraram atividade gastroprotetora: a fração hexânica, na dose de 100 mg/Kg (52,14% de proteção); a fração acetato na dose de 100 mg.Kg⁻¹ (50% de proteção) e a fração aquosa na dose de 25 mg.Kg⁻¹ (42,61% de proteção). Os mecanismos gastroprotetores evidenciados nos modelos de indução de úlcera por etanol são variados. As drogas que tenham atividade antioxidante tendem a proteger a mucosa dos danos causados pelo estresse oxidativo induzidos pelo agente lesivo (MIZUI et al., 1987). É possível, ainda, que a atividade citoprotetora nesse modelo de indução seja devida ao fato de o extrato ou fração estar atuando apenas como uma barreira física, exercendo, portanto, uma ação mecânica, formando uma película sobre a mucosa e impedindo que etanol removesse a camada de muco (TWARDOWSCHY, 2007).

O fato de as três frações terem apresentado significativo efeito gastroprotetor indica que há a presença de diferentes compostos que estão atuando nessa atividade e que o fracionamento não foi efetivo em separar os

compostos com ação antiulcerogênica. Porém, o que se destaca dos resultados apresentados é a fração aquosa que exerceu elevada proteção (42,61%) numa dose de 25 mg.Kg⁻¹, ou seja, uma dose quatro vezes menor do que a utilizada do extrato bruto, e também quatro vezes menor que a dose do controle positivo. Considerando que a carbenoxolona é uma substância pura e que a fração aquosa possui vários compostos juntos, é um bom indicativo de ação protetora. Isso, provavelmente, se deve à maior presença de compostos polifenólicos, como taninos, que já são conhecidos pela literatura quanto a sua ação antiulcerogênica (ANDREO et al., 2006).

A análise fitoquímica de *T. catappa* confirmou os dados apresentados pela literatura, indicando que os compostos majoritários encontrados no extrato etanólico das folhas são a punicalagina, punicalina, ácido galágico e derivados do ácido elágico e gálico.

Nossos estudos evidenciaram também a importância de utilização das folhas (parte renovável) o que pode permitir a fácil utilização da planta para produção futura de um agente fitoterapêutico para o tratamento de úlceras gástricas (SILVA et al., 2015).

Os compostos polifenólicos são um conjunto heterogêneo de moléculas que têm como característica ter estrutura composta por vários grupos benzênicos substituídos por hidroxilas. Muitos estudos relatam que os compostos fenólicos têm um grande papel como seqüestradores de radicais livres e, por isso, se tornam importantes para a prevenção e terapia de doenças. O ácido gálico e o ácido elágico são fortes antioxidantes naturais, diminuem a peroxidação lipídica e são conhecidos compostos antiulcerogênicos, antimutagênicos e anticarcinogênicos (RAO et al., 2008).

Então, levando-se em conta os resultados prévios obtidos com o extrato etanólico bruto, na dose de 100 mg.Kg⁻¹, em que houve uma redução significativa das lesões de 36%, e que a fração aquosa na dose de 25 mg.Kg⁻¹ mostrou proteção de cerca de 42%, valor de proteção mais próximo ao do extrato bruto, se comparados com as frações nas doses que mostraram atividade significativa, e que, além disso, a fração aquosa corresponde a cerca

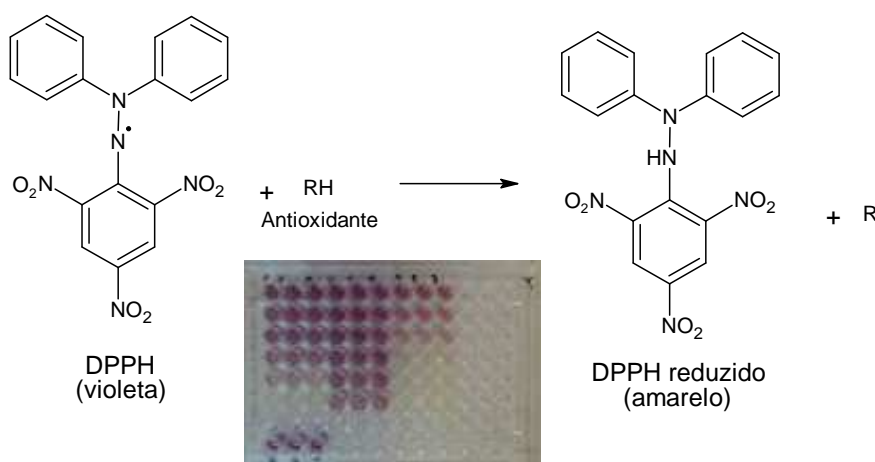
de 25% do rendimento do extrato bruto, ou seja, a dose de 25 mg.Kg⁻¹ seria correspondente ao encontrado na dose de 100 mg.Kg⁻¹ do extrato bruto.

É interessante destacar que os estudos de quantificação indicaram, para a fração aquosa, proveniente do extrato etanólico (etanol absoluto), um maior teor (%) do constituinte majoritário punicalagina, (99,85%), em relação à infusão de folhas (19,87%). O extrato etanólico (etanol absoluto) apresentou um teor de punicalagina de (75,46%) e o extrato hidroalcoólico apresentou um teor de punicalagina de (49,35%), portanto, a maior concentração de punicalagina na fração aquosa pode estar relacionada à maior atividade de gastroproteção encontrada neste estudo (LIN et al., 1999; AQIL et al., 2012).

4.11 Avaliação da Atividade Antirradicalar

Os resultados da atividade antirradicalar do extrato hidroalcoólico, fração acetato de etila, infusão, punicalagina, ácido galágico, apigenina 8-C-(2''-galoil)-β-D-glicopiranosil de folhas de *T. catappa*, obtidos com o ensaio antirradicalar por DPPH e utilizando-se os padrões quercetina e ácido gálico, estão reunidos na Figura 109. O DPPH (Figura 81) apresenta coloração violeta, tendo absorção em 517 nm e, quando reduzido, torna-se amarelo. Essa redução ocorre quando existem substâncias capazes de doar hidrogênios radicalares ao DPPH dando origem a outro radical estável, a qual está associada à propriedade antirradicalar (HOSTETTMANN et al., 2003).

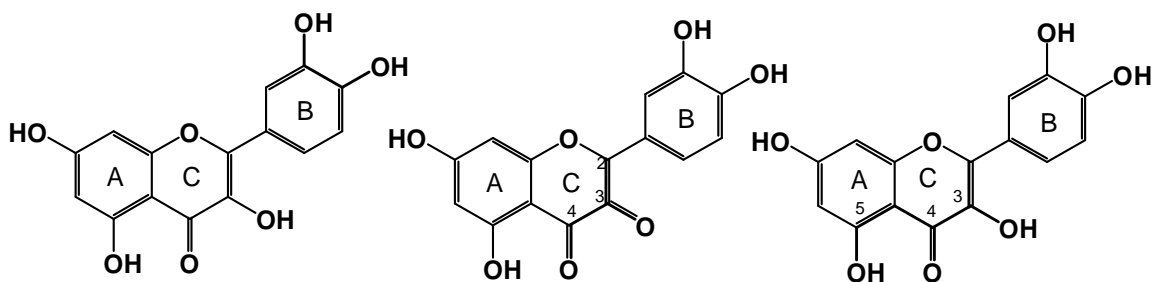
Figura 81 - Reação de redução de DPPH. No detalhe, imagem de uma placa que ilustra a coloração do DPPH antes (violeta) e após a redução (amarelo).



As plantas produzem uma variedade de substâncias antioxidantes, dentre as quais se destacam os compostos fenólicos. A atividade antioxidante de compostos fenólicos, em especial os flavonoides, deve-se, principalmente, as suas propriedades redutoras e estrutura química (Figura 82). Essas características desempenham um papel importante na neutralização ou sequestro de radicais livres e quelação de metais de transição, agindo tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo (SOUSA et al., 2007).

Com relação a sua estrutura química, as principais características para captura de radicais livres são a presença de um grupo catecol (Figura 82 “a”) no anel B, que possui melhor propriedade de doar elétrons para estabilizar espécies radicalares, uma dupla ligação entre as posições 2 e 3 conjugada com o grupo 4-oxo (Figura 82 “b”) , que é responsável pela deslocalização de elétrons e a presença de hidroxilas nos carbonos 3 e 5 juntamente com o grupo 4-oxo (Figura 82 “c”) , conferindo potencial máximo na captura de radicais livres (EDENHARDER et al., 1997). Essas três características estruturais são apresentadas pela molécula da quercetina.

Figura 82 - Principais características para a captura de radicais livres.



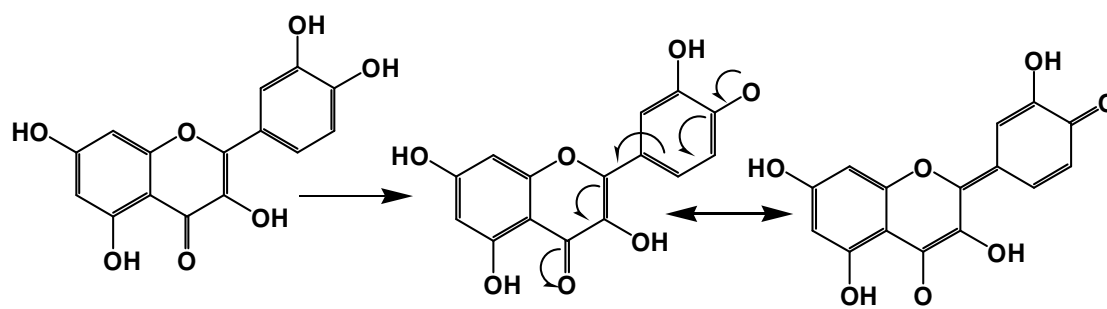
a) Grupo Catecol

b) Dupla entre C2 e C3 conjugada

c) OH em C3 e C5 com 4-oxo

Os intermediários formados pela ação dos antioxidantes fenólicos são relativamente estáveis, devido à ressonância do anel aromático presente na estrutura destas substâncias (Figura 83) (SOUSA et al., 2007).

Figura 83 - Anel do flavonóide entra em ressonância para a estabilização do radical livre.



Fonte: Adaptado de JOVANOVIC et al. 1994; HALLIWELL, et al. 1995.

