

UFAL

INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA

**ESTUDO FITOQUÍMICO E BIOLÓGICO
DE *Terminalia catappa* L. (Combretaceae)**

DANNIELLE DE LIMA COSTA

Universidade Federal de Alagoas

Campus A. C. Simões
Tabuleiro dos Martins

57.072-970 – Maceió-AL



Universidade Federal de Alagoas
Instituto de Química e Biotecnologia

Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia
PPGQB



IQB

ESTUDO FITOQUÍMICO E BIOLÓGICO
DE *Terminalia catappa* L. (Combretaceae)

Danielle de Lima Costa

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas, para a obtenção do Título de mestre em Química.

Orientador: Prof.Dr.Antônio Euzébio
Goulart Sant'Ana

Co-orientador: Profa. Dra. Margarida Maria
dos Santos Humberto

Maceió – Alagoas
Novembro de 2010.

Catlogação na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico
Bibliotecário Maria Auxiliadora G. da Cunha

- C837e Costa, Dannielle de Lima Costa.
Estudo fitoquímico e biológico de *Terminalia catappa* L. (*Combretaceae*) /
Dannielle de Lima Costa. 2010.
113 f. : il. tabs., graf.
- Orientador: Antônio Euzébio Goulart Sant'Ana.
Co-orientador: Margarida Maria dos Santos Humberto.
Dissertação (mestrado em Química e Biotecnologia) – Universidade Federal de
Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. Maceió, 2010.
- Bibliografia: f. 100-113.
1. *Terminalia catappa* L. 2. *Combretaceae*. I. Título.

CDU:543:615.2/3



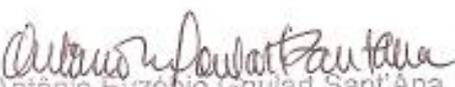
UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA E
BIOTECNOLOGIA



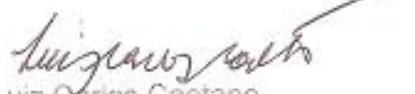
BR 104 Km14, Campus A. C. Simões
Cidade Universitária, Tabuleiro dos Martins
57072-970, Maceió-AL, Brasil
Fone: (82) 3214-1384, Fax: (82) 3214-1384
Email: cpgqb@qui.ufal.br

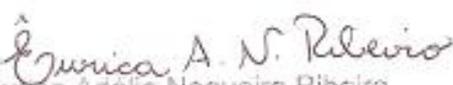
Membros da Comissão Julgadora da Dissertação de Mestrado Dannielle de Lima Costa intitulada: "Estudo Fitoquímico e Biológico de *Terminalia catappa* L. (Combretaceae)", apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas em 05 de novembro de 2010, às 14h na Sala de Aulas do PPGQB/UFAL.

COMISSÃO JULGADORA


Prof. Dr. Antônio Euzébio Goulart Sant'Ana
Orientador – PPGQB/IQB/UFAL


Prof. Dr. Ronan Batista
UESB


Prof. Dr. Luiz Carlos Caetano
PPGQB/IQB/UFAL


Prof.ª Dr.ª Eunice Adélia Nogueira Ribeiro
ESENFAR/UFAL

AGRADECIMENTOS

Ao **Prof. Dr Antônio Euzébio Goulart Sant'Ana**, pela orientação, oportunidade e amizade.

À **Profª. Dra. Margarida Maria dos Santos Humberto** pelos valiosos ensinamentos, iniciando-me na pesquisa científica. Por sua orientação, incentivo e amizade.

Ao Instituto de Química e Biotecnologia (**IQB**) da Universidade Federal de Alagoas (**UFAL**) pelo programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia (**PPGQB**), por proporcionar minha qualificação profissional.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (**CAPES**) por ter fornecido uma bolsa de mestrado.

Aos **Laboratórios de Pesquisa em Recursos Naturais** e de **Ressonância Magnética Nuclear** do IQB da Universidade Federal de Alagoas onde foram desenvolvidos os experimentos e análises.

À **Profª. Dra. Êurica Adélia Nogueira Ribeiro**, pelo apoio e por disponibilizar o Laboratório de Farmacologia Cardiovascular da Escola de Enfermagem e Farmácia (**ESENFAR**) da Universidade Federal de Alagoas (**UFAL**) para realização dos experimentos antidiabéticos.

Ao **Prof. Dr. Charles dos Santos Estevam** do Laboratório de Bioquímica e Química de Produtos Naturais (**LBPN**) da Universidade Federal de Sergipe (**UFS**) pela contribuição nos ensaios antioxidante.

Aos **professores do Instituto de Química e Biotecnologia** que contribuíram para minha formação.

Ao **Prof. Dr. João Xavier de Araújo Junior** por suas contribuições para melhoria deste trabalho.

À **Profª. Sônia Salgueiro Machado** por seus ensinamentos, apoio e contribuição.

Aos queridos amigos que conquistei **Ana Lucila, Edilson, Luciana e Rose** pelos incentivos em laboratório, pelas trocas de experiências, palavras de conforto e pelos ótimos momentos que passamos juntos.

Aos amigos **Daniel Lira, Mariana e Pedro** por sempre me incentivarem, estarem presentes e pelos ótimos momentos de confraternização vivenciados.

À querida **Cenira** por sua contribuição nos experimentos moluscicida, por sua amizade e palavras preciosas.

As colegas **Érica, Cristiane, Roberta e Amélia** que contribuíram para a parte experimental deste trabalho.

Aos queridos amigos e companheiros de laboratório, **Marcos, Milena, Micael, Edjane, Élica, Érica, Daniel Melo, Emília, Isis, Daniel Moraes e Cláudia** pelo incentivo, companheirismo e carinho.

Ao funcionário do departamento e grande amigo **Aldy** por sua valiosa contribuição no laboratório, apoio e amizade.

À querida funcionária **Margarida** que esteve presente desde o início da minha iniciação científica, por sua ajuda e carinho.

Aos funcionários da Secretaria de Pós-Graduação, pela presteza quando da solicitação de informes e documentos.

Aos meus amados amigos **Marcella, Eliete, Diogo e Thiago** por seu carinho, incentivo e acreditarem.

Ao meu amado **Narsh** e à minha grande amiga **Adriana** por sempre estarem presentes nos momentos de aflição e insegurança.

Aos meus pais **Luiz Bonifácio e Angelina Conceição** e aos meus irmãos **Julio, Amanda e Luiz Alberto** pelo amor, apoio, compreensão e por acreditarem nessa conquista.

Enfim, a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a conclusão deste trabalho.

*Isto sabemos.
Todas as coisas estão ligadas
como o sangue
que une uma família....
Tudo o que acontece com a Terra,
acontece com os filhos e filhas da Terra.
O homem não tece a teia da vida;
ele é apenas um fio.
Tudo o que faz à teia,
ele faz a si mesmo.
(Ted Perry)*

*Dedico este trabalho aos meus pais,
meus irmãos e a todos os meus
familiares pelo amor e apoio constante.*

LISTA DE FIGURAS E QUADROS

Figura 1 - Flavonóides com atividade antimicrobiana isolados de espécies do gênero <i>Combretum</i> .	18
Figura 2 - <i>Terminalia catappa</i> , árvore (a), folhas e frutos (b).	19
Figura 3 - Constituintes químicos isolados de <i>T. catappa</i> .	21
Figura 4 - Toxina seletiva das células β -pancreáticas.	26
Figura 5 - Estrutura molecular de alguns inibidores da enzima acetilcolinesterase.	28
Figura 6 - Estrutura molecular de alguns neurotransmissores.	30
Figura 7 - Biossíntese da acetilcolina (ACh)	31
Figura 8 - Hidrólise da acetilcolina	31
Figura 9 - Estruturas moleculares de alguns inibidores da acetilcolinesterase.	33
Figura 10 - Substâncias utilizadas no controle da esquistossomose.	34
Figura 11 - Substâncias moluscicida isoladas de plantas.	36
Figura 12 - Fluxograma de obtenção do extrato etanólico bruto e frações das folhas da espécie <i>Terminalia catappa</i> L.	39
Figura 13 - Fluxograma de obtenção do extrato etanólico bruto e frações das cascas do caule da espécie <i>T. catappa</i> L.	40
Figura 14 - Fluxograma de obtenção do extrato etanólico bruto e frações da madeira do caule da espécie <i>T. catappa</i> L.	41
Figura 15 - Fluxograma do isolamento dos constituintes químicos da fração em Hexano das folhas de <i>T. catappa</i> .	43
Figura 16 - Fluxograma do isolamento dos constituintes químicos da fração em clorofórmio das folhas de <i>T. catappa</i> .	45
Figura 17 - Fluxograma do fracionamento e purificação da fração em acetato de etila das folhas de <i>T. catappa</i> .	47
Figura 18 - Fluxograma do fracionamento e purificação da fração em acetato de etila das folhas de <i>T. catappa</i> .	49
Figura 19 - Fluxograma do fracionamento e purificação da fração Hexano da madeira do caule.	52
Figura 20 - Espectro na região do infravermelho da substância codificada TCFH-1.	62

Figura 21 - Espectro na região do infravermelho da substância TCFH-2.	64
Figura 22 - Espectro de RMN ^1H (400 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ 3:1) da substância TCFH-2.	66
Figura 22a - Expansão do espectro de RMN ^1H (400 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ 3:1) da substância TCFH-2.	67
Figura 23 - Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ 3:1) da substância TCFH-2.	68
Figura 24 - Espectro de RMN DEPT 135° ^{13}C (100 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ 3:1) da substância TCFH-2.	69
Figura 25 - Espectro de RMN 2D COSY de TCFH-2 em $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ 3:1.	70
Figura 26 - Espectro de RMN 2D HSQC de TCFH-2 em $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ 3:1.	71
Figura 27 - Espectro de RMN 2D HMBC de TCFH-2 em $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ 3:1.	72
Figura 28 - Espectro na região do infravermelho (ATR) da substância TCFA-1.	75
Figura 29 - Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CD_3OD) da substância TCFA-1	76
Figura 30 - Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CD_3OD) da substância TCFA-1	77
Figura 31 - Espectro na região do infravermelho das substâncias TCMH-1a e TCMH-1b obtido através da técnica de ATR	79
Figura 32 - Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) das substâncias TCMH-1a e TCMH-1b.	80
Figura 32a - Expansão do espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) das substâncias TCMH-1a e TCMH-1b.	81
Figura 33 - Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) das substâncias TCMH-1a e TCMH-1b	82
Figura 33a - Expansão do espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) das substâncias TCMH-1a e TCMH-1b.	83
Figura 34 - Espectro de RMN DEPT 135° ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) das substâncias TCMH-1a e TCM-1b.	84
Figura 35 - Espectro de RMN DEPT 90° ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) das substâncias TCMH-1a e TCM-1b.	85
Figura 36 - Porcentagem da atividade antioxidante dos extratos etanólicos de <i>T. catappa</i> frente ao radical DPPH.	92

Figura 37 - Comportamento cinético dos extratos etanólicos de <i>T. catappa</i> , frente ao radical DPPH.	93
Figura 38 - Comportamento dos extratos brutos de <i>T. catappa</i> e controle Ácido Gálico frente ao agente indutor de dano oxidativo H ₂ O ₂ . Os valores são significativos a p≤0,05.	94
Figura 39 - Reações para detecção de atividade anticolinesterásica pelo método de Ellman.	95
Quadro 1 - Fracionamento em gel de sílica da fração em n-C ₆ H ₁₄ das folhas.	42
Quadro 2 - Fracionamento em gel de sílica da fração em CHCl ₃ (16,28 g) das folhas.	44
Quadro 3 - Fracionamento em gel de sílica da fração II-1 (10,88 g).	44
Quadro 4 - Fracionamento em gel de sílica da fração AcOEt (78,5 g), das folhas.	46
Quadro 5 - Cromatografia em coluna de gel de sílica da fração fração V (AcOEt : MeOH 1:1) (15,0 g) das folhas.	48
Quadro 6 - Fracionamento cromatográfico da fração em hexano da madeira do caule de <i>T. catappa</i> .	51

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Dados de RMN ^1H , ^{13}C , HSQC, COSY e HMBC para a amostra TCFH-2. Valores de deslocamento químico em ppm, solvente $\text{CDCl}_3:\text{CD}_3\text{OD}$ 3:1. 65
- Tabela 2** - Resultados experimentais de RMN (^{13}C : 100 MHz, CD_3OD) da substância TCFA-1 e do ácido gálico comparados com a literatura (ALMEIDA *et al.*, 2005). 74
- Tabela 3** - Resultados experimentais de RMN (^{13}C : 100 MHz, CDCl_3) das substâncias TCMH-1a e TCM-1b, do Sitosterol e Estigmasterol comparados com a literatura (BORGES, 2006). 86
- Tabela 4** - Médias glicêmicas antes do tratamento e após quinze dias de tratamento. 89
- Tabela 5** - Determinação do conteúdo de fenóis totais e DPPH quantitativo dos extratos etanólicos de *T. catappa*. 90
- Tabela 6** - Atividade anticolinesterásica qualitativa dos extratos e frações de *T. catappa* na concentração de 3 mg/mL.. 96
- Tabela 7** - Atividade anticolinesterásica quantitativa do extrato e frações de *T. catappa*, na concentração de 3 mg/mL. 96
- Tabela 8** - Atividade moluscicida dos extratos etanólico de *T. catappa* frente ao *B. glabrata* após 24 horas de exposição e 72 horas de observação. 98
- Tabela 9** - Atividade moluscicida do extrato etanólico da casca do caule de *T. catappa* frente ao *B. glabrata* após 24 horas de exposição e 72 de observação. 86
- Tabela 10** - Atividade moluscicida do extrato etanólico da madeira do caule de *T. catappa* frente ao *B. glabrata* após 24 horas de exposição e 72 de observação. 99

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Acetil-CoA – acetil-coenzima A

ATCI - acetiltiocolina

AcOEt – Acetato de Etila

AChE – Acetilcolinesterase

ACh – Acetilcolina

CAT – Colina-acetiltransferase

CCD – Cromatografia em Camada Delgada

CDCl_3 - Clorofórmio Deuterado

CD_3OD – Metanol Deuterado

CHCl_3 – Clorofórmio

CL – Concentração letal

CI – Concentração Inibitória

DA – Doença de Alzheimer

DEPT – Distortionless Enhancement by Polarization Transfer

DM – Diabetes Melito

DMSO - Dimetilsulfóxido

DPPH - 2,2 difenil-1-picril hidrazil

DTNB - ácido 5,5'-ditiobis-[2-nitrobenzóico]

D_2O – Água Deuterada

EAG – Equivalentes de Ácido Gálico

EtOH - Etanol

FDA - Food and Drug Administration

Hz - Hertz

IACHe – Inibidores da acetilcolinesterase

IV – Infravermelho

IP – Percentual de Inibição

MeOH – Metanol

n-BuOH – n-butanol

C_6H_{14} - hexano

RMN ^{13}C – Ressonância Magnética Nuclear de Carbono treze

RMN ^1H - Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

RESUMO

A espécie *Terminalia catappa* L. (Combretaceae) é uma planta originária da Malásia distribuí-se em regiões tropicais e subtropicais, no Brasil é popularmente conhecida como chapéu de sol ou amendoeira. O gênero destaca-se por apresentar uma variedade de metabólitos bioativos como taninos, flavonóides e triterpenóides. O presente trabalho teve como objetivo o estudo fitoquímico e biológico de *T. catappa*. Foram preparados extratos etanólicos (Ext. EtOH) das folhas, casca e madeira do caule que foram submetidos aos fracionamentos por partição líquido-líquido e cromatográfico. As frações em hexano e acetato de etila das folhas conduziram ao isolamento do ácido asiático e do ácido gálico respectivamente. Os fitoesteróides sitosterol e estigmasterol foram isolados da fração em hexano da madeira do caule. A elucidação estrutural dessas substâncias foi realizada através de espectrometrias de infravermelho e RMN 1D (^1H , ^{13}C , DEPT 90° e DEPT 135°) e 2D (COSY, HSQC e HMBC). No teste antidiabético *in vivo* o extrato etanólico da casca do caule foi ativo, apresentando reduções significativas de 53 % ($p < 0,01$) da glicose sanguínea, em ratos com diabetes induzido por aloxano, na dose de 300 mg/Kg. No ensaio antioxidante com DPPH o extrato etanólico da casca do caule apresentou maior atividade antioxidante com $\text{CI}_{50} = 5,97 \pm 0,74$ quando comparado aos extratos da folha $\text{CI}_{50} = 9,56 \pm 0,25$ e madeira do caule $\text{CI}_{50} = 7,85 \pm 0,50$. Utilizou-se como controle positivo o ácido gálico ($\text{CI}_{50} = 1,51 \pm 0,18$). Os extratos etanólicos apresentaram alto teor de compostos fenólicos, no entanto, o extrato da casca do caule foi o que apresentou maior conteúdo fenólico ($338,53 \pm 31,09$), o que provavelmente contribuiu para sua maior atividade antioxidante. Nos ensaios anticolinesterásicos os extratos não apresentaram inibição significativa. Nos ensaios moluscicida o extrato etanólico da madeira do caule apresentou significativa atividade com $\text{CL}_{50} = 21,49$ mg/L e $\text{CL}_{90} = 54,64$ mg/L, extratos cuja $\text{CL}_{50} \leq 40$ mg/L são promissores para o uso de controle de caramujo *Biomphalaria glabrata*. Em síntese, esses resultados indicam atividades antidiabética do Ext. EtOH da casca do caule e moluscicida do Ext. EtOH da madeira do caule pela primeira vez relatadas, e ampliam o conhecimento sobre o potencial farmacológico de *T. catappa*.

Palavras chave: *Terminalia catappa*. Combretaceae. Atividade antidiabética.

ABSTRACT

The species *Terminalia catappa* L. (Combretaceae) is a plant native to Malaysia is distributed in tropical and subtropical regions, in Brazil it is popularly known as a sun hat or almond. The genus is notable for presenting a variety of bioactive metabolites such as tannins, flavonoids and triterpenoids. This work aimed to study the phytochemical and biological *T. catappa*. Ethanol extracts were prepared (Ext. EtOH) of the leaves, bark and wood of the stem that were submitted to fractionation by liquid-liquid partition and chromatographic. The fractions in hexane and ethyl acetate sheets led to the isolation of Asiatic acid and gallic acid respectively. The phytosteroids sitosterol and stigmasterol were isolated from the hexane fraction of stem wood. The Structure elucidation was performed by infrared spectroscopy and 1D NMR (¹H, ¹³C, DEPT 90 and DEPT 135) and 2D (COSY, HSQC and HMBC). In vivo antidiabetic test the ethanol extract of stem bark was active, showing significant reductions of 53% (p <0.01) blood glucose in rats with diabetes induced by alloxan in a dose of 300 mg / kg. In the test antioxidant with DPPH ethanol extract of stem bark showed the highest antioxidant activity with IC₅₀ = 5.97 ± 0.74 compared to leaf extracts IC₅₀ = 9.56 ± 0.25 and stem wood IC₅₀ = 7.85 ± 0.50. It was used as positive control gallic acid (IC₅₀ = 1.51 ± 0.18). Ethanol extracts showed high concentration of phenolic compounds, however, the stem bark extract showed the highest phenolic content (338.53 ± 31.09), which probably contributed to its higher antioxidant activity. In tests anticholinesterase extracts showed no significant inhibition. Over the molluscicide tests the ethanol extract of stem wood had significant activity with LC₅₀ = 21.49 mg / L and LC₉₀ = 54, 64 mg / L, which extracts LC₅₀ ≤ 40 mg / L are promising for use in controlling snail *Biomphalaria glabrata*. In summary, these results indicate antidiabetic activities of EtOH Ext stem bark and the molluscicidal Ext EtOH of stem wood for the first time reported, and broaden the knowledge about the pharmacological potential of *T. catappa*.

Keywords: *Terminalia catappa*. Combretaceae. Antidiabetic activity.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 Objetivos	16
1.2 Considerações sobre a família Combretaceae	17
1.3 Considerações sobre a espécie vegetal <i>Terminalia catappa</i> L.	18
1.3.1 Aspectos taxonômicos	18
1.3.2 Utilização na medicina popular	19
1.3.3 Composição química e atividades farmacológicas	20
1.4 Considerações sobre a diabetes melito	22
1.4.1 Considerações gerais	22
1.4.2 Plantas medicinais com atividade hipoglicemiante	24
1.5 Considerações sobre a atividade antioxidante	26
1.6 Considerações sobre os anticolinesterásicos	27
1.6.1 Plantas medicinais como uma fonte de inibidores da enzima acetilcolinesterase	27
1.6.2 Fisiologia da doença de Alzheimer	29
1.6.3 Acetilcolina e acetilcolinesterase: biossíntese e função	30
1.6.4 Hipótese colinérgica	31
1.6.5 Tratamentos para a doença de Alzheimer (DA)	32
1.7 Considerações sobre a esquistossomose mansônica	33
1.7.1 Moluscidas de origem vegetal	35
2 EXPERIMENTAL	37
2.1 Condições experimentais: reagentes, solventes e equipamentos	37
2.2 Coleta e identificação do material vegetal	38
2.3 Preparações dos extratos e frações de <i>T. catappa</i>	38
2.4 Fracionamento e purificação dos constituintes químicos de <i>T. catappa</i>	42
2.4.1 Folhas	42
2.4.2 Casca do caule	50
2.4.3 Madeira do caule	50
2.5 Avaliação do potencial antidiabético	53
2.6 Quantificação de fenóis totais – Método de Folin-Ciocalteu	54

2.7 Avaliação da atividade antioxidante	55
2.7.1 Avaliação seqüestrante de radical DPPH	55
2.7.2 Ensaio TBARS (Substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico)	57
2.8 Avaliação da atividade anticolinesterásica	58
2.9 Avaliação da atividade moluscicida	60
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	62
3.1 Estudo Fitoquímico	62
3.2 Identificação e determinação estrutural	63
3.2.1 Identificação estrutural da substância TCFH-2	63
3.2.2 Identificação estrutural da substância TCFA-1	73
3.2.3 Identificação estrutural das substâncias TCMH-1a e TCMH-1b	78
3.3 Ensaios Biológicos	87
3.3.1 Atividade antidiabética	87
3.3.2 Resultados da determinação do teor de fenóis totais	89
3.3.3 Resultados da avaliação quantitativa frente ao DPPH	91
3.3.4 Resultados da avaliação quantitativa frente ao TBARS	93
3.3.5 Resultados da avaliação anticolinesterásica	94
3.3.6 Resultados da avaliação moluscicida	97
4 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	99
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	100

1 INTRODUÇÃO

O uso de plantas medicinais, para o tratamento, cura e prevenção de doenças é uma das mais antigas práticas medicinais da humanidade (VEIGA JR. & PINTO, 2005). As observações populares sobre o uso e a eficácia de plantas medicinais contribuem de forma relevante para a divulgação das propriedades terapêuticas dos vegetais, pelos efeitos medicinais que produzem, apesar de não terem seus constituintes químicos conhecidos (MACIEL *et al.*, 2002).

A prática fitoterápica proporciona um crescimento no estudo científico para se comprovar a eficácia dessas plantas medicinais, com isso muitos fármacos da medicina ocidental são baseados em compostos de ocorrência natural de plantas utilizadas na medicina tradicional (LIMA, 2005).

Pelo fato das plantas constituírem uma fonte importante para a descoberta de novas substâncias biologicamente ativas, nos últimos anos, tem-se verificado um grande avanço científico na química de produtos naturais principalmente com vistas à obtenção de novos compostos com propriedades terapêuticas (CECHINEL FILHO & YUNES, 1998; DI STASI *et al.*, 2002).

O Brasil, país com maior diversidade genética vegetal do mundo, conta com cerca de 55 mil espécies catalogadas, de um total que varia entre 250 a 500 mil espécies de plantas existentes na flora mundial. Desse total, menos de 10% já foram avaliadas em relação aos aspectos biológicos, e, até meados dos anos 1990, apenas cerca de 5% tiveram estudos acerca de aspectos químicos (LUNA *et al.*, 2005). Ultimamente, tem ocorrido um grande avanço na química de produtos naturais visando à obtenção de novos compostos com propriedades terapêuticas e efetivas no controle de pragas (DI STASI *et al.*, 2002).

Através destas informações, pode-se concluir que, de forma geral, as plantas superiores são, ainda, pouco exploradas do ponto de vista químico, e a submissão de frações dos extratos, a testes biológicos e farmacológicos é ainda menor (CECHINEL FILHO & YUNES, 1998). Dentre os estudos biológicos nessa área, nos últimos anos, têm se destacado aqueles que visam o controle de vetores ou mesmo de diversas doenças de interesse a Saúde Pública.

Problemas como esses têm direcionado a procura de estratégias alternativas de controle, onde se incluem a utilização de extratos vegetais e de substâncias naturais que poderia apresentar baixo custo, além de ser mais facilmente disponível (COSTA *et al.*, 2005; SIMAS *et al.*, 2004).

No Brasil, dentre as espécies vegetais onde essas substâncias podem ser encontradas, têm-se a espécie *Terminalia catappa* L. (Combretaceae). É uma das árvores de sombra comum ao longo de todo litoral brasileiro, sendo popularmente conhecida como chapéu-de-sol ou amendoeira (CRUZ, 1982; ROCHA, 2005). Apesar de ser uma espécie bastante comum no litoral brasileiro os estudos que evidenciaram uma grande variedade de substâncias químicas e farmacologicamente ativas foram realizados com plantas nativas da Ásia (MAU *et al.*, 2003; FAN *et al.*, 2004; GAO *et al.*, 2004) e África (BABAYI *et al.*, 2004).

Desta forma o presente trabalho teve o objetivo de contribuir para o conhecimento fitoquímico da espécie vegetal *T. catappa* presente no Estado de Alagoas, através do estudo químico e biológico dos extratos das folhas, casca e madeira do caule.

1.1 Objetivos

- **Geral**

Realizar estudo fitoquímico e avaliar as atividades biológicas das folhas, casca e madeira do caule de *T. catappa* L.

- **Objetivos específicos**

a) Isolar os constituintes químicos das folhas, cascas e madeira do caule de *T. catappa*;

b) Avaliar as atividades antidiabética, antioxidante, anticolinesterásica e moluscicida dos extratos e frações das folhas, casca e madeira do caule de *T. catappa*;

1.2 Considerações sobre a Família Combretaceae

As plantas pertencentes à família Combretaceae são árvores, arbustos e lianas, de ocorrência tropical e subtropical, distribuídas em cerca de 600 espécies (JOLY, 1985; KATERERE *et al.*, 2003). Essa família é constituída de 18 gêneros, os dois gêneros de maior ocorrência são *Terminalia* e *Combretum*, cada um com 250 espécies, sendo extensivamente usadas na medicina tradicional da África e de alguns países do sudeste da Ásia como laxativas, carminativas, para combater disenterias, diarréias e diabetes (KHAN *et al.*, 2002; NAGAPPA *et al.*, 2003; FAN *et al.*, 2004). Do ponto de vista químico é uma família muito versátil fornecendo flavonóides, triterpenóides, lignanas, cardenólídeos e taninos (YADAVA & RATHORE, 2000; LIN *et al.*, 2000; KHAN *et al.*, 2002; GARCEZ *et al.*, 2003).

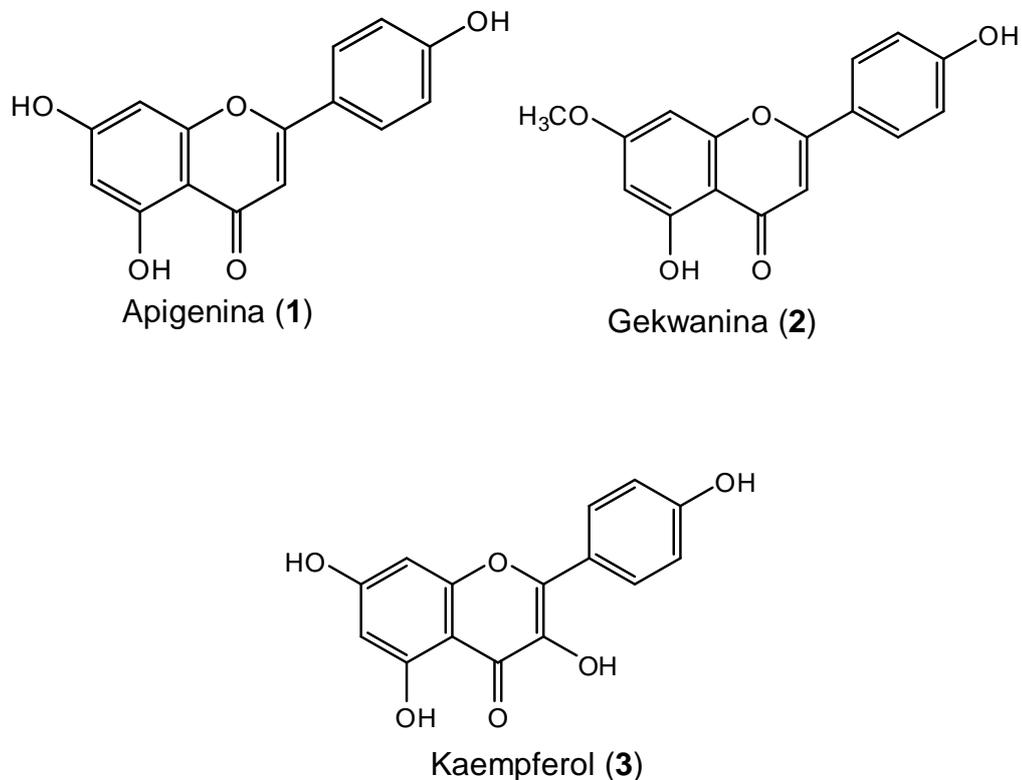
Populações do sul da África utilizam plantas da família Combretaceae para o tratamento de dores abdominais, dor nas costas, dor de ouvido, dor de dente e dor de cabeça, contra a esquistossomose, resfriados, conjuntivites, diarréia, parasitos intestinais, infertilidade feminina, lepra, pneumonia, mordida de cobras, sífilis e caxumba (MCGAW *et al.*, 2001).

As plantas do gênero *Terminalia* apresentam diversas atividades farmacológicas reveladas pelos extratos ou substâncias isoladas, tais como antimicrobiana, antioxidante, antidiabética, anti-HIV-1, antimalárica, e outras (GARCEZ *et al.*, 2003; ARAÚJO & CHAVES, 2005).

As espécies pertencentes ao gênero *Terminalia* são amplamente distribuídas nas áreas tropicais do mundo e conhecidas como fonte rica de metabólitos secundários, tais como triterpenóides pentacíclicos e seus derivados glicosilados, taninos, flavonóides, e compostos aromáticos (SIMÕES *et al.*, 2003; ARAÚJO & CHAVES, 2005).

Várias espécies do gênero *Combretum* apresentaram atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, devido a flavonóides como a apigenina (1), genkwanina (2) e kaempferol (3) (**Figura 1, p 5**). Estes compostos também apresentam atividade significativa contra *Vibrio cholerae* e *Enterococcus faecalis*. Além disso, foi demonstrada a atividade antifúngica devido à presença de taninos e saponinas. O extrato metanólico das folhas de *Combretum micranthum* apresentou atividade antiinflamatória (PIETROVSKI, 2004).

Figura 1 - Flavonóides com atividade antimicrobiana isolados de espécies do gênero *Combretum*.



Fonte: (PIETROVSKI, 2004)

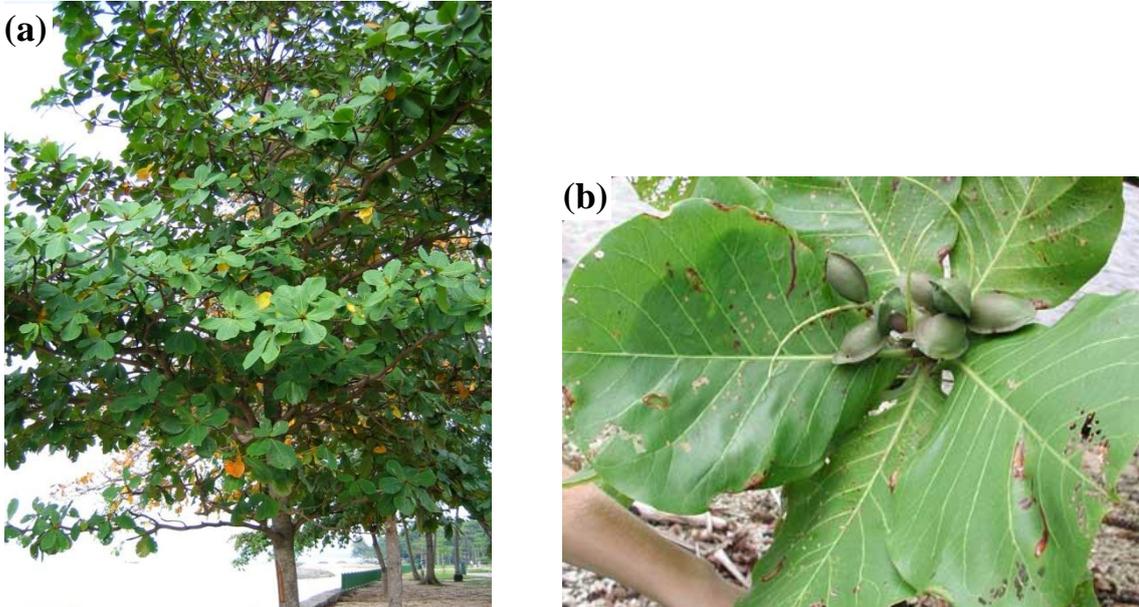
1.3 Considerações sobre a Espécie Vegetal *Terminalia catappa* L.

1.3.1 Aspectos Taxonômicos

A espécie vegetal *Terminalia catappa* L. pertencente à família Combretaceae é originária da Malásia. É uma árvore amplamente distribuída em regiões litorâneas tropicais e subtropicais (FAN *et al.*, 2004; KELSEY *et al.*, 1984) (**Figura 2, p 6**). É uma árvore de tronco alto, áspero e tortuoso, os galhos são dispostos horizontalmente. Esta árvore chama atenção pela grandiosa copa e folhas grandes que são quase sésseis, obcordiformes, e agrupadas nas extremidades dos ramos, cuja coloração dependendo da idade, vai do verde intenso ao vermelho rubro. As flores são pequenas de coloração branco-rósea, apétalas dispostas em espigas axilares e drupa elíptica, glabra e achatada com cerca de 5 cm de comprimento, indeiscente e de mesocarpo comestível. Os frutos são amarelos ou vermelho claro, a casca do caule é adstringente com alto grau de taninos. É uma planta bastante

encontrada em praias devido à facilidade de se desenvolver perfeitamente nos terrenos arenosos, salinos e resistir aos efeitos do vento (BRAGA, 1976).

Figura 2 - *Terminalia catappa*, árvore (a), folhas e frutos (b).



Fonte: www.moorea.berkeley.edu/.../terminalia_catappa.jpg (acessado em setembro de 2008).

Classificação sistemática da espécie T. catappa

Reino	Plantae
Subreino	Tracheobionta
Superdivisão	Spermatophyta
Divisão	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Ordem	Myrtales
Família	Combretaceae
Gênero	<i>Terminalia</i> L., 1767
Espécie	<i>Terminalia catappa</i> L., 1767

1.3.2 Utilização na Medicina Popular

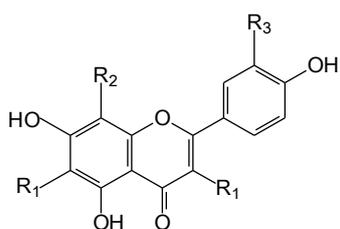
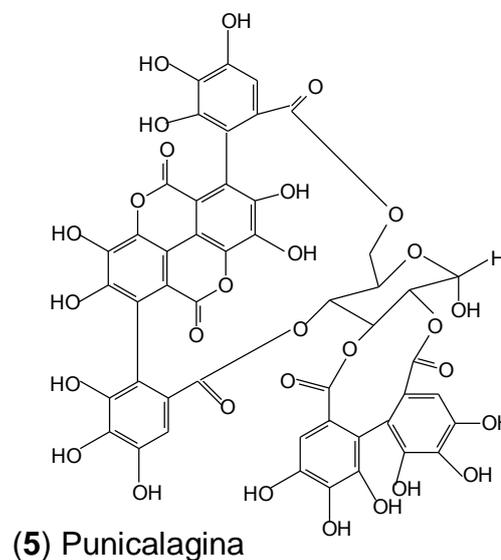
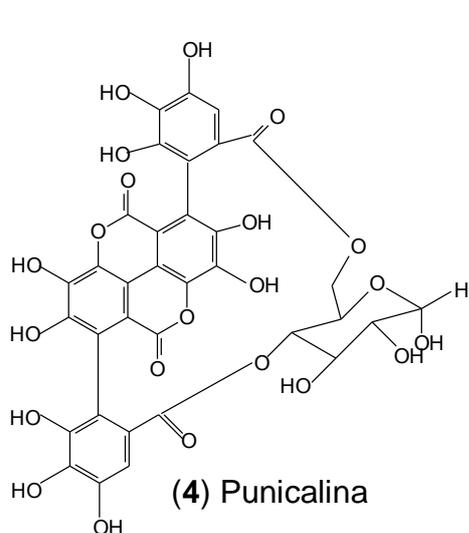
A espécie *T. catappa*, apesar de exótica, tem sido utilizada no Brasil para tratamento das moléstias das vias respiratórias, no combate a disenterias e diarreias (CORRÊA, 1984; CRUZ, 1982). Em alguns países do sudeste da Ásia é utilizada na medicina popular, como antipirético, no combate às diarreias, dermatites, hepatite e diabetes, e na prevenção de hepatoma (CHEN *et al.*, 2000; NAGAPPA *et al.*, 2003;

GOUN *et al.*, 2003; GAO *et al.*, 2004, CHYAU *et al.*, 2006). Na Índia, Filipinas, Malásia e Indonésia, as folhas, cascas e frutos são usados comumente na medicina popular como, antidiarréico, antipirético e hemostático. Em Taiwan, as folhas de *T. catappa* são usadas para a prevenção e tratamento de hepatites e doenças do fígado (CHYAU *et al.*, 2006).

1.3.3 Composição Química e Atividades Farmacológicas

A revisão da literatura relacionada a espécie *T. catappa* revelou que os estudos de investigação química e de ação biológica efetuados são recentes e utilizaram plantas nativas da Ásia (MAU *et al.*, 2003; FAN *et al.*, 2004; GAO *et al.*, 2004) e África (BABAYI *et al.*, 2004). Tais estudos químicos focalizam a presença de taninos hidrolisáveis nas folhas, como constituintes majoritários, dentre os quais a punicalina (**4**) e a punicalagina (**5**) (CHEN *et al.*, 2000; LIN *et al.* 2000); flavonóides glicosilados (**6-10**) foram isolados da fração em n-butanol do extrato etanólico das folhas (LIN *et al.*, 2000); ácidos triterpênicos, como o ácido ursólico (**11**) e o ácido 2 α , 3 β , 23-triidroxi -12-en-28-óico (**12**) foram isolados da fração em clorofórmio do extrato etanólico das folhas e considerados possíveis responsáveis pela atividade antiinflamatória apresentada pela fração clorofórmica das folhas (FAN *et al.*, 2004). Em adição, foram isolados das folhas compostos fenólicos, bem como compostos voláteis (CHYAU *et al.*, 2006; MAU *et al.*, 2003; LIN *et al.*, 2000; FAN *et al.*, 2004).

Figura 3 - Constituintes químicos isolados de *T. catappa*.



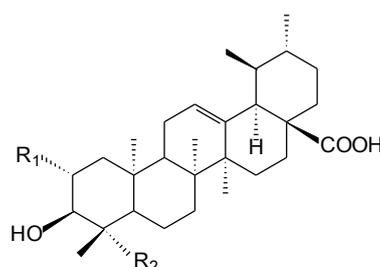
(6) $R_1 = \text{C-}\beta\text{-D-glicosil (2''-galoil)}$, $R_2 = R_3 = R_4 = \text{H}$

(7) $R_1 = R_3 = R_4 = \text{H}$, $R_2 = \text{C-}\beta\text{-D-glicosil(2''-galoil)}$

(8) $R_1 = \text{C-}\beta\text{-D-glicosil}$, $R_2 = R_3 = R_4 = \text{H}$

(9) $R_1 = R_3 = R_4 = \text{H}$, $R_2 = \text{C-}\beta\text{-D-glicosil}$

(10) $R_1 = \text{C-}\beta\text{-D-glicosil}$, $R_2 = R_4 = \text{H}$, $R_3 = \text{OH}$



(11) $R_1 = \text{H}$, $R_2 = \text{CH}_3$

(12) $R_1 = \text{OH}$, $R_2 = \text{CH}_2\text{OH}$

Fonte: (CHEN *et al.*, 2000; LIN *et al.* 2000; CHYAU *et al.*, 2006; MAU *et al.*, 2003; LIN *et al.*, 2000; FAN *et al.*, 2004)

Plantas ricas em taninos, tais como *T. catappa*, são empregadas na medicina tradicional como remédios para o tratamento de diversas moléstias orgânicas, como diarreia, reumatismo, hemorragias, feridas, queimaduras, problemas estomacais, hipertensão arterial, problemas renais e do sistema urinário e processos inflamatórios (HASLAM, 1996). Apesar da ocorrência de taninos em *T. catappa*, e considerando que os mesmos são candidatos a agentes moluscidas, ainda não há relato na literatura desse tipo de ação. Nas últimas décadas, vários grupos de

pesquisa têm investigado as atividades farmacológica e biológica dos taninos. Testes *in vitro* realizados com extratos ricos em taninos ou com taninos puros têm identificado diversas atividades biológicas dessa classe de substâncias. Dentre essas atividades destacam-se: ação bactericida, fungicida, antiviral, antioxidante, antitumoral, antidiabética e elevada atividade moluscicida (MARSTON & HOSTETTMANN, 1985; SIMÕES, 2003).

Os compostos fenólicos presente na espécie *T. catappa* também são responsáveis pelas atividades antidiabética e antioxidante de extratos provenientes de várias partes da planta (AHMED *et al.*, 2005; NAGAPPA *et al.*, 2003), até o presente momento a literatura não menciona tais atividades utilizando a casca do caule. Estudos de atividade farmacológica de extratos de folhas, cascas e frutos de *T. catappa* revelaram atividade anticâncer, anti-HIV, antiinflamatória e hepatoprotetora (CHYAU *et al.*, 2002; GAO *et al.*, 2004; TANG *et al.*, 2006; CHYAU *et al.*, 2006).

1.4 Considerações Sobre a Diabetes Melito

1.4.1 Considerações Gerais

A Diabetes Melito (DM) é uma doença caracterizada por distúrbios metabólicos que apresentam em comum a hiperglicemia. Essa hiperglicemia é decorrente da deficiência na produção e/ou ação de insulina. Além da hiperglicemia crônica a DM está freqüentemente associada a distúrbios no metabolismo de proteínas e lipídios, causando danos a vários sistemas no organismo principalmente o sistema nervoso e vascular (FOLADOR, 2009; LINO, 2008).

Clinicamente existem duas classificações gerais para a diabetes: Tipo 1 (DM1) e tipo 2 (DM2), são formas de maior incidência, prevalência e importância clínica. A DM1 atinge cerca de 5-10 % dos pacientes e ocorre devido à destruição auto-imune das células β das ilhotas de Langerhans ou ilhotas pancreáticas, estas células são responsáveis pela produção dos hormônios peptídeos insulina, glucagon e somatostatina. A DM2 atinge 90-95 % dos pacientes e se caracteriza por resistência à insulina ou deficiência na sua secreção (BRAGA, 2008).

A DM afeta cerca de 246 milhões de pessoas em todo o mundo. Até 2025, a previsão é que esse número atinja 380 milhões. Estima-se que boa parte das

peças que têm diabetes desconheça a sua própria condição. No Brasil, a ocorrência média da diabetes na população adulta (acima de 18 anos) é de 5,2 %. A prevalência da doença aumenta com a idade. A diabetes atinge 18,6 % da população com idade superior a 65 anos (BRASIL, 2007).

A expectativa de vida em pacientes diabéticos é diminuída à metade, especialmente nos países em desenvolvimento, onde a prevalência está aumentando e o tratamento adequado geralmente não está disponível. A DM está associada a complicações que comprometem a produtividade, a qualidade de vida e a sobrevivência dos indivíduos. Além disso, acarreta altos custos para seu controle metabólico e tratamento de suas complicações. No Brasil, os custos totais estimados para a diabetes, no ano de 2002, foram de cerca de 22 milhões de dólares. Estes fatos justificam a busca de novos compostos eficazes para o tratamento da DM a partir de plantas medicinais regionais mais acessíveis à população (LINO, 2008; CARVALHO, *et al.*, 2005).

O tratamento inicial da diabetes, geralmente envolve mudanças do estilo de vida especialmente relacionadas à dieta, exercício físico e controle de peso. Quando o controle da glicemia não é atingido com tais medidas, opções farmacológicas devem ser escolhidas de acordo com cada caso (FOLADOR, 2009)

Na Diabetes tipo 1 o tratamento baseia-se na terapia com insulina, quando o controle glicêmico com os hipoglicemiantes orais não é alcançado, a insulina se torna a alternativa para os diabéticos tipo 2. A administração por via subcutânea com frequência requer múltiplas doses de injeção por dia. Além disso, apresenta um risco considerável de hipoglicemia e requer o auto-monitoramento regular da glicemia pelo paciente (FOLADOR, 2009).

Os hipoglicemiantes orais são medicamentos utilizados na terapia da diabetes tipo 2, principalmente em pacientes que apresentam a doença após os 40 anos. Os principais grupos de agente hipoglicemiantes orais são: Sulfonilurías; Meglitinidas; Biguanidas; Inibidores da alfa-glicosidase; Tiazolidinadonas; estimulantes da secreção de insulina não-sulfoniluréia ou análogos da meglitinida; Derivados da D-fenilalanina; Inibidores da enzima DPP-4 (dipeptidil peptidase). Os agentes hipoglicemiantes orais atuam por diferentes mecanismos de ação: (1) aumento do suprimento insulínico, os chamados secretagogos de insulina (sulfonilurías, análogos da meglitinida, e, derivados da D-fenilalanina); (2) aumento da ação insulínica, também conhecidos como sensibilizadores da insulina

(biguanidas, tiazolidinedionas) e (3) inibidores da absorção rápida de carboidratos, pois atuam retardando a sua absorção (inibidores da α - glicosidase) (OLIVEIRA, 2008).

Apesar dos antiabéticos orais e a insulina apresentarem efeitos eficazes na terapêutica do DM, estes possuem efeitos colaterais que dificultam seu uso, além de seu elevado custo. A busca por plantas ou compostos naturais com atividade antidiabética vem suprir a necessidade de novos compostos ativos, menos tóxicos e possivelmente mais acessíveis à população (CARVALHO *et al.*, 2005).

1.4.2 Plantas Medicinais com Atividade Hipoglicemiante

Muitas espécies de plantas têm sido usadas etnofarmacologicamente em vários países do mundo como um tratamento alternativo para o diabetes melito. Essas espécies são conhecidas na medicina tradicional de diferentes culturas pelas propriedades hipoglicemiantes. Plantas de vários gêneros possuem comprovada atividade hipoglicemiante como, *Mormodica charantia* Linn (Cucurbitaceae), *Mucuna pruriens* (L.) DC. (Fabaceae), *Brassica juncea* L. (Brassicaceae), *Zygophyllum gaetulum* Emb. (Zygophyllaceae), *Aloe vera* (L.) Burm. Fil. (Liliaceae) (VIRDI *et al.*, 2003; RATHI *et al.*, 2002; GROVER *et al.*, 2002; JAOWHARI *et al.*, 1999; OKYAR *et al.*, 2001).

Entre as espécies de interesse medicinal no tratamento da diabetes, têm-se o gênero *Terminalia*. Estudos demonstram que a administração oral do extrato etanólico dos frutos de *Terminalia pallida* Brandis (Combretaceae) apresenta atividade anti-hiperglicemiante em ratos que tiveram a diabetes induzida por aloxano (RAO, *et al.*, 2003). O extrato de *Terminalia bellirica* Roxb (Combretaceae) apresentou atividade na redução do nível de glicose do soro. Extrato metanólico dos frutos de *T. bellirica* reduziu 54 % da hiperglicemia em ratos que tiveram a diabetes induzida por aloxano (SABU & KUTTAN, 2009). os extratos dos frutos de *T. bellirica* estimulam a secreção de insulina (KASABRI *et al.*, 2010) .

O extrato clorofórmico das sementes de *Terminalia chebula* reduziu a glicose do soro sanguíneo de ratos que tiveram a diabetes induzida por estreptozotocina (RAO & NAMMI, 2006). AHMED *et al.*, (2005) em seus estudos comprovam que extrato aquoso das folhas de *T. catappa* exibiram significativa atividade antidiabética. Extrato dos frutos de *T. catappa* diminuiu os níveis de glicose no soro sanguíneo de

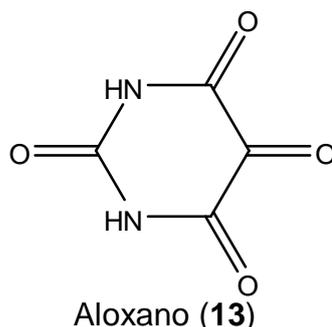
ratos que tiveram a diabetes induzida por aloxano (NAGAPPA *et al.*, 2003). Até o presente momento, estudos da avaliação do potencial antidiabético da casca do caule de *T.catappa* não foram encontrados.

A maioria das plantas quando avaliadas farmacologicamente confirmam a atividade hipoglicemiante e constituintes químicos que podem ser utilizados como modelos para novos antidiabéticos. Estudos comprovam que muitas substâncias extraídas de plantas reduzem o nível de glicose no sangue, a grande variedade de classes químicas dessas substâncias indica que diferentes mecanismos de ação devem estar envolvidos na ação da redução do nível de glicose no sangue (NEGRI, 2005).

Os mecanismos de ação pelos quais as plantas baixam a taxa de glicose do sangue pode ser atribuído aos seguintes fatores: aumento da liberação de insulina através da estimulação das células β -pancreáticas; resistência aos hormônios que aumentam a taxa de glicose; aumento do número e da sensibilidade do sítio receptor de insulina; diminuição da perda de glicogênio; aumento do consumo de glicose nos tecidos e órgãos; eliminação de radicais livres; resistência á peroxidação de lipídeos; correção da desordem metabólica causada em lipídios e proteínas e estímulo ao aumento da microcirculação do sangue no organismo (MARLES & FARNSWORTH, 1995; HUO *et al.*, 2003; SAID *et al.*, 2002; LI *et al.*, 2004; VOLPATO *et al.*, 2002).

Nos ensaios antidiabéticos *in vivo*, os modelos mais utilizados para o estudo do diabetes são roedores tratados com aloxano (13). O aloxano, um derivado da pirimidina, é uma toxina muito seletiva das células β -pancreáticas por causar a inibição da glicoquinase. A glicoquinase é uma enzima que entra em atividade quando os níveis de glicose no sangue são altos. Ela atua sobre a glicose transformando-a em glicose 6-fosfato, a qual será armazenada no fígado na forma de glicogênio. No diabetes melito há uma deficiência na produção de glicoquinase em virtude da falta de insulina (NEGRI, 2005).

Figura 4 - Toxina seletiva das células β -pancreáticas.



Fonte: (NEGRI, 2005)

1.5 Considerações sobre a Atividade Antioxidante

Os antioxidantes podem ser definidos como substâncias que, presentes em baixas concentrações inibem a oxidação de um substrato. Alguns antioxidantes são proteínas e enzimas, enquanto outros são pequenas moléculas (NIKI, 2010). O conhecimento sobre antioxidantes tem aumentado devido principalmente, aos estudos dos efeitos dos radicais livres sobre os organismos vivos na etiologia de várias doenças.

O estresse oxidativo provocado pelos radicais livres é a causa de muitas doenças humanas como o câncer, enfisema, cirrose, aterosclerose e artrite (ALVES, 2007; CHYAU *et al.*, 2006). Estudos comprovam que os antioxidantes estão relacionados com a redução do risco de doenças crônicas tais como: doença vascular, câncer, diabetes, doença de Alzheimer e de Parkinson (ARGOLO *et al.*, 2004; GUENDEZ *et al.*, 2005; LIN & CHANG *et al.*, 2005; ZHANG & HAMAUZU *et al.*, 2004).

Radicais livres são espécies químicas que possuem um ou mais elétrons desemparelhados na camada mais externa, esses elétrons desemparelhados têm propriedades de alterar a reatividade química de um átomo ou molécula o que os tornam extremamente instáveis e reativos em particular com moléculas essenciais nas membranas celulares e ácidos nucleicos (KONRATH, 2006). Esses radicais livres que possuem o elétron desemparelhado centrado no átomo de oxigênio ou nitrogênio são denominados espécies reativas de oxigênio (EROs) ou espécies reativas de nitrogênio (ERNs) (KAPPEL, 2007).

As espécies reativas de oxigênio são: ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radical hidroxila (OH^{\cdot}), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical lipídico (L^{\cdot}), entre outros. As espécies reativas de nitrogênio são óxido nítrico (NO^{\cdot}), dióxido de nitrogênio (NO_2^{\cdot}), peroxinitrito ($ONOO^{\cdot}$). São importantes nos processos biológicos de produção de energia e fagocitose, mas podem causar instabilidade química acarretando danos à saúde. (RUFINO, 2007).

A maioria dos organismos são bem protegidos contra os danos causados pelos radicais livres, através de antioxidantes que podem ser de origem endógena agindo enzimaticamente, como a superóxido desmutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx) ou antioxidantes oriundos da dieta tais como α -tocoferol (vitamina E), β -caroteno (pro-vitamina A), ascorbato (vitamina C), compostos fenólicos (ácidos fenólicos e flavonóides) (KAPPEL, 2007).

Quando os mecanismos de proteção entram em desequilíbrio por fatores como envelhecimento e alteração de funções fisiológicas podem resultar em doenças e aceleração do envelhecimento (CHYAU *et al.*, 2006). Desta forma os antioxidantes são substâncias que preservam os processos oxidativos e são capazes de inibir a deterioração oxidativa (ESTEVAM, 2006).

As plantas constituem uma importante fonte de produtos naturais que diferem em suas propriedades biológicas e estruturas químicas e podem conter uma variedade de moléculas seqüestradoras de radicais livres como compostos fenólicos das seguintes classes: flavonóides, quinonas, cumarinas, lignanas e taninos. Diversos estudos comprovam a atividade antioxidante desses compostos (REDDY *et al.*, 2003; CAI *et al.*, 2004; SABU *et al.*, 2002; SOLER-RIVAS *et al.*, 2000).

1.6 Considerações sobre os Anticolinesterásicos

1.6.1 Plantas como uma Fonte de Inibidores da Enzima Acetilcolinesterase

Diversas plantas têm apresentado atividade inibidora da acetilcolinesterase (AChE) fornecendo drogas que auxiliam no tratamento da doença de Alzheimer. O maior avanço no tratamento da doença de Alzheimer foi o uso de inibidores da acetilcolinesterase como a Galantamina (14), Huperzina A (15) e Fisostigmina (16) (Figura 5, p 15) e seus derivados (HOUGHTON, 2004).

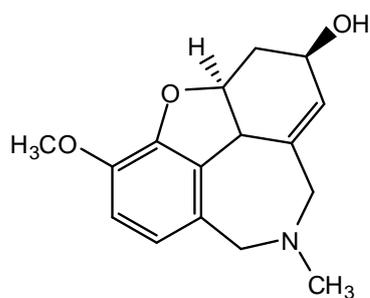
A Galantamina (15) é um alcalóide obtido de *Galanthus nivalis* L., planta tradicionalmente usada em países como a Bulgária e Turquia para doenças neurológicas (MUKHERJEE, 2007). A Huperzina (15), um composto natural isolado da planta *Huperzia serrata*, de uso popular na medicina chinesa, é um potente, reversível e seletivo inibidor da acetilcolinesterase (BARBOSA FILHO *et al.*,2006).

A Fisostigmina (16), um alcalóide indólico isolado de *Physostigma venenosum*, planta tradicionalmente utilizada na África, mostrou significantes benefícios cognitivos em pacientes normais e com Doença de Alzheimer (DA). A fisostigmina (16) promoveu um modelo para o desenvolvimento da Rivastigmina (22) (MUKHERJEE, 2007). Desta maneira, é evidente que alcalóides inibidores da AChE, podem ser considerados como importantes candidatos no desenvolvimento de fármacos para tratamento da DA.

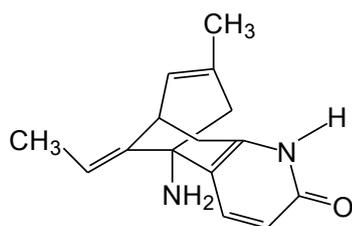
Substâncias naturais que demonstraram um potencial inibidor da enzima AChE são pertencentes a compostos das classes de alcalóides, monoterpenos, cumarinas, triterpenos, flavonóides, benzenóides, diterpenos, lignanas, carotenóides, dentre outros (BARBOSA FILHO *et al.*,2006).

Estudos recentes realizados no Brasil mostraram excelentes resultados de inibição da AChE utilizando extratos brutos de plantas. Extratos da casca do caule de *Amburana cearensis* apresentaram 100 % de inibição em ensaios de microplaca, *Lippia sidoides*, *Paullinia cupana*, *Plathymiscium aribundum* e *Solanum asperum* mostraram excelentes resultados como atividade inibidora da enzima AChE (TREVISAN, 2003).

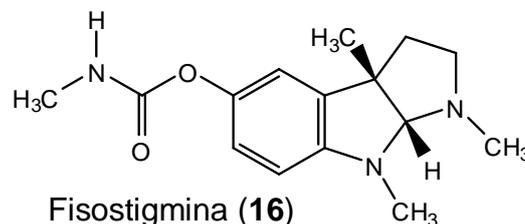
Figura 5 - Estrutura molecular de alguns inibidores da enzima acetilcolinesterase.



Galantamina (14)

Huperzina A (**15**)

Fonte: (HOUGHTON, 2004)

Fisostigmina (**16**)

1.6.2 Fisiologia da Doença de Alzheimer (DA)

A Doença de Alzheimer foi primeiramente descrita pelo psiquiatra alemão, Alois Alzheimer, em 1907 (HEINRICH & TEOH, 2004). A DA é responsável por cerca de 50-60% do número total de pessoas que apresentam demência acima dos 65 anos. Esta doença atinge cerca de 15% da população entre 65-69 anos, 21% entre 85-86 anos e 39% acima dos 90 anos, afetando aproximadamente 15 milhões de pessoas em todo o mundo (VIEGAS JR. *et al.*, 2004).

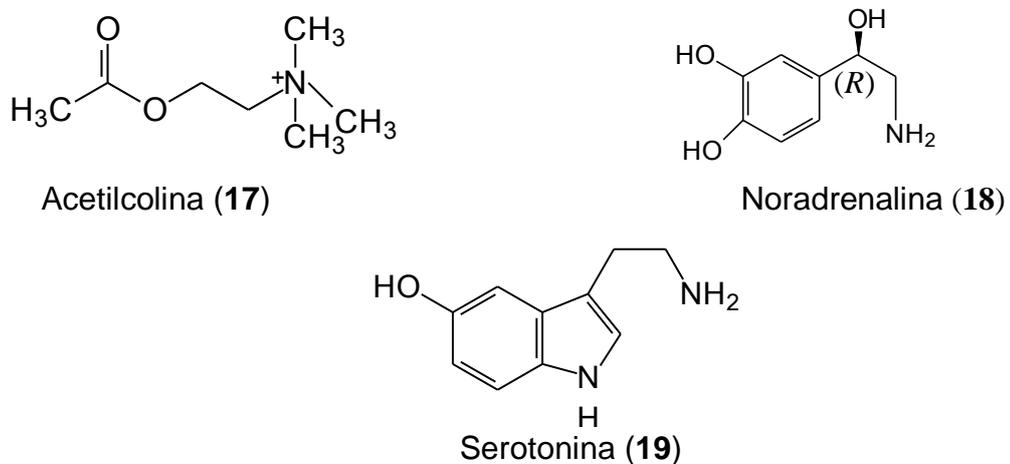
A DA é uma doença degenerativa que tem sido associada a uma série de alterações genéticas, neuropatológicas e neurofisiológicas. Os sistemas cerebrais que utilizam acetilcolina (ACh) (**17**) são afetados, ocorrendo uma redução desproporcional nos níveis de acetilcolina, redução da enzima colina-acetiltransferase (CAT), degeneração do núcleo basal de Meynert, alteração no número e sensibilidade de receptores nicotínicos e muscarínicos cerebrais, sensibilidade aumentada aos efeitos de fármacos anticolinérgicas (ALMEIDA, 1998).

As alterações bioquímicas decorrentes da DA afetam principalmente as regiões cerebrais que estão associadas às funções mentais superiores, como o córtex frontal e o hipocampo. Dentre as principais causas da origem da DA estão a deposição extracelular de peptídeo β -amilóide em plaquetas senis e a formação irregular de neurofibrilas intracelulares. Estes acontecimentos resultam em perda da função neuronal e dano sináptico e conseqüentemente compromete a memória, a coordenação motora e o raciocínio, além de perda da capacidade cognitiva e demência (VIEGAS JR. *et al.*, 2004).

A nível celular o que ocorre na doença de Alzheimer é uma diminuição de neurotransmissores como, por exemplo, a acetilcolina (**17**), noradrenalina (**18**), e

serotonina (**19**) (Figura 6). A acetilcolina está presente no cérebro e nas junções neuromusculares, compondo parte do sistema nervoso parassimpático. A acetilcolina liga-se ao receptor do neurônio pós-sináptico causando a abertura dos canais de íons. Os íons Na^+ e Ca^{2+} extracelulares entram através desses canais, gerando um potencial de ação na membrana e permitindo a transmissão de sinais de uma célula nervosa a outra e de uma célula nervosa à célula muscular (GUYTON, 2006). A acetilcolinesterase (AChE) é uma enzima que regula a atividade e permanência da acetilcolina na fenda sináptica. (VIEGAS JR. *et al.*, 2004). Normalmente a concentração de acetilcolina na fenda sináptica é rapidamente diminuída pela ação da enzima acetilcolinesterase, presente na fenda sináptica (NELSON & COX, 2005).

Figura 6 - Estrutura molecular de alguns neurotransmissores.



Fonte: (VIEGAS JR. *et al.*, 2004)

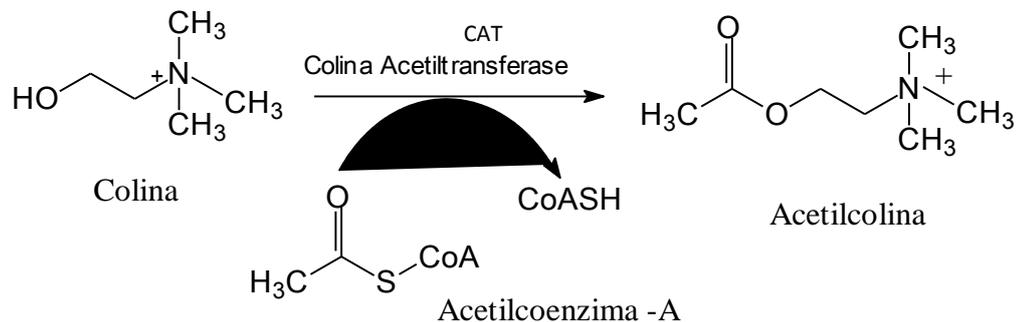
1.6.3 Acetilcolina e Acetilcolinesterase: Biossíntese e Função

A biossíntese da acetilcolina (ACh) se dá a partir da acetil-coenzima A (acetil-CoA) e colina por ação da enzima colina-acetiltransferase (CAT) (**figura 7**).

A acetilcolina está envolvida na contração do músculo liso, dilatação dos vasos sanguíneos e regulação da taxa de batimentos cardíacos, no cérebro está envolvida nas sinapses associadas ao controle motor, memória e cognição. A atividade e permanência da ACh na fenda sináptica são reguladas por hidrólise

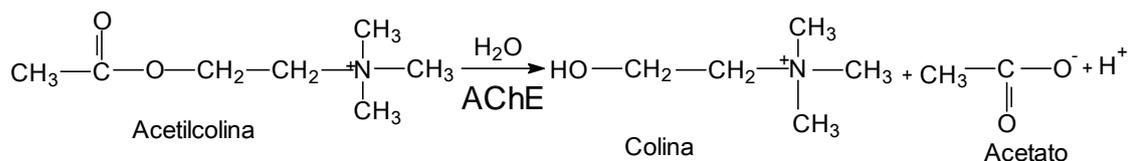
catalisada pela acetilcolinesterase (AChE) (**Figura 8, p 18**) que regenera a colina seu precursor. O mecanismo de hidrólise de AChE envolve o ataque nucleofílico da serina ao carbono carbonílico da ACh, gerando um intermediário tetraédrico estabilizado por ligações de hidrogênio, o qual produz colina livre e serina acetilada. Ao final, a hidrólise do grupo acetila da serina pela água recupera o sítio catalítico da enzima (VIEGAS JR. *et al.*, 2004).