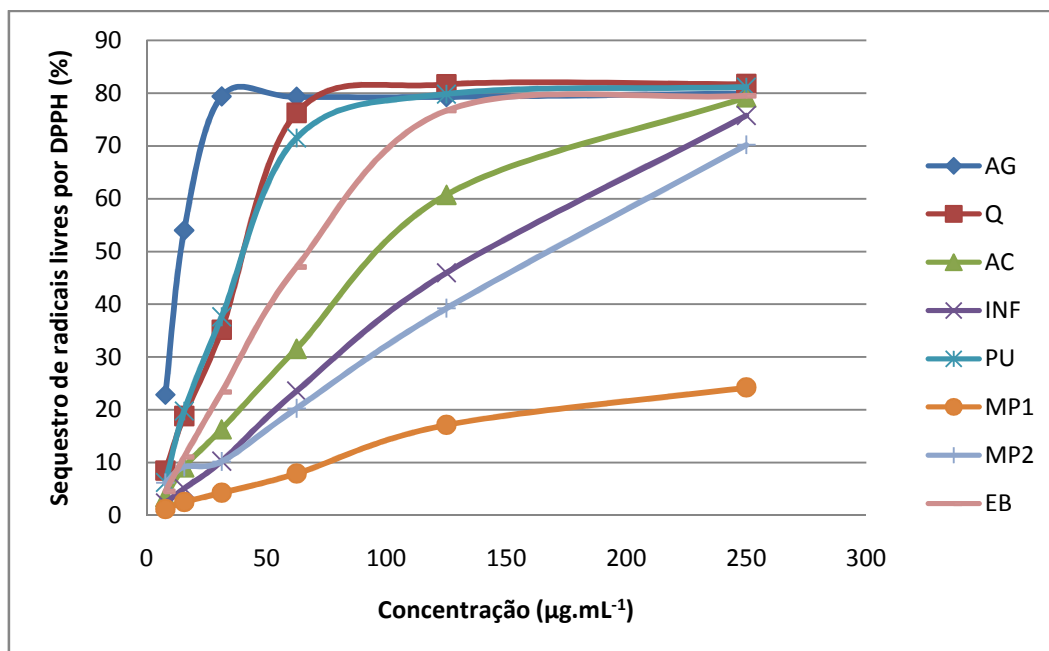
O valor de IC_{50} é a concentração na qual 50% dos radicais DPPH são seqüestrados (Figura 84). Desse modo, os estudos realizados utilizando o teste de DPPH revelaram que a atividade antiradicalar de punicalagina ($IC_{50} = 43,22903 \mu\text{g.mL}^{-1}$) é a que mais se aproximou do valor de IC_{50} da quercetina ($41,74244 \mu\text{g.mL}^{-1}$).

Os compostos ácido galágico, apigenina 8-C-(2''-galoil)- β -D-glicopiranosil, fração acetato de etila e infusão apresentaram atividade antiradicalar bastante inferiores aos padrões ácido gálico e quercetina, conforme indicado na Tabela 12.

Tabela 12 - Resultados da atividade antiradicalar (IC_{50}) de extratos, infusão e substâncias isoladas de *T. catappa* e padrões (quercetina e ácido gálico).

Padrões e substâncias analisadas	IC_{50} ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)
Ácido Gálico	17,33104
Quercetina	41,74244
Extrato hidroalcoólico	76,81129
Fração Acetato de Etila	101,8958
Infusão	156,4159
Punicalagina	43,22903
Ácido Galágico (MP1)	>250
Apigenina 8-C-(2''-galoil)- β -D-glicopiranosil (MP2)	172,2026

Figura 84 - Porcentagem de inibição de DPPH do extrato bruto, fração acetato de etila, infusão, punicalagina, (MP1) ácido galágico, (MP2) Apigenina 8-C-(2''-galoil)- β -D-glicopiranosil de folhas de *T. catappa* e dos padrões quercetina e ácido gálico.



AG = Ácido Gálico; Q = Quercetina; AC = Fração Acetato; INF = Infusão; PU = Punicalagina; MP1 = Ácido Galágico; MP2 = Apigenina 8-C-(2''-galoil)- β -D-glicopiranosil; EB = Extrato Bruto (hidroalcoólico)

Punicalagina é um polifenol com dezesseis grupos funcionais hidroxila (-OH) com alto potencial antioxidante. Cada grupo -OH pode reduzir a molécula de DPPH. O mecanismo de captura e estabilização da molécula de DPPH é mostrado na Figura 85.

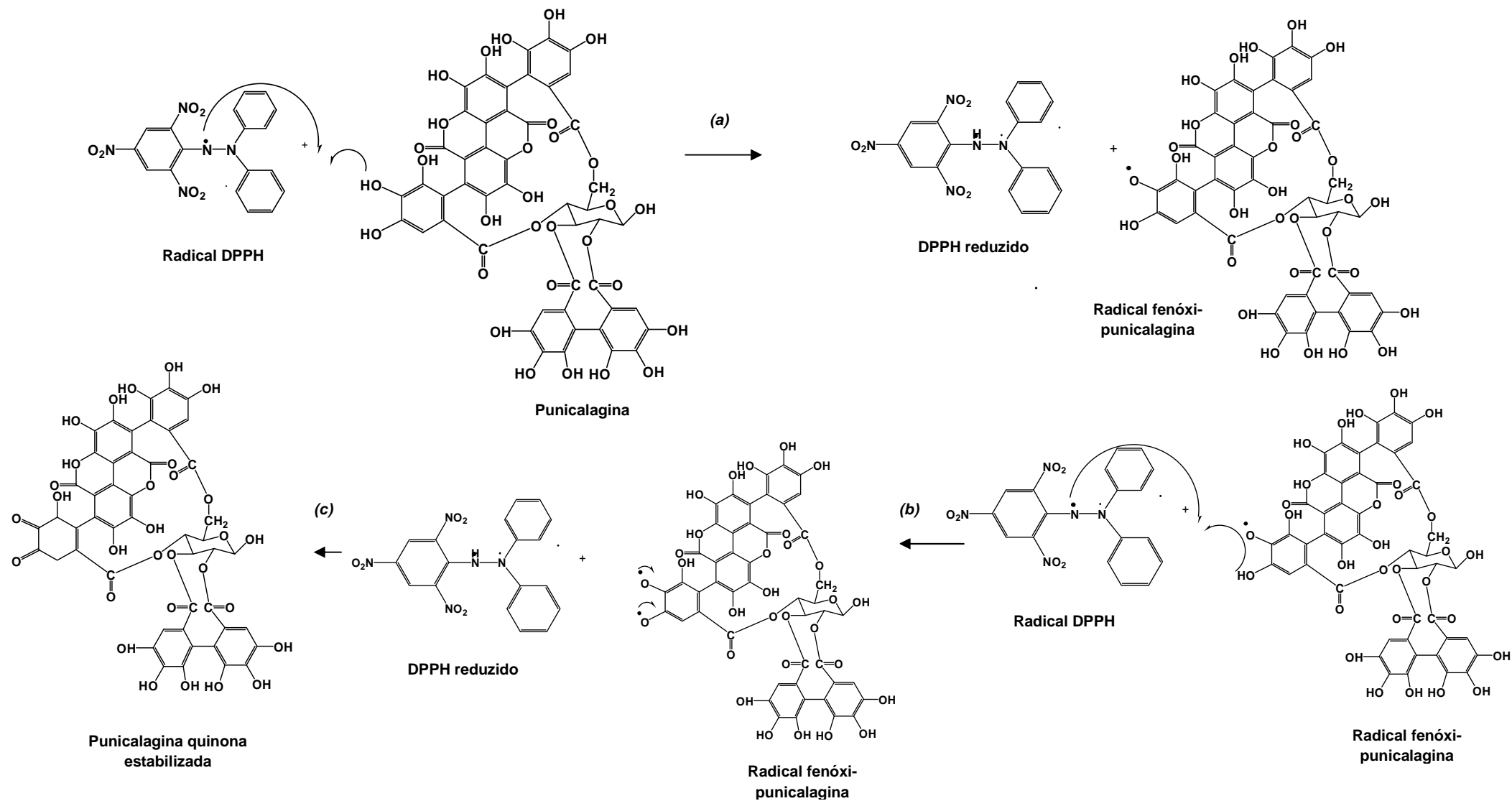
Conforme indicado pelo esquema da Figura 85, a molécula de punicalagina reduz o radical DPPH através da doação de hidrogênio radicalar, resultando na formação do radical fenóxi-punicalagina (a). Para que ocorra estabilização do radical fenóxi formado, o hidrogênio adjacente é abstraído para reduzir outro radical DPPH (b). O radical fenóxi originado pela oxidação da punicalagina por duas moléculas do radical DPPH é estabilizado pela delocalização do par de elétrons não compartilhado, resultando na formação de punicalagina quinona (c) (Figura 85).

O efeito antioxidante da punicalagina em sistemas biológicos deve-se, portanto, a sua capacidade de eliminação dos radicais livres. Essa habilidade é devido à presença de múltiplos grupos hidroxila, os quais aumentam a

atividade antioxidante por causa da estabilização por ressonância do radical fenóxi, formando *o*-quinona ou *p*-quinona (CHEN & HO, 1997).

Trabalho publicado por Reddy e colaboradores (2007) com *Punica granatum* L. (Punicaceae) indica igualmente uma maior atividade antioxidante (IC₅₀) de punicalagina (1,4 µM) em relação ao composto ácido gálgico (3,2 µM). A atividade antioxidante observada pode estar relacionada aos grupos galagil e hexahidroxidifenoíla (HHDP). Punicalagina tem um grupo HHDP adicional em relação à estrutura do ácido galágico. A presença desse grupo HHDP pode explicar a superior capacidade antioxidante de punicalagina quando comparado à vitamina C. A presença de muitos grupos fenólicos aumenta a natureza hidrofílica destes compostos e, portanto, reduz a habilidade de penetrar na membrana celular, explicando, assim, a eficácia de punicalagina como antioxidante (REDDY et al., 2007). A literatura aponta para o extrato metanólico de frutos de *T. catappa* valores superiores de IC₅₀ em relação aos resultados que obtivemos com o extrato hidroalcoólico de folhas (Tabela 11). O valor de IC₅₀ diminui com a diminuição da concentração, a 1000 µg. mL⁻¹, 88 ± 0,008, a 100 µg. mL⁻¹, 87 ± 0,004, a 10 µg. mL⁻¹, 75 ± 0.002, quando comparados com extratos metanólicos de *T. belerica* (frutos), *T. chebula* (folha) e *T. sericea* (casca) quando em comparação com os estudos anteriores. Os resultados demonstram, portanto, uma maior atividade a concentrações mais baixas (OLOLADE et al., 2014).

Figura 85 - Modelo hipotético do mecanismo de captura de hidrogênio radicalar da punicalagina pelo radical DPPH (Adaptado de KULKARNI et al., 2004).

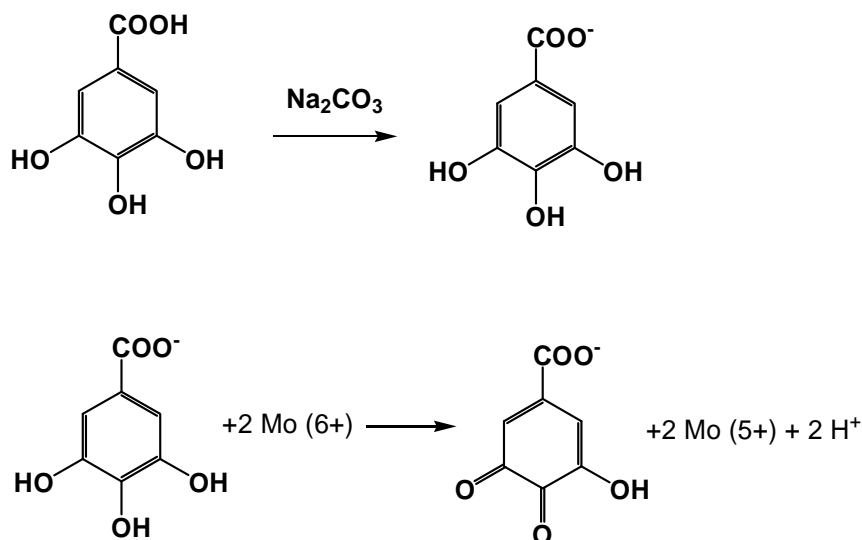


4.12 Determinação de Fenóis Totais

A quantificação de fenóis totais presentes nos extratos foi realizada através do método colorimétrico de Folin-Ciocalteu. O método baseia-se na produção de complexos de coloração azul, que podem ser medidos em espectrofotômetro a 750 nm (LENORE et al., 2005).