Figura 7 - Biossíntese da acetilcolina (ACh)



Fonte: (VIEGAS JR. *et al.*, 2004)

Figura 8 - Hidrólise da acetilcolina



Fonte: (VIEGAS JR. *et al.*, 2004)

1.6.4 Hipótese Colinérgica

Depois de formada, a ACh é liberada na fenda sináptica a qual pode ser acoplada a receptores muscarínico e nicotínico. O restante da ACh é degradada pela acetilcolinesterase (AChE) na fenda sináptica em colina e acetato, que são as bases de sua formação. Na doença de Alzheimer ocorre uma deficiência de acetilcolina pela atrofia do núcleo basal de Meynert, o qual é a fonte produtora da enzima CAT. Com isso, a estratégia adotada no desenvolvimento de fármacos antidemência é a de aprimorar a função colinérgica. Os níveis de ACh na fenda

sináptica podem ser aumentados através da inibição da AChE (MINETT & BERTOLUCCI, 2000).

1.6.5 Tratamentos Para a Doença de Alzheimer (DA)

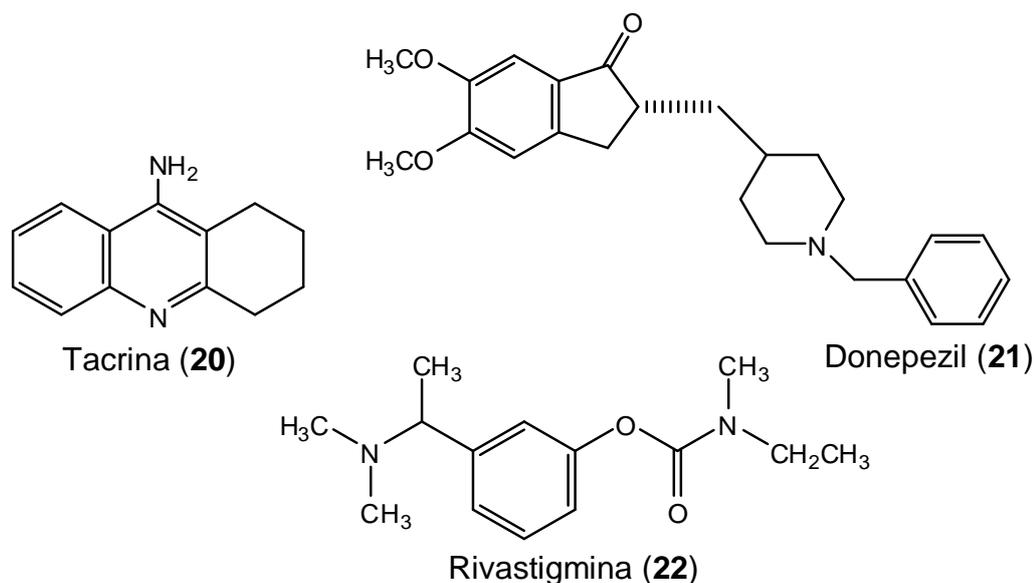
Tratamentos para a DA sugerem que uma elevação no nível de ACh promove uma melhora dos sintomas da doença. A terapia se baseia na restauração da função colinérgica e atualmente os inibidores de acetilcolinesterase mostraram um maior efeito no tratamento clínico da doença (TREVISAN, 2006).

Para o tratamento da DA foram realizados diversos ensaios clínicos com os inibidores da acetilcolinesterase (AChE). A tacrina (Cognex®) (**20**) primeiro fármaco a ser testada e clinicamente usada, foi aprovada pela Food and Drug Administration (FDA) em 1993 e pela Agência de Vigilância Sanitária (ANVISA) em 1994. No entanto, essa droga precisa ser administrada quatro vezes ao dia, além de apresentar toxicidade hepática. O donepezil (Aricept®) (**21**) foi a segunda droga a ser produzida, aprovado pelo FDA em 1996 e pela ANVISA em 2000. Essa droga tem como vantagem de ser administrada somente uma vez ao dia. No entanto tem uma meia-vida muito longa (GOMES & KOSZUOSKI, 2005).

A rivastigmina (Exelon®) (**22**) terceira droga, disponível na Europa em 1997 e liberada pela ANVISA em 1998 e pela FDA apenas em 2000. A vantagem adicional desta droga é que também atua na inibição da butirilcolinesterase (BuChE), pois a medida que a DA evolui, aumenta a participação da BuChE na degradação da acetilcolina na fenda sináptica. Acredita-se que a inibição da BuChE promova a diminuição da toxicidade da proteína amilóide nas placas senis (GOMES & KOSZUOSKI, 2005).

A galantamina (Reminyl®) (**14**) foi aprovada pela FDA e ANVISA em 2001. É a droga mais recente do grupo de inibidores da acetilcolinesterase (GOMES & KOSZUOSKI, 2005). Sendo considerada mais efetiva no tratamento de DA que os fármacos sintéticos fisostigmina (**16**) e tacrina. A galantamina apresenta-se como um inibidor de ação longa, e tem servido como modelo para o desenvolvimento de novos fármacos anticolinesterásicas (VIEGAS JR. *et al.*, 2004).

Figura 9 - Estruturas moleculares de alguns inibidores da acetilcolinesterase.



Fonte: (GOMES & KOSZUOSKI, 2005)

1.7 Considerações Sobre a Esquistossomose Mansônica

A esquistossomose mansônica é uma doença parasitária difundida em todo o mundo, conhecida como esquistossomíase, e popularmente como barriga d'água, atinge 74 países e distribui-se ao longo da faixa tropical e subtropical do globo, onde acomete cerca de 200 milhões de pessoas, e 600 milhões de habitantes de áreas endêmicas correm o risco de contraí-la (WHO, 2002).

No Brasil, a esquistossomose mansônica, é prevalente em 19 Estados da federação, atingindo 9,97 % da população (KATZ & PEIXOTO, 2000), com aproximadamente 26 milhões de pessoas em áreas endêmicas (FUNASA, 2003). Em Alagoas é endêmica em 60 % dos municípios e mais de dois milhões de indivíduos estão expostos à infecção (COUTO, 2005). Em 2006 foram registrados no Brasil 106.989 casos confirmados de esquistossomose, com 17.922 casos em Alagoas (SVS, 2007).

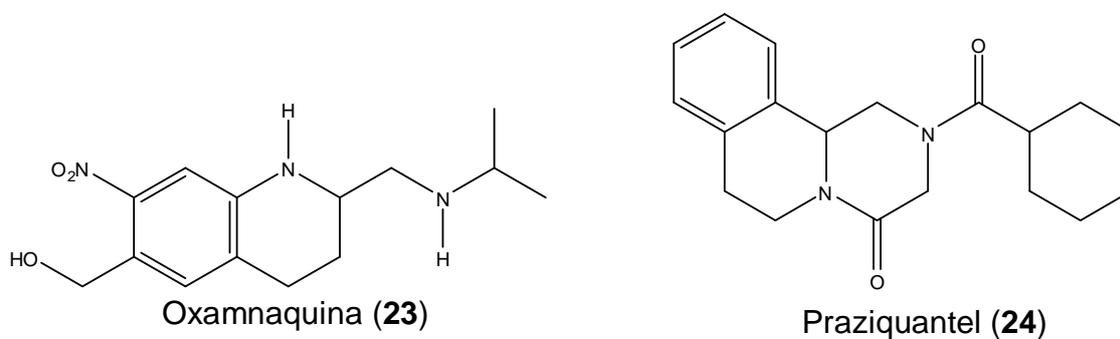
A transmissão da esquistossomose mansônica numa região depende da existência dos hospedeiros intermediários que, no Brasil são caramujos do gênero *Biomphalaria*. A espécie *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) é o vetor mais importante. O contato humano com águas infectadas pelas cercárias é a maneira pela qual o indivíduo adquire a esquistossomose. (PRATA, 1987; NARVAEZ, 1983).

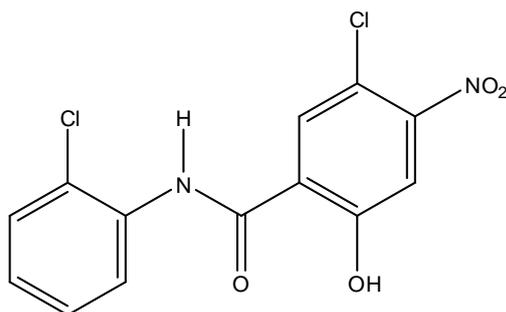
Através do estudo do ciclo de vida do *S. mansoni*, ficou evidenciado que a propagação da doença em uma região depende basicamente de três fatores: da presença de indivíduos eliminando ovos, da existência de hospedeiros intermediários e do contato de pessoas com águas naturais, infectadas de cercárias. Assim, no combate a essa doença há dois caminhos a seguir: o tratamento de indivíduos infectados e a profilaxia mediante a destruição das cercárias e dos caramujos, hospedeiros intermediários (PRATA, 1987).

Os compostos esquistossomicidas destroem os vermes parasitos ou são capazes de removê-los do hospedeiro. No entanto, ainda não se descobriu um esquistossomicida ideal, diversos tipos de fármacos com esta atividade vêm sendo utilizados isoladamente ou em combinações entre si. A oxamniquina (**23**) é o agente esquistossomicida de principal uso na terapêutica brasileira por ter a mesma eficácia e menor custo em relação ao fármaco alternativo, praziquantel (**24**) (XIAO *et al.*, 2000). Efeitos colaterais podem aparecer como tonturas e, com menor frequência, náuseas, vômitos, cefaléia, sonolência e urina alaranjada (FUNASA, 2003).

Outra forma de controle da doença consiste na eliminação do caramujo, através do uso de substâncias moluscidas que são produtos químicos de natureza sintética ou natural. Dentre os moluscidas sintéticos destaca-se a niclosamida (**25**), a droga mais utilizada desde 1960. Promove 100% de mortalidade sobre o caramujo, na concentração de 1,5 ppm em duas horas de exposição. No entanto a principal desvantagem é apresentar atividade piscicida semelhante a moluscida. (PERRET & WHITFIELD, 1996).

Figura 10 - Substâncias utilizadas no controle da esquistossomose.



Niclosamida (**25**)

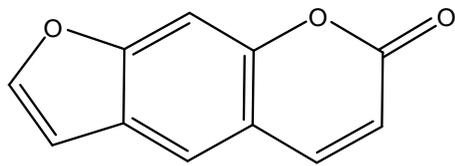
Fonte: (XIAO *et al.*, 2000).

1.7.1 Moluscidas de Origem Vegetal

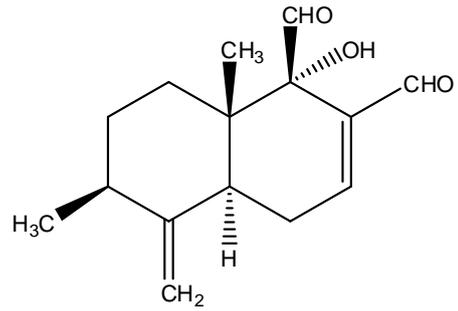
A procura de moluscidas a partir de produtos naturais de origem vegetal ocorre principalmente devido a problemas com os moluscidas sintéticos como: biodegradação lenta, toxicidade para outros organismos, alto custo e necessidade de importação. Várias espécies de plantas já foram testadas apresentando significativa atividade moluscida (SANTOS, 1997). Em função disto a busca por plantas com atividade moluscida se faz necessário, visando apresentar um custo mais baixo, e que estejam mais facilmente disponíveis nas áreas endêmicas, sendo mais confiáveis na estratégia de controle do que o uso de moluscidas sintéticos (MARSTON & HOSTETTMAN, 1985; LUNA *et al.*, 2005).

Após detectada como agente moluscida, é feito o isolamento e identificação dos constituintes ativos da planta e o estudo de sua toxicidade, efeito sobre o caramujo e estabilidade quando utilizada em campo. Alguns substâncias isoladas de plantas e com efeito moluscida pertencem a grupos como cumarinas (**26**), sesquiterpenóides (**27**), saponinas (**28**), diterpenóides (**29**) e ésteres de ingenol (**30**) (Figura 11, p 22) (SANTOS, 1997).

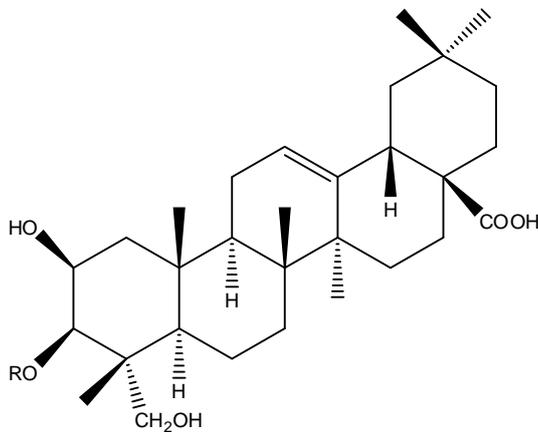
Figura 11 - Substâncias moluscicidas isoladas de plantas.



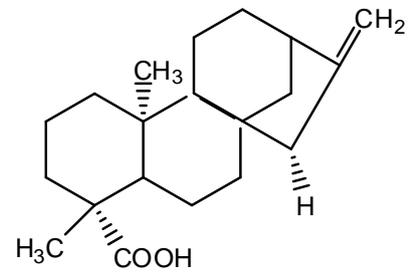
Psoraleno (26)



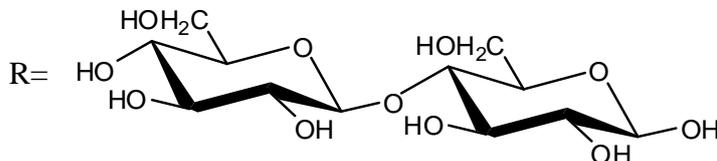
Muzigadial (27)



Balyogenina (28)



ácido caur-16-en-19-oico (29)



Miliamina (30)

Fonte: (SANTOS, 1997).

2 EXPERIMENTAL

2.1 Condições Experimentais: Reagentes, Solventes e Equipamentos

- **Fases Estacionárias para Cromatografia**

Para o preparo de colunas cromatográficas clássicas utilizou-se como fases estacionárias gel de sílica 60, (70-230 Mesh) da Merck (Alemanha) e Sephadex LH-20 da marca Pharmacia (Suécia).

Nas análises comparativas através de cromatografia em camada delgada (CCD), foram utilizadas placas cromatográficas de gel de sílica 60 PF₂₅₄ da Merck.

- **Solventes e Reagentes**

Para fracionamento dos extratos, partições, filtrações e colunas cromatográficas foram utilizados solventes de grau comercial, os quais foram submetidos à destilação fracionada no próprio laboratório.

A revelação das placas cromatográficas foi realizada através de luz UV com comprimento de onda 254 e 365 nm, vapores de cristais de I₂ (Iodo), solução ácida de sulfato cérico e reagente de Liebermann Burchard.

A solução de sulfato cérico foi preparada através da dissolução de 0,3 g de Ce(SO₄)₂ em 7 mL de H₂SO₄, em seguida o volume foi completado para 100 mL com água destilada. O reagente de Liebermann Burchard foi preparado com 50,0 mL de anidrido acético e 1,0 mL de ácido sulfúrico concentrado.

Solventes deuterados CDCl₃, CD₃OD, da marca Aldrich foram utilizados para preparação das substâncias destinadas a análise de RMN ¹H e ¹³C.

- **Equipamentos**

A concentração das soluções dos extratos e frações foi efetuada em evaporador rotativo tipo Büchler, sob pressão reduzida. As soluções contendo pequeno volume foram concentradas em capela de exaustão. Os espectros de infravermelho foram registrados em espectrofotômetro da marca Varian 660-IR/FT-IR

Spectrometer, através da técnica de ATR, já os espectros de RMN foram registrados em espectrômetro da marca Bruker 400 MHz. Os pontos de fusão foram realizados em aparelho de ponto de fusão Microquímica-MQAPF-301. As medidas de absorvância do ensaio anticolinesterásico foram realizadas em espectrofotômetro de microplaca Thermo Scientific – Multiskan Spectrum.

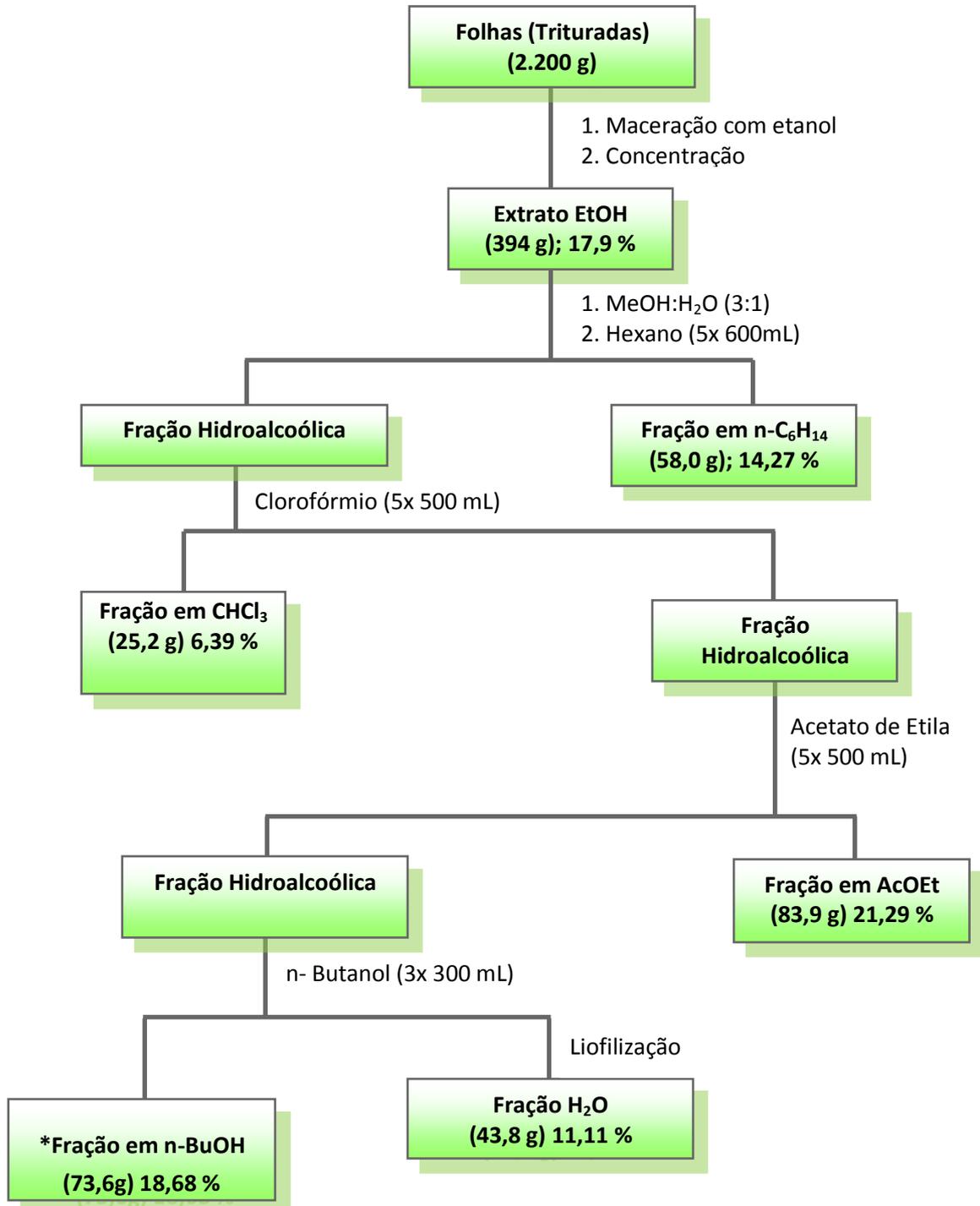
2.2 Coleta e Identificação do Material Vegetal

A espécie *Terminalia catappa*, foi coletada no município de Maceió, no Campus A. C. Simões da Universidade Federal de Alagoas, em janeiro de 2006, sendo identificada pela botânica Rosário de Fátima de Almeida Rocha, do Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde (ICBS), da Universidade Federal de Alagoas. Um exemplar do referido material encontra-se catalogado sob o número 03805, no Herbário Professor Honório Monteiro (MUFAL), do Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde (ICBS)/UFAL, sediado no Museu de Historia Natural.

2.3 Preparações dos Extratos e Frações de *T. catappa* L.

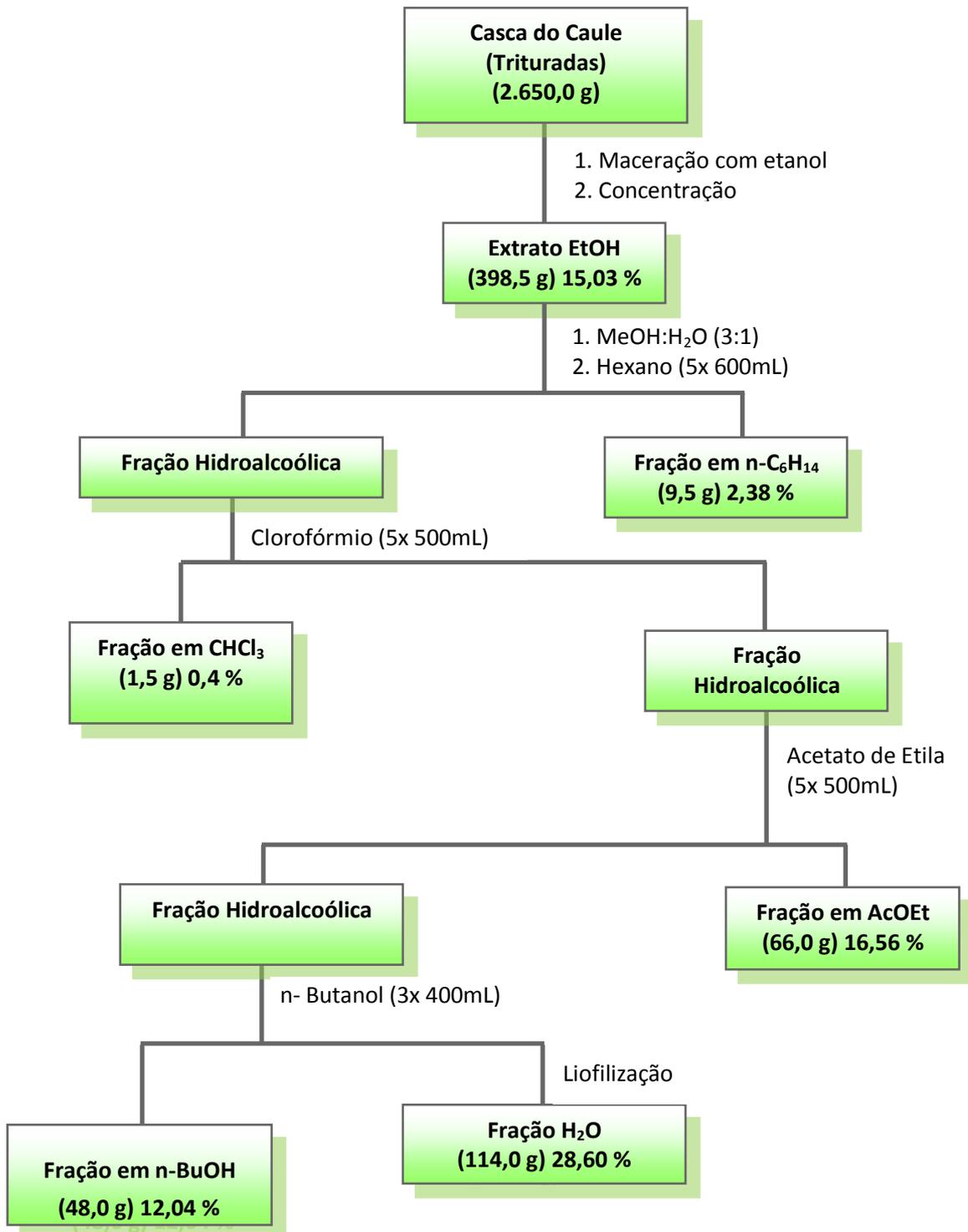
As folhas (2.200,0 g), cascas do caule (2.650,0 g), e madeira do caule (5.100,0 g) separadamente, após secagem à temperatura ambiente e trituração foram extraídos através de maceração com etanol 90 % à temperatura ambiente (25 ± 1 °C) por 3 vezes. Após concentração das soluções, sob pressão reduzida em evaporador rotativo, os extratos brutos resultantes das folhas (394,0 g; 17,9 %), cascas do caule (398,5 g; 15,03 %) e madeira do caule (92,0 1,8 % g) foram suspensos em uma solução de metanol e água (3:1) e extraídos com n-hexano, clorofórmio, acetato de etila e n-butanol. Após a concentração das soluções, sob pressão reduzida em evaporador rotativo, foram obtidas as frações em n-hexano (n-C₆H₁₄), clorofórmio (CHCl₃), acetato de etila (AcOEt), n-butanol (n-BuOH) e água (**Figuras 12, 13, 14, p 26, 27, 28**).

Figura 12 - Fluxograma de obtenção do extrato etanólico bruto e frações das folhas da espécie *T. catappa* L.



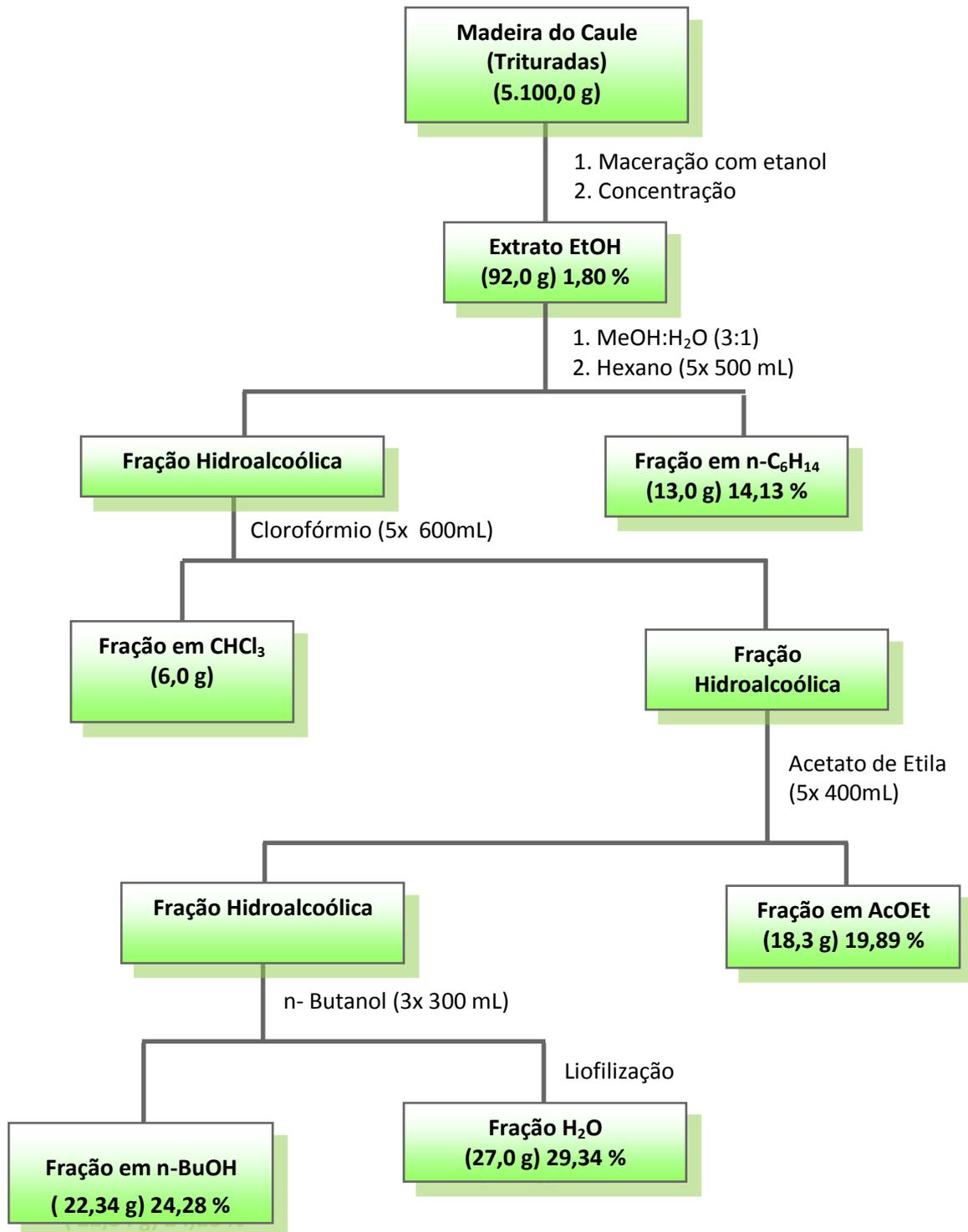
Fonte: (COSTA, 2010)

Figura 13 - Fluxograma de obtenção do extrato etanólico bruto e frações das cascas do caule da espécie *T. catappa* L.



Fonte: (COSTA, 2010)

Figura 14. Fluxograma de obtenção do extrato etanólico bruto e frações da madeira do caule da espécie *T. catappa* L.



Fonte: Autora, 2010.

2.4 Fracionamento e Purificação dos Constituintes Químicos de *T. catappa*

2.4.1 Folhas

As frações em $n\text{-C}_6\text{H}_{14}$, CHCl_3 e AcOEt provenientes da partição do extrato bruto das folhas foram submetidas aos processos de purificação. Para as separações por Cromatografia em Colunas (CC) foram utilizadas gel de sílica, Sephadex LH-20 e gel de sílica C-18.

2.4.1.1 Fração em Hexano

A fração em hexano ($n\text{-C}_6\text{H}_{14}$) das folhas de *T. catappa* (44,0 g) foi submetida à fracionamento a vácuo em gel de sílica (900 g). Utilizou-se como fase móvel hexano ($n\text{-C}_6\text{H}_{14}$), clorofórmio (CHCl_3), acetato de etila (AcOEt) e metanol (MeOH), 4 frações foram coletadas (**Quadro 1**).

Quadro 1 - Fracionamento em gel de sílica da fração em $n\text{-C}_6\text{H}_{14}$ das folhas.

Frações	Eluição	Massa; Rendimento
I	$n\text{-C}_6\text{H}_{14}$	22,5 g; 51,13 %
II	CHCl_3	3,3 g; 7,5 %
III	AcOEt	12,5 g; 28,40 %
IV	MeOH	4,5 g; 10,22 %

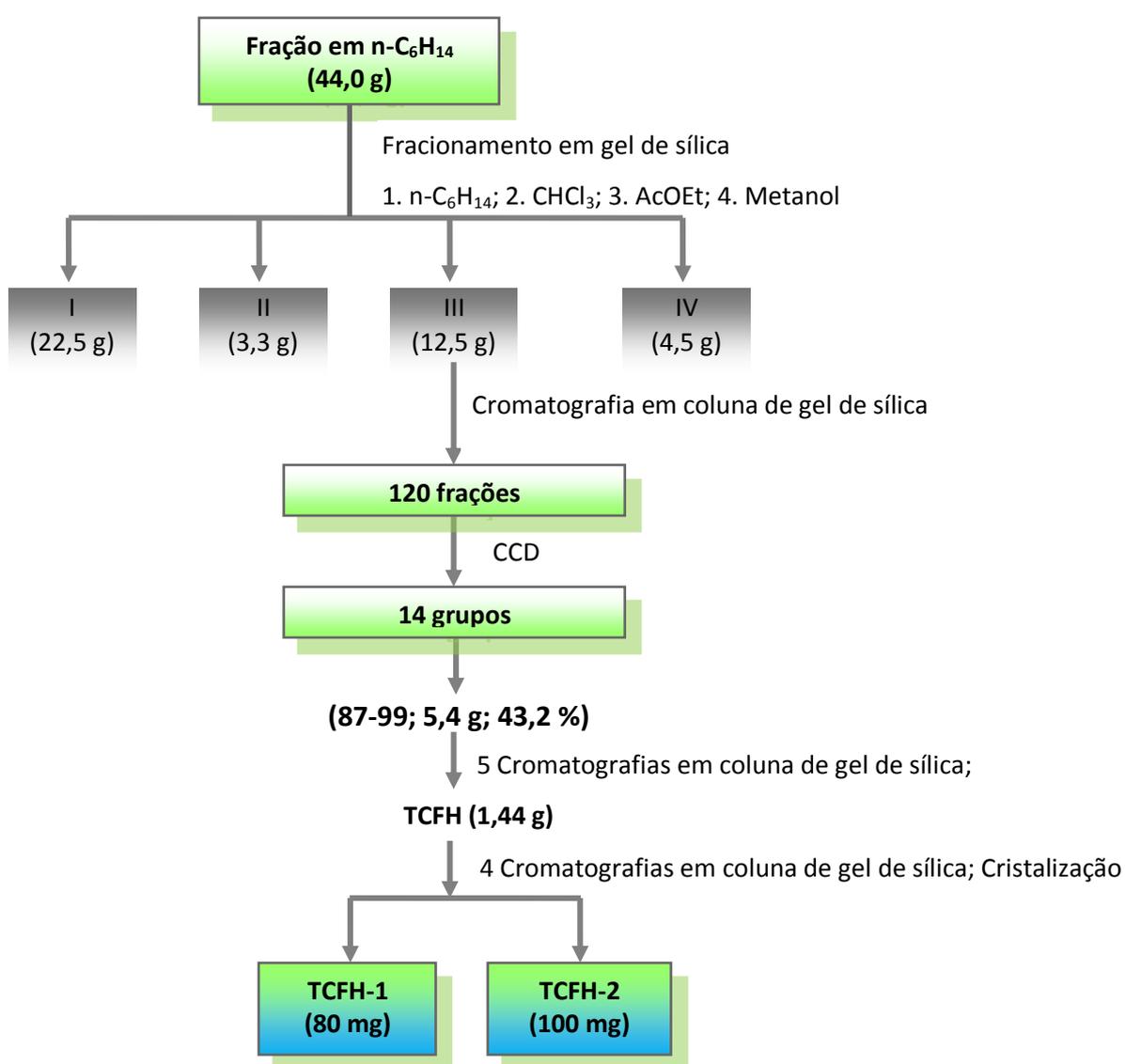
Fonte: Autora, 2010.

A fração III (12,5 g), foi submetida à cromatografia em coluna de gel de sílica (260 g) utilizando-se como eluentes $n\text{-C}_6\text{H}_{14}$, CHCl_3 , MeOH e mistura destes em grau crescente de polaridade, foram coletadas 120 frações as quais foram agrupadas após análise por CCDC em 14 grupos. O grupo (87-99; 5,4 g; 43,2 %) foi submetido a cinco processos de separação por cromatografias em coluna de gel de sílica até obtenção de uma fração de cor branca, amorfo codificada como TCFH (1,44 g) (**Figura 15, p 30**).

A fração TCFH (1,44 g) foi submetida a uma seqüência de quatro colunas cromatográficas em gel de sílica, eluídas em $n\text{-C}_6\text{H}_{14}$, CHCl_3 , MeOH e misturas em

gradiente crescente de polaridade. Após processos de cristalização em etanol forneceu duas substâncias codificadas de TCFH-1 (80 mg) e TCFH-2 (100 mg) cuja análise em CCD eluídas com o sistema de solvente CHCl_3 : MeOH (95:5) e revelados com reagente de Lieberman-Burchard exibiu cor lilás e rosa respectivamente (**Figura 15**).

Figura 15 - Fluxograma do isolamento dos constituintes químicos da fração em Hexano das folhas de *T. catappa*.



Fonte: Autora, 2010.

2.4.1.2 Fração em Clorofórmio

A fração em CHCl_3 das folhas de *T. catappa* (16,28 g) foi submetida à fracionamento a vácuo em gel de sílica (330 g) e eluída com CHCl_3 , AcOEt e MeOH, fornecendo três frações (**Quadro 2**).

Quadro 2 - Fracionamento em gel de sílica da fração em CHCl_3 (16,28 g) das folhas.

Frações	Eluição	Massa; Rendimento
I-1	CHCl_3	3,48 g; 21,37 %
II-1	AcOEt	10,88g; 66,83 %
III-1	MeOH	1,74g; 10,68 %

Fonte: Autora, 2010.

A fração II-1 (10,88 g) foi submetida à cromatografia em coluna com gel de sílica (250 g) utilizando como solvente $n\text{-C}_6\text{H}_{14}$: CHCl_3 7:3, CHCl_3 , AcOEt e MeOH. Foram coletadas 4 frações (**Quadro 3**).

Quadro 3 - Fracionamento em gel de sílica da fração II-1 (10,88 g).

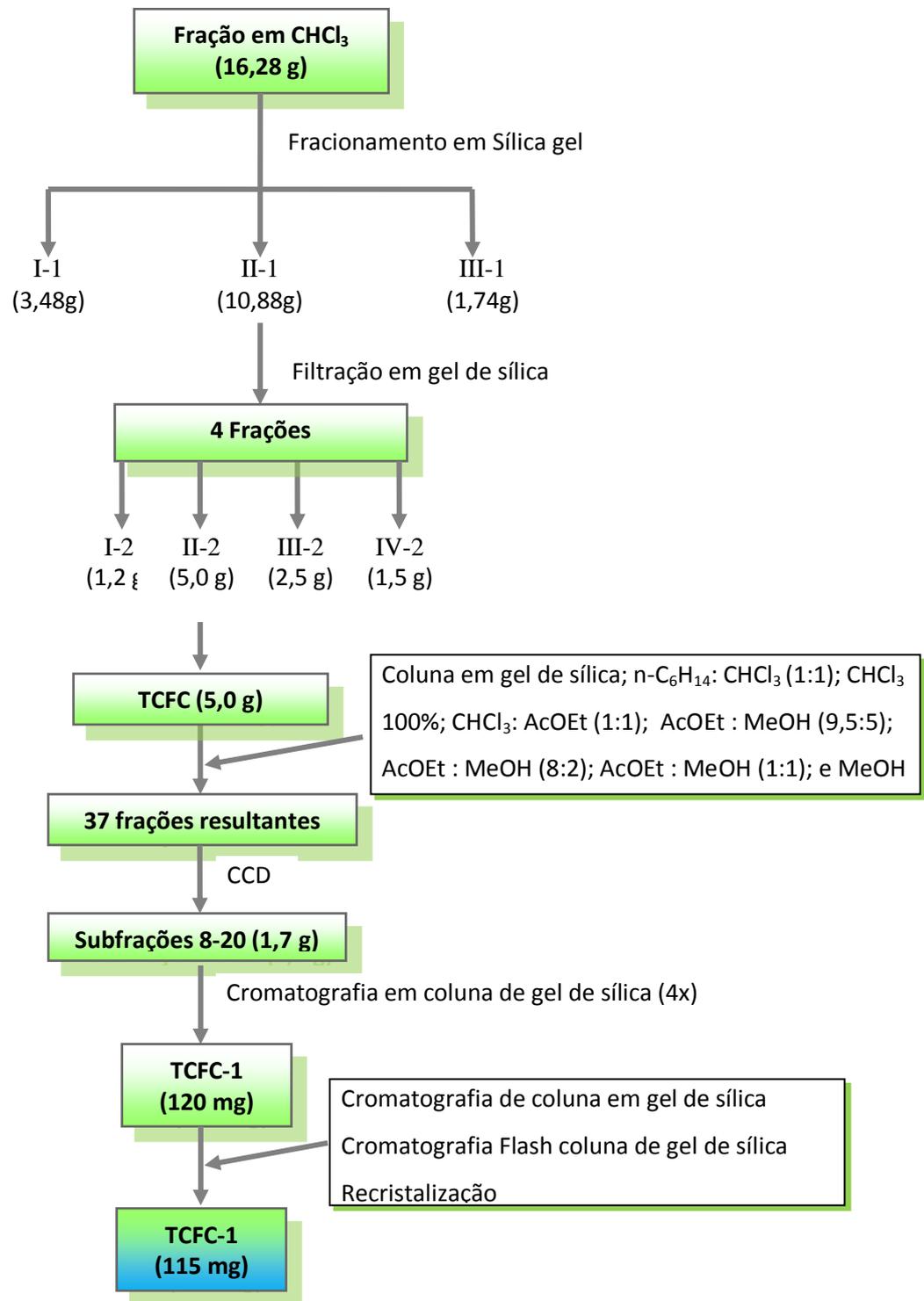
Frações	Eluição	Massa; Rendimento
I-2	$n\text{-C}_6\text{H}_{14}$: CHCl_3 7:3	1,2 g; 11,02%
II-2	CHCl_3	5,0 g; 45,9 %
III-2	AcOEt	2,5 g; 22,9 %
IV-2	MeOH	1,5 g; 13,7 %

Fonte: Autora, 2010.

A fração II-2 (5,0 g) foi direcionada para purificação por cromatografia em coluna de gel de sílica, as demais frações foram analisadas por CCD e mostraram-se como misturas complexas com bastante pigmentos e não foram trabalhadas.

A fração II-2 codificada de TCFC (5,0 g) foi submetida à cromatografia em gel de sílica (150 g), fornecendo 35 frações que após análise por CCD permitiu reunir as frações de 8 à 20 (1,7 g) e novamente submetidas a cromatografia em coluna de gel de sílica por quatro vezes, fornecendo ao final um material de cor branca amorfo codificado **TCFC-1** (120 mg) (**Figura 16, p 32**).

Figura 16. Fluxograma do isolamento dos constituintes químicos da fração em clorofórmio das folhas de *T. catappa*.



Fonte: Autora, 2010.

A fração TCFC-1 por análise em CCD eluída em CHCl_3 :MeOH 95:5 mostrou dois pontos bastante próximos com Rfs de 0,35 e 0,25 e revelados com solução de sulfato cérico exibiram cor lilás e marrom respectivamente. TCFC-1 (120 mg) foi submetido a vários processos de purificação em coluna de gel de sílica, cromatografia Flash em coluna de sílica e recristalização mas, não foi possível sua purificação.

2.4.1.3 Fração em Acetato de Etila

A fração em AcOEt (78,5 g), das folhas de *T. catappa* foi submetida à fracionamento a vácuo em gel de sílica (1500 g), utilizando como fase móvel CHCl_3 , AcOEt, MeOH e mistura desses, em grau crescente de polaridade, obtendo-se 6 frações (**Quadro 4**).

Quadro 4 - Fracionamento em gel de sílica da fração AcOEt (78,5 g), das folhas.

Frações	Eluição	Massa; Rendimento
I	CHCl_3 : AcOEt 1:1	3,5 g; 4,45%
II	AcOEt 100 %	4,8 g; 6,11 %
III	AcOEt : MeOH 9,5:5	2,5 g; 3,18 %
IV	AcOEt : MeOH 8:2	6,7 g; 8,53 %
V	AcOEt : MeOH 1:1	48,0 g; 61,14 %
VI	MeOH	12,0 g; 15,28 %

Fonte: Autora, 2010.

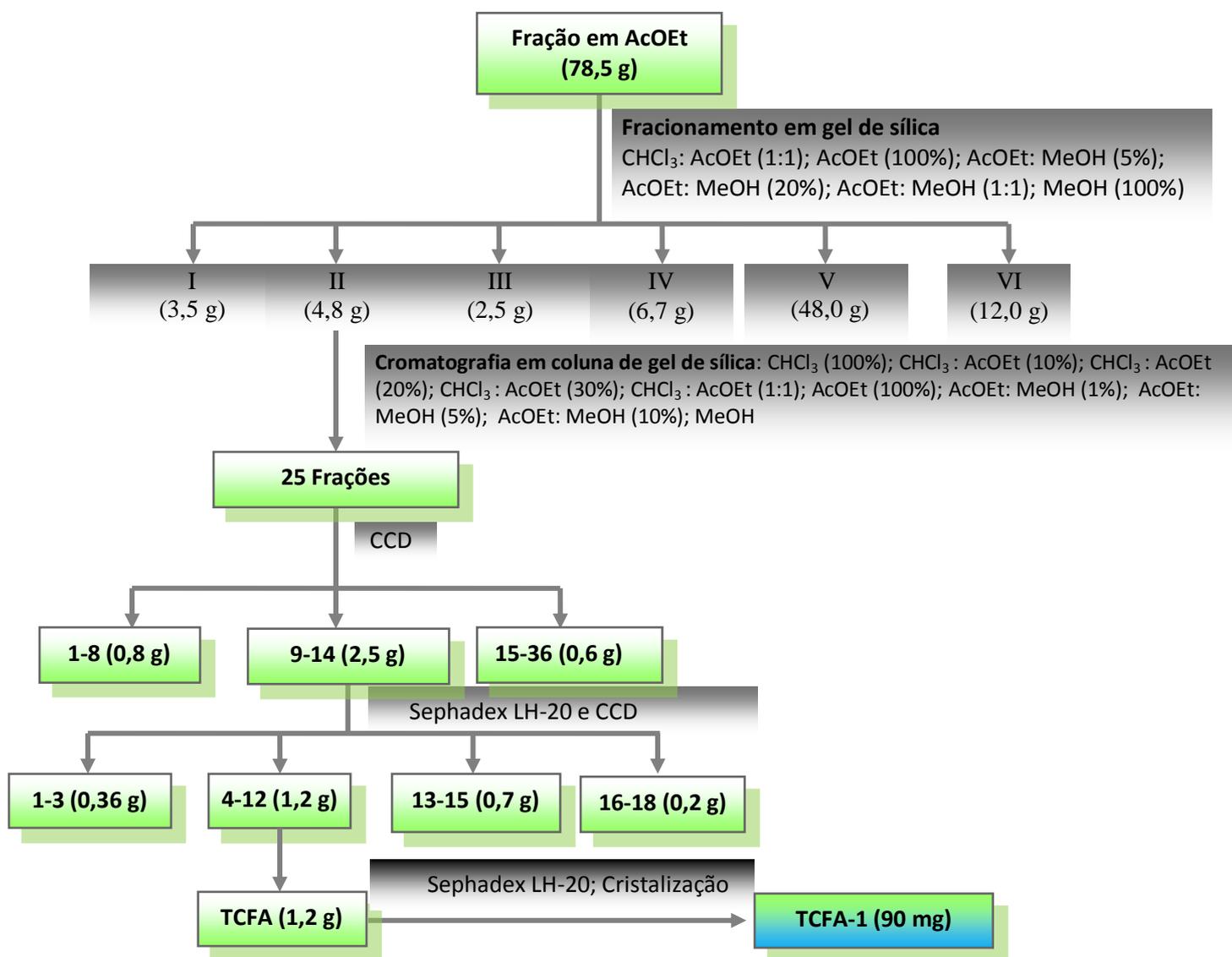
A fração II (AcOEt 100 %) (4,8 g) foi submetida à cromatografia em coluna de gel de sílica (100 g) utilizando misturas de $n\text{-C}_6\text{H}_{14}$, CHCl_3 , AcOEt e MeOH com solvente em ordem crescente de polaridade, fornecendo 25 frações. Após análise por CCD forneceram 3 grupos frações de 1-8 (0,8 g); 9-14 (2,5 g); 15-36 (0,6 g) (**Figura 17, p 34**).

A fração 9-14 (2,5 g), com coloração marrom e solúvel em metanol, foi submetida à cromatografia de exclusão em Sephadex LH-20 em metanol. Forneceu 18 frações, estas foram analisadas por CCD e reveladas em sulfato cérico, fornecendo 4 grupos **1-3** (0,36 g), **4-12** (1,2 g), **13-15** (0,7 g) e **16-18** (0,2 g). O grupo **4-12** (1,2 g) foi codificado de **TCFA**. Os demais grupos quando analisados em CCD

mostraram-se como misturas complexas e por estarem em pequenas quantidades não foram promissoras para purificação.

A fração **TCFA** (1,2 g) foi submetida a cromatografia de exclusão em Sephadex-LH 20 e eluída com metanol. Coletou-se um total de 40 frações de 10 mL e após cristalização em etanol obteve-se a partir destas frações um material cristalino de cor levemente amarelo codificado como **TCFA1** (Figura 17).

Figura 17 - Fluxograma do fracionamento e purificação da fração em acetato de etila das folhas de *T. catappa*.



Fonte: Autora, 2010.

A fração V (AcOEt : MeOH 1:1) (48,0 g) (**Figura 18, p 36**) foi submetido a processos de purificação, utilizou-se 15 g para cromatografia em coluna de gel de sílica (300 g) e como fase móvel CHCl₃:MeOH em grau crescente de polaridade. Desta coluna foram recolhidos um total de 50 frações de 50 mL, que foram reunidas posteriormente em 10 subfrações (**Quadro 5**) após análise em CCD reveladas em luz UV e vapores de iodo.

Quadro 5 - Cromatografia em coluna de gel de sílica da fração fração V (AcOEt : MeOH 1:1) (15,0 g) das folhas.

Frações	Eluição	Massa; Rendimento
1-2	CHCl ₃ :MeOH 20 %	0,4 g; 2,6 %
3-7	CHCl ₃ :MeOH 40 %	0,6 g; 4 %
8-9	CHCl ₃ :MeOH 40 %	0,25 g; 1,66 %
10-15	CHCl ₃ :MeOH 50 %	1,12 g; 7,46 %
16-21	CHCl ₃ :MeOH 50 %	1,4 g; 9,33 %
22-25	CHCl ₃ :MeOH 50 %	0,95 g; 6,33 %
26-34	CHCl ₃ :MeOH 50 %	0,3 g; 2 %
35-40	CHCl ₃ :MeOH 70 %	1,0 g; 6,66 %
41-45	CHCl ₃ :MeOH 70 %	4,0 g; 26,66 %
45-50	MeOH 100 %	3,21 g; 21,4 %

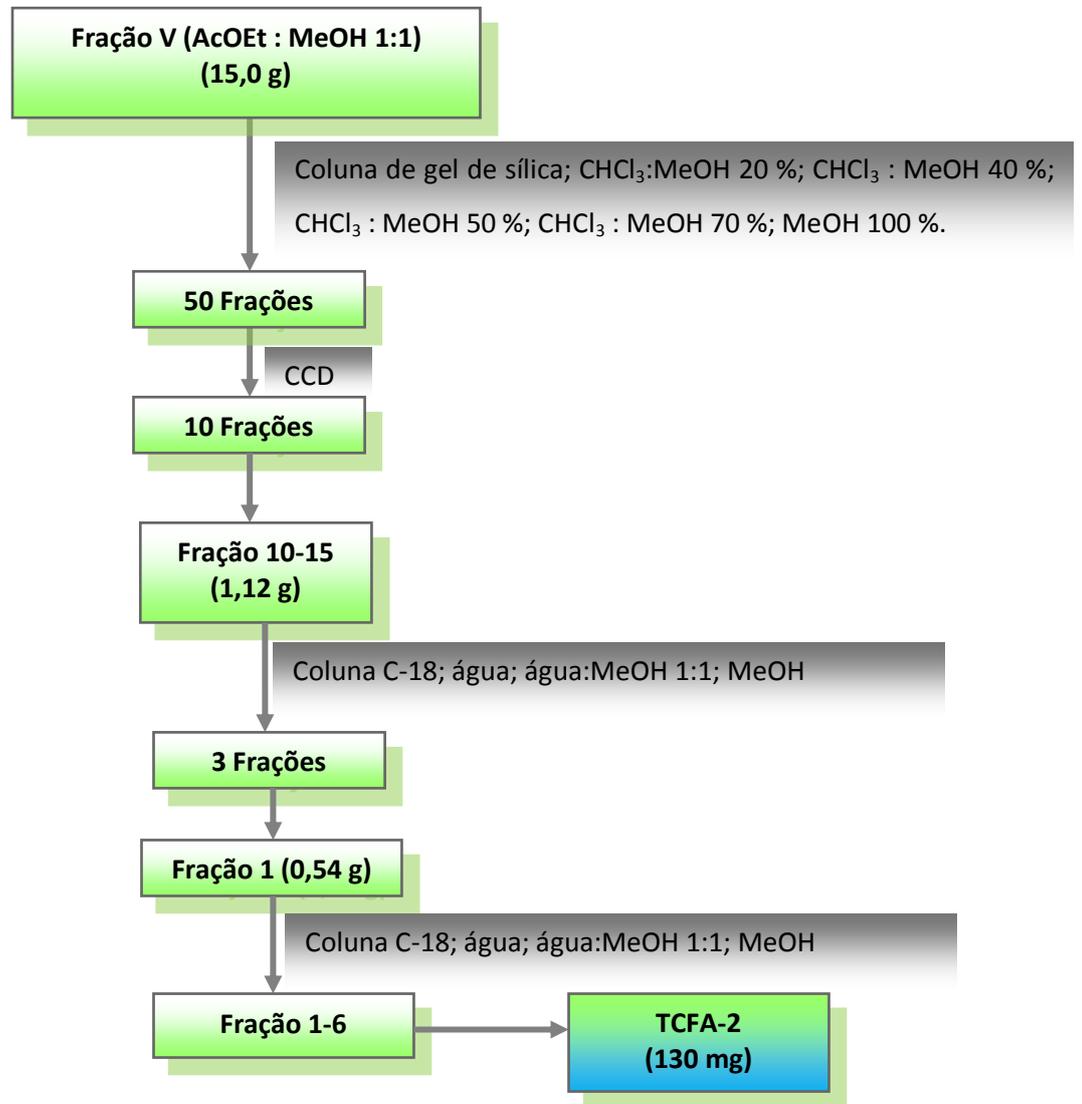
Fonte: Autora, 2010.

A fração 10-15 (1,12 g) foi submetida à cromatografia em coluna de gel de sílica C-18 sob pressão (20 g), eluída com os solventes água; água:MeOH 1:1 e MeOH em gradiente decrescente de polaridade. Foram coletadas 3 frações de aproximadamente 300 mL cada (**Figura 18, p 36**).

A fração recolhida da fase em água (0,54 g) foi novamente submetida à cromatografia em coluna de gel de sílica C-18 (10 g), eluída com água (frações 1-6), água:MeOH (1:1) (fração 7) e MeOH (fração 8) dessa coluna foram recolhidas 8 frações (**Figura 18, p 36**).

A fração 1-6 foi codificada como **TCFA 2** (0,2 g) que após tratamento com AcOEt e em seguida com MeOH levou a precipitação de um material amorfo de cor amarela.

Figura 18 - Fluxograma do fracionamento e purificação da fração em acetato de etila das folhas de *T. catappa*.



Fonte: Autora, 2010.

2.4.2 Casca do Caule

As frações polares (Acetato de Etila, Butanol e Água) provenientes do extrato bruto da casca mostraram-se de difícil purificação, pois não foi possível a solubilização completa dessas em solventes orgânicos.

A fração em clorofórmio não foi destinada a purificação devido a um baixo rendimento (1,5 g). Somente a fração em hexano foi destinada para purificação.

2.4.2.1 Fração em Hexano

A fração em $n\text{-C}_6\text{H}_{14}$ (5,5 g) foi submetida à cromatografia em coluna de gel de sílica (120 g) utilizando como solventes, $n\text{-C}_6\text{H}_{14}$, CHCl_3 , AcOEt, MeOH e mistura dos mesmos em gradiente de ordem crescente de polaridade.

Foram coletadas 27 frações de 50 mL cada, as frações 1-4 (0,3 g) foram reunidas após análise por CCD, eluídas com AcOEt:MeOH 5%, e reveladas em solução de sulfato cérico, mostrou os dois pontos com o mesmo R_f do composto TCFC-1. As demais frações 5-27 (3,97 g) foram analisadas em CCD e mostraram misturas complexas e bastante impuras, não foram purificadas.

2.4.3 Madeira do Caule

2.4.3.1 Fração em Hexano

A fração em Hexano (12,0 g) foi submetida a fracionamento cromatográfico em coluna a vácuo de gel de sílica (250 g) e eluída em gradiente crescente de polaridade $n\text{-C}_6\text{H}_{14}$, CHCl_3 , MeOH e mistura dos mesmos, forneceu 75 frações que foram recolhidas com um volume médio de 150 mL para cada fração (**Quadro 6**).

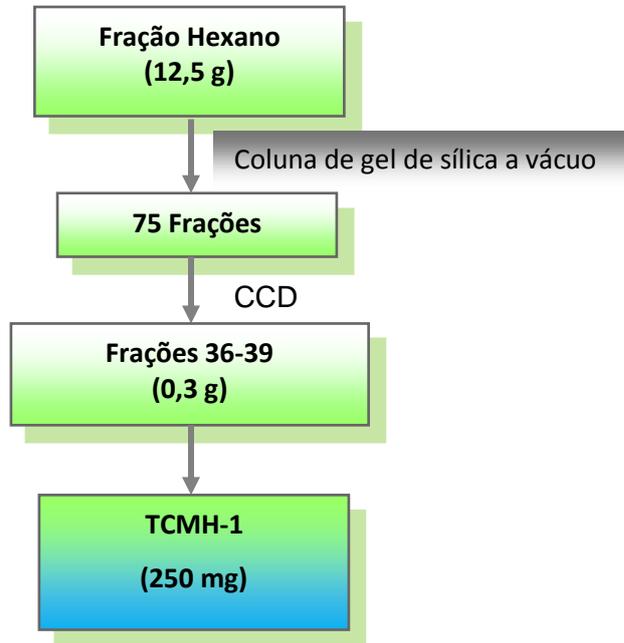
As frações 36 a 39 após evaporação do solvente em capela de exaustão forneceram cristais brancos em forma de agulhas, foram reunidas após análise em CCD usando solução de sulfato cérico como revelador, mostrou um ponto de cor marrom. As demais frações foram analisadas por CCD e demonstraram misturas complexas. A fração 36-39 (0,3 g) foi codificada como **TCMH-1 (Figura 19, p 39)**.

Quadro 6 - Fracionamento cromatográfico da fração em hexano da madeira do caule de *T. catappa*.

Frações	Eluição
1-6	n-C ₆ H ₁₄ 100 %
7-8	n-C ₆ H ₁₄ :CHCl ₃ 5 %
9-13	n-C ₆ H ₁₄ :CHCl ₃ 10 %
14-31	n-C ₆ H ₁₄ :CHCl ₃ 20 %
32-40	n-C ₆ H ₁₄ :CHCl ₃ 30 %
41	n-C ₆ H ₁₄ :CHCl ₃ 40 %
42-49	n-C ₆ H ₁₄ :CHCl ₃ 1:1
50-53	CHCl ₃ 100 %
54-61	CHCl ₃ :MeOH 5 %
62-63	CHCl ₃ :MeOH 10 %
64-68	CHCl ₃ :MeOH 30 %
69-74	CHCl ₃ :MeOH 50 %
75	MeOH 100 %

Fonte: Autora, 2010.

Figura 19 - Fluxograma do fracionamento e purificação da fração Hexano da madeira do caule.



Fonte: Autora, 2010.

2.5 Avaliação do Efeito Antidiabético

Os ensaios para a avaliação do efeito antidiabético foram realizados em colaboração com a Profa. Dra. Êurica Adélia Nogueira Ribeiro do Laboratório de Farmacologia Cardiovascular da Escola de Enfermagem e Farmácia (ESENFAR) da Universidade Federal de Alagoas (UFAL).

- **Animais**

Foram utilizados ratos (*Rattus norvegicus* variedade *albinus*), machos, adultos, sadios da linhagem Wistar, pesando entre 190 e 270 g, procedentes do Biotério Central da Universidade Federal de Alagoas.

Os animais foram acondicionados em gaiolas plásticas coletivas, com dois ou quatro animais por gaiolas, mantidos em fotoperíodo de 12 horas de claro e escuro, ruídos mínimos, temperatura ambiente $21\pm 1^{\circ}\text{C}$ e umidade mantida por ar condicionado. Os animais foram alimentados com ração balanceada (Nuvilab) e água “*ad libitum*”. Antes do início do experimento os animais passaram por um período de adaptação de sete dias.

- **Indução da Diabetes Melito Experimental**

Para a realização dos ensaios farmacológicos *in vivo* os animais foram pesados isoladamente e aqueles com peso corporal conforme o protocolo foram selecionados, identificados individualmente e divididos em quatro grupos de cinco animais.

- Grupo 1: Não-diabético controle (GC);
- Grupo 2: Diabético não tratado (DN);
- Grupo 3: Diabético tratado com insulina (DH)
- Grupo 4: Diabético tratado com extrato (DE).

O diabetes experimental foi induzido pela administração de Aloxana monoidratada (Sigma – Aldrich) diluída em solução salina 0,9 % a uma dose de 40 mg/Kg de peso corporal. A droga foi administrada por via intravenosa, a partir da veia ventral peniana. O animal foi levemente anestesiado por inalação de éter etílico

para a inoculação da droga. A administração da droga foi realizada após 12 horas da retirada do suprimento alimentar dos animais.

No sétimo dia após a administração da aloxana verificou-se a glicemia dos animais em jejum. Todos os animais que apresentaram glicemia iguais ou acima de 190 mg/dL foram considerados diabéticos. Em seguida os Grupos 2, 3 e 4 receberam algum tipo de tratamento durante 15 dias, com administração sempre no mesmo horário.

A administração nos animais do Grupo 2 (DN) e Grupo 4 (DE) foi realizada por via oral (0,2 mL de solução por animal) através da técnica de gavagem. Os Animais do Grupo 2 (DN) receberam solução salina 0,9 %. Grupo 4 (DE) receberam tratamento com extrato etanólico da casca do caule de *T. catappa* na dose de 200 mg/kg solubilizado em água.

Os animais do Grupo 3 (DH) receberam a insulina por via intraperitoneal. Todos os animais foram pesados semanalmente para adequação da dose durante o tratamento e acompanhamento da evolução clínica. Ao final do período de tratamento, os animais, em jejum, tiveram a glicemia novamente verificada. Os animais foram sacrificados com anestesia de tiopental sódico.

Os valores das glicemias foram apresentados como médias \pm erro padrão da média (e.p.m). As diferenças estatísticas entre o tratamento e os controles foram testados por meio da análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey. Toda a análise estatística foi realizada utilizando o programa estatístico Graph-Pad Prism 3.0.

2.6 Quantificação de Fenóis Totais – Método de Folin-Ciocalteu (FCR)

A determinação do teor de fenóis totais presentes nas amostras dos extratos de *T. catappa* foi realizada por meio de espectrofotometria de absorção na região do visível utilizando o método de Folin–Ciocalteu com modificações (SOUSA *et al.*, 2007). Os extratos da folha, casca do caule e madeira do caule (10 mg) foram solubilizados em metanol com um volume final de 10 mL. Uma alíquota de 7,5 mL desta solução foi transferida para um balão volumétrico de 50 mL; esta segunda solução teve seu volume acertado novamente com metanol. Uma alíquota de 100 μ L desta última solução foi agitada com 500 μ L do reagente de Folin- Ciocalteu e 6 mL

de água destilada por 1 min; passado este tempo foram adicionados 2 mL de Na_2CO_3 a 20% e a solução foi agitada por 30 s. A solução teve seu volume acertado para 5 mL com água destilada. Após 2 h, a absorvância das amostras foi medida a 750 nm utilizando-se cubetas de vidro, tendo como “branco” o metanol e todos os reagentes.

O teor de fenóis totais (FT) foi determinado por interpolação da absorvância das amostras contra uma curva de calibração construída com padrões de ácido gálico (20 a 380 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e expressos como mg de EAG (equivalentes de ácido gálico) por g de extrato. A Equação da curva de calibração do ácido gálico foi $C = 0,001A - 0,0194$, sendo C a concentração do ácido gálico, A é a absorvância a 750 nm e o coeficiente de correlação $R = 0,9918$. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

2.7 Avaliação da Atividade Antioxidante

Os ensaios para avaliação da atividade antioxidante foram realizados em colaboração com o Prof. Dr. Charles dos Santos Estevam do Laboratório de Bioquímica e Química de Produtos Naturais (LBPN) da Universidade Federal de Sergipe (UFS).

2.7.1 Atividade seqüestrante de radical DPPH

- **Análise quantitativa da atividade antioxidante**

A atividade seqüestrante de radical DPPH (2,2 difenil-1-picril hidrazil) foi determinada de acordo com metodologia descrita por Sousa *et al.*, 2007 e Solerivas, 2000 com modificações. O consumo do radical livre DPPH pelas amostras foi monitorado através da medida do decréscimo das absorvâncias das soluções em diferentes concentrações (BRAND-WILLIAMS *et al.*, 1995). As medidas foram realizadas em um espectrofotômetro (UV-BEL Photonics 1105), no comprimento de onda de 515 nm, tendo como controle positivo o ácido gálico.

- **Curva de calibração do DPPH**

Foram preparados 75 mL de solução estoque de DPPH em metanol na concentração de 40 µg/mL, mantida sob refrigeração e protegida da luz. As diluições foram de 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30 e 35 µg/mL. A curva de calibração foi construída a partir dos valores da absorvância a 515 nm com todas as soluções medidas em cubetas de vidro, com percurso óptico de 1 cm e tendo como branco o metanol. As medidas foram efetuadas em triplicata em intervalos de 1 min entre cada leitura. A equação da curva de calibração do DPPH foi $C=110,547-0,02804A$, onde C corresponde à concentração do DPPH no meio, A é a absorvância medida no comprimento de onda de 515 nm e o coeficiente de correlação $R=0,9983$.

- **Leitura das medidas de absorvância nas amostras**

A solução estoque dos extratos (500 µg/mL) etanólico bruto de *Terminalia catappa* L. das folhas, casca do caule e madeira do caule, foram diluídas para as concentrações de 5, 10, 15, 20, 25, e 30 µg/mL. A medida da absorvância das misturas reacionais (0,3 mL da solução da amostra ou do controle positivo e 2,7 mL da solução estoque de DPPH na concentração de 40 µg/mL) foi realizada a 515 nm, no 1º, 5º e 10º min até completar 60 min. A solução metanólica do extrato foi utilizada como branco. A partir da equação da curva de calibração e dos valores de absorvância nos tempos avaliados até 60 min para cada concentração testada foram determinados os percentuais de DPPH remanescentes, calculados de acordo com Brand-Willians *et al.* (1995), conforme a equação: **%DPPHREM = [DPPH]T/[DPPH]To x 100**, onde [DPPH]T corresponde à concentração de DPPH no meio, após a reação com extrato, e [DPPH]To a concentração inicial de DPPH.