Na primeira etapa de reação (Figura 86), ocorre desprotonação dos compostos fenólicos (no exemplo, o padrão ácido gálico) em meio básico, gerando os ânions fenolatos.

Figura 86 - Reação do ácido gálico com molibdênio, componente reagente de *Folin-Ciocalteu*.

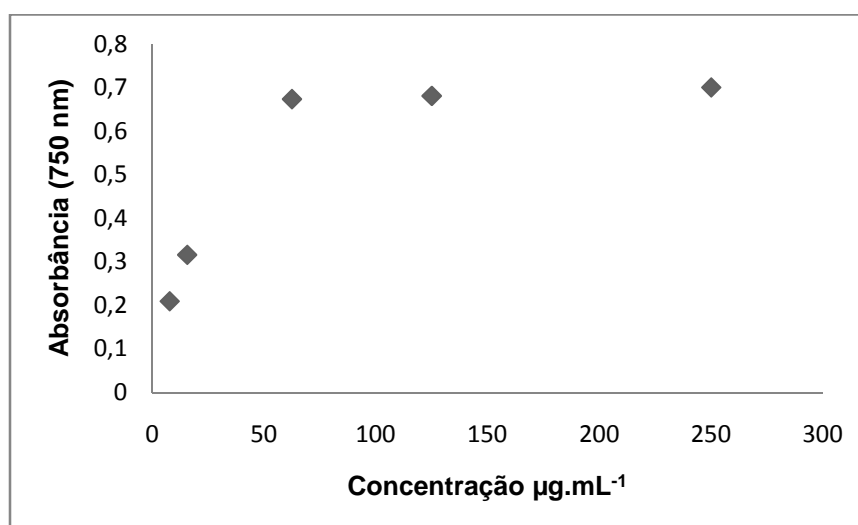


Fonte: SINGLETON et al., 1999.

Em seguida, ocorre uma reação de oxirredução entre o ânion fenolato e o reagente de Folin, na qual o molibdênio, componente do reagente de Folin, sofre redução e o meio reacional muda de coloração amarela para azul (SINGLETON et al., 1999).

A curva de calibração (Figura 87) foi obtida utilizando 8 diluições das soluções de ácido gálico, substância utilizada como padrão de fenol. As leituras foram determinadas em triplicata através de absorbância registrada a 760 nm em função da concentração do padrão fenólico.

Figura 87 - Curva de calibração de ácido gálico obtida pelo método de Folin-Ciocalteu.



Os valores de concentração de fenóis totais do extrato hidroalcoólico, fração acetato de etila, infusão de folhas foram obtidos por interpolação, e são mostrados na Tabela 13.

Tabela 13 - Teores de fenóis totais no extrato hidroalcoólico, fração acetato de etila e infusão de folhas de *T. catappa*, acompanhados do desvio padrão relativo.

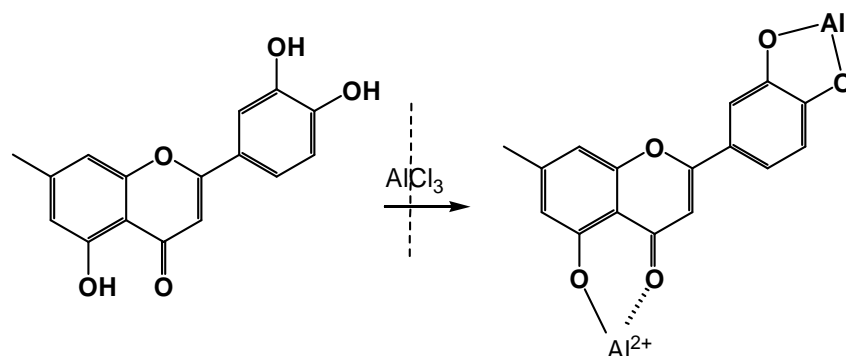
Analitos	(Teor) mg.g ⁻¹ ± DPR (%)
<i>Extrato hidroalcoólico</i>	81,31 ± 1,26
<i>Fração acetato de etila</i>	60,14 ± 1,16
<i>Infusão de folhas</i>	56,71 ± 2,37

A maior concentração de fenóis totais foi observada no extrato hidroalcoólico de folhas (81,31 ± 1,26 miligramas de fenóis totais por grama de extrato). Esse resultado é condizente com o resultado obtido para a atividade antiradicalar, uma vez que o extrato hidroalcoólico de folhas apresentou uma significativa atividade de estabilização de radicais DPPH (menores IC₅₀) quando comparados aos padrões ácido gálico e quercetina.

4.13 Determinação do Teor de Flavonóides Totais

O teor de flavonoides foi verificado a partir do método colorimétrico no qual ocorre a complexação dos flavonoides com cloreto de alumínio (Figura 88).

Figura 88 - Formação do complexo Flavonoide-Al, em solução metanólica de cloreto de alumínio.

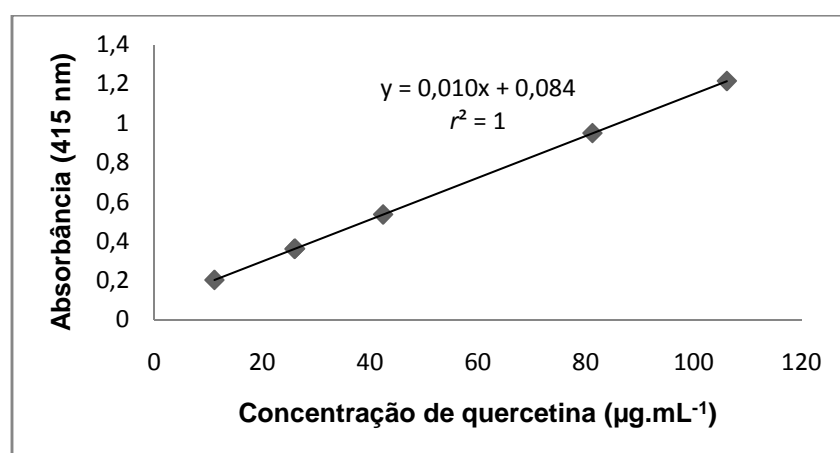


Fonte: Reproduzido de MARKHAM, 1982.

O cátion alumínio forma complexos estáveis com os flavonoides em metanol, ocorrendo, na análise espectrofotométrica, um desvio para maiores comprimentos de onda e uma intensificação da absorção. Deste modo, é possível determinar a quantidade de flavonoides, evitando-se a interferência de outras substâncias fenólicas.

A curva de calibração (Figura 89) foi obtida utilizando 8 diluições das soluções de quercetina, substância utilizada como padrão de flavonoide. As leituras foram determinadas em triplicata através de absorbância registrada a 415 nm em função da concentração do padrão de flavonoide.

Figura 89 - Curva de calibração de quercetina obtida por reação de complexação com AlCl_3 .



A curva apresentou tendência linear, com coeficiente de correlação r^2 igual a 1. Os teores de flavonoides totais nas amostras foram calculados pela equação da reta ($y = 0,010x + 0,084$).

Os teores de flavonoides encontrados nas amostras são mostrados na Tabela 14.

Tabela 14 - Teores de flavonóides em extrato bruto, fração acetato, infusão e substâncias isoladas.

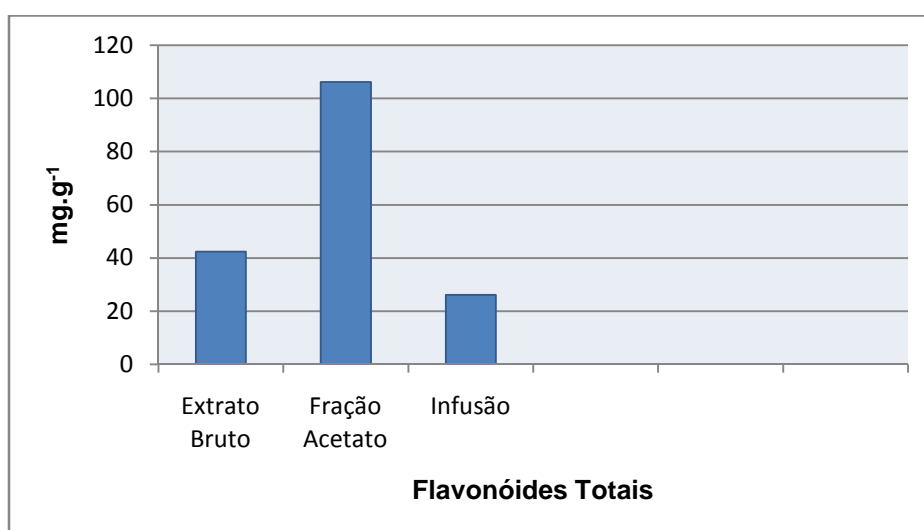
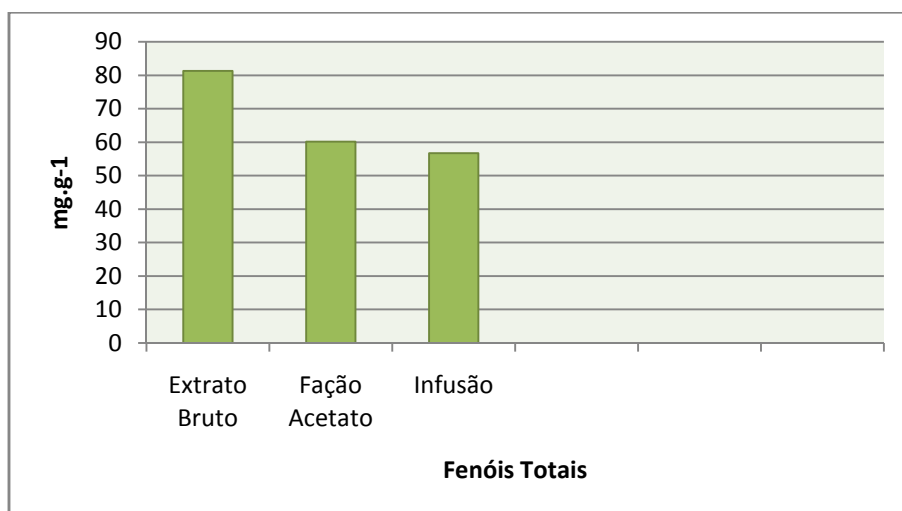
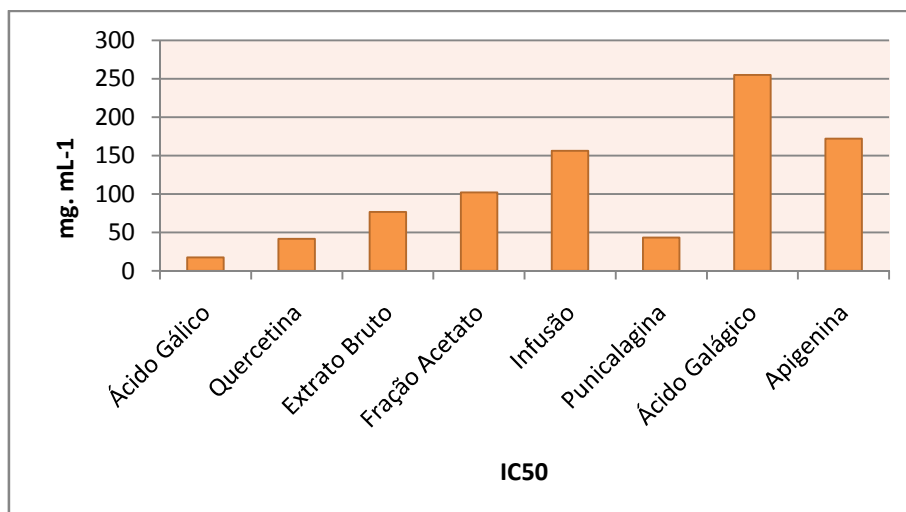
Analitos	(Teor) mg.g⁻¹ ± DPR (%)
<i>Extrato hidroalcoólico</i>	42,43 ± 4,70
<i>Fração acetato de etila</i>	106,17 ± 4,63
<i>Infusão de folhas</i>	26,12 ± 9,38

Pela análise da tabela, pode-se observar que a infusão de folhas, devido ao seu caráter bastante polar, apresenta menor teor de flavonóides do que o extrato bruto. A fração acetato de etila apresentou maior teor de flavonóides totais (106,17 ± 4,63 miligramas de flavonóides por grama de fração).