A quantidade de antioxidante necessária para decrescer a concentração inicial de DPPH em 50% (IC₅₀) foi calculada plotando o %DPPH REM no tempo de 10 min em oposição às concentrações do extrato. Os resultados foram expressos em µg/mL ± desvio-padrão. A absorvâncias em todas as concentrações testadas no tempo de 10 min foram convertidas em percentual de inibição (IP) determinado (a) pela equação: **IP={[Abscontrole-(Absamostra-Absbranco)]x100}/Abscontrole**,

onde Abscontrole é a absorvância inicial da solução metanólica de DPPH e Absamostra é a absorvância da mistura reacional (DPPH + amostra). Os resultados foram expressos em % de inibição e correspondem à média de três repetições (n=3) \pm desvio-padrão da média. Os valores encontrados foram submetidos à ANOVA seguido pelo teste de Tukey. Todas as análises foram realizadas utilizando o programa GraphPad Prism, versão 5.0.

2.7.2 Ensaio TBARS (Substâncias Reativas do Ácido Tiobarbitúrico)

Para o ensaio TBARS foram utilizados os seguintes reagentes:

- 2-carboxi-2,5,7,8-tetrametil-6-cromanol - TROLOX
- 2,2'-azobis(2-amidinopropano) – AAPH
- Ácido Tiobarbitúrico – TBA
- Ácido Tricloroacético – TCA

O ensaio TBARS foi estimado pela quantificação da peroxidação lipídica induzida por geradores de radicais livres em gema de ovo usada como substrato rico em lipídeos.

A gema do ovo foi homogeneizada 1% (v/v) em tampão fosfato (PBS) (pH 7,4). 1 μ L do homogenato foi acrescido de 100 μ L dos extratos etanólicos das folhas, casca do caule e madeira do caule ou controles positivos em diferentes concentrações (5, 50, 100, 150 e 200 μ g/mL).

Para a indução da peroxidação lipídica foram adicionados 100 μ L da solução de AAPH (0,17 M). Foram utilizados como antioxidante de referência (controles positivos) o TROLOX e o ácido gálico. A etapa reacional ocorreu por 30 min por 37°C. Após o aquecimento 500 μ L das amostras foram centrifugados com 500 μ L de TCA (15%) por 2000 g por 10 min. Uma alíquota de 500 μ L do sobrenadante foi misturado com 500 μ L de TBA (0,67%) e aquecido a 95°C por 30 min. Após o aquecimento a absorvância das amostras foi medida em espectrofotômetro a 532 nm. Os resultados foram expressos em porcentagem da atividade antioxidante.

2.8 Avaliação da Atividade Anticolinesterásica

Os ensaios qualitativo (CCD) e quantitativo (Microplaca) para avaliação do potencial inibitório da acetilcolinesterase foi realizado utilizando o método de Ellman com modificações (TREVISAN *et al.*, 2003; RHEE *et al.*, 2003; NIÑO *et al.*, 2006). Os experimentos foram realizado no Laboratório de Pesquisa em Recursos Naturais (LPqRN) do Instituto de Química e Biotecnologia (IQB) da Universidade Federal de Alagoas (UFAL).

- **Ensaio em Cromatografia em Camada Delgada (CCD)**

Para os ensaios anticolinesterásicos qualitativo em CCD foram preparadas as seguintes soluções:

- Tampão A: 50 mM de tampão Tris-HCl em pH 8,0.
- 1 mM de Iodeto de acetiltiocolina (ATCI - Sigma) solubilizado em água desionizada.
- 1 mM de ácido 5,5'-ditiobis-[2-nitrobenzóico] (DTNB ou reagente de Ellman - Sigma).
- Enzima acetilcolinesterase: Acetilcolinesterase (pó liofilizado contendo 1,18 mg; 426 U/mg de sólido - Sigma) A enzima foi solubilizada no tampão A para obtenção de uma solução estoque 502, 68 U/mL. Em seguida diluída novamente com o tampão A para obter uma solução final a 3 U/mL concentração necessária para realização do ensaio em CCD.
- Amostra: solução dos extratos e frações das folhas, madeira do caule e casca do caule de *T. catappa*, solubilizadas em metanol ou mistura de metanol:clorofórmio (1:1) para uma concentração de 3 mg/mL.
- Controle: cumarina na concentração de 2mg/mL solubilizada em metanol.

As amostras e o controle (2,5 μ L) foram aplicados em cromatoplaças DC-Alufolien, Sílicagel 60 F254, 0,2 mm (Merck). Em seguida a placa foi levada para capela de exaustão para evaporação por completo do solvente.

Borrifou-se a placa com uma solução de DTNB e ATCI (1:1), que foi mantida em repouso por um período de 3 minutos. Após secar borrifou-se com a solução da enzima acetilcolinesterase. Esperou-se por um período de 10 minutos para que a placa desenvolvesse uma coloração amarela. Nos extratos que inibiram a enzima e no controle, observou-se a formação de um halo branco. Em 20 – 30 minutos a coloração desapareceu.

- **Ensaio em microplaca**

Para os ensaios da atividade anticolinesterase em microplacas foram preparadas as seguintes soluções:

- Tampão A: 50 mM de tampão Tris-HCl em pH 8,0.
- Tampão B: 50 mM Tris-HCl em pH 8,0, contendo 0,1 % de albumina bovina sérica (BSA).
- Substrato: 15 mM de iodeto de acetilticolina (ATCI) (Sigma) solubilizado em água desionizada.
- Reagente de Ellman: 3mM de ácido 5,5'-ditiobis-[2-nitrobenzóico](DTNB-Sigma) dissolvido no tampão A.
- Enzima: Acetilcolinesterase (pó liofilizado contendo 1,18 mg; 426 U/mg de sólido - Sigma). A enzima foi inicialmente dissolvida no tampão A para obtenção de uma solução estoque 502,68 U/mL. Em seguida esta solução foi diluída no tampão B para a obtenção de uma solução final a 0,2 U/mL, concentração necessária para realização do ensaio em microplaca.
- Amostra: Extratos e frações de *T. catappa*, solubilizados em metanol para produzir uma solução estoque de 3 mg/mL. Em seguida essa solução foi diluída 10 vezes com o tampão A.
- Controle positivo: 2 mM de carbaril dissolvido em metanol.
- Branco: metanol a 10 % com o tampão A.

Para a reação enzimática no ensaio em microplaca utilizou-se espectrofotômetro Thermo Scientific - Multiskan Spectrum. Os ensaios foram realizados em quadruplicata. Em cada poço da placa foi adicionado 125 μL de DTNB; 50 μL de tampão B; 25 μL da amostra ou branco ou controle positivo e 25 μL da enzima acetilcolinesterase 0,2 U/mL. Em seguida a velocidade da reação enzimática foi medida 10 vezes a cada 13 segundos. Após este período adicionou-se 25 μL do substrato ATCI, e a absorvância foi novamente medida por 10 vezes a cada 13 segundos. Antes de cada leitura a placa foi levemente agitada por 10 segundos.

Após a leitura espectrométrica, a velocidade da reação antes de adicionar o substrato foi subtraída da velocidade de reação depois da adição do substrato. A porcentagem de inibição das amostras foi calculada por comparação com a inibição observada no branco (10 % de metanol em tampão A).

A atividade enzimática foi calculada através da fórmula:

$$Z/m = (DA \cdot V \cdot 1000)/(e \cdot d \cdot Dt \cdot v \cdot p)$$

Em que:

ΔA = variação de absorvância

V = volume do ensaio em L

e = coeficiente de absorção do ânion formado

d = caminho óptico em mm

Δt = variação do tempo em min.

v = volume da amostra utilizado no ensaio

p = concentração da amostra enzimática utilizada no ensaio em g/L

$\Delta A / \Delta t$ = coeficiente linear (b da reta)

$V = 2,5 \cdot 10^{-4}$ L

$e = 1,36 \text{ mmol}^{-1}\text{mm}^{-1}$

$v = 2,5 \cdot 10^{-5}$ L

$p = 0,0005164$ g/L

$d = 10$ mm

2.9 Avaliação da Atividade Moluscicida

Os ensaios para avaliação da atividade moluscicida foram realizados no Laboratório de Bioensaios, pertencente ao Laboratório de Pesquisa em Recursos Naturais (LPqRN) do Instituto de Química e Biotecnologia (IQB) da Universidade Federal de Alagoas (UFAL).

Os testes de atividade moluscicida foram realizados com os caramujos da espécie *Biomphalaria glabrata* Say na fase adulta, criados em laboratório e descendentes de exemplares, não infectados por trematódeos, originários da região

de Barreiro de Cima, zona periférica de Belo Horizonte, Minas Gerais. Essa população caracteriza-se por possuir 5 % de exemplares albinos (SANTOS, 2005).

Os caramujos foram mantidos em aquários de vidro, à temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, sistema de água corrente e desclorada, com uma mistura de terra, areia e carbonato de cálcio. Como alimentos recebiam alfaces frescas e ração para peixe.

Os ensaios biológicos para avaliação da atividade moluscicida consistiram na imersão do caramujo em soluções aquosas a 0,1 % de dimetilsulfóxido (DMSO) dos extratos etanólico e frações das folhas, casca e madeira do caule sob investigação nas concentrações apropriadas (SANTOS E SANT'ANA, 1999).

No bioensaio preliminar foram utilizados 5 caramujos por concentração, a solução teste para cada extrato vegetal foi preparada a $100 \mu\text{g/mL}$.

Dois conjuntos de controle foram usados visando verificar a suscetibilidade dos caramujos, um positivo com Niclosamida a $3 \mu\text{g/mL}$ e um negativo somente com água desclorada a 0,1 % de DMSO. O tempo de exposição destes organismos foi de 24 horas e o de observação 72 horas, com leitura e troca de água a cada 24 horas, além da remoção dos exemplares mortos. Durante o período de observação foi fornecido alface para os caramujos.

A morte dos caramujos foi indicada pela descoloração, ausência de contrações musculares, hemorragia e deterioração dos tecidos do corpo. Apenas foi submetido ao teste apurado o extrato vegetal que promoveu no mínimo 40% de mortalidade a $100 \mu\text{g/mL}$. Os valores de concentração letal (CL_{90} , CL_{50} e CL_{10}) foram estatisticamente calculados, através da análise de regressão linear, utilizando o programa Probit.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

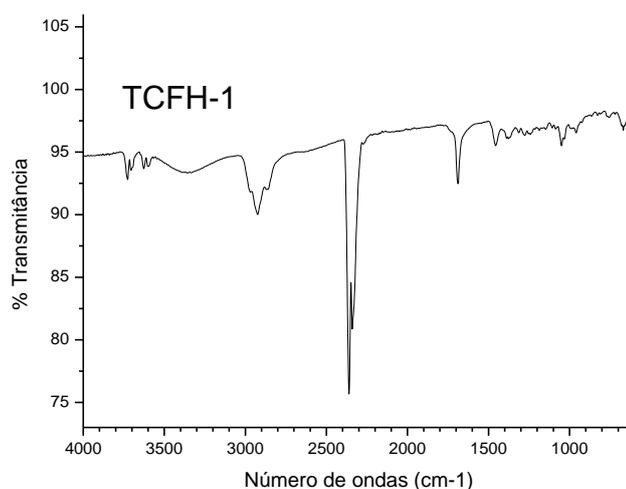
3.1 Estudo Fitoquímico

Após a triagem das atividades biológicas dos extratos etanólicos as frações foram destinada para os processos de purificação. No entanto, durante o processo de separação observou-se que as frações provenientes do extrato etanólico da casca do caule eram muito polares e complexas e os processos de separação não foram eficientes.

O estudo fitoquímico dos extratos da folha e madeira do caule resultou, até o momento, no isolamento de quatro substâncias um triterpeno, um ácido fenólico e dois fitoesteróides que foram codificadas de acordo com a parte da planta estudada (F = folhas), (M = madeira) e dos solventes utilizados para obtenção das frações (H = Hexano, A = Acetato de Etila).

De acordo com análise em CCD utilizando reagente de Liebermann Burchard e espectroscopia na região de comprimento de onda do infravermelho, que revelou bandas de estiramento para grupos hidroxila e carbonila em 3400 cm^{-1} e 1670 cm^{-1} respectivamente, (**Figura 20**) sugere-se que o composto codificado TCFH-1 seja da classe triterpênica. Novas análises de RMN unidimensional e bidimensional estão sendo realizadas para elucidação estrutural dessa substância.

Figura 20 - Espectro na região do infravermelho da substância codificada TCFH-1.



Fonte: Autora, 2010.

3.2 Identificação e Determinação Estrutural

3.2.1 Identificação Estrutural da Substância Codificada como TCFH-2

A substância TCFH-2 foi isolada como um sólido de cor branca, ponto de fusão 320 - 325 °C. O espectro na região de comprimento de onda do infravermelho revelou a presença de bandas de estiramento para grupos hidroxila em 3400 cm^{-1} e estiramento C-O da carbonila carboxílica em 1690 cm^{-1} (**Figura 21, p 52**) (SILVERSTEIN *et al.*, 2007).

A análise do espectro de RMN ^1H , obtido a 400 MHz em $\text{CDCl}_3:\text{CD}_3\text{OD}$ (3:1) (**figura 22, p 54**), mostrou sinais de prótons metílicos entre δ 0,53 e 1,10. Em δ 3,13 (m) foi registrado um sinal na forma de multiplete atribuído ao hidrogênio do grupo metileno, este sinal indica a presença de acoplamento geminal dos hidrogênios diastereotópicos C-23. Sinais em δ 3,28 (d) e δ 3,50 são relativos aos hidrogênios carbinólicos H-3 e H-2, respectivamente. Em δ 5,02 observa-se um simpleto largo, relativo ao hidrogênio olefínico H-12.

A análise comparativa dos espectros de ^{13}C e DEPT 135° (**figuras 23 e 24, p 56 e 57**) obtidos para TCFH-2 permitiu identificar sinais referentes a trinta átomos de carbono, sendo seis carbonos metílicos (δ 12,74; 16,70; 16,76; 16,87; 20,89; 23,28) nove carbonos metilênicos (δ 17,95; 23,15; 24,01; 27,79; 30,49; 32,29; 36,67; 46,12; 67,14;), oito carbonos metínicos (δ 38,78; 38,94; 47,27; 47,65; 52,68; 68,26; 78,29; 125,07) e sete carbonos não hidrogenados (δ 37,73; 39,32; 42,52; 42,99; 138,21; 180,65).

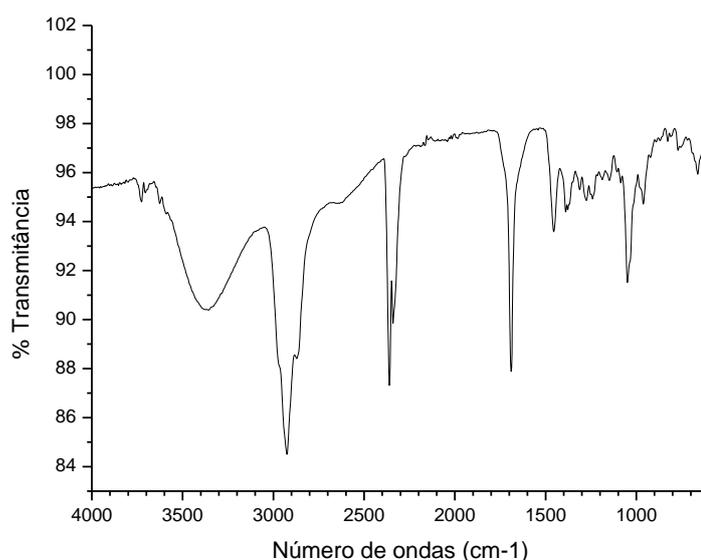
O valor de deslocamento químico em δ 180,65 sugere a presença de uma carbonila do grupo ácido que foi atribuído ao carbono na posição C-28. Os sinais em δ 68,26; 78,29 e 67,14 indicam a presença dos carbonos carbinólicos que podem ser atribuídos aos carbonos C-2, C-3 e C-23 e os sinais em δ 125,07 e 138,21 indicam a existência de uma ligação dupla trissubstituída. O espectro de RMN HSQC permitiu observar as correlações diretas C-H, o espectro de COSY mostrou as correlações entre os hidrogênios que estão acoplados por $^2\text{-}^3\text{J}$ (acoplamentos geminais e vicinais). A análise do espectro de HMBC (correlação H-C a longa distância) foi responsável pela união dos fragmentos definidos pela análise do espectro de COSY, devido às interações observadas entre átomos de carbono não hidrogenados (**Figuras 25, 26 e 27, p 58, 59 e 60**) e (**Tabela 01, p 53**).

Com base nos dados apresentados e análise completa das informações espectrais, comparados com os dados registrados na literatura (JUNGES *et al.*, 2000; AGUIRRES *et al.*, 2006), atribui-se a estrutura da substância TCFH-2 como sendo um triterpenóide do grupo ursano, conhecido como ácido asiático.

O ácido asiático possui diversas atividades farmacológicas como a inibição de biofilmes provocados por bactérias como a *Pseudomonas aeruginosa* que causam infecção das vias aéreas e é responsável pela morte de vários pacientes com fibrose cística (GAO *et al.*, 2007), possui atividade hepatoprotetora (JEONG *et al.* 2007). Estudos *in vivo* e *in vitro* comprovaram que o ácido asiático aumenta a síntese de acetilcolina (KIM *et al.*, 2004). Derivados do ácido asiático demonstraram efeito neuroprotetor contra a toxicidade induzida por beta-amilóide, um peptídeo associado à Doença de Alzheimer (JEW SANG-SÚP *et al.*, 2000).

Vários estudos sugerem que o ácido asiático possui atividade citotóxica. Coldren *et al.*, (2003) demonstraram que o ácido asiático tem atividade citotóxica em fibroblastos. Diversos grupos mostraram que essa molécula induz a apoptose e a paralisação do ciclo celular em diferentes tipos de câncer (QIAN *et al.*, 1982; BABU *et al.*, 1995; CHO *et al.*, 2006; HSU *et al.*, 2006; PARK *et al.*, 2007).

Figura 21 - Espectro na região do infravermelho da substância TCFH-2.



Fonte: Autora, 2010.

Tabela 1 - Dados de RMN ^1H , ^{13}C , HSQC, COSY e HMBC para a amostra TCFH-2.
Valores de deslocamento químico em ppm, solvente $\text{CDCl}_3:\text{CD}_3\text{OD}$ 3:1.

TCFH-2 ($\text{CDCl}_3:\text{CD}_3\text{OD}$)				
C	δC^{13}	δH^1	COSY	HMBC
1	46,12	1,77/0,72	1,77 (0,72)	
2	68,26	3,50 sl	3,50 (1,77; 0,72; 3,28)	0,72
3	78,29	3,28 d		
4	42,52			3,28; 0,54
5	47,65	0,96	0,96 (1,19)	0,80; 0,53; 1,77
6	17,95	1,19	1,19 (0,96)	1,75
7	32,29	1,34/1,10		0,59
8	39,32			0,59; 0,88; 1,39
9	47,27	1,39		0,80; 0,59; 5,02
10	37,73			0,72; 1,39
11	23,15	0,71/1,74	1,74 (1,39; 0,71)	
12	125,07	5,02 sl	5,02 (1,74; 1,97)	1,97; 1,74
13	138,21			1,74; 1,97
14	42,99			
15	27,79	1,65/0,89	1,65(0,89)	0,88;
16	24,01	1,79/1,44		1,97
17	42,99			
18	52,68	1,97	1,97 (0,64)	0,64; 5,02
19	38,94	1,13	1,13 (0,64)	0,64; 0,73; 1,97
20	38,78	0,81		0,73
21	30,49	1,10/1,28	1,10 (0,73)	0,73
22	36,67	1,46/1,40		
23	67,14	3,13/3,08 m	3,13 (3,08)	
24	12,74	0,54		
25	16,70	0,59		
26	16,87	0,80		
27	23,28	0,88		
28	180,65			1,79; 1,97
29	16,76	0,64		
30	20,89	0,73		

Fonte: Autora, 2010.

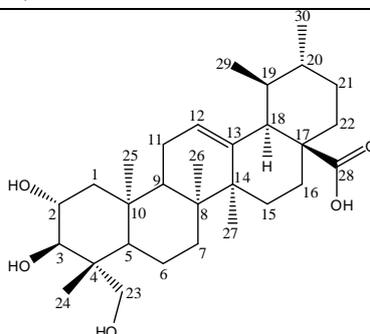
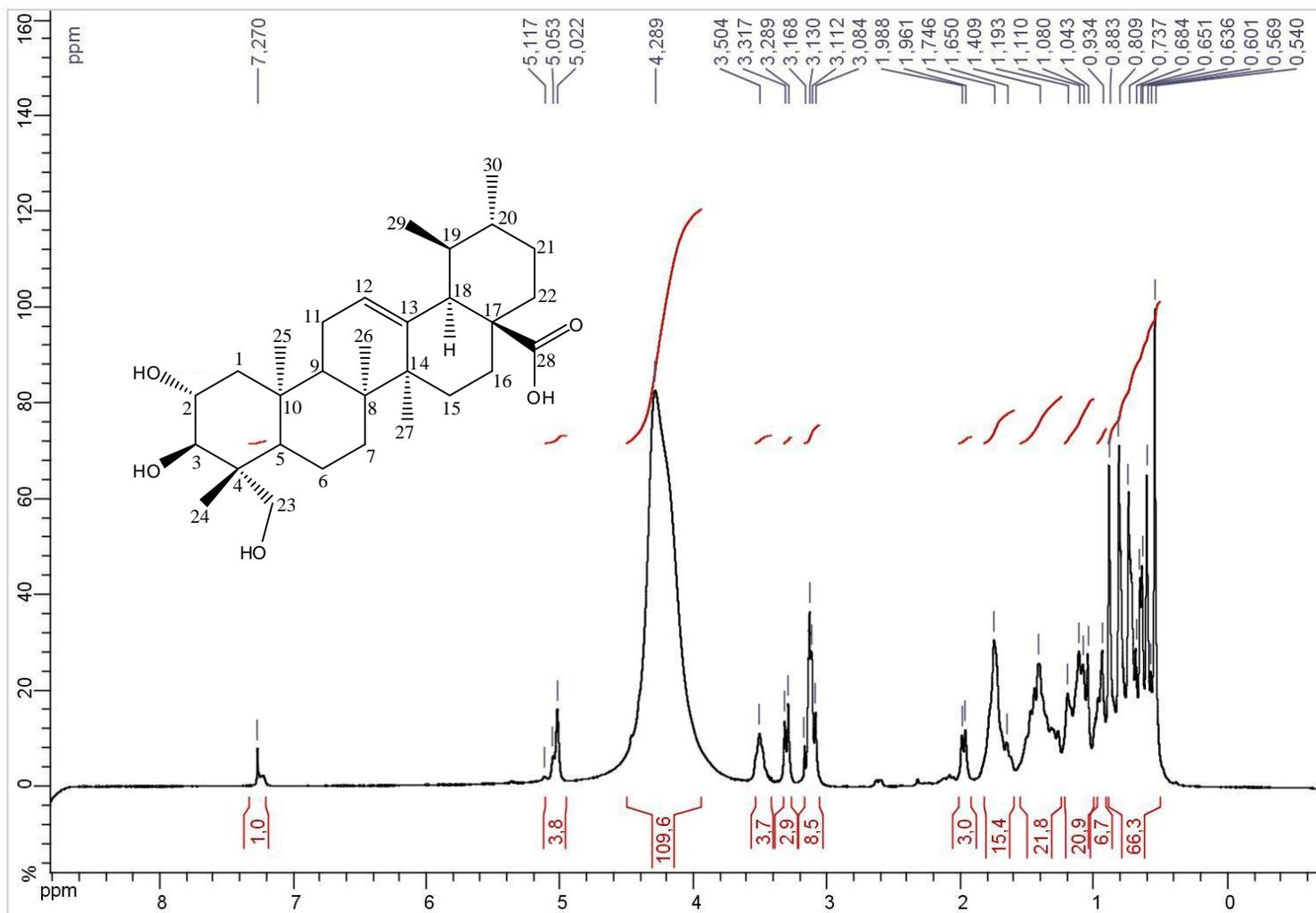
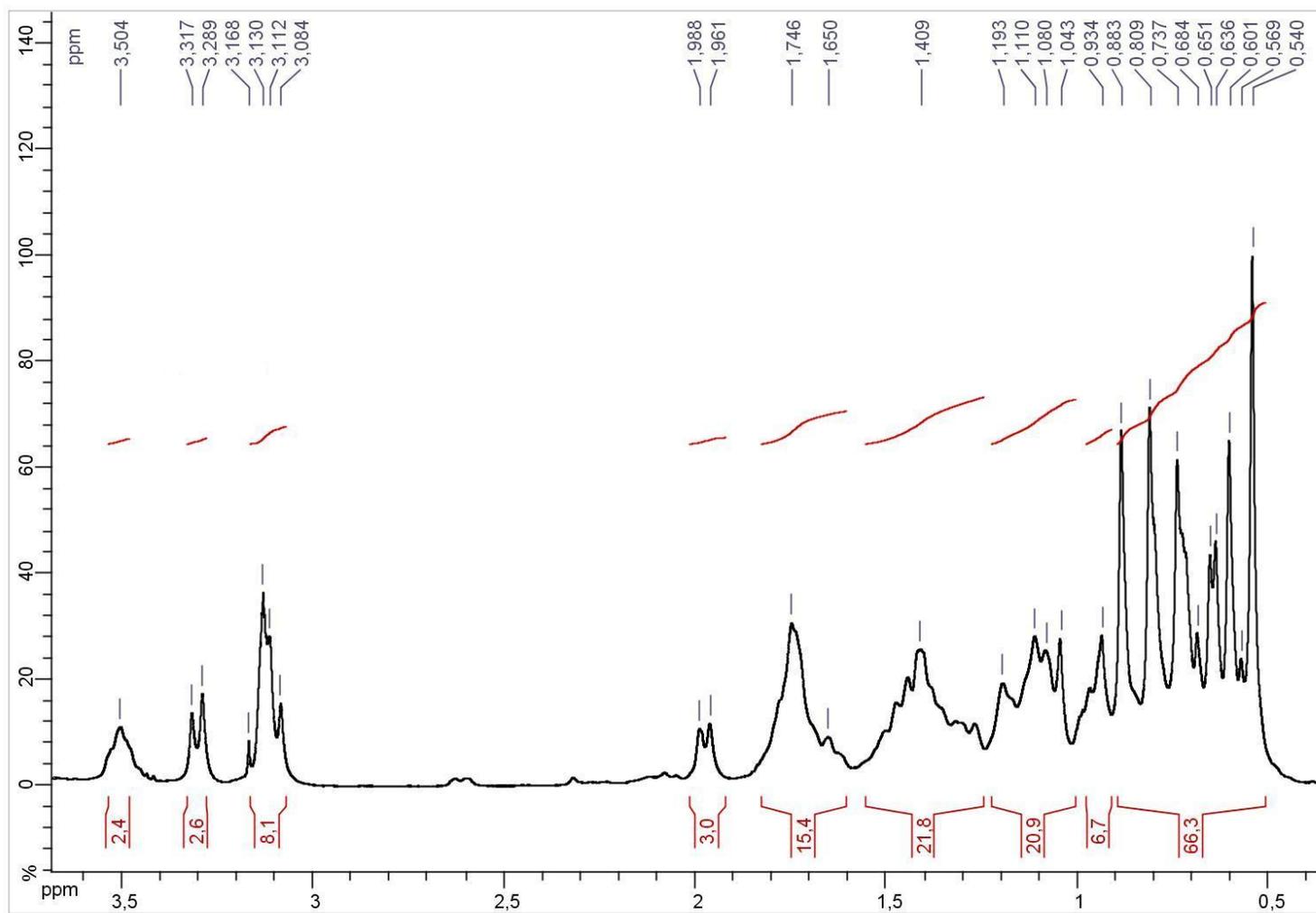


Figura 22 - Espectro de RMN ^1H (400 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ 3:1) da substância TCFH-2.



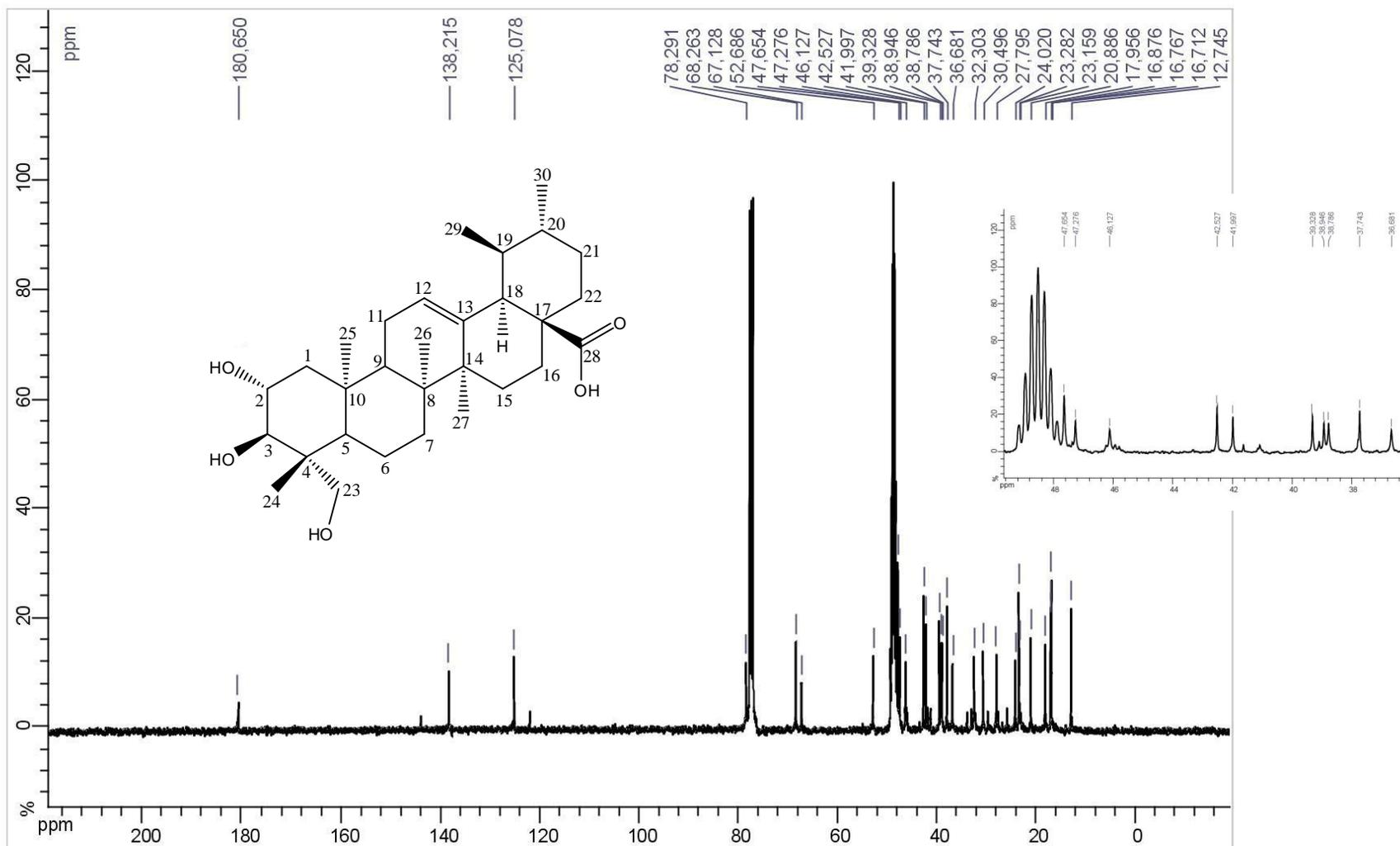
Fonte: Autora, 2010.

Figura 22a - Expansão do espectro de RMN ^1H (400 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ 3:1) da substância TCFH-2.



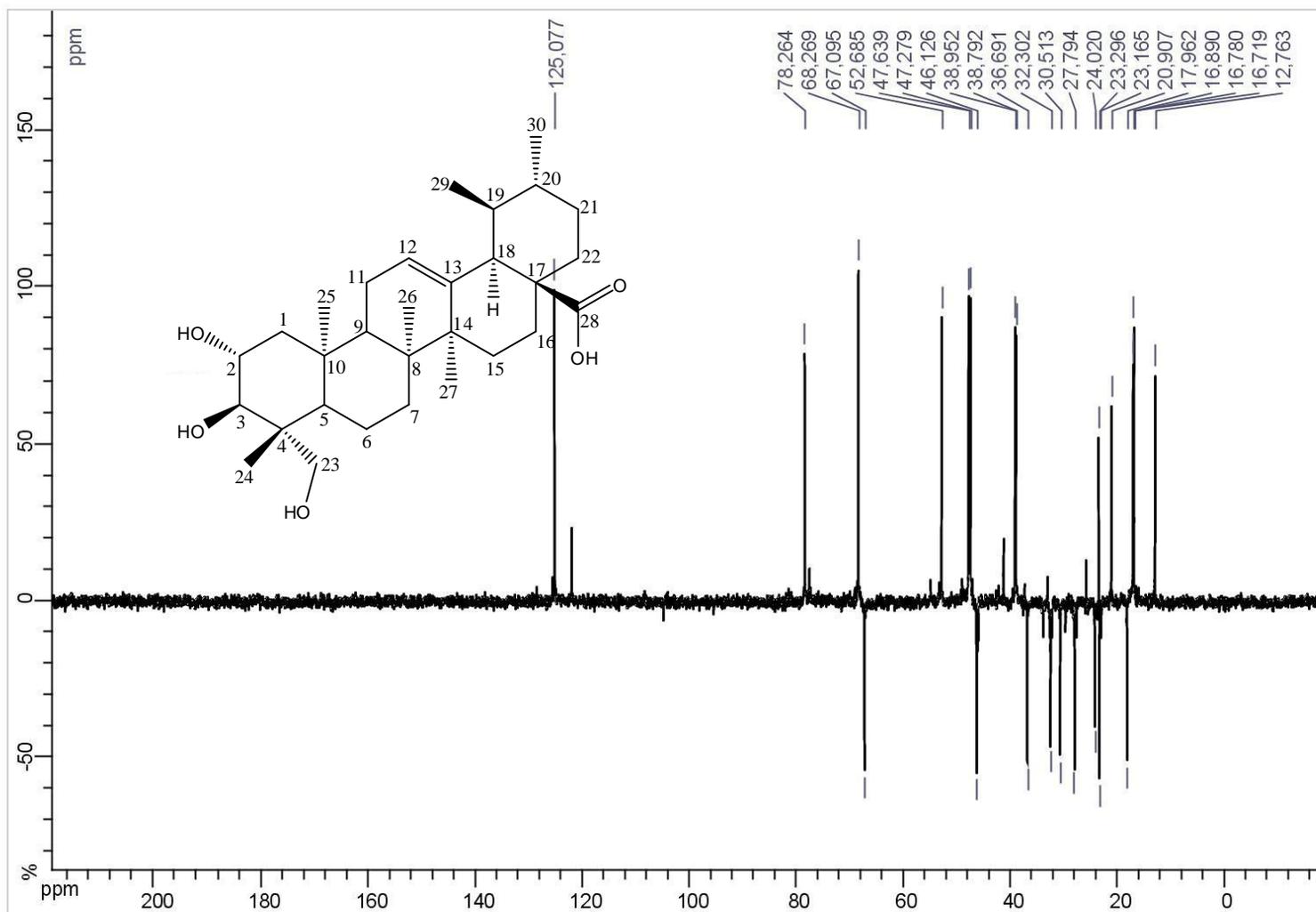
Fonte: Autora, 2010.

Figura 23 - Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ 3:1) da substância TCFH-2.



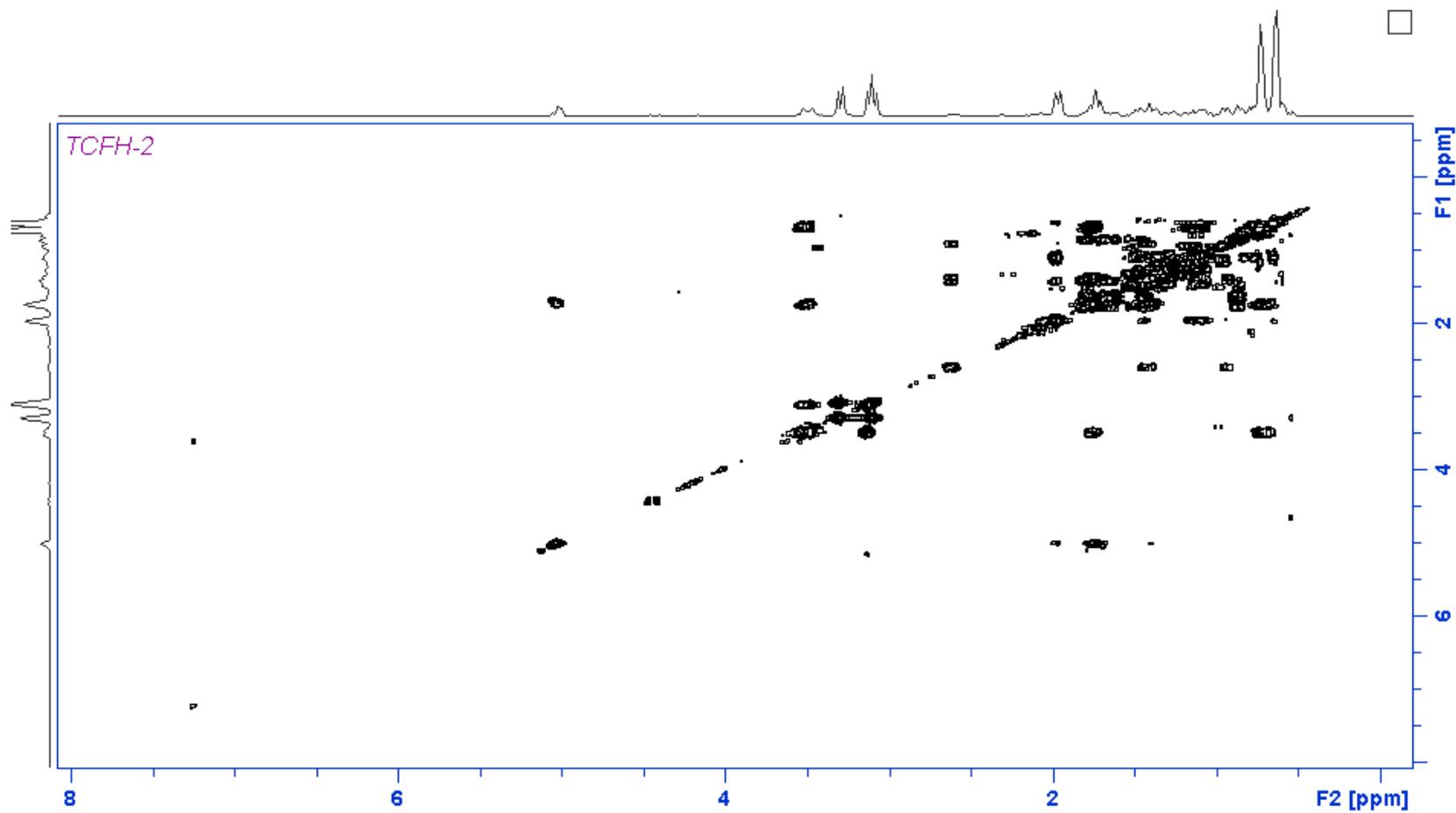
Fonte: Aurora, 2010.

Figura 24 - Espectro de RMN DEPT 135° ¹³C (100 MHz, CDCl₃/CD₃OD 3:1) da substância TCFH-2.



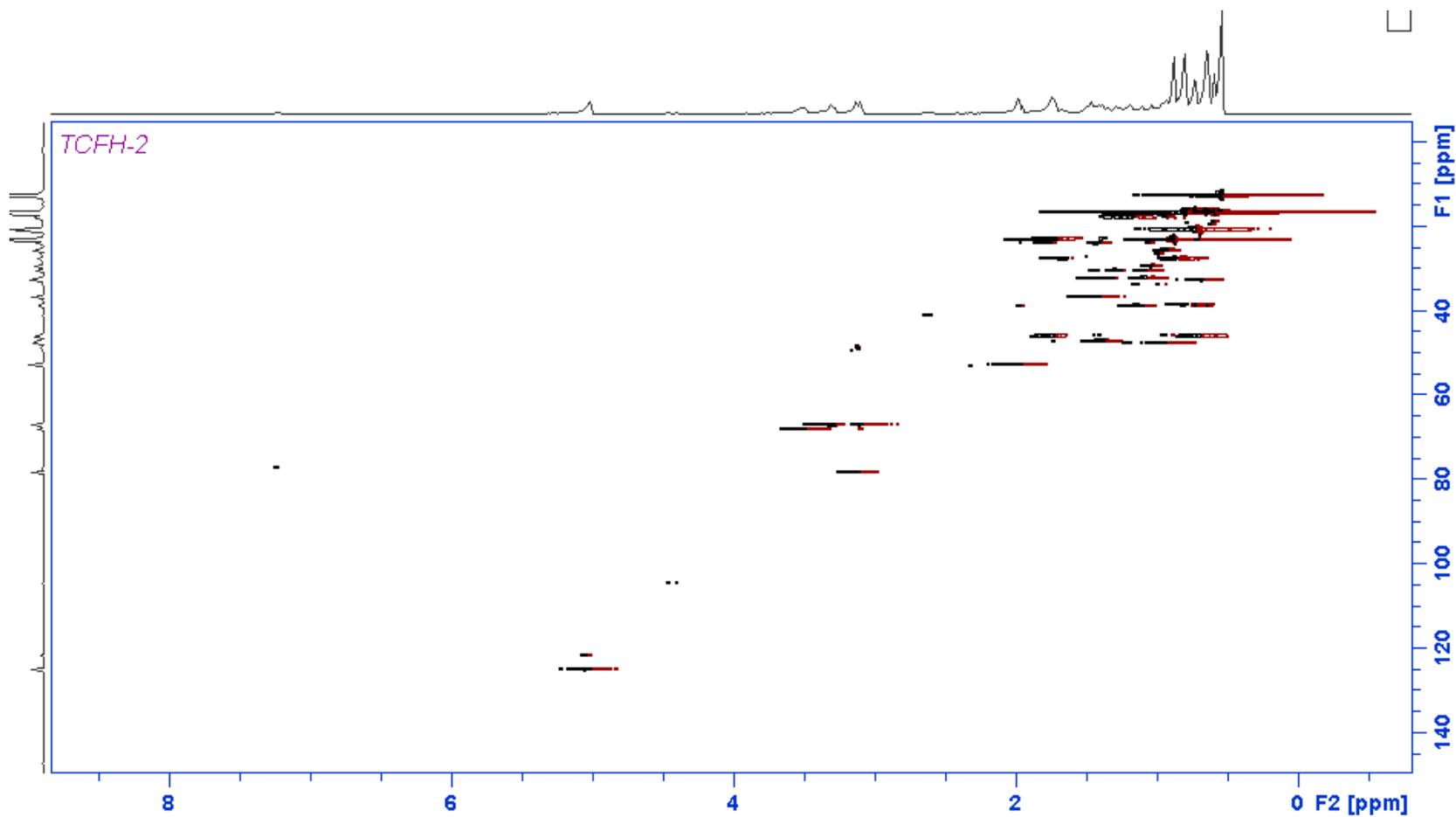
Fonte: Aurora, 2010.

Figura 25 - Espectro de RMN 2D COSY de TCFH-2 em $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ 3:1.



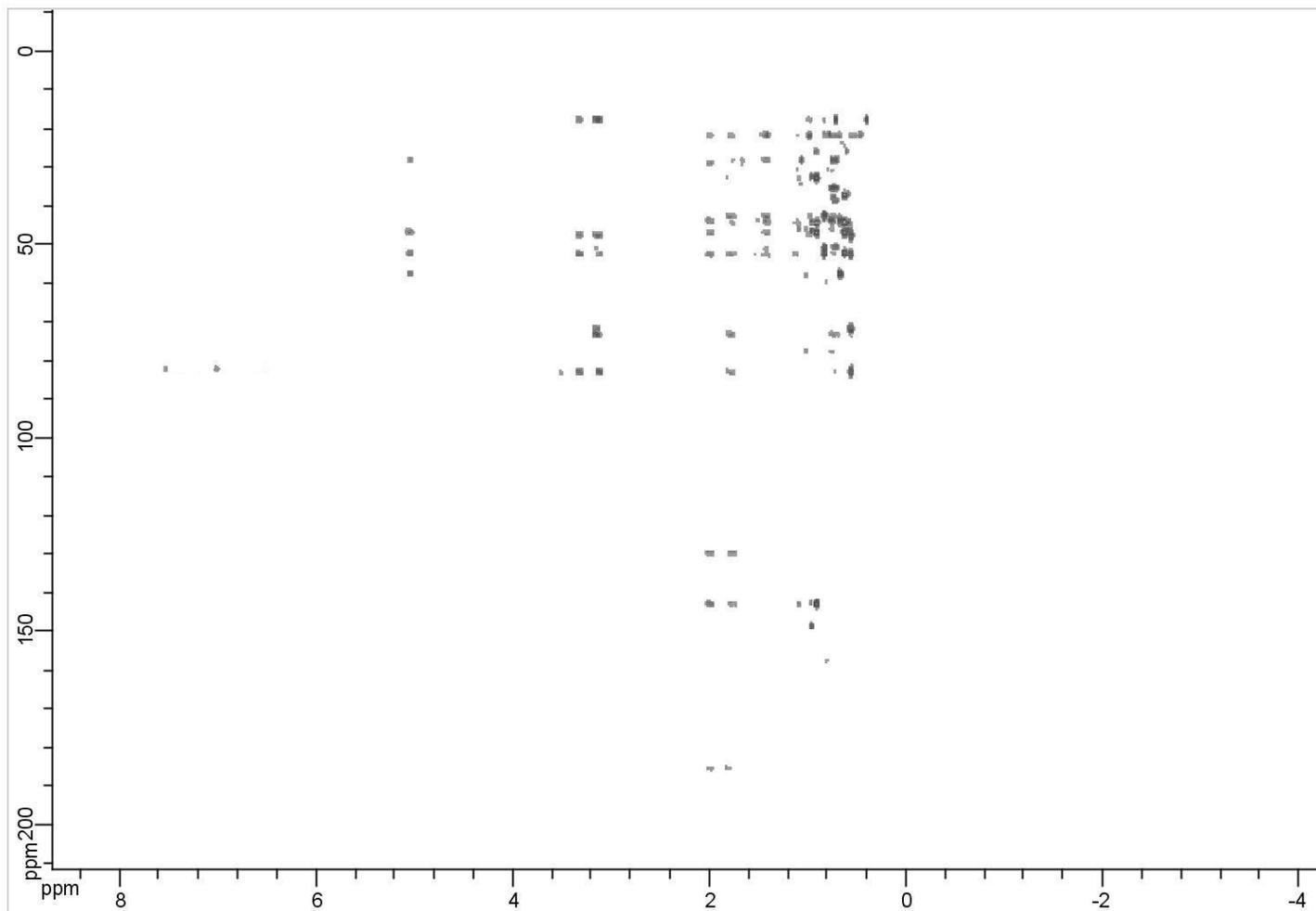
Fonte: Autora, 2010.

Figura 26 - Espectro de RMN 2D HSQC de TCFH-2 em $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ 3:1.



Fonte: Autora, 2010.

Figura 27 - Espectro de RMN 2D HMBC de TCFH-2 em $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ 3:1.



Fonte: Autora, 2010.

3.2.2 Identificação Estrutural da Substância Codificada como TCFA-1

A substância TCFA-1 foi isolada como cristais de cor branca, ponto de fusão 240° C (metanol). O espectro na região de comprimento de onda do infravermelho (**Figura 28, p 63**), revelou a presença de bandas de absorção de estiramento e deformação característico de sistemas aromáticos 1,3,4,5 tetrasubstituído (1623, 1548, 1455, 867 cm^{-1}), grupo carboxila (1700 e 3151 cm^{-1}), grupos hidroxila de fenol (3477 cm^{-1}) e estiramento C-O de fenol (1273 e 1044 cm^{-1}) (SILVERSTEIN *et al.*, 1998).

O espectro de RMN ^1H em CD_3OD a 400 MHz (**Figura 29, p 64**) revelou a presença de apenas um simpleto em δ 7,07, valor de deslocamento químico característico para átomos de hidrogênio em anel aromático (SILVERSTEIN *et al.*, 1998).

A análise do espectro de RMN ^{13}C (**Figura 30, p 65**) em CD_3OD 100 MHz da substância indicou a presença de apenas cinco sinais. Sendo que quatro desses sinais apresentaram valores de deslocamento químico compatíveis com carbonos em um sistema aromático (δ 109,93; 121,54; 139,20; 145,99). O quinto sinal, com deslocamento químico δ 170,03 foi atribuído a um carbono de grupo carboxila, como evidenciado no espectro na região do infravermelho (SILVERSTEIN *et al.*, 1998) (**Tabela 02, p 62**).

Com base nos dados observados nos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C para a substância TCFA-1 associados à análise comparativa com os dados descritos na literatura (ALMEIDA *et al.*, 2005; ALVES *et al.*, 2007) propomos para TCFA-1 a estrutura do Ácido 3,4,5 triidroxibenzóico conhecido como ácido gálico.

O ácido gálico pode existir na forma livre ou ligado como galoil. É de ocorrência comum em chás, vinhos vermelhos, frutas e em várias plantas medicinais. Estudos comprovam diversas atividades biológicas relacionada ao ácido gálico como antiinflamatória, anti-mutagênica, anticancerígena, antioxidante, antimicrobiana, tripanocida e hepatoprotetora (CHYAU, *et al.*, 2006; ANAND *et al.*, 1997; SOONG *et al.*, 2006; ESTEVAM, 2006; LONGHINI, 2006).

Além das atividades biológicas, o ácido gálico tem sido usado como produto de partida, originando diversos derivados com importantes ações farmacológicas, tais como anticarcinogênica, analgésica, antioxidante e antimalárico (NEGI *et al.*, 2005;

KROGH *et al.*, 2000). O ácido gálico possui atividade analgésica comparada ou superior à substâncias como o ácido acetilsalicílico e paracetamol (KROGH *et al.*, 2000).

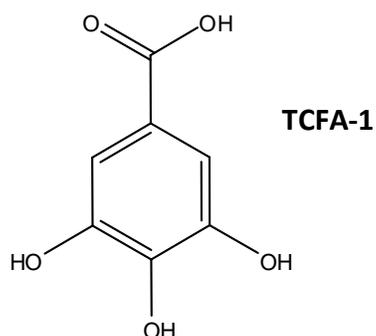
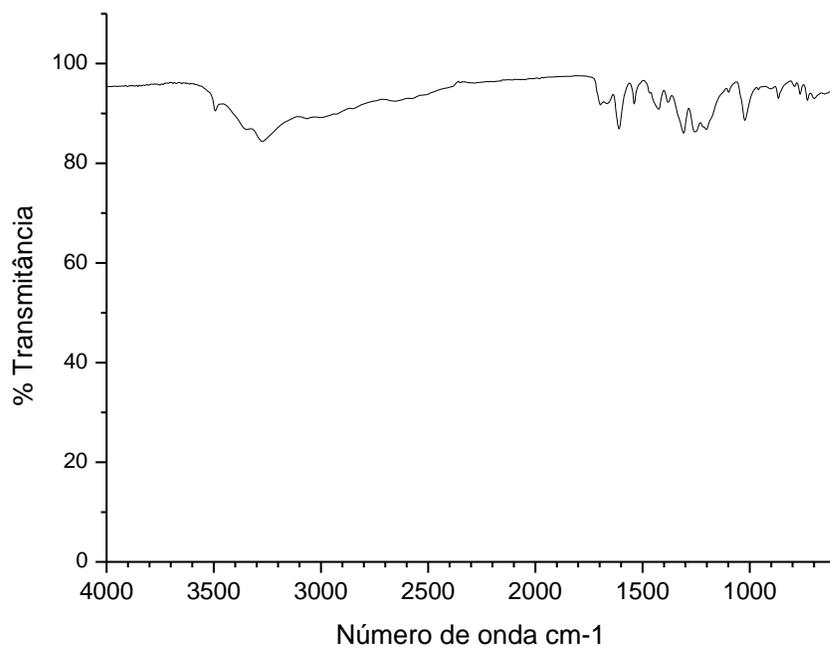


Tabela 2 - Resultados experimentais de RMN (^{13}C : 100 MHz, CD_3OD) da substância TCFA-1 e do ácido gálico (ALMEIDA *et al.*, 2005).

	Experimental CD_3OD	Literatura CD_3OD
Carbono	TCFA-1	Ácido gálico
1	121,54	120,70
2	109,93	109,70
3	145,99	145,10
4	139,20	138,30
5	145,99	145,10
6	109,93	109,10
7	170,03	169,10

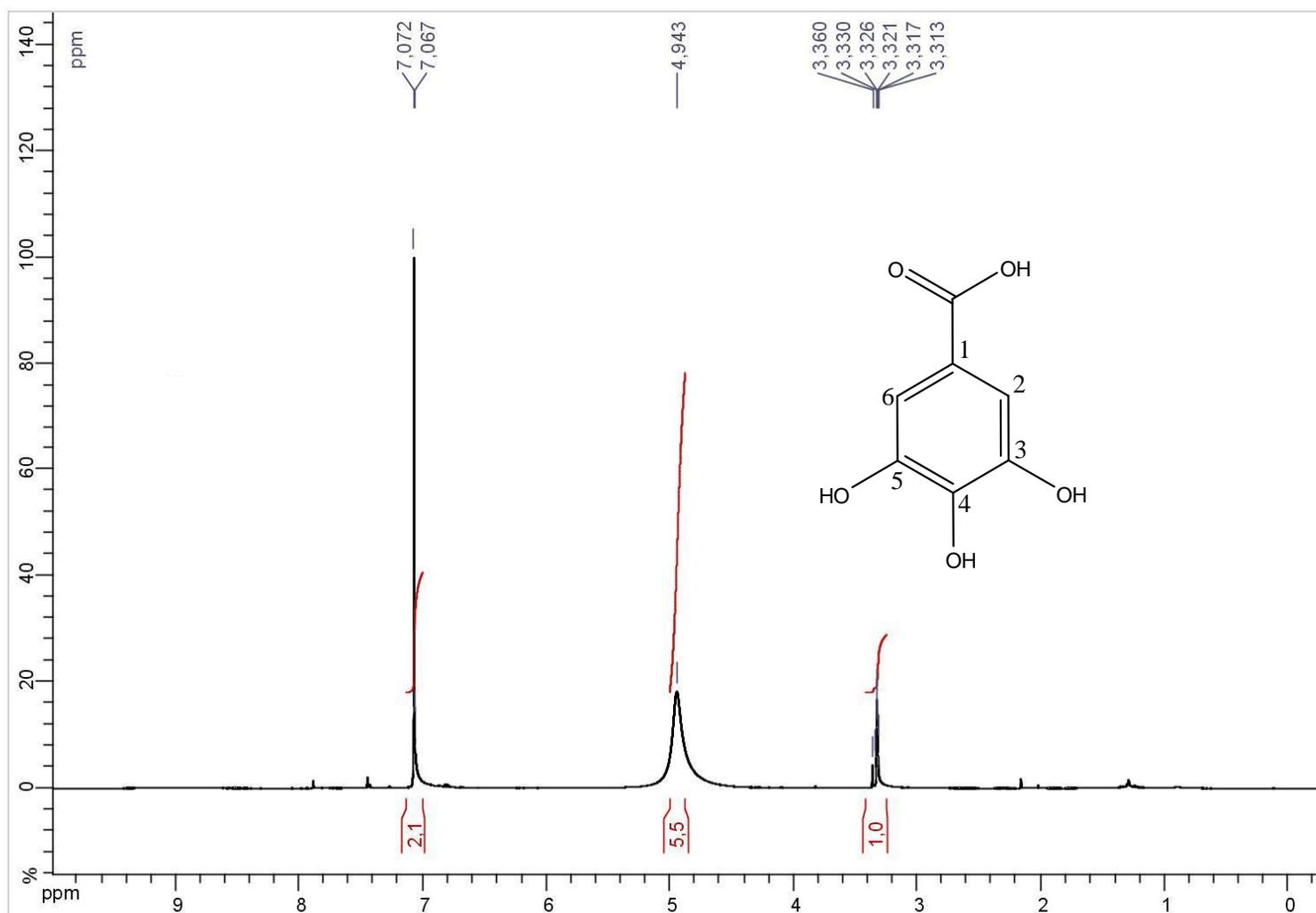
Fonte: Autora, 2010.

Figura 28 - Espectro na região do infravermelho (ATR) da substância TCFA-1



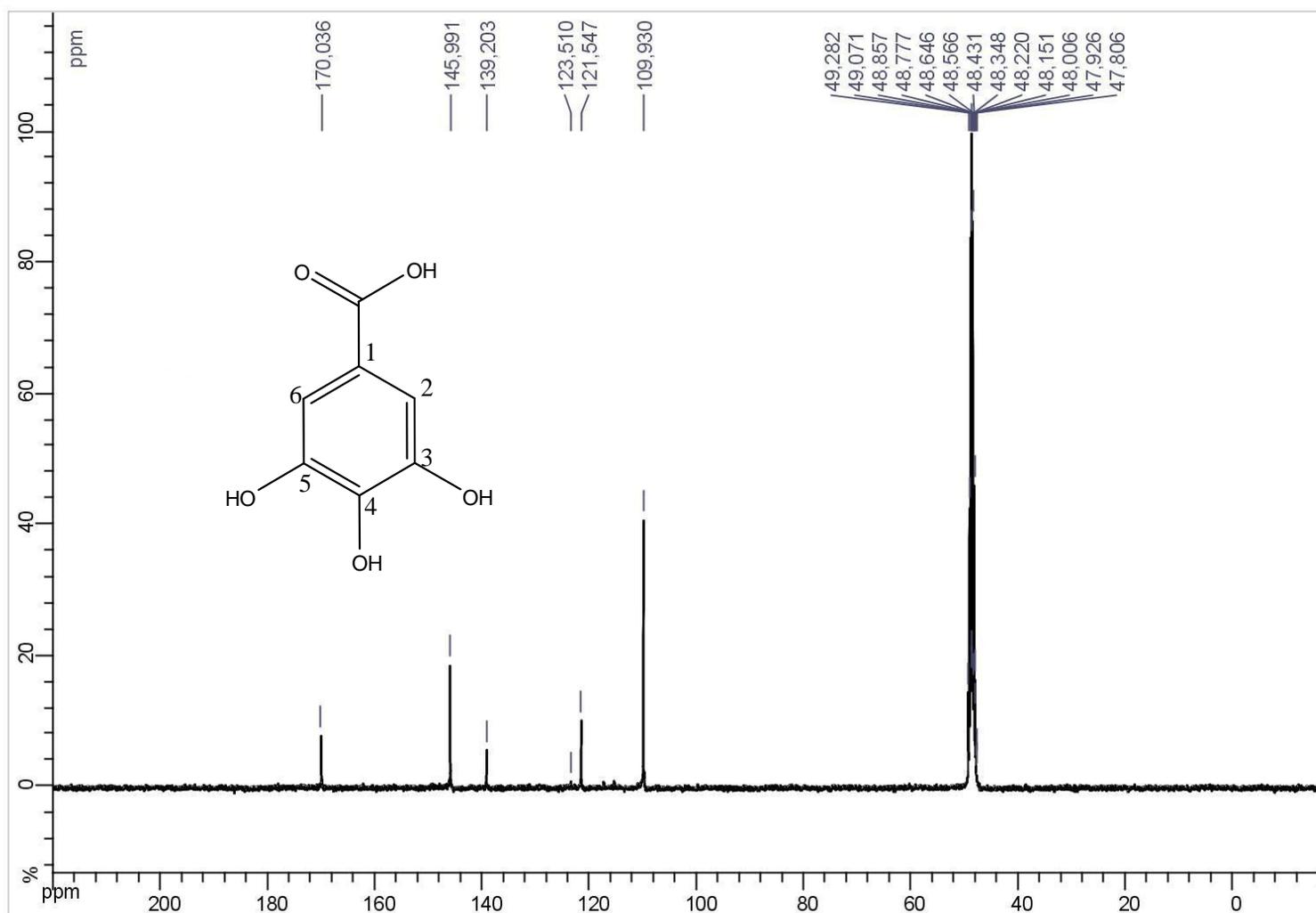
Fonte: Autora, 2010.

Figura 29 - Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CD_3OD) da substância TCFA-1.



Fonte: Autora, 2010.

Figura 30. Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CD_3OD) da substância TCFA-1.



Fonte: Autora, 2010.

3.2.3 Identificação Estrutural das Substâncias Codificadas como TCMH-1a e TCMH-1b

As substâncias TCMH-1a e TCMH-1b, em mistura, foram obtidos como cristais na forma de agulhas, branco e ponto de fusão 133,5-136,5 °C (etanol). O espectro obtido na região de comprimento de onda do infravermelho revelou a presença de bandas de estiramento para grupos hidroxila em 3426 cm⁻¹, sistema alifático 2937 cm⁻¹, ligação olefínica em 1663 cm⁻¹, estiramento C-O em 1047 cm⁻¹, além de banda de deformação do esqueleto carbônico olefínico em 1462 e 1376 cm⁻¹ (**Figura 31, p 67**) (SILVERSTEIN *et al.*, 1998).

O espectro de RMN ¹H em CDCl₃ (**Figuras 32, 32a, p 68 e 69**) permitiu reconhecer valores de deslocamento químico correspondentes a vários grupos metilas (sinais entre δ 0,7 e δ 1,0), múltiplos sinais entre δ 1,0 e δ 2,0 que podem ser atribuídos a grupos metilênicos. Um multiplete em δ 3,53 (H-3) referente a hidrogênios hidroximetínicos, sinais compatíveis com a presença de hidrogênios olefínicos em δ 5,36 (H-6), δ 5,12 (H-22) e δ 5,05 (H-23). Todos esses sinais sugerem a presença de fitoesteróides (MACARI *et al.*, 1990; BORGES, 2006).

A análise dos dados obtidos dos espectros de RMN ¹³C e DEPT 135° e DEPT 90° das substâncias TCMH-1a e TCMH-1b (**Figuras 33, 33a, 34 e 35, p 70 - 73**) revelou a presença de vinte e nove sinais de átomos de carbonos, dentre esses três não hidrogenados (C), onze monoidrogenados (CH), onze diidrogenados (CH₂) e seis triidrogenados (CH₃). No espectro de RMN ¹³C a presença de esteróides também foi confirmada devido aos sinais δ 140,75 e δ 121,74 (C-5 e C-6) de uma ligação dupla trissubstituída δ 140,75; δ 121,74 (C-5 e C-6) e δ 138,36 e δ 129,25 (C-22 e C-23). Além da presença de um sinal com deslocamento em δ 71,81 que confirma a presença do carbono oxigenado (C-3) (MACARI *et al.*, 1990.)

Através das comparações dos dados espectrais obtidos (**Tabela 3, p 74**) juntamente com os descritos na literatura (MACARI *et al.*, 1990) foi possível identificar as substâncias TCMH-1a e TCMH-1b, respectivamente, como sendo sendo os fitoesteróides conhecidos como sitosterol (estimasta-5-en-3β-ol) e estigmasterol (5,22-estimastadien-3β-ol).

Diversas atividades biológicas são atribuídas ao sitosterol como antitumoral, efeito hiperlipoproteinemia, inibindo a absorção do colesterol. A atividade

antinociceptiva está associada ao sitosterol e estigmasterol (HESS, 1995; SANTOS, 1995).