Os resultados obtidos evidenciaram que o extrato bruto e fração acetato de etila são uma boa fonte de compostos fenólicos e antioxidantes, sendo opções viáveis de uso quando da substituição de antioxidantes sintéticos, porém, deve-se considerar as constantes discussões a respeito da toxicidade destes (BAUER et al., 2001)

A Figura 90 apresenta os resultados dos ensaios de fenóis totais, flavonoides totais e potencial antirradicalar, na forma de gráficos de colunas, o que permite a visualização de que a atividade antirradicalar do extrato ou infusão está diretamente relacionada ao seu teor de fenóis totais.

Figura 90 - Gráficos de colunas comparativos dos teores de fenóis totais, flavonoides totais e IC₅₀ de extrato Bruto, Fração Acetato, Infusão, Punicalagina, Ácido Galágico e Apigenina de *T. catappa*.



5 CONCLUSÕES

Tendo em vista informações etnofarmacológicas a respeito da espécie *T. catappa*, investigou-se os extratos hidroalcoólico, etanólico, partições destes extratos e a infusão das folhas. A análise destes extratos, fração aquosa e infusão por HPLC-PDA permitiu constatar não haver diferenças significativas nos perfis cromatográficos de cada um destes.

A utilização das técnicas de FIA-ESI-IT-MS/MS, portanto, possibilitou avaliar de maneira rápida a composição química dos extratos hidroalcoólico, etanólico e frações provenientes destes extratos permitindo a identificação de dezesseis substâncias, sendo que três delas (punicalagina, ácido galágico e um derivado galoilado da apigenina) foram isolados e caracterizados por RMN ^1H e ^{13}C , mono e bidimensionais. Experimentos de dicroísmo circular (DC) foram utilizados para determinação da conformação (S) dos grupos hexahidroxidifenoila (HHDP) da punicalagina e identificar o flavonoide galoilado como apigenina 8-C-(2''-galoil)- β -D-glicopiranosil.

A quantificação de metabólitos vegetais isolados e/ou identificados no extrato vegetal e frações provenientes desse extrato foi realizado por HPLC-PDA. As substâncias punicalagina, ácido elágico, ácido gálico, galato de metila e apigenina 8-C-(2''-galoil)- β -D-glicopiranosil foram quantificadas pela primeira vez no extrato hidroalcoólico das folhas de *T. catappa*.

Observaram-se os seguintes teores (%) de punicalagina total: (49,35%) no extrato hidroalcoólico, (19,87%) na infusão de folhas, (75,46%) no extrato etanólico, (99,85%) na fração aquosa proveniente do extrato hidroalcoólico. O alto teor de punicalagina em extratos e frações pode explicar a potente atividade antioxidante dos mesmos. Punicalagina apresentou IC_{50} (43,22 $\mu\text{g. mL}^{-1}$), muito próximo à quercetina IC_{50} (41,74 $\mu\text{g. mL}^{-1}$) e menor também que o extrato hidroalcoólico IC_{50} (76,81 $\mu\text{g. mL}^{-1}$), fração acetato de etila IC_{50} (101,89 $\mu\text{g. mL}^{-1}$) e infusão, IC_{50} (156,41 $\mu\text{g. mL}^{-1}$). Este fato indica que punicalagina, guardados novos estudos *in vitro* e *in vivo*, pode ser uma substância com

potencial para produção de drogas anti-radicais livres e para tratamento de enfermidades como úlceras gástricas e prevenção a danos no DNA.

O ensaio de mutagenicidade foi feito utilizando-se o extrato hidroalcoólico de folhas. Esse ensaio evidenciou mutagenicidade positiva para as linhagens TA 97 e TA 100. Esse fato permitiu afirmar que o extrato hidroalcoólico possui compostos mutagênicos que atuam pelo mecanismo *frameshift* (TA97) e substituição de pares de bases (TA100). Provavelmente, no extrato, esses compostos estão numa concentração suficiente para induzir esse efeito mutagênico. Tendo em vista a semelhança dos perfis químicos do extrato hidroalcoólico, etanólico e infusão, confirmados por HPLC-FIA-ESI-IT-MS e HPLC-PDA, e os resultados de mutagenicidade *in vitro* do extrato hidroalcoólico, faz-se necessário investigações criteriosas da mutagenicidade *in vivo* dessa espécie, que tem utilização comprovada na medicina popular.

Por meio deste estudo, pode-se comprovar que extratos e frações de *T. catappa* têm significativa atividade antiulcerogênica em modelo animal. Compostos polifenólicos presentes nos extratos de folhas, como a punicalagina, ácido galágico, flavonoides entre outros, são particularmente importantes por suas atividades antiúlceras e ação na proteção gástrica. Em vista dos resultados de mutagenicidade e antiulcerogênico apresentado por extratos e frações de *T. catappa* e considerando-se que as plantas medicinais contêm misturas complexas de milhares de substâncias que podem atuar em sinergismo ou sozinhas, é importante dar continuidade aos estudos fitoquímicos e biológicos de extratos e frações provenientes destes extratos, incluindo testes biológicos *in vivo* de substâncias isoladas.

Este trabalho de pesquisa está inserido no Programa Biota-FAPESP, o qual engloba um trabalho multidisciplinar. Assim, a partir do reconhecimento da composição química e das atividades farmacológicas em conjunto, poder-se-ão estabelecer correlações interessantes, dando embasamento científico às informações etnofarmacológicas.

REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução RE 899, de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 02 jun. 2003.

Disponível em:

<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/4983b0004745975da005f43fbc4c6735/RE_899_2003_Determina+a+publica%C3%A7%C3%A3o+do+Guia+para+valida%C3%A7%C3%A3o+de+m%C3%A9todos+anal%C3%ADticos+e+bioanal%C3%ADticos.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em: 30 jul. 2014.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Gerência Geral de Medicamento. **Perguntas e respostas workshop validação de métodos analíticos**. 2013. Disponível em:

<<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/a9ce720042540b6ca6e3af6d490f120b/Workshop+GGMED++Valida%C3%A7%C3%A3o+de+m%C3%A9todo+anal%C3%ADticos+-Perguntas+e+respostas.pdf?MOD=AJPERES>>. Acesso em: 20 nov. 2014.

AHMED, S. M. et al. Anti-diabetic activity of *Terminalia catappa* Linn. Leaf extracts in alloxan-induced diabetic rats. **Iranian Journal of Pharmacology & Therapeutics**, v. 41, p. 36-39, 2005.

AIMOLA, I. et al. *Terminalia catappa* extract enhances erythropoiesis in adult balb C Mice. **Journal of Molecular Biology Research**, v. 1, p. 40-46, 2011.

AIMOLA, I. et al. Erythropoietic and bone marrow stimulating activity of *Terminalia catappa* extract: possible role of nitric oxide signaling. **International Blood Research & Reviews**, v. 1, p. 1-13, 2013.

AKAHARAIY, I.; ILORI, R. M.; ADESIDA, J. A. Antibacterial effect of *Terminalia catappa* on some selected pathogenic bacteria. **International Journal of Pharmaceutical and Biomedical Research**, v. 2, n. 2, p. 64-67, 2011.

AL-RAWAHI, A. S. et al. Phenolic constituents of pomegranate pels (*Punicagranatum* L.) cultivated in Oman. **European Journal of Medicinal Plants**, v. 4, n. 3, p. 315-331, 2014.

ALMEIDA, R. B.; SCHEFFER, T. P. Estudo sobre a utilização de recursos vegetais com potencial terapêutico. **Revista Saúde Pública de Santa Catarina**, v. 5, n. 1, p. 50-71, 2012.

ANDREO, A. A. et al. Effects of *Mouriripusa* extracts on experimentally induced gastric lesions in rodents: role of endogenous sulfhydryls compounds and nitric oxide in gastroprotection. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 107, n. 3, p. 431-441, 2006.

ANGEL, M. H. et al. Almendro de la India: potencial biológico valioso. **Revista Cubana de Invest Biomed**, v. 22, n. 1, p. 44-55, 2003.

ANNEGOWDA, H. V. et al. Evaluation of phenolic content and antioxidant property of hydrolysed extracts of *Terminalia catappa* L. leaf. **Asian Journal of Plant Sciences**, v. 8, p. 479-485, 2010.

AQIL, F. et al. Anti-proliferative activity and protection against oxidative DNA damage by punicalagin isolated from pomegranate husk. **Food Research International**, v. 49, p. 345-353, 2012.

ARAÚJO D. S.; CHAVES, M. H. Triterpenóides pentacíclicos das folhas de *Terminalia brasiliensis*. **Química Nova**, v. 28, n. 6, p. 996-999, 2005.

ARCOLINE, T. Plantas medicinais, saúde e cura pelas plantas. In: _____. **Fitoterapia**. São Paulo: On Line, 2003. n. 1.

ARDREY, R. E. **Liquid chromatography-mass spectrometry: an introduction**. San Francisco: John Wiley & Sons, 2003. 289 p.

ARGENTA, S. C. et al. Plantas medicinais: cultura popular x ciência. **Vivências**, v. 7, p. 51-60, 2011.

ARJARIYA, S.; NEMA, N.; TIWARI, S. Investigate the toxicological effect on extract of *Terminalia catappa* Linn. in rat. **International Journal of Research and Development in Pharmacy and Life Sciences**, v. 2, p. 596-601, 2013.

AYRES, M. C. C. et al. Constituintes químicos e atividade antioxidante de extratos das folhas de *Terminalia fagifoliamart.* et. Zucc. **Química Nova**, v. 32, n. 6, p. 1509-1512, 2009.

AZRUL, L. et al. Determination of anthelmintic potential in *Terminalia catappa* by modified selected in vitro bioassay. INTERNATIONAL CONFERENCE ON BIOTECHNOLOGY AND FOOD SCIENCE IPCBEE, 2., 2011; Singapore. [Proceedings...]. [S.l.]: IACSIT Press, 2011. p. 165-167.

BABA-MOUSSA, F.; AKPAGANA, K.; BOUCHET, P. Antifungal activities of seven West African Combretaceae used in traditional medicine. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 66, p. 335-338, 1999.

BARATELLI, T. G. et al. Phytochemical and allelopathic studies of *Terminalia catappa* L. (Combretaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 41, p. 119-125, 2012.

BARRIOS, J. G. et al. Validação de método analítico por cromatografia líquida de alta eficiência para doseamento do adapaleno em suspensões de nanocápsulas. **Química Nova**, v. 34, n. 8, p. 1464-1467, 2011.