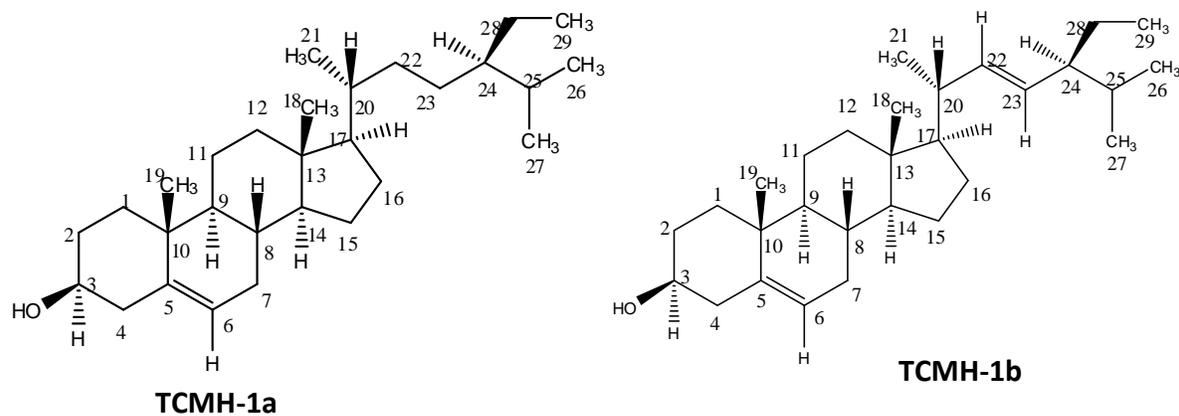
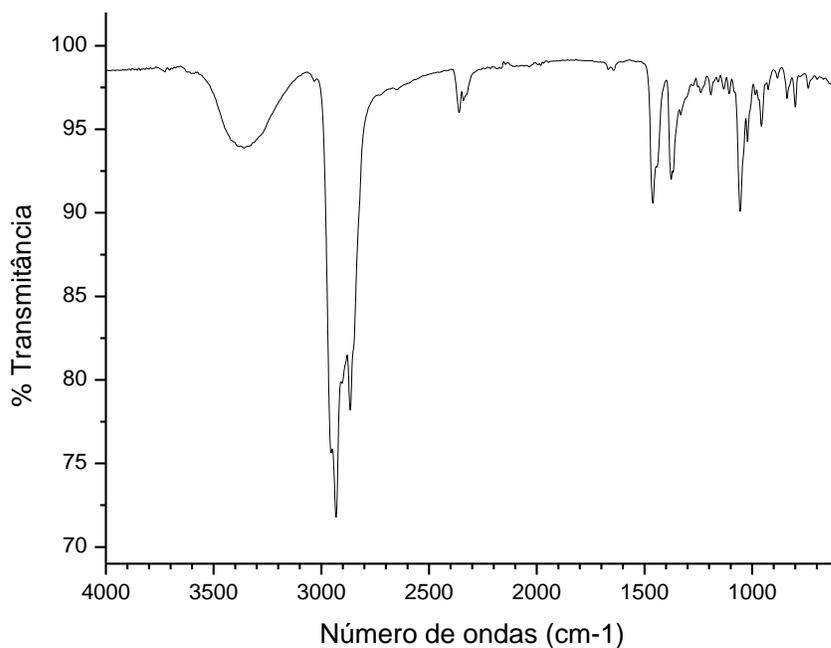
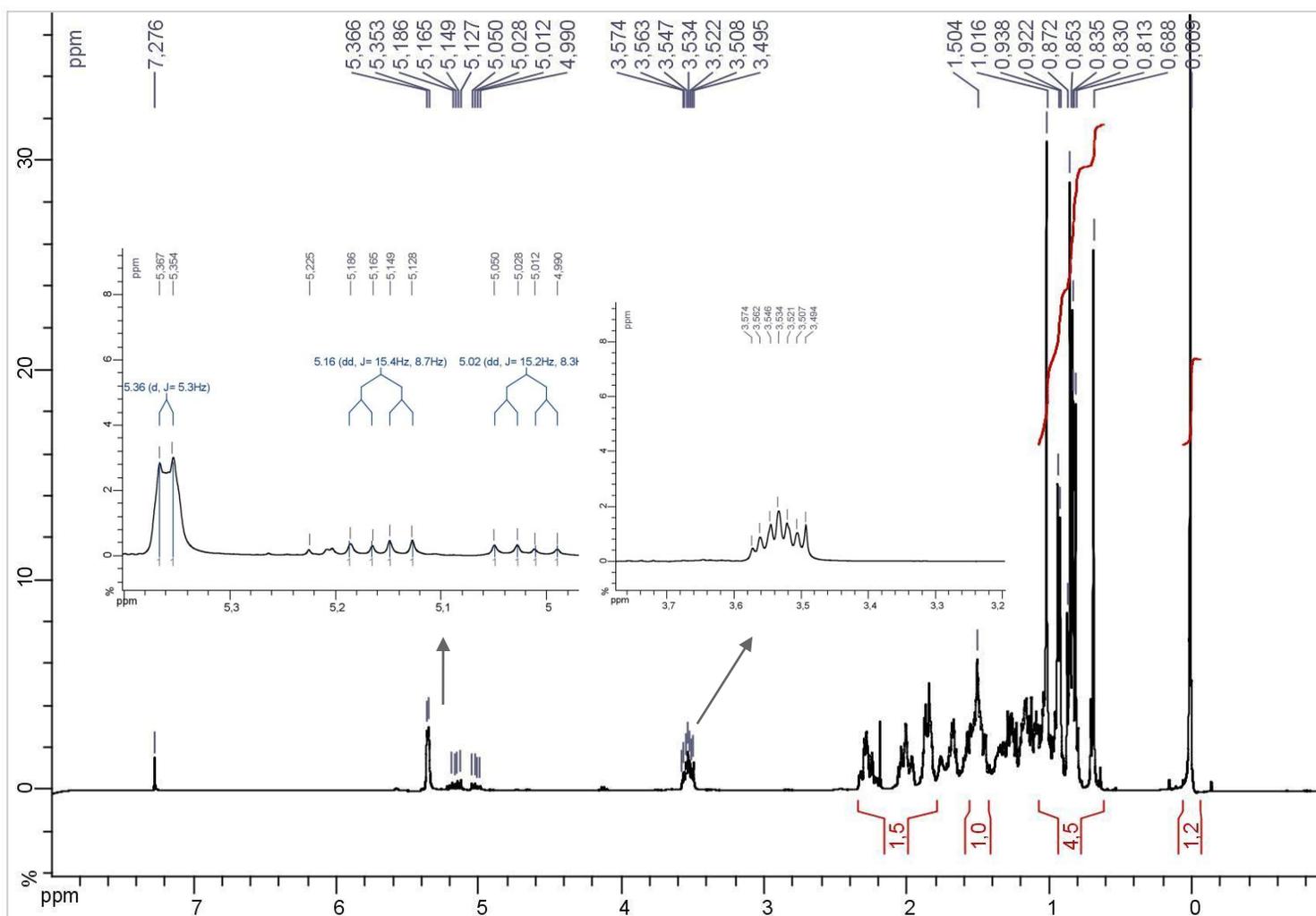


Figura 31 - Espectro na região do infravermelho das substâncias TCMH-1a e TCMH-1b obtido através da técnica de ATR.

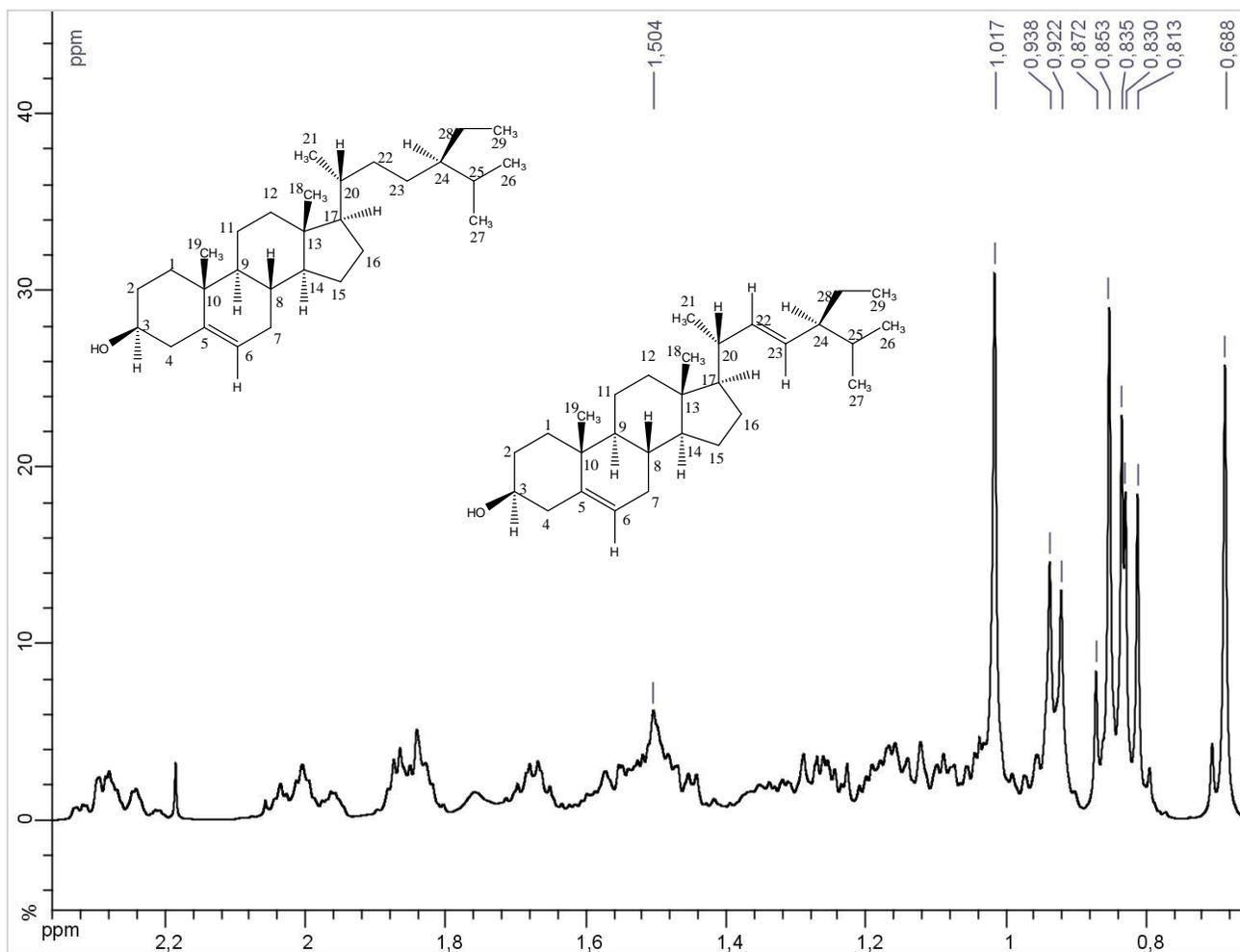


Fonte: Autora, 2010.

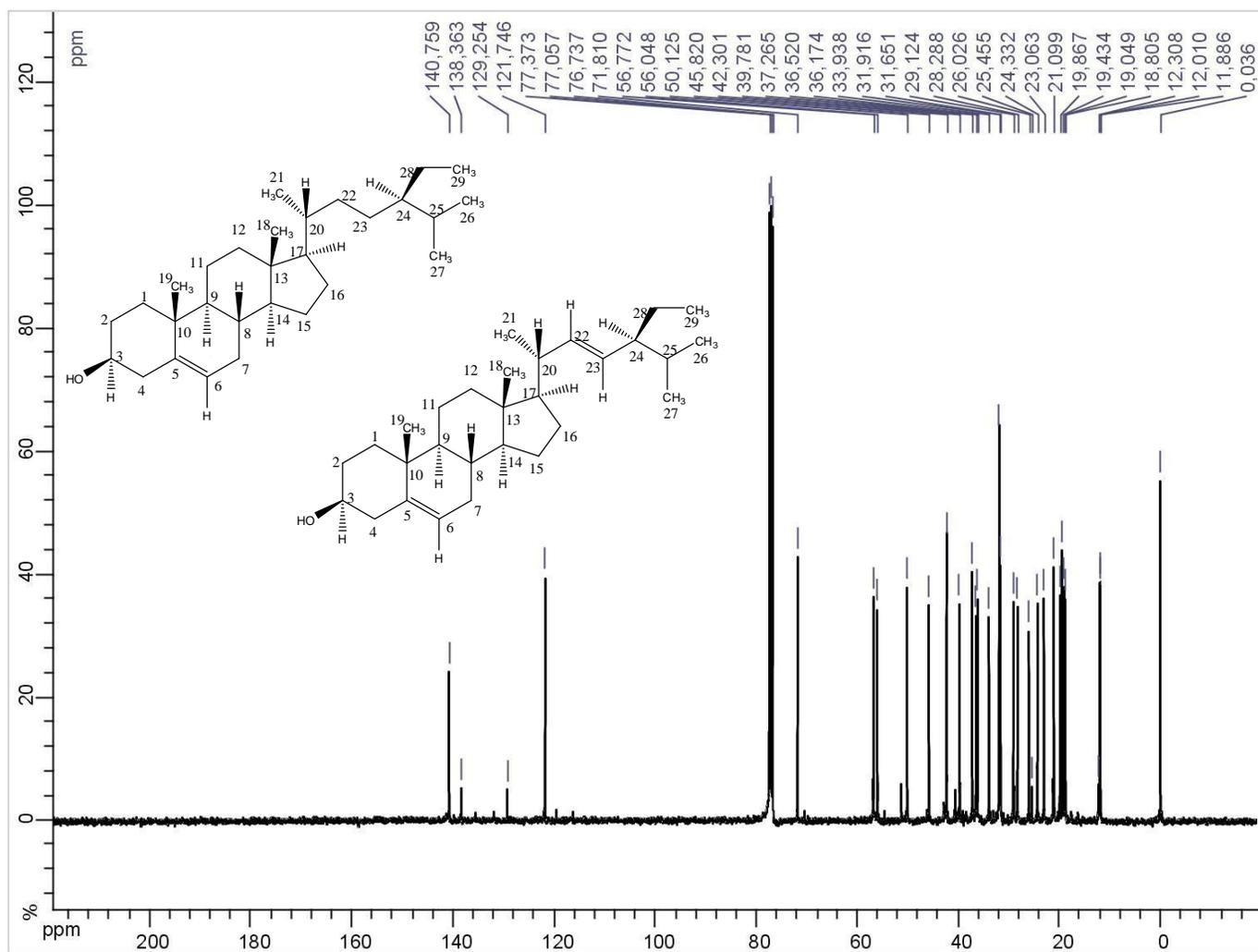
Figura 32 - Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) das substâncias TCMH-1a e TCMH1b.



Fonte: Autora, 2010.

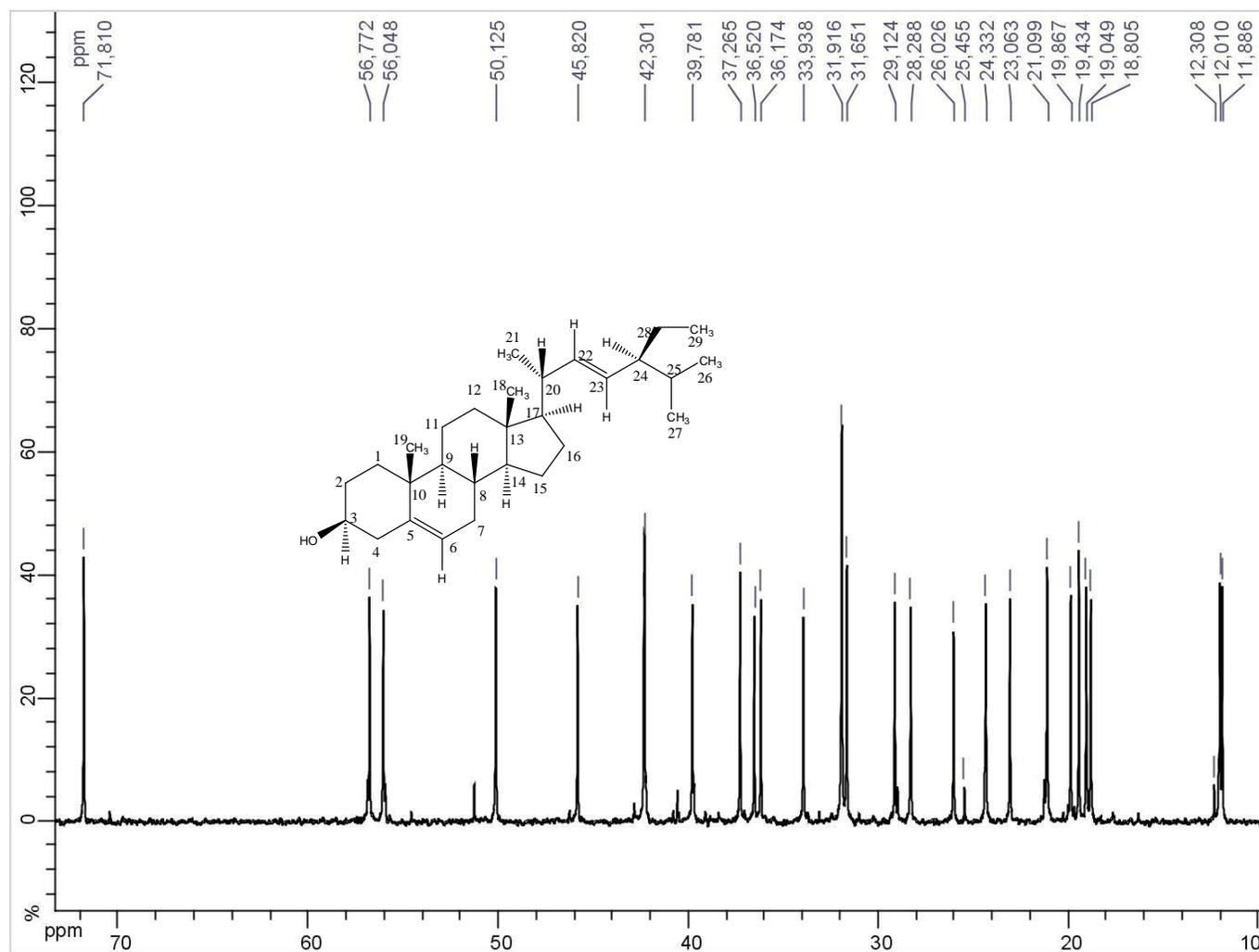
Figura 32a - Expansão do espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) das substâncias TCMH-1a e TCMH-1b

Fonte: Autora, 2010.

Figura 33 - Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) das substâncias TCMH-1a e TCMH-1b

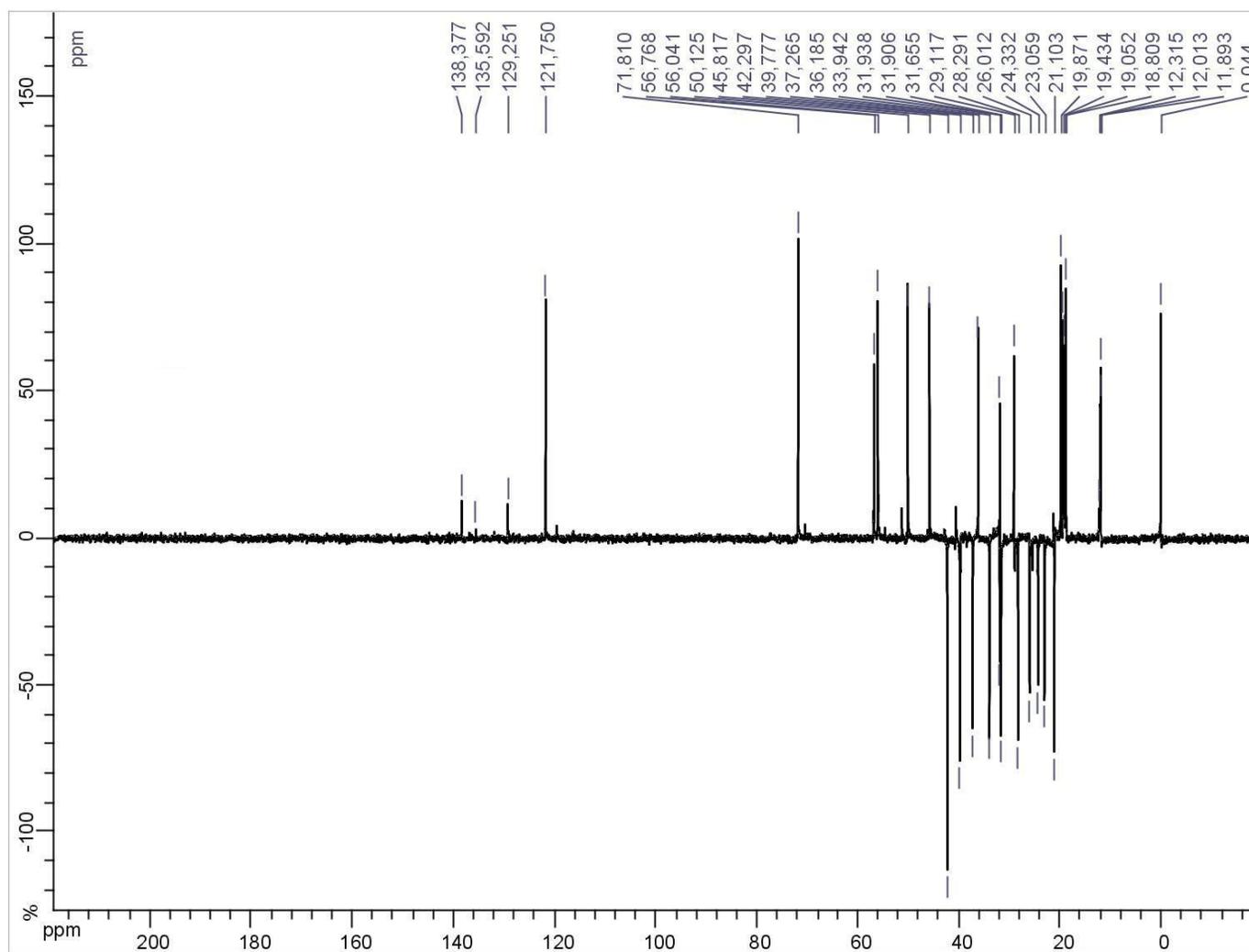
Fonte: Autora, 2010.

Figura 33a - Expansão do espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) das substâncias TCMH-1a e TCMH-1b



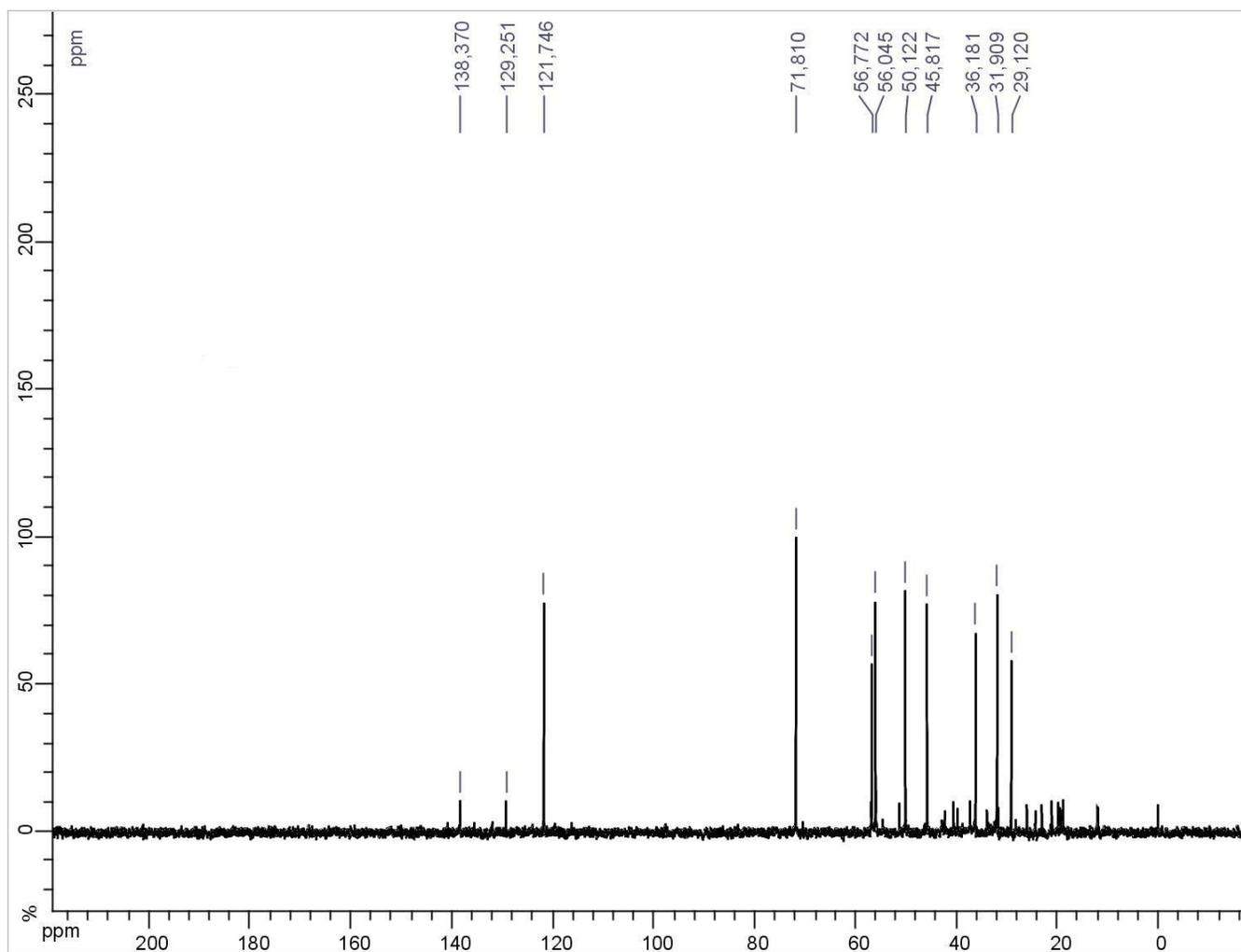
Fonte: Autora, 2010.

Figura 34 - Espectro de RMN DEPT 135° ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) das substâncias TCMH-1a e TCM-1b.



Fonte: Autora, 2010.

Figura 35 - Espectro de RMN DEPT 90° ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) das substâncias TCMH-1a e TCM-1b.



Fonte: Autora, 2010.

Tabela 3 - Resultados experimentais de RMN (^{13}C : 100 MHz, CDCl_3) das substâncias TCMH-1a e TCM-1b, do Sitosterol e Estigmasterol comparados com a literatura (BORGES, 2006).

C	Experimental CDCl_3				Literatura CDCl_3	
	TCMH-1a		TCMH-1b		β -Sitosterol	Estigmastero
	δC	δH	δC	δH	δC	δC
1	37,26		37,26		37,2	37,2
2	31,65		31,65		31,6	31,6
3	71,81	3,49 m	71,81	3,49 m	71,8	71,8
4	42,30		42,21		42,3	42,3
5	140,75		140,75		140,7	140,7
6	121,74	5,35 d $J = 5,3$	121,74	5,35 d $J = 5,3$	121,7	121,7
7	31,91		31,91		31,9	31,9
8	31,91		31,91		31,9	31,9
9	50,12		50,12		50,1	50,1
10	36,52		36,52		36,6	36,6
11	21,09		21,09		21,1	21,1
12	39,78		39,78		39,9	39,7
13	42,30		42,30		42,3	42,2
14	56,77		56,77		56,6	56,6
15	24,33		24,33		24,3	24,4
16	28,28		28,28		28,8	28,9
17	56,04		56,04		56,0	55,9
18	11,88	0,68 s	11,88	0,68 s	11,9	12,0
19	19,43	0,81 s	19,43	0,81 s	19,4	19,4
20	36,17		36,17		36,1	30,5
21	18,80	1,01 sl	18,80		18,8	21,2
22	33,93		138,36	5,12 dd	33,9	138,3
23	26,02		129,25	5,05 dd	26,6	129,2
24	45,82		51,26		45,5	51,2
25	29,12		31,91		29,1	31,9
26	19,86	0,83 d	21,09	0,83 d	19,9	21,1
27	19,04	0,81 sl	19,04	0,81 sl	19,0	19,0
28	23,06		25,45		23,0	25,4
29	12,01	0,85 sl	12,30	0,85 sl	12,0	12,3

Fonte: Autora, 2010.

3.3 Ensaios Biológicos

3.3.1 Atividade Antidiabética

A espécie *Terminalia catappa* é utilizada na medicina popular asiática no combate da diabetes. Apesar de ser bastante comum no litoral brasileiro, não há relatos desse uso popular no Brasil. Nagappa *et al.*, (2003) e Ahmed *et al.*, (2005) confirmam atividade antidiabética dos extratos das folhas e frutos com plantas da Ásia. No entanto, estudos da casca do caule ainda não haviam sido relatados.

No presente trabalho foi utilizado o modelo de indução de diabetes por aloxano para o estudo do efeito antidiabético do extrato etanólico da casca do caule de *T. catappa*. Segundo Folador (2009) esse modelo apresenta alta faixa glicêmica que caracteriza um diabetes severo, onde a concentração de insulina residual liberada pelas células β -pancreáticas é muito baixa ou nula.

O extrato etanólico da casca do caule de *Terminalia catappa* na concentração de 200 mg/kg, diminuiu significativamente os níveis de glicose sanguínea em ratos hiperglicêmicos induzidos com aloxano. Durante os experimentos pôde-se observar que os animais do grupo controle (não diabético) apresentaram ingestão hídrica, ingestão alimentar e diurese dentro dos níveis esperados para ratos saudáveis. Os animais do grupo diabético apresentaram polifagia, polidipsia e poliúria, sintomas compatíveis com o quadro clínico da diabetes. Nos ratos submetidos à administração com o extrato bruto da casca do caule de *T. catappa* ocorreu uma diminuição desses sintomas quando comparados ao grupo diabético tratado com salina.

De acordo com os resultados mostrados na **Tabela 4, p 77** pôde-se verificar que os animais do grupo controle (não diabético) permaneceram com glicemia compatível com animais normoglicêmicos. Os valores normais da glicemia em ratos variam entre 47,7 a 107 mg/dL segundo Cavali (2006).

A verificação da glicemia realizada no sétimo dia após a indução com aloxano e no vigésimo primeiro dia, fim do tratamento, estão representados na **Tabela 4**. Os animais do grupo controle (diabético tratado com salina) permaneceram com hiperglicemia durante os quinze dias, comprovando que o aloxano foi capaz de induzir a

diabetes e manter o mesmo durante todo o período do experimento. Já os animais do grupo controle (tratado com insulina) tiveram redução da glicemia em mais de 50 %.

Os ratos que foram submetidos ao tratamento com o extrato etanólico da casca do caule de *T. catappa* apresentaram diminuição da glicemia em 53 % ($p < 0,01$). Segundo Cavali (2006), uma droga é considerada eficaz quando reduz a glicemia em pelo menos 15 % dos valores iniciais, sendo assim o extrato se mostrou bastante eficaz.

Relatos da literatura Nagappa *et al.*, (2003) e Ahmed *et al.*, (2005) revelaram que o extrato metanólico dos frutos de *T. catappa* na dose de 343 mg/kg e o extrato aquoso das folhas na dose de 215 mg/kg diminuiu 50 % da glicemia em ratos submetidos a três semanas de tratamento. O presente estudo demonstrou que o extrato da casca do caule de *T. catappa* a uma dose de 200 mg/kg possui atividade hipoglicemiante com um tratamento de duas semanas.

Outras plantas do gênero *Terminalia* com potencial atividade anti-hiperglicêmica já foram estudadas. Segundo Rao *et al.*, (2003) *Terminalia pallida* demonstrou redução de 23,8 % da glicemia na dose de 500 mg/kg. Rao & Nammi, (2006) revelaram em seus estudos que o extrato em clorofórmio das sementes de *T. chebula*, na dose de 300 mg/kg leva a diminuição da glicose sanguínea em 45,20 % em ratos submetidos a duas semanas de tratamento. Quando comparado a esses estudos o extrato da casca do caule da espécie *T. catappa* apresentou atividade anti-hiperglicêmica de 53 % na concentração 200 mg/Kg.

A quantificação de fenóis totais do extrato etanólico da casca do caule de *T. catappa* permitiu identificar $338,53 \pm 31,09$ mg EAG/g de extrato. Segundo Negri (2005) a atividade antidiabética de vários extratos de plantas estão relacionadas com a presença de compostos fenólicos. Seus efeitos incluem aumento da liberação de insulina das ilhotas de Langerhans, proteção das células β pancreáticas do dano oxidativo, redução da taxa triglicérides no sangue e inibição da ação da enzima insulinase.

A espécie *T. catappa* é uma planta rica em taninos, segundo Nagappa *et al.*, (2003) os taninos são responsáveis pela atividade hipoglicemiante de várias plantas. Baseado nos resultados obtidos neste trabalho é possível propor que o extrato

etanólico da casca do caule de *T. catappa* possa exercer ações anti-hiperglicêmicas através do estímulo da secreção de insulina pelas células β pancreáticas, ou seja, como secretagogos de insulina.

Tabela 4 - Médias glicêmicas antes do tratamento e após quinze dias de tratamento (n=5).

Grupo	Glicemia antes do tratamento	Glicemia após o tratamento
Não-Diabético	89,80 \pm 3,86	89,20 \pm 5,37
Diabético Tratado com Extrato da Casca do Caule de <i>T. catappa</i> (200 mg/Kg,V.O)	335,7 \pm 49,52•	157,8 \pm 35,95**
Diabético Tratado com Salina	401,3 \pm 57,60•	554,0 \pm 6,93*
Diabético Tratado com Insulina	479,7 \pm 17,03•	203,0 \pm 9,81***

Os valores expressos representam as médias \pm erro padrão da média (EPM)

*p < 0,05; **p < 0,01; *** p < 0,001

• após a indução com aloxano

Fonte: Autora, 2010.