BARROS, C. B. Validação de métodos analíticos. **Biológico**, v. 64, n. 2, p. 175-177, 2002.

BARROSO, G. M. **Sistemática de angiosperma do Brasil**. Viçosa: Ed. UFV, 1991. v. 2.

BASTOS, J. C. S.; CUNHA, L. C. C.; OSTROSKY, E. A. Desenvolvimento e validação de método analítico para determinação do 4—nerolidilcatecol (4-NRC) em solução de proteína plasmática para aplicação em estudos de microdiálise cutânea. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 34, n. 2, p. 191-198, 2013.

BATAWILA, K. et al. Antifungal activities of five Combretaceae used in Togolose traditional medicine. **Fitoterapia**, v. 76, p. 264-268, 2005.

BATISTA, A. L. **Avaliação da atividade antimicrobiana e antiradicular dos extratos e substâncias dos frutos de *Buchanavia tomentosa-eichlercombretaceae* e *Ourateaspectralis* sub.(Ochnaceae)**. 2011. 176 f. Tese (Doutorado em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste) - Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2011.

BAUER, A. K. et al. Butylated hydroxytoluene (BHT) induction of pulmonary inflammation: a role in tumor promotion. **Experimental Lung Research**, v. 27, n. 3, p. 197-216, 2001.

BERA, D. et al. Biotechnological applications in agriculture: a new source of edible oil and production of bio fertilizer and antioxidant from its by – products. **Journal of Food Engineering**, v. 81, p. 688-692, 2007.

BEROVA, N.; BARI, L. D.; PESCIPELLI, G. Application of electronic circular dichroism in configurational and conformational analysis of organic compounds. **Chemical Society Reviews**, v. 36, n. 6, p. 914-931, 2007.

BEROVA, N.; NAKANISHI, K.; WOODY, R. W. **Circular dichroism: principles and applications**. 2nd ed. New York: John Wiley & Sons, 2000. 877p.

BHARATH, K. G. et al. Antiulcer activity of ethanolic extract of *Terminalia catappa* leaves against gastric ulcers by pyrolic ligation induced model in rats. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research**, v. 6, p. 38-40, 2014.

BIZIMANA, N. et al. Evaluation of medicinal plants from Mali for their in vitro and vivo trypanocidal activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 103, p. 350-356, 2006.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Food Science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25-30, June 1995.

BRITO, N. M. **Resíduos de pesticidas organoclorados (OC) e organofosforados (OF) em matriz de coco: metodologia e aplicação**. 2001. 115 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2001.

CALANI, L. et al. Ultra-HPLC-MSⁿ (Poly) phenolic profiling and chemometric analysis of juices from ancient *Punica granatum* L. cultivars: a nontargeted approach. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 23, p. 5600-5609, 2013.

CANNEL, R. J. P. **Natural products isolation**. New Jersey: Humana Press, 1998.

CASSIANO, N. M. et al. Validação em métodos cromatográficos para análises de pequenas moléculas em matrizes biológicas. **Química Nova**, v. 32, n.4, p. 1021-1030, 2009.

CASTRO, H. G. et al. **A contribuição ao estudo das plantas medicinais: metabólitos secundários**. 2.ed.Viçosa: Ed. UFV, 2004.

CATALDI, T. R.; BIANCO, G.; ABATE, S. Profiling of N-acyl-homoserine lactones by liquid chromatography coupled with electrospray ionization and a hybrid quadrupole linear ion-trap and Fourier-transform ion-cyclotron-resonance mass spectrometry (LC-ESI-LTQ-FTICR-MS). **Journal of Mass Spectrometry**, v. 43, n. 1, p. 82-89, 2008.

CATHARINO, R. R. et al. Characterization of must and wine of six varieties of grapes by direct infusion electrospray ionization mass spectrometry. **Journal of Mass Spectrometry**, v.41, n. 2, p. 185-190, 2006.

CERDA, B. et al. Repeated oral administration of high doses of the pomegranate ellagitannin punicalagin to rats for 37 days is not toxic. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 3493-3501, 2003a.

CERDA, B. et al. Evaluation of the bioavailability and metabolism in the rat of punicalagin, an antioxidant polyphenol from pomegranate juice. **European Journal of Nutrition**, v. 42, p. 18-28, 2003b.

CHANDA, S. et al. Antimicrobial activity of *Terminalia catappa* L. Leaf extracts against some clinically important pathogenic microbial strains. **Chinese Medicine**, v. 2, p. 171-177, 2011.

CHANDA, S. et al. Antimicrobial, antioxidant and synergistic properties of two nutraceutical plants: *Terminalia catappa* and *Colocasia esculenta* L. **Turkish Journal of Biology**, v. 37, p. 81-91, 2013.

CHEN, J. H; HO, C. T. Antioxidant activities of caffeic acid and its related hydroxycinnamic acid components. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, p. 2374-2378, 1997.

CHEN, P. S.; LI, J. H. Chemopreventive effect of punicalagin, a novel tannin component isolated from *Terminalia catappa*, on H-ras-transformed NIH375 cells. **Toxicology Letters**, v. 163, n. 1, p. 44-53, 2006.

CHEN, P. S. et al. Folk medicine *Terminalia catappa* and its major tannin component, punicalagin, are effective against bleomycin-induced genotoxicity in Chinese hamster ovary cells. **Cancer Letters**, v. 152, p. 115-122, 2000.

CHENG, H.; LIN, C.; LIN, T. Antiherpes simplex virus types 2 activity of casuarinin from the bark of *Terminalia arjuna* Linn. **Antiviral Research**, v. 55, p. 447-455, 2002.

CHRISTIE, G. H.; KENNER, J. J. The molecular configurations of polynuclear aromatic compounds. Part I. The resolution of -6 : 6'-dinitro- and 4 : 6 : 4' : 6'-tetranitro-diphenic acids into optically active components. **Journal of the American Chemical Society**, v. 121, p. 614-620, 1992.

CHU, A. et al. Stereospecificity of (+) –Pinoresinol and (+)-Laricerresinol reductase from *Forsythia intermedia*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 28, n. 36, p. 27026-27033, 1993.

CHYAU, C. C.; KO, P. T.; MAU, J. L. Antioxidant properties of aqueous extracts from *Terminalia catappa* leaves. **LWT – Food Science and Technology**, v. 39, n. 10, p. 1099-1108., 2006.

CHYAU, C. C. et al. Antioxidant properties of solvent extracts from *Terminalia catappa* leaves. **Food Chemistry**, v. 78, p. 483-488, 2002.

CLAYDEN, J.; WESTLUND, N.; FRAMPTON, C. S. Diastereo selective synthesis of atropisomers containing two non-biaryl stereogenic axes: stereochemical relay through stereogenic centres in dihydrostilbene-2,2'-dicarboxamides. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 4, n. 3, p. 455-461, 2006.

CONRAD, J. et al. Two triterpene esters from *Terminalia macroptera* bark. **Phytochemistry**, v. 48, n. 4, p. 647-650, 1998.

COS, P. et al. Plant-derived leading compounds for chemotherapy of human immunodeficiency virus (HIV) infection: an update (1998–2007). **Planta Medica**, v. 74, p. 1323-1337, 2008.

COSTA, D. L. M. G. **Estudo químico e avaliação da atividade mutagênica dos extratos hidroalcoólicos das folhas de *Pouteria torta* e *Pouteria ramiflora* (Sapotaceae)**. 2014. 139 f. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2014.

COUTO, R. O. et al. Validated CLAE-pda method for rosmarinic acid quantification in Rosemary. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 30, n. 10, p. 1951-1956, 2011.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. **Journal of Natural Products**, v. 23, p. 311-335, 2012.

CRONQUIST, A. **An integrated system of classification of flowering plants**. New York: Columbia University Press, 1998.

DANET, A. F. et al. Flow injection methods of analysis for waters. I. Inorganic species. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 31, p. 191-222, 2001.

DHOOGHE, L. et al. The quantification of ellagic acid in the crude extract of *Phyllanthus amarus* Schum. & Thonn. (Euphorbiaceae). **Phytochemical Analysis**, v. 22, p. 361-366, 2010.

DWIVEDI, S. *Terminalia arjuna* Wight & Arn. - a useful drug for cardiovascular disorders. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 114, p. 114-129, 2007.

EDENHARDER, R.; RAUSCHER, R.; PLATT, K. L. The inhibition by flavonoids of 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline metabolic activation to a mutagen: a structure-activity relationship study. **Mutation Research**, v. 379, p. 21-32, 1997.

EL-AMMEN, M. S. et al. Chemical investigation and antioxidant activity of phenolic acids from the leaves of *Terminalia arjuna*. **Global Journal of Pharmacology**, v. 7, p. 448-456, 2013.

ELDEEN, I. M. S. et al. Anolignan B: a bioactive compound from the roots of *Terminalia sericea*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 103, p. 135-138, 2006.

ELIEL, E. L.; WILEN, S. H. Configuration. In: _____. **Stereochemistry of carbon compounds**. New York: McGraw-Hill, 1962. Chap. 5. p. 87-123.

ELIEL, E. L.; WILEN, S. H.; MANDER, L. N. **Stereochemistry of organic compound**. New York: John Wiley & Sons, 1994.

FAN, Y. M. et al. Phytochemical and antiinflammatory studies on *Terminalia catappa*. **Fitoterapia**, v. 75, p. 253-260, 2004.

FISCHER, U. A.; CARLE, R.; KAMMERER, D. R. Identification of phenolic compounds from pomegranate (*Punicagranatum* L.) peel, mesocarp, aril and differently produced juices by HPLC-PDA-ESI/MSⁿ. **Food Chemistry**, v. 127, p. 807-821, 2011.

FOGAÇA, D. N. L. et al. Atividade antioxidante e teor de fenólicos de folhas da *Terminalia catappa* Linn. em diferentes estágios de maturação. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 34, p. 257-261, 2013.

FRANCOTTE, E.; DAVATZ, A.; RICHERT, P. Development and validation of chiral high-performance liquid chromatographic methods for the quantitation of valsartan and of thetosylate of valinebenzyl ester. **Journal of Chromatography B**, v. 686, p. 77-83, 1996.

FYHRQUIST, P. et al. Ethnobotanical and antimicrobial investigation on some species of *Terminalia* and *Combretum* (Combretaceae) growing in Tanzania. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 79, p. 169-177, 2002.

GAO, J. et al. Inhibitory effect of TCCE on CCl₄-induced overexpression of IL-6 in acute liver injury. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, Shanghai, v. 36, p. 767- 772, 2004.

GARBA, I.; ISA, S.; HAFSAT, G. L. Bacteriostatic effect of *Terminalia catappa* leaves extract on clinical isolates of gram negative bacteria. **Asian Journal of Applied Sciences**, v. 1, p. 2321-0893, 2013.

GHASEMZADEH, A. et al. Antioxidant activities, total phenolics and flavonoids content in two varieties of Malaysia young ginger (*Zingiberofficinale* Roscoe). **Molecules**, v. 15, p. 4324-4333, June 2010.

GIL, M. I. et al. Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 10, p. 4581-4589, 2000.

GONÇALVES, N. M. T. et al. A tradição popular como ferramenta para a implantação da fitoterapia no município de Volta Redonda – RJ. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 92, n. 4, p. 346-351, 2011.

GONZÁLES, A. G.; HERRADOR, M. A.; ASUER, A. G. Intra-laboratory testing of method accuracy from recovery assays. **Talanta**, v.48, p. 729-736, 1999.

GOODACRE, R. et al. Metabolic profiling using direct infusion electrospray ionisation mass spectrometry for the characterization of olive oils. **Analyst**, v. 127, n.11, p.1457-1462, 2002.

GOTO, T.; KONDO, T. Structure and molecular stacking of anthocyaninsflower color variation. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 30, p. 17-33, 1991.

GOTO, T. et al. Chiral stacking of a natural flavone, flavocommelin in aqueous solutions. **Tetrahedron Letters**, v. 31, p. 713-716, 1990.

GOTTLIEB, O. R.; KAPLAN, M. A.; BORIN, M. R. M. B. **Biodiversidade**: um enfoque químico-biológico. Rio de Janeiro: Ed. UFRJ, 1996.

GUPTA, S.; SAHA, B.; GIRI, A. K. Comparative antimutagenic and anticlastogenic effects of green tea and black tea: a review. **Mutation Research**, v. 512, n. 1, p. 37-65, 2002.

HALLIWELL, B. et al. Free radicals and antioxidants in food and in vivo: what they do and how they work. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 35, p.7-20, 1995.

HARBONE, J.B. **The flavonoids**: advances in research since 1986. London: Chapman and Hall, 1986. 676 p.

HOSTETTMANN, K.; QUEIROS, F. E.; VIEIRA, C. P. **Princípios ativos de plantas superiores**. São Carlos: Ed. UFSCar, 2003. 54p.

HVATTUM, E. Determination of phenolic compounds in rose hip (*Rosa canina*) using liquid chromatography coupled to electrospray ionisation tandem mass spectrometry and diode-array detection. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 16, p. 655-662, 2002.

IBEGBULEM, C. O.; EYONG, E. U.; ESSIEN, E. U. Biochemical effects of drinking *Terminalia catappa* Linn. decoction in Wistar rats. **African Journal of Biochemistry Research**, v. 5, p. 237-243, 2011.

IBEGBULEM, C. O. et al. LDL-cholesterol lowering effect of *Terminalia littoralis* decoction: hypothesized mechanisms. **Pharmacologia**, v. 4, p. 34-37, 2013.

IKHWANUDDIN, M. et al. Effect of Indian almond, *Terminalia catappa* leaves water extract on the survival rate and growth performance of black Tiger shrimp, *Penaeus monodon* post larvae. **AAFL Bioflux**, v. 7, p. 85-93, 2014.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL. **DOQ-CGCRE-008**: orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos. 2010. 20 p. Revisão 3. Disponível em: <http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/CGCRE/DOQ/DOQ-CGCRE-8_03.pdf>. Acesso em: 25 jan. 2011.

INSTITUTO PLANTARUM. **Amendoeira**. Disponível em: <<http://www.plantarum.com.br/amendoeira.html>>. Acesso em: 14 mar. 2014.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION. **Validation of analytical procedures**: text and methodology Q2 (R1). 2005. Disponível em: <http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1__Guideline.pdf>. Acesso em: 22 abr. 2014.

JAGESSAR, R. C.; ALLEN, R. Phytochemical screening and atomic absorption spectroscopic studies of solvent type extract from leaves of *Terminalia catappa*, (Almond). **Natural & Applied Sciences-Part I**, v. 3, n. 3, p. 17-26, Nov. 2012.

JOVANOVIC, S. V. et al. Flavonoids as antioxidants. **Journal of the American Chemical Society**, v. 116, p. 4846-4851, 1994.

JURD, L.; GEISSMAN, T. A. Absorption spectra of metal complexes of flavonoid compounds. **Journal of Organic Chemistry**, v. 21, n. 12, p. 1395-1401, Dec. 1956.

KÄHKÖNEN, M. P. et al. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, n. 10, p. 3954-3962, Sept. 1999.

KANDIL F. E.; NASSAR, M. I. A tannin anti-cancer promoter from *Terminalia arjuna*. **Phytochemistry**, v. 47, n. 8, p. 1567-1568, 1997.

KESHINRO, O. O. The unconventional sources of ascorbic acid in the tropics. **Nutrition Reports International**, v. 31, p. 381-387, 1985.

KINOSHITA, S. et al. Antioxidant and hepatoprotective actions of medicinal herb, *Terminalia catappa* L. from Okinawa Island and its tannin corilagin. **Phytomedicine**, v. 14, p. 755-762, 2007.

KO, T. F.; WENG, Y. M.; CHIOU, Y. Y. Squalene content and antioxidant activity of *Terminalia catappa* leaves and seeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 19, p. 5343-5348, 2002.

KOKORA, P. A. et al. Antibacterial activity of ethanolic and aqueous extracts of four medicinal plants on the in vitro growth of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. **Journal of Drug Delivery & Therapeutics**, v. 3, p. 113-116, 2013.

KRASZNI, M.; MAROSI, A.; LARIVE, C. K. NMR assignments and the acid-base characterization of the pomegranate ellagitannin punicalagin in the acidic pH-range. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 405, p. 5807-5816, 2013.

KULKARNI, A. P.; SOMARADHYA, M. A.; DIVAKAR, S. Isolation and identification of a radical scavenging antioxidant – punicalagin from pith and carpellary membrane of pomegranate fruit. **Food Chemistry**, v. 87, p. 551-557, 2004.

LABIENIEC, M.; GABRYELAK, T. Response of DNA, proteins and membrane bilayer in the digestive gland cells of freshwater mussel *Unio tumidus* to tannins exposure. **Toxicology in Vitro**, v. 18, p. 773-781, 2004.

LADOKUN, O. A.; OJEZELE, M. O. Comparative study on the antibacterial activity of fresh and fallen leaves of *Terminalia catappa* L. **Journal of Agricultural Science and Technology**, v. 1, p. 217-220, 2011.

LAMBERT, W. E.; BOCXLAER, J. F.; DE LEENHEER, A. P. Potential of high-performance liquid chromatography with photodiode array detection in forensic toxicology. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 689, n. 1, p. 45-53, 1997.

LANÇAS, F. M. **Extração em fase sólida (SPE)**. São Carlos: RiMa, 2004.

LANÇAS, F. M. A cromatografia líquida moderna e a espectrometria de massas: finalmente “compatíveis”? II. A escolha do analisador de massas. **Scientia Chromatographica**, v. 5, p. 27-46, 2013.

- LENORE, S. et al. **Standard methods for examination of water and wastewater**. 21th ed. Washington D. C: American Public Health Association, 2005.
- LÉVAI, A. Utilization of the chiroptical spectroscopies for the spectroscopies for the structures elucidation of flavonoids and related benzopyran derivatives. **Acta Chimica Slovenica**, v. 45, n. 3, p. 267-284, 1998.
- LI, S. P.; ZHAO, J.; YANG, B. Strategies for quality control of Chinese medicines. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 55, p. 802-809, 2011.
- LIN, C. C.; HSU, Y. F.; LIN, T. C. Effects of punicalagin and punicalin on carrageenan-induced inflammation in rats. **American Journal of Chinese Medicine**, v. 27, p. 371-376, 1999.
- LIN, C. C.; HSU, Y. F.; LIN, T. C. Antioxidant and free radical scavenging effects of tannins of *Terminalia catappa* L. **Anticancer Research**, v. 21, p. 237-243, 2001.
- LIN, C. C. et al. Evaluation of the antioxidant and hepatoprotective activity of *Terminalia catappa*. **American Journal of Chinese Medicine**, v. 25, p. 153-161, 1997.
- LIN, C. C. et al. Antioxidant and hepatoprotective activity of punicalagin and punicalin on carbon tetrachloride-induced liver damage in rats. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 50, n. 7, p. 789-794, 1998.
- LIN, C. C. et al. Antioxidant and hepatoprotective effects of punicalagin and punicalin on acetaminophen-induced liver damage in rats. **Phytotherapy Research**, v. 15, n. 3, p. 206-212, 2001.
- LIN, L. T. et al. Hidrolizable tannins (chebulagic acid and punicalagin) target viral glycoprotein-glycosaminoglycan interactions to inhibit herpes simplex virus 1 entry and cell-to-cell spread. **Journal of Virology**, v. 85, p. 4386-4398, 2011.
- LIN, T. C.; HSU, F. L. Tannin and related compounds from *Terminalia catappa* and *Terminalia parviflora*. **Journal of the Chinese Chemical Society**, v. 46, n. 4, p. 613-618, 1999.
- LIN, Y. L. et al. Flavonoid glycosides from *Terminalia catappa* L. **Journal of the Chinese Chemical Society**, v. 47, p. 253-256, 2000.
- LIU, M. et al. Phytochemical and antifungal studies on *Terminalia mollis* and *Terminalia brachystemma*. **Fitoterapia**, v. 80, p. 369-373, 2009.
- LIU, T. Y. et al. Modification of mitomycin C-induced clastogenicity by *Terminalia Catappa*L. in vitro and in vivo. **Cancer Letters**, v. 105, p. 113-118, 1996.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil. 2. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2005. v. 2.

LU, J.; DING, K. E.; YUAN, Q. Determination of punicalagin isomers in pomegranate husk. **Chromatography**, v. 68, n. 3/4, p. 303-306, 2008.

LU, J.; WEI, Y.; YUAN, Q. Preparative separation of punicalagin from pomegranate husk by high-speed countercurrent chromatography. **Journal of Chromatography B**, v. 857, p. 175-179, 2007.

M MURTY, N.V.S.V. et al. Antipyretic activity of *Terminalia catappa* (Linn) gum in pyrexia induced albino rats. **International Journal of Biological & Pharmaceutical Research**, v. 4, p. 172-175, 2013.

MABRY, T. J.; MARKHAM, K. R.; THOMAS, M. B. **The systematic identification of flavonoids**. New York: Springer-Verlag, 1970.

MACHADO, B. T. et al. Antimicrobial ellagitannin of *Punicagranatum* fruits. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 13, n. 5, p. 606-610, 2002.

MALIK, A.; MUKHTAR, H. Prostate cancer prevention through pomegranate fruit. **Cell Cycle**, v. 5, n. 4, p. 371-373, 2006.

MALIK, A. et al. Pomegranate fruit juice for chemoprevention and chemotherapy of prostate cancer. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of American**, v. 102, n. 41, p. 14813-14818, 2005.

MANDLOI, S. et al. A study on phytochemical and antifungal activity of leaf extracts of *Terminalia catappa*. **International of Pharma and Bio Sciences**, v. 4, p. 1385-1393, 2013a.

MANDLOI, S. et al. Antifungal activity of alcoholic leaf extracts of *Terminalia catappa* and *Terminalia arjuna* on some pathogenic and allergenic fungi. **Advances in Life Science and Technology**, v. 8, p. 25-27, 2013b.

MARKHAM, K. R. **Techniques of flavonoid identification**. London: Academic Press, 1982. 113 p.

MARON, D. M.; AMES, B. N. Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. **Mutation Research**, v. 113, n. 3/4, p. 173-215, 1983.

MARQUES, M. R. et al. An in –vitro analysis of the total phenolic content, antioxidant power, physical, physicochemical, and chemical composition of *Terminalia catappa* Linn fruits. **Food Science and Technology**, v. 32, p. 209-213, 2012.

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.

MATSUURA, H. et al. Regulation of cyclooxygenase-2 by interferon γ and transforming growth factor α in normal human epidermal keratinocytes and squamous carcinoma cells. Role of mitogen activated protein kinases. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 41, p. 29138-29148, 1999.