3.3.2 Resultados da Determinação do Teor de Fenóis Totais

A quantificação de fenóis totais fornece informações importantes que podem caracterizar os produtos naturais como fonte de substâncias seqüestradoras de radicais livres de acordo com Uchôa (2009). Dentre os métodos desenvolvidos o reagente de

Folin–Ciocalteu é usado com estimativa bruta da quantidade de compostos fenólicos presentes em extratos vegetais.

O resultado da análise do conteúdo de fenóis totais demonstrou que os extratos etanólico da folha, casca do caule e madeira do caule apresentam alta concentração de compostos fenólicos (**Tabela 5**). O extrato etanólico da casca do caule foi o que apresentou maior concentração de fenóis totais (338,53 ±31,09 mg EAG/g de extrato) confirmando o comportamento da análise da ação antioxidante frente ao DPPH. Estudos anteriores com folhas e semente (KINOSHITA, *et al.*, 2007; KO, *et al.*, 2002; CHYAU *et al.*, 2002) já mencionam que *T. catappa* possui alta atividade antioxidante frente ao radical DPPH, no entanto estudos dessa atividade com o caule ainda não haviam sido relatados.

Tabela 5 - Determinação do conteúdo de fenóis totais e DPPH quantitativo dos extratos etanólicos de *T. catappa*.

Extrato Etanólico	CI₅₀ (µg/mL DPPH)	FENÓIS TOTAIS (mg EAG/g de extrato)
Folha	9,56 ± 0,25	228,53 ±54,08
Casca do caule	5,97 ± 0,74	338,53 ±31,09
Madeira do caule	7,85 ± 0,50	153,53 ±17,01
Ácido Gálico	1,51 ± 0,18	-

CI: Concentração Inibitória

Fonte: Autora, 2010.

3.3.3. Resultados da Avaliação Quantitativa frente ao DPPH

Os resultados da avaliação quantitativa da atividade antioxidante (IP) do extrato etanólico da casca, folhas e caule (*T. catappa* L.) e do controle positivo ácido Gálico na concentração de 30 µg/mL no tempo de 10 min, determinada no ensaio com o radical livre DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazina), está apresentado na **figura 36, p 80**. O extrato etanólico da casca do caule, madeira do caule e folha apresentaram atividade seqüestradora do radical, de IP 94,73%; 93,94% e 93,54% respectivamente, demonstrando que os extratos apresentaram potencial redox-protetor quando comparados ao controle positivo, ácido Gálico com IP 99,91 %.

A quantidade de extrato necessária para decrescer a concentração do DPPH em 50%, (CI_{50}) (**Tabela 5, p 78**), foi para a casca de $5,97 \pm 0,74$ µg/mL, madeira de $7,85 \pm 0,50$ µg/mL e folha $9,56 \pm 0,25$ µg/mL. Ao comparar os valores das amostras com os encontrados para a substância antioxidante de referência (controle positivo) o ácido Gálico ($1,51 \pm 0,18$ µg/mL), pode-se observar que quanto maior o consumo de DPPH por extrato, menor será o valor de CI_{50} e maior será a sua atividade antioxidante segundo Sousa *et al.*, (2007).

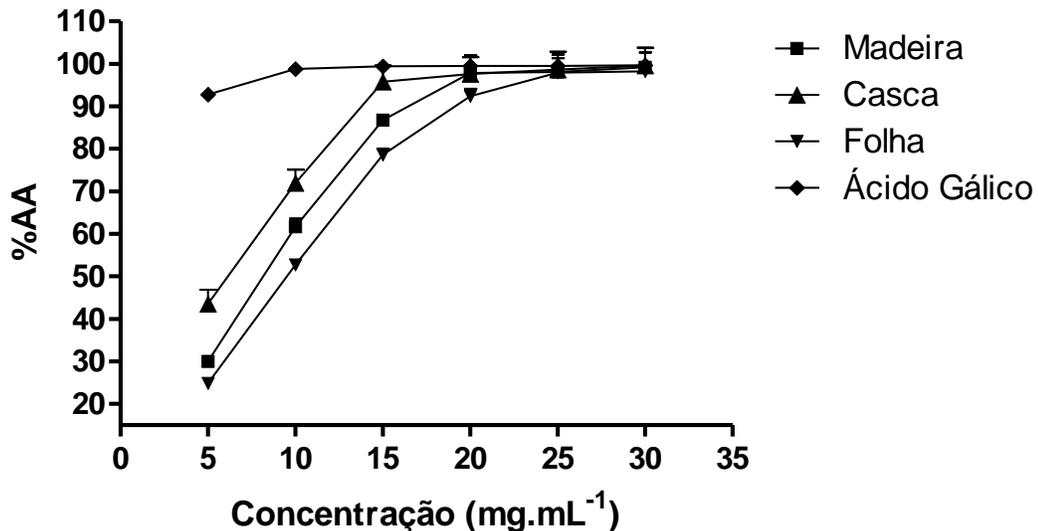
Os valores de CI_{50} dos extratos e do ácido Gálico apresentaram diferenças significativas entre eles ao serem comparados pelo teste Tukey com $p \leq 0,05$. Sousa *et al.* (2007) ao avaliarem a atividade antioxidante de algumas espécies de plantas medicinais, encontraram valores de CI_{50} de $27,59 \pm 0,82$ µg/mL para *Terminalia brasiliensis* (casca), $42,23 \pm 1,72$ µg/mL para *Terminalia fagifolia* e $44,53 \pm 1,09$ µg/mL para *Terminalia brasiliensis* (folha); o que indica que a *Terminalia catappa* L. possui uma maior capacidade seqüestradora do radical DPPH dentre as citadas.

O comportamento cinético da reação do DPPH com os extratos e com o controle positivo, ácido Gálico, na concentração de 30 µg/mL está apresentado na **figura 37, p 81**, através da curva dose resposta relativa ao decréscimo da porcentagem remanescente de DPPH em função do tempo (min). Observou-se que os extratos da casca e da madeira apresentaram cinética rápida, atingindo 50 % de consumo do DPPH no tempo de 5 minutos. O extrato da folha atingiu 50 % do consumo de DPPH no tempo de 30 minutos.

A avaliação da capacidade sequestrante de radicais DPPH mostrou que os extratos etanólico de *Terminalia catappa* L., possuem atividade antioxidante, sendo o extrato da casca a de maior atividade. O mecanismo de redução de radicais livres com o DPPH envolve doação de radical hidrogênio. Baseado em dados da literatura a potente atividade antioxidante de extratos polares é dada pela presença de substância com hidroxiladas segundo Harbone & Williams, (2001) e Mensor *et al.*, (2001).

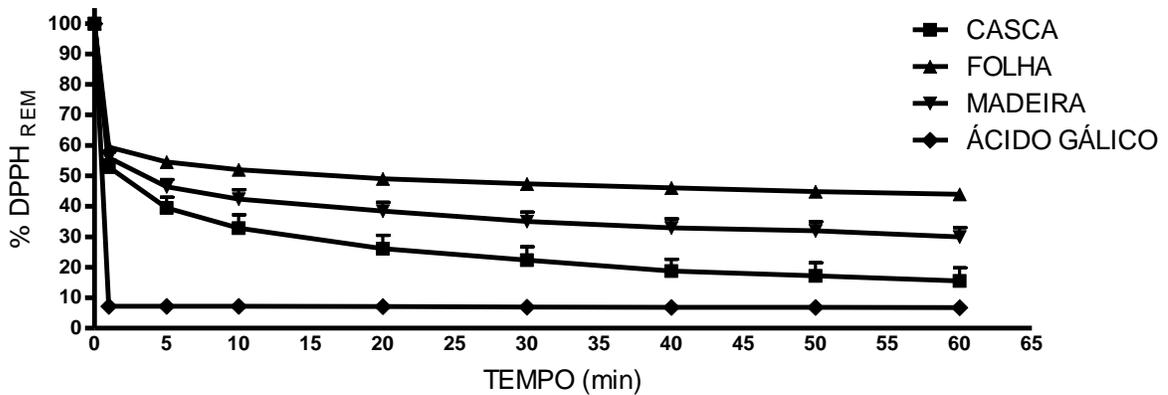
Todos os extratos etanólico apresentaram alto teor de compostos fenólicos, o que contribuiu para a atividade antioxidante demonstrada neste estudo. O conteúdo de derivados fenólicos foi maior na casca do caule. Estudos conduzidos por Einbond *et al.*, 2004; Banerjee *et al.*, 2005; Choi *et al.*, 2006 relatam que muitas atividades biológicas, assim como a antioxidante, são conseqüências do alto teor de compostos fenólicos. Dessa forma, o alto índice de compostos fenólicos do extrato etanólico da casca do caule de *T. catappa* deve ter contribuído em grande parte para o melhor efeito da capacidade seqüestrante de radicais DPPH.

Figura 36 - Porcentagem da atividade antioxidante dos extratos etanólicos de *T. catappa* frente ao radical DPPH.



Fonte: Autora, 2010.

Figura 37 - Comportamento cinético dos extratos etanólicos de *T. catappa*, frente ao radical DPPH.



Fonte: Autora, 2010.

3.3.4 Resultados da Avaliação Quantitativa dos Extratos de *T. catappa* frente ao TBARS

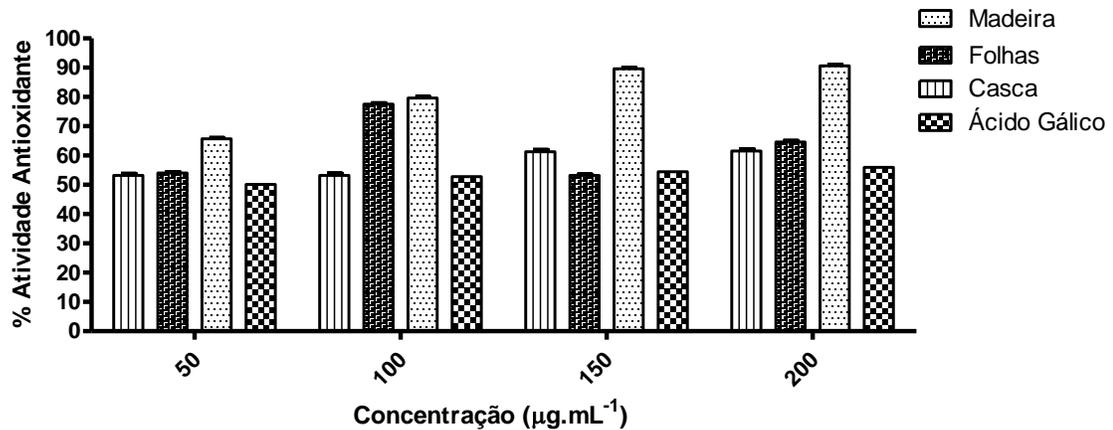
A diminuição da oxidação lipídica por radicais livres induzidos pelo gerador AAPH foi avaliada pelos níveis de redução na formação de TBARS. As diferentes concentrações dos extratos etanólicos das folhas, casca do caule e madeira do caule reduziram os níveis de formação de TBARS, os extratos revelaram proteção nas concentrações de 50, 100, 150 e 200 $\mu\text{g/mL}$ de extrato.

A avaliação da peroxidação lipídica demonstrou que os produtos finais da peroxidação reagem com o ácido tiobarbitúrico e formam complexos coloridos que são determinados por espectrofotometria a 532 nm. Os resultados mostraram que todos os extratos etanólico de *T. catappa* apresentaram atividade contra a peroxidação lipídica (**Figura 38**).

Segundo Budni *et al.*, (2007) compostos fenólicos inibem a oxidação de lipoproteínas e são capazes de capturar radicais como hidroxila, peroxila, superóxido, óxido nítrico e DPPH. A indução da lipoperoxidação por um azo-indicador, como o AAPH, apresenta como característica a geração de um carbono central na forma de radical que reage prontamente com o oxigênio para formar um radical peroxila. A avaliação da atividade antioxidante dos extratos das folhas, casca do caule e madeira

do caule, indicou a redução na formação de TBARS em todas as concentrações testadas utilizando o indutor de lipoperoxidação AAPH.

Figura 38 - Comportamento dos extratos brutos de *T. catappa* e controle Ácido Gálico frente ao agente indutor de dano oxidativo H_2O_2 . Os valores são significativos a $p \leq 0,05$.



Fonte: Autora, 2010.

3.3.5 Resultados da Avaliação Anticolinesterásica

Em 1961, Ellman e colaboradores descreveram um método fotométrico para a determinação da atividade anticolinesterásica. O método se baseia na medição da taxa de produção de tiocolina à medida que a acetiltiocolina é hidrolisada pela acetilcolinesterase. A enzima acetilcolinesterase hidrolisa o substrato acetiltiocolina gerando como produto a tiocolina (I) que reage com o reagente de Ellman (DTNB) (II) para produzir 2-nitrobenzoato-5-mercaptotiocolina e 5-tio-2-nitrobenzoato (III) produzindo uma cor amarela que pode ser detectada a 412 ou 405 nm (**Figura 39**).

O ensaio enzimático em CCD é um teste qualitativo, para os dados quantitativos foi utilizado o ensaio em microplaca. Os resultados quantitativos dos extratos e frações estão representados na **Tabela 8, p 85**. De acordo com Trevisan (2003), os extratos são considerados candidatos a futuros fracionamentos quando a inibição enzimática for maior ou igual a 50 %. Sendo assim os extratos não foram considerados promissores para o fracionamento bio-guiado, para isolamento de princípios ativos. As frações em AcOEt, BuOH e H₂O da casca do caule não foram solúveis em metanol fato que limitou a análise por meio do ensaio em microplaca.

Tabela 6 - Atividade anticolinesterásica qualitativa dos extratos e frações de *T. catappa* na concentração de 3 mg /mL.

CCD						
Parte da Planta	Extrato EtOH	Fração n-C ₆ H ₁₄	Fração CHCl ₃	Fração AcOEt	Fração BuOH	Fração H ₂ O
Folha	+	-	+	-	-	-
Casca do Caule	+	+	-	-	-	+
Madeira do Caule	+	+	+	-	-	-

Fonte: Autora, 2010.

Tabela 7 - Atividade anticolinesterásica quantitativa do extrato e frações de *T. catappa*, na concentração de 3 mg/mL.

Microplaca (% de Inibição)						
Parte da Planta	Extrato EtOH	Fração n-C ₆ H ₁₄	Fração CHCl ₃	Fração AcOEt	Fração BuOH	Fração H ₂ O
Folha	12	7,6	11	0	0	0
Casca do Caule	44,1	0	10	-	-	-
Madeira do Caule	45	4	11	14	0	0
Carbaril 2mM	100	-	-	-	-	-

Fonte: Autora, 2010.

3.3.6 Resultados da Avaliação Moluscicida

O objetivo do estudo da atividade moluscicida foi verificar a ação dos extratos de *T. catappa* frente ao caramujo *Biomphalaria glabrata*. O ensaio foi realizado com extratos da folha, casca do caule e madeira do caule na concentração de 100 mg/L. Os extratos da casca e madeira do caule apresentaram 100 % de mortalidade dos caramujos no tempo de 48 horas (**Tabela 8, p 86**). Esses extratos foram direcionados para os ensaios utilizando concentrações de 50, 25 e 10 mg/L (**Tabelas 8 e 9, p 87**). De acordo com a metodologia adotada no grupo de pesquisa, os extratos brutos que apresentarem atividade moluscicida superior a 40 % na concentração de 100 mg/L são considerados promissores para isolamento de compostos ativos.

O extrato da casca do caule apresentou 100 % de mortalidade dos caramujos na concentração de 50 mg/L no tempo de 48 horas no entanto, nas concentrações de 25 e 10 mg/L não houve mortalidade no tempo de 72 horas (**Tabela 9, p 86**).

Tabela 8 - Atividade moluscicida dos extratos etanólico de *T. catappa* frente ao *B. glabrata* após 24 horas de exposição e 72 horas de observação.

Extrato Etanólico	Concentração (ppm)	Mortalidade (%)
Folha	100	0
Casca do caule	100	100
Madeira do caule	100	100
Branco	-	0
Niclosamida	3	100

Fonte: Autora, 2010.

O extrato da madeira do caule foi o que apresentou maior mortalidade dos caramujos nas concentrações de 50, 25 e 10 mg/L (**Tabela 10, p 87**). Esse extrato apresentou $CL_{50} = 21,49$ mg/L e $CL_{90} = 54, 64$ mg/L. No grupo de pesquisa

consideramos que os extratos cuja $CL_{50} \leq 40$ mg/L são promissores para o uso de controle de caramujo *B. glabrata*. Segundo Luna *et al.*, (2005) valores de $CL_{50} < 40$ mg/L são considerados promissores para utilização dos extratos em população de caramujos *B. glabrata*.

Tabela 9 - Atividade moluscicida do extrato etanólico da casca do caule de *T. catappa* frente ao *B. glabrata* após 24 horas de exposição e 72 de observação.

Extrato Etanólico	Concentração (ppm)	Mortalidade (%)
Casca do caule	50	100
Casca do caule	25	0
Casca do caule	10	0
Branco	-	0
Niclosamida	3	100

Fonte: Autora, 2010.

Tabela 10 - Atividade moluscicida do extrato etanólico da madeira do caule de *T. catappa* frente ao *B. glabrata* após 24 horas de exposição e 72 de observação.

Extrato Etanólico	Concentração (ppm)	Mortalidade (%)
Madeira do caule	90	100
Madeira do caule	50	84
Madeira do caule	25	50
Madeira do caule	10	20
Branco	-	0
Niclosamida	3	100

Fonte: Autora, 2010.

4 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

O estudo fitoquímico de *Terminalia catappa* L. (Combretaceae) conduziu até o presente momento, no isolamento de um triterpeno, o ácido asiático, um ácido fenólico, o ácido gálico, e dois fitoesteróides, o sitosterol e o estigmasterol.

A avaliação do potencial antidiabético revelou que o extrato etanólico da casca do caule de *T. catappa* apresenta atividade hipoglicemiante na concentração de 200 mg/kg. Ensaio futuros com o extrato e suas frações utilizando concentrações menores, são necessários, bem como a identificação de substâncias ativas e o mecanismo responsável pelo efeito antidiabético.

Uma maior concentração de compostos fenólicos foi observada na casca do caule de *T. catappa*. A análise quantitativa revelou que todos os extratos etanólicos (folha, casca e madeira do caule) apresentaram atividade antioxidante frente ao DPPH e TBARS. Pretende-se avaliar o efeito antioxidante *in vivo* dos extratos de *T. catappa* em ratos e a relação com o efeito antidiabético.

No teste da atividade moluscicida o extrato da madeira do caule de *T. catappa* mostrou-se positivo, com $LC_{50} = 21,49$ mg/L e $LC_{90} = 54,64$ mg/L. Ensaio com as frações são necessários para a busca de substâncias ativas.

A avaliação da atividade anticolinesterásica revelou que os extratos etanólicos das folhas, casca e madeira do caule de *T. catappa* são positivos para o teste qualitativo, no entanto quanto ao teste quantitativo os extratos não apresentaram atividade inibidora da AChE.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMED, S. D., BM, S. V., DHANAPAL, P. G. R., CHANDRASHEKARA, VM. Anti-Diabetic Activity of *Terminalia catappa* Linn. leaf extract in alloxan-induced diabetic rats. Iranian **Journal of Pharmacology & Therapeutics**, v.4, nº1, p.36-39, 2005.

ALMEIDA, O. P. Tratamento da doença de Alzheimer, avaliação crítica sobre o uso de anticolinesterásicos. **Neuropsiquiatria**, v.56(3-B), p. 688-696, 1998.

ALMEIDA, S. C. X., LEMOS, T. L. G., SILVEIRA, E. R., PESSOA, O. D. L. Constituintes químicos voláteis e não voláteis de *Cochlospermum vitifolium* (WILLDENOW) SPRENGEL. **Química Nova**, v.28, n.1, p.57-60, 2005.

ALVES, Clayton Queiroz. **Flavonóides antioxidantes e derivados de ácido gálico isolados de *Cenostigma gardnerianum* Tul. (Leguminosae)**. Salvador, 2007. 108p. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia.

ANAND, K. K., SINGH, B., SAXENA, A. K., CHANDAN, B. K., 3,4,5-trihydroxy benzoic acid (gallic acid), the hepatoprotective principle in the fruits of *Terminalia belerica*-bioassay guided activity. **Pharmacological Research**, v.36, n.4, 1997.

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

ARGOLO, A. C. C., SANT'ANA, A. E. G., PLETSCH, M., COELHO, L. C. B. B. Antioxidant activity of leaves extracts from *Bauhinia monandra*. **Bioresource Technology**, v.95, p.229-233, 2004.

BABAYI, H., KOLO, I., OKOGUN, J. I., IJAH, U. J. J. The antimicrobial activities of methanolic extracts of *Eucalyptus camaldulensis* and *Terminalia catappa* against some pathogenic microorganisms. **Biokemistri**, v.16, p.106-111, 2004.

BANERJEE, A., DASGUPTA, N., DE, B. In vitro study of antioxidant activity of *Syzygium cumini* fruit. **Food Chemistry**, v.90, p.727-733, 2005.

BARBOSA FILHO, J. M., MEDEIROS, K. C. P., DINIZ, M. F., BATISTA, L. M., ATHAYDE FILHO, P. F., SILVA, M. S., CUNHA, E. V. L. da, ALMEIDA, J. R. G. S.,

QUINTANS JUNIO, L. J. Natural products inhibitors of the enzyme acetylcholinesterase. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.16(2), p. 258-285, 2006.

BORGES, Endler Marcel. **Estudo fitoquímico de *Trichogonia menthaefolia* Gardner (Asteraceae – Eupatorieae)**. Ribeirão Preto, 2006. 98p. Dissertação (Mestrado) – Departamento de Química, Universidade de São Paulo.

BRAGA, R. **Plantas do nordeste especialmente do Ceará**. 3ª ed. Fortaleza, 1976, 177 p.

BRAGA, Tatiane Vieira. **Avaliação da atividade farmacológica de *Cissus verticillata* Nicolson & C. E. Jarvis subsp. *verticillata* como antioxidante, antifúngico, hipogliceminate e cicatrizante**. Ouro Preto, 2008. 202p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Ouro Preto.

BRAND-WILLIAMS, CUVELIER, M. E., BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT**, v.28, n.1, p.25-30, 1995.

BRASIL, Ministério da Saúde. 2007. <<http://portal.saude.gov.br/portal/saude>> Acesso em 24 de maio de 2010.

BRAZ FILHO, R., Contribuição da fitoquímica para o desenvolvimento de um país emergente. **Química Nova**, v.33, n.1, p.229-239, 2010.

BUDNI, P., PETRONILHO, F. C., ZANETTE, V. C., MARCONDES, C., ZOCH, A. N., REGINATTO, F. H., DAL PIZZOL, F. Estudos preliminares da atividade antioxidante do extrato hidroetanólico de folhas jovens e adultas de *Tabebuia heptaphylla* (Vell.) Toledo (ipê-roxo). **Latin American Journal of Pharmacy**, v.26(3), p.394-398, 2007.

CAI, Y., LUO, Q., SUN, M., CORKE, H., Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. **Lefe Sci.**, v.74, p.2157-2184, 2004.

CARVALHO, A. C. B., DINIZ, M. F. F. M., MUKHERJEE, R. Estudo da atividade antidiabética de algumas plantas de uso popular contra o diabetes no Brasil. **Revista Brasileira de Farmácia**, v.86(1), p.11-16, 2005.

CAVALLI, V. L. L. O., SORDI, C., TONINI, K., GRANDO, A., MUNERON, T., GUIGI, A., JÚNIOR, W. A. R. Avaliação *in vivo* do efeito hipoglicemiante de extratos obtidos da raiz e folha de bardana *Arctium minus* (Hill.) Bernh. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17(1), p.64-70, 2007.

CECHINEL FILHO, V., YUNES, A. R. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**, v.21, p. 99-103, 1998.

CHEN, P.-S., LI, J.-H., LIU, T.-Y., LIN, T.-C. 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.

CHOI, Y., LEE, S. M., CHUN, J., LEE, H. B., LEE, J. Influence of heat treatment on the antioxidant activities and polyphenolic compounds of Shiitake (*Lentinus edodes*) mushroom. **Food Chemistry**, v.99, p.381-387, 2006.

CHYAU, C.-C., TSAI, S.-Y., KO, P.-T., MAU, J.-L. Antioxidant properties of solvent extracts from *Terminalia catappa* leaves. **Food Chemistry**, v.78, p.483-488, 2002.

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, p.1099-1108, 2006.

COSTA, J. G. M., RODRIGUES, F. F. G., ANGÉLICO, E. C., SILVA, M. R., MOTA, M. L., SANTOS, N. K. A., CARDOSO, A. L. H., LEMOS, T. L. G. Estudo químico-biológico dos óleos essenciais de *Hyptis martiusii*, *Lippia sidoides* e *Syzygium aromaticum* frente às larvas de *Aedes aegypti*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v15, p.304-309, 2005.

CORRÊA, M. P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**, 2ª ed. Rio de Janeiro v.l, Imprensa Nacional, 1984, 93 p.

COUTO, J. L. A. Esquistossomose mansoni em duas mesorregiões do Estado de Alagoas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.38(4), p.301-304, 2005.

CRUZ, G. L. **Dicionário das plantas úteis do Brasil**, 2ª ed Civilização Brasileira; 1982, 48 p.

DI STASI, L. C.; OLIVEIRA, G. P.; CARVALHAES; M. A.; QUEIROZ-JUNIOR. M.; TIEN. O. S.; KAKINAMI. S. H.; REIS. M. S. Medicinal plants popularly used in the Brazilian Tropical Atlantic Forest. **Fitoterapia**, v.73, n. 1, p.69-91, 2002.

EINBOND, L. S., REYNERTSON, K. A., LUO, X. D., BASILE, M. J., KENNELLY, E. D. Anthocyanin antioxidants from edible fruits. **Food Chemistry**, v.84, p.23-28, 2004.

ELLMAN, G.L., COURTNEY, K.D., ANDRES JR., V., FEATHERSTONE, R.M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**, v.7, p.88–95, 1961.

ESTEVA, C. S., **Estudo fitoquímico biomonitorado da entrecasca de *Maytenus rigida* Mart. (Celastraceae)**. Maceió, 2006. 189p. Tese (Doutorado) – Instituto de Química e Biotecnologia, Universidade Federal de Alagoas.

FAN, Y. M., XU, L. Z., GAO, J., WANG, Y., TANG, X. H. , ZHAO X. N. , ZHANG, Z. X. Phytochemical and anti-inflammatory studies on *Terminalia catappa*. **Fitoterapia**, v.75, p.253-260, 2004.

FOLADOR, Poliane. **Estudo do Potencial Hipoglicemiante da *Wilbrandia ebracteata* em ratos normais e diabéticos**. Florianópolis, 2009. 70p. Dissertação (Mestrado) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Catarina.

FUNASA – Guia de Vigilância Epidemiológico. < www.funasa.gov.br/pub/GVE/GVE05108.htm >. Data de acesso: abril 2003.

GAO, J., DOU, H., TANG, X. H., XU, L-Z., FAN, Y-M., ZHAO, X-N. Inhibitory effect of TCCE on CCl4-induced overexpression of IL-6 in acute liver injury. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, v.36, p. 767-772, 2004.

GARCEZ, F. R., GARCEZ, W. S., MARTINS, A., LOPES, F. A., triterpenoids, lignans and flavans from *Terminalia argentea* (Combretaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v.31, p.229-232, 2003.

GOMES, A. M., KOSZUOSKI, R. Evidências atuais do impacto terapêutico dos inibidores da acetilcolinesterase no transtorno cognitivo leve e na demência vascular. **Revista Psiquiatria**, v.27(2), p.97-205, 2005.

GOUN, E., CUNNINGHAM, G., CHU, D., NGUYEN, C., MILES, D. Antibacterial and antifungal activity of Indonesian ethnomedical plants. **Fitoterapia**, v.76, p.592-596, 2003.

GROVER, J. K.; YADAV, S.; VATS, V. Effect of feeding *Murraya koeingii* and *Brassica juncea* diet kidney functions and glucose levels in streptozotocin diabetic mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 85, p. 1-5, 2003.

GUENDEZ, R., KALLITHRAKA, S., MARKKRIS, D. P., KEFALAS, P. Determination of low molecular weight polyphenolic constituents in grape *Vitis vinifera* seeds extracts: correlation with antiradical activity. **Food Chemistry**, v. 89, p.1-9, 2005.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Textbook of Medical Physiology**. Pennsylvania, Elsevier Saunders, 2006. 1152 p.

HARBORNE, J. B., WILLIAMS, C. A., Anthocyanins and other flavonoids. **Natural Product Reports**. v.18, p.310-333, 2001.

HASLAM, E. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs and medicines: possible modes of action. **Journal Natural Products**, v.59, p. 205-215, 1996.

HEINRICH, M., TEOH, H. L. Galanthamine from snowdrop – the development of a modern drug against Alzheimer's disease from local Caucasian knowledge. **Journal of Ethnopharmacology**, v.92, p.147-162, 2004.

HESS, S. C. **Estudos químicos, biológicos e farmacológicos com *Vochysia divergens* Pohl. (Vochysiaceae)**. Florianópolis,1995. Tese (Doutorado) – Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, Universidade Federal de Santa Catarina.

HOUGHTON, P. J., HOWES, M. J. Natural products and derivatives affecting neurotransmission relevant to Alzheimer's and Parkinson's diseases. **Neurosignals**, v.14, p.6-22, 2004.

HUO, Y.; WINTERS, W. D.; YAO, DA-LIN. Prevention of diet-induced type 2 diabetes in the C57BL/6J mouse model by an antidiabetic herbal formulae. **Phytother. Res.**, v. 17, p.48-55, 2003.

JAOWHARI, J. T.; LAZREK, H. B.; SEDDIK, A.; JAN, M. Hypoglycemic response to *Zygophyllum gaetulum* extracts in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 64, p.211-216, 1999.

JOLY, A. B. **Botânica – Introdução a Taxonomia Vegetal**. 7^a ed. São Paulo/SP, Companhia Editora Nacional, 1985, 777 p.

KAPPEL, Virginia Demarchi. **Avaliação das propriedade antioxidante e antimicrobiana de extratos de *Capsicum baccatum* L. var *pendulum***. Porto Alegre, 2007. 74p. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

KASABRI, V., FLATT, P. R., ABDEL-WAHAB, Y. H. A., *Terminalia bellirica* stimulates teh secretion and action of insulin and inhibits starch digestion and protein glycation *in vitro*. **British Journal of Nutrition**, v.103, p.212-217, 2010.

KATERERE, D. R., GRAY, A. I., NASH, R.J., WAIGH, R. D. Antimicrobial activity of pentacyclic triterpenes isolated from African Combretaceae. **Phytochemistry**, v.63, p.81-88, 2003.

KATZ, N., PEIXOTO, S. V. Análise crítica da estimativa de portadores de esquistossomose mansônica no Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.33, p.303-308, 2000.

KELSEY, R. G., REYNOLDS, G. W., RODRIGUEZ, E. HEALEY, P. L., MEHTA I., eds. **Biology and Chemistry of plant trichomes**. New York, Plenum Press, 1984.

KHAN, M. R., KIHARA, M., OMOLOSO, A. D. **Antimicrobrial activity of *Terminalia complanata* and *Flacourtia zippelii***. **Fitoterapia**, v.73, p.737-740, 2002.

KINOSHITA, S., INOUE, Y., NAKAMA, S., ICHIBA, T., ANIYA, Y. Antioxidant and hepatoprotective actions of medicinal herb, *Terminalia catappa* L. from Okinawa island and its tannin corilagin. **Phytomedicine**, v.14, p.755-762, 2007.

KONRATH, Eduardo Luis. **Investigação *in vitro* do efeito neurotóxico, antioxidante e anticolinesterásico de alcalóides e avaliação de parâmetros de estresse oxidativo em fatias de hipocampo submetidas à privação de oxigênio e glicose.** Porto Alegre, 2006. 237p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

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

KROGH, R., YUNES, R. A., ANCRICOPULO, A. D., Structure-activity relationships for the analgesic activity of gallic acid derivatives. **II Farmaco**, v.5, p.730-735, 2000.

LI, W. L.; ZHENG, H. C.; BUKURU, J.; De KIMPE, N. Natural medicines used in the traditional chinese medical system for therapy of diabetes mellitus. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 92, p.1-21, 2004.

LIMA, M. R. F. **Contribuição para o Conhecimento Fitoquímico e da Atividade Biológica de *Annona crassiflora* Mart. e *Schinus terebinthifolius* Raddi.** Maceió, 2005. Tese (de doutorado) – Instituto de Química e Biotecnologia, Universidade Federal de Alagoas.

LIN, YUN-LIAN, KUO, YUEH-HSIUNG, SHIAO, MING-SHI, CHEN