MAU, J. L.; KO, P. T.; CHYAU, C. C. Aroma characterization and antioxidant activity of supercritical carbon dioxide extracts from *Terminalia catappa* leaves. **Food Research International**, v. 36, p. 97-104, 2003.

MAURI, P.; PIETTA, P. Electrospray characterization of selected medicinal plant extracts. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 66, n. 1, p.61-68, 2000.

MBENGUI, R. D. et al. Phytochemical screening and study of comparative antibacterial activity of aqueous and alcoholic extracts of the leaves and barks of *Terminalia catappa* on multiresistant strains. **Journal of Applied Biosciences**, v. 66, p. 5040-5048, 2013.

MEET, L. S. et al. Activation of phosphoinositide 3-kinase in response to inflammation and nitric oxide leads to the up-regulation of cyclooxygenase-2 expression and subsequent cell proliferation in mesangial cells. **Cellular Signaling**, v.17, n. 8, p. 975-974, 2005.

MEKKAWY, S. et al. Anti-HIV-1 and anti-HIV-1 protease substances from *Ganoderma lucidum*. **Phytochemistry**, v. 49, p. 1651-1657, 1998.

MENA, P. et al. rapid and comprehensive evaluation of (poly)phenolic compounds in pomegranate (*Punicagranatum* L.) juice by UHPLC-MSⁿ. **Molecules**, v. 17, p. 14821-14840, 2012.

MERKEN, H. M.; BEECHER, G. R. Measurement of food flavonoids by high-performance liquid chromatography: a review. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 3, p. 577-599, 2000.

METY, S.; MATHAD, P. Antioxidative and free radical scavenging activities of *Terminalia* species. **International Research Journal of Biotechnology**, v. 2, p. 119-127. 2011.

MINCIS, M. et al. Ethanol and the gastrointestinal tract. **Archives of Gastroenterology**, v. 32, p. 131-139, 1995.

MIZUI, T.; SHIMONO, N.; DOTEUCHI, M. A possible mechanism of protection by polyamines against gastric damage induced by acidified ethanol in rats: polyamine protection may depend on its antiperoxidative properties. **Japanese Journal of Pharmacology**, v.44, p. 43-50, 1987.

MOCHIZUKI, M.; HASEGAWA, N. Anti-inflammatory effect of extract of *Terminalia Sericea* roots in an experimental model of colitis. **Journal of Health Science**, v. 53, n. 3, p. 329-331, 2007.

MORIMOTO, Y. et al. Effects of the new anti-ulcer agent KB-5492 on experimental gastric mucosal lesions and gastric mucosal defensive factors, as compared to those of teprenone and cimetidine. **Japanese Journal of Pharmacology**, v. 57, n. 4, p. 495-505, 1991.

MORTELMANS, K.; ZEIGER, E. The ames salmonella/microsome mutagenicity assay. **Mutation Research**, v. 455, n. 1/2, p. 29-60, 2000.

MOSHI, M. J; MBWAMBO, Z. H. Some pharmacological properties of extracts of *Terminalia sericea* roots. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 97, p. 43-47, 2005.

MOURA, A. C.; VILEGAS, W.; SANTOS, L. C. Identificação de alguns constituintes químicos de *Índigo ferahirsuta* Linn. (Fabaceae) por CLAE-IES-EM (TOF) e avaliação da atividade antirradicalar. **Química Nova**, v. 34, n. 7, S1-S8, 2011.

MUDI, S.; MUHAMMAD, A. phytochemical screening and antimicrobial activities of *Terminalia catappa* Leaf extracts. **Biochemistry**, v. 23, p. 35-39, 2011.

MURAKAMI, S. et al. Inhibition of gastric H⁺, K⁺-ATPase and acid secretion by ellagic acid. **Planta Medica**, v. 57, p. 305-308, 1991.

NADIRAH, M.; WEE, T. L.; NAJIAH, M. Differential responses of *Vibrio* sp. to young and mature leaves extracts of *Terminalia catappa* L. **International Food Research Journal**, v. 20, p. 961-966, 2013.

NAGAPPA, A. N. et al. Antidiabetic activity of *Terminalia catappa* Linn fruits. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 88, n. 1, p. 45-50, 2003.

NEELAVATHI, P.; VENKATALAKSHMI, P.; BRINDHA, P. Antibacterial activities of aqueous and ethanolic extract of *Terminalia catappa* leaves and bark against some pathogenic bacteria. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutica Sciences**, v. 5, p. 114-120, 2013.

NEMA, N.; ARJARIYA, S.; TIWARI, S. In vivo wound healing potential of *Terminalia catappa* (Indian Almond) leaves extract on rats. **Asian Journal of Pharmacy and Medical Science**, v. 3, p. 54-57, 2013.

NIEMETZ, R.; GROSS, G. G. Enzymology of gallotannin and ellagitannin biosynthesis. **Phytochemistry**, v. 66, p. 2001-2011, 2005.

OKUDA, T. Systematics and health effects of chemically distinct tannins in medicinal plants. **Phytochemistry**, v. 66, p. 2012-2031, 2005.

OKUDA, T. et al. Circular dichroism of hydrolyzable tannins. I. Ellagitannins and gallotannins. **Tetrahedron Letters**, v. 23, p. 3937-3940, 1982a.

- OKUDA, T. et al. Circular dichroism of hydrolyzable tannins. II. Dehydroellagitannins. **Tetrahedron Letters**, v. 23, p. 3941-3944, 1982b.
- OLIVEIRA, J. T. A. et al. Composition and nutritional properties of seeds from *Pachira aquatica* Aubl, *Sterculia striata* StHil et Naud and *Terminalia catappa* Linn. **Food Chemistry**, v. 70, p. 185-191, 2000.
- OLOLADE, Z. S. et al. Total phenolic content, free radical inhibition, antioxidant and antibacterial potentials of the medicinal organic compounds in the fruit of *Terminalia catappa* Linn. **Nature and Science**, v.12, n.2, p.46-50, 2014.
- OPARA, F. N. et al. Preliminary phytochemical screening and antibacterial activities of leaf extracts of *Terminalia catappa*. **Journal of Emerging Trends in Engineering and Applied Sciences**, v. 3, p. 424-428, 2012.
- PACIFICO, M. et al. Metabolite fingerprinting of capim dourado (*Syngonanthus nitens*), a basis of Brazilian handcrafts. **Industrial Crops and Products**, v. 33, n. 2, p. 488-496, 2011.
- PANDYA, N. B. et al. Antitumor and antioxidant status of *Terminalia catappa* against Ehrlich ascite carcinoma in Swiss albino mice. **Indian Journal of Pharmacology**, v. 45, p. 464-469, 2013.
- PAULETTI, P. M. et al. New antioxidant C-glucosylxanthone from the stems of *Arrabidaea asamydoides*. **Journal of Natural Products**, v. 66, n. 10, p. 1384-1387, Oct. 2003.
- PEFUNDSTEIN, B. et al. Polyphenolic compounds in the fruits of Egyptian medicinal plants (*Terminalia bellerica*, *Terminalia chebula* and *Terminalia hórrida*): characterization, quantitation and determination of antioxidant capacities. **Phytochemistry**, v. 71, p. 1132-1148, 2010.
- PEIXOTO SOBRINHO, T. J. S. et al. Otimização de metodologia analítica para o doseamento de flavonoides de *Bauhinia cheilantha* (Bongard) Steudel. **Química Nova**, v.33, n. 2, p. 288-291, jan. 2010.
- POOLE, C. F.; GUNATILEKA, A. D.; SETHURAMAN, R. Contributions of theory to method development in solid-phase extraction. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 885, p. 17-39, 2000.
- PRAVEENA, K. Phytochemical, anti-microbial and In-vitro antioxidant activity of *Terminalia catappa*. **International Journal of Pharmaceutical and Life Sciences**, v. 5, p. 3325-3329, 2014.
- PRISTA, L. N. **Tecnologia farmacêutica**. 4. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1995. v. 3, 786 p.

PURDIE, N. Analytical applications of CD to the forensic, pharmaceutical, clinical, and food sciences. In: PURDIE, N.; BRITAIN, H.G. (Ed.). **Analytical applications of circular dichroism**. Amsterdam: Elsevier, 1994. v.1, p. 241-278.

QING, L.-S. et al. Identification of enzyme inhibitors using therapeutic target protein-magnetic nanoparticle conjugates. **Analytical Methods**, v. 4, n. 6, p. 1612-165, 2012. Supplemental materials.

QUIDEAU, S.; FELDMAN, K. S. Ellagitannin chemistry: the first synthesis of dehydrohexahydroxydiphenolate (dhhd) esters from oxidative coupling of unetherified methyl gallate. **Journal of Organic Chemistry**, v.62, p. 8809-8813, 1997.

QUIDEAU, S. et al. The chemistry of wine polyphenolic C-glycosidic ellagitannins targeting human topoisomerase II. **European Journal of Chemistry**, v. 11, p. 6503-6513, 2005.

RAO, Ch. V. et al. Gastroprotective effect of standardized extract of *Ficus glomerata* fruit on experimental gastric ulcer in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v.115, p.323-326, 2008.

RATNASOORIYA, W. D. et al. Tender leaf extract of *Terminalia catappa* antinociceptive activity in rats. **Pharmaceutical Biology**, v. 40, n. 1, p. 60-66, 2002.

REDDY, M. K. et al. Antioxidant, antimalarial and antimicrobial activities of tannin-rich fractions, ellagitannins and phenolic acids from *punicagranatum* L. **Planta Medica**, v.73, p.461-467, 2007.

REPETTO, M. G.; LLESUY, S. F. Antioxidant properties of natural compounds used in popular medicine for gastric ulcers. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 35, p. 523-534, 2002.

RIBANI, M. et al. Validação em métodos cromatográficos eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

RIBEIRO, C. A. F. Justifica-se o uso de extractos de plantas medicinais na terapêutica da ansiedade e da depressão? **Revista Saúde Mental**, v. 2, n. 4, p. 9-14, 2000.

RINALDO, D. **Determinação de enantiômeros em extratos vegetais por cromatografia quiral e dicroísmo circular**. 2010. 105 f. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2010.

ROBARDS, K. Strategies for the determinations of bioactive phenols in plants, fruit and vegetables. **Journal of Chromatography A**, v. 1000, n.1/2, p. 657-691, 2003.

RODRIGUES, A. G.; SANTOS, M G. dos; AMARAL, A. C. F. Políticas públicas em plantas medicinais e fitoterápicos. In: BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. **A fitoterapia no SUS e o programa de pesquisas de plantas medicinais da central de medicamentos**. Brasília, DF: Ideal, 2006. Cap. 1, p. 9-28. (Série B: textos básicos de saúde).

RODRIGUES, C. M. **Caracterização quali e quantitativa de metabólitos secundários em extratos vegetais**. 2007. 197 f. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2007.

ROSA, C.; CAMARA, S. G.; BERIA, J. U. Representações e intenção e uso da fitoterapia na atenção básica de saúde. **Ciência e Saúde Coletiva**, v. 16, n. 1, p. 311-318, 2011.

RUZICKA, J.; HANSEN, E. H. Retro-review of flow-injection analysis. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 27, p. 390-391, 2008.

SANTOS, F. V. et al. Assessment of DNA damage induced by extracts and fractions of *Strychnos pseudoquina*, a Brazilian medicinal plant with antiulcerogenic activity. **Food and Chemical Toxicology**, v. 44, p. 1585-1589, 2006.

SARAVANAN, S. et al. Hypolipidemic effect of triphala in experimentally induced hypercholesteremic rats. **Journal of the Pharmaceutical Society of Japan**, v. 127, n. 2, p. 385-388, 2007.

SAROJA, M.; SANTHI, R.; ANNAPOORANI, S. Antitumor activity of methanolic extract of *Terminalia catappa* leaves against Ehrlich ascites induced carcinoma in mice. **International Research Journal of Pharmacy**, v. 2, p. 253-254. 2011.

SAROJA, M.; SANTHI, R.; ANNAPOORANI, S. Studies on immunomodulatory activity of flavonoid fractions of *Terminalia catappa* in Swiss albino mice. **International Journal of Pharma and Bio Sciences**, v. 3, p. 418-422, 2012.

SAXENA, M. et al. Cytotoxic agents from *Terminalia arjuna*. **Planta Medica**, v. 73, p. 1486-1490, 2007.

SCHENKEL, E. P. et al. Screening of Brazilian plants for the presence of peroxides. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 38, n. 2, p. 191-196, 2002.

SEERAM, N. et al. Rapid large scale purification of ellagitannins from pomegranate husk, a by-product of the commercial juice industry. **Separation and Purification Technology**, v. 41, p. 49-55, 2005.

SEERAM, N. P. et al. In vitro antiproliferative, apoptotic and antioxidant activities of punicalagin, ellagic acid and a total pomegranate tannin extract are enhanced in combination with other polyphenol as found in pomegranate juice. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 16, n. 6, p. 360-367, 2005.

SHIN, T. Y. et al. Inhibitory action of watersoluble fractions of *Terminalia chebula* on systemic and local anaphylaxis. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 74, p. 133-140, 2001.

SILVA, C. G. A.; COLLINS, C. H. Aplicações da cromatografia líquida de alta eficiência para estudo de poluentes orgânicos emergentes. **Química Nova**, v. 34, n. 4, p. 665-676, 2011.

SILVA, L. P. et al. *Terminalia catappa* L.: a medicinal plant from the Caribbean pharmacopeia with anti-*Helicobacter pylori* and antiulcer action in experimental rofent models. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 159, p. 285-295, 2015.

SILVA, O. et al. Antimicrobial activity of *Terminalia macroptera* root. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 57, p. 203-207, 1997.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTÓS, R. S. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of *Folin-Ciocalteu* reagent. **Methods in Enzymology**, v. 299, p. 152-178, 1999.

SIQUEIRA-MOURA, M. P.; LIRA, M. C. B.; SANTOS-MAGALHÃES, N. S. S. Validação de método analítico espectrofotométrico UV para determinação de ácido úsnico em lipossomas. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 44, n. 4, p. 621-628, 2008.

SMITH, H. E. Chiroptical properties of the benzene chromophore. A method for the determination of the absolute configurations of benzene compounds by application of the benzene sector and benzene chirality rules. **Chemical Reviews**, v. 98, p. 1709-1740, 1998.

SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; DOLAN, J. W. **Introduction to modern liquid chromatography**. 3rd ed. New Jersey: John Wiley & Sons, 2010. 912 p.

SOUSA, C. M. M. et al. Total phenolics and antioxidant activity of five medicinal plants. **Química Nova**, v. 30, p. 351-355, 2007.

SOUZA V. C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de angiospermas da flora brasileira**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2005. 465 p.

STICZAY, T. et al. Studies on circular dichroism. XII. Chiroptical properties of some flavone and isoflavone glycosides. **Chemické Zvesti**, v. 29, n. 4, p. 538-543, 1975.

STUBBERUD, K. P.; ASTROM, O. Separation of ibuprofen, codeine phosphate, their degradation products and impurities by capillary electrophoresis: II Validation. **Journal of Chromatography A**, v. 826, p. 95-102, 1998.

TABOPDA, T. K. et al. α -glucosidase inhibitors ellagic acid and derivatives with immunoinhibitory properties from *Terminalia superba*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 56, n. 6, p. 847-850, 2008.

TAKECHI, M. et al. Structure and antiherpetic activity among the tannins. **Phytochemistry**, v. 24, p. 2245-2250, 1985.

TANAKA, T.; NONAKA, G.; NISHIOKA, I. Tannins and related compounds. XLII: Isolation and characterization of four new hydrolyzable tannins, terflavins A and B, tergalagin and tercatalin from the leaves of *Terminalia catappa* L. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 34, p. 1039-1049, 1986a.

TANAKA, T.; NONAKA, G.; NISHIOKA, I. Tannins and related compounds. XL: Revision of the structures of punicalin and punicalagin, and isolation and characterization of 2-O-galloylpunicalin from the bark of *Punica granatum* L. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 34, p. 650-655, 1986b.

TANG, X. H. et al. Hepatoprotective effects of chloroform extract from leaf of *Terminalia catappa* in relation to the inhibition of liver IL-6 expression. **Zhongguo Zhongyao Zazhi**, v. 28, p. 1170-1174, 2003.

TANG, X. et al. Effective protection of *Terminalia catappa* L. leaves from damage induced by carbon tetrachloride in liver mitochondria. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 17, p. 177-182, 2005.

TEIXEIRA, H. L. **Composição química e perfil de ácidos graxos da castanha do fruto da castanhola (*Terminalia catappa* Linn)**. 2010. 50 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Campus de Itapetinga, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga, 2010.

THOMSON, L.; EVANS, B. **Species profiles for pacific island agroforestry: *Terminalia catappa* (Tropical Almond)**. 2006. Disponível em: <<http://www.agroforestry.net/tti/T.catappa-tropical-almond.pdf>>. Acesso em: 28 fev. 2011.

THOMPSON, M. Harmonized guidelines for international quality control in analytical chemistry laboratories. **Pure and Applied Chemistry**, v. 67, n. 4, p. 649-666, 1995.

THOMPSON, M.; ELLISON, S. L. R.; WOOD, R. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis - (IUPAC technical report). **Pure and Applied Chemistry**, v. 74, n. 5, p. 835-855, 2002.

TWARDOWSCHY, A. **Vias envolvidas no mecanismo de ação do efeito gastroprotetor das cascas de *Tabebuia avellanedae* Lorentz exGrieb (Bignoniaceae)**. 2007.76 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Setor de Ciências Biológica, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

U. S. PHARMACOPEIA. **Pharmacists' pharmacopeia**. 2nd ed. [Rockville], 2009. Supplement, 3. Disponível em: <http://www.usp.org/sites/default/files/usp_pdf/EN/products/usp2008p2supplement3.pdf>. Acesso em: 20 fev. 2014.

UNITED STATES. Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration. Center for Drug Evaluation and Research. Center for Biologics Evaluation and Research. **Guidance for industry: guideline q2-b validation of analytical procedures methodology**. Rockville, 1996. 13 p. Disponível em: <<http://www.fda.gov/downloads/drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidances/ucm073384.pdf>>. Acesso em: 14 fev. 2013.

VASCONCELOS, P. C. P. et al. Studies of gastric mucosa regeneration and safety promoted by *Mouriri pusa* treatment in acetic acid ulcer model. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 107, p. 293-301, 2008.

VENKATALAKSHMI, P.; BRINDHA, P.; INDUJA, K. In-vitro anti-oxidant and antitumor studies on *Terminalia catappa* bark. **International Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 6, p. 1-3, 2014. suppl 1.

VESSMAN, J. Selectivity or specificity? Validation of analytical methods from the perspective of an analytical chemist in the pharmaceutical industry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 14, n. 8/10, p.867-869, 1996.

VILADOMIU, M. et al. Preventive and prophylactic mechanisms of action of pomegranate bioactive constituents. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, 2013. doi: 10.1155/2013/789764.

VILLAS BOAS, G. K.; GADELHA, C. A. G. Oportunidades na indústria de medicamentos e a lógica do desenvolvimento local baseado nos biomas brasileiros: bases para a discussão de uma política nacional. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 23, n. 6, p. 1463-1471, 2007.

VRUSHABENDRA SWAMY, B. M. et al. Antidiarrhoeal activity of *Terminalia catappa* Linn leaf extracts in rats. **Asian Journal of Chemistry**, v. 18, n. 2, p. 1236-1242, 2006.

WALACE, J. L. Pathogenesis of NSAID-induced gastroduodenal mucosal injury. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, v. 15, p. 691-703, 2001.

WANG, H.-F. et al. Composition and antioxidative activity of essential oils from *Terminalia catappa* L. leaves. **Taiwanese Journal of Agricultural Chemistry and Food Science**, v. 38, p. 27-35, 2000.

WEAVER, J. L. et al. Prevention of binding of rgp120 by anti-HIV active tannins. **Biochemical Pharmacology**, v. 43, p. 2479-2480, 1992.

WILLIAMS, P.L.; GIRALT, E. Atropisomerism, biphenyls and the Suzuki coupling: peptide antibiotics. **Chemical Society Reviews**, v. 30, p. 145-157, 2001.

WYREPKOWSKI, C. **Estudo químico e atividades mutagênica e antirradicalar de *Caesalpinia ferrea***. 2014. 139 f. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2014.

YANG, S.-F. et al. Antimetastatic effects of *Terminalia catappa* L. on oral cancer via a down-regulation of metastasis-associated proteases. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, p. 1052-1058, 2010.

YEH, C. B. et al. *Terminalia catappa* exerts antimetastatic effects on hepatocellular carcinoma through transcriptional inhibition of matrix metalloproteinase-9 by modulating NF- κ B and AP-1 activity. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012, 2012. doi:10.1155/2012/595292.

YEH, C. B. et al. *Terminalia catappa* attenuates urokinase-type plasminogen activator expression through Erk pathways in hepatocellular carcinoma. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 14, 2014. Disponível em: <<http://www.biomedcentral.com/content/pdf/1472-6882-14-141.pdf>>. Acesso em: 30 jan. 2015.

YOSHIDA, T.; AMAKURA, Y.; YOSHIMURA, M. Structural features and biological properties of ellagitannins in some plant families of the order myrtales. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 11, p. 79-106, 2010.

YOSHIDA, T.; HATANO, T.; ITO, H. Chemistry and function of vegetable polyphenols with high molecular weights. **BioFactors**, v. 13, p. 121-125, 2000.

YULIANA, N. D. et al. Metabolomics for bioactivity assessment of natural products. **Phytotherapy Research**, v. 25, p. 157-169, 2011.

YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**. Chapecó: Argos, 2001. 500p.

ZANUTTO, F. V. **Estudo químico e atividades mutagênica e antirradicalar de *Paepalanthus chiquetensis* Herzog (ERIOCAULACEAE)**. 2013. 175 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2013.

ZEIGER, E. Mutagens that are not carcinogens: faulty theory or faulty tests? **Mutation Research**, v. 492, p. 29-38, 2001.

ZHAIN, M. et al. Punicalagin and ellagic acid demonstrate antimutagenic activity and inhibition of benzo [a] pyreneinducedDNA adducts. **Biomed Research International**, v. 2014, 2014. Disponível em: <<http://www.hindawi.com/journals/bmri/2014/467465/>>. Acesso em: 10 out. 2014.

ZHANG, Y. et al. Rapid method development for chiral separation in drug discovery using multi-column parallel screening and circular dichroism signal pooling. **Journal of Chromatography A**, v. 1049, n. 1/2, p. 75-84, 2004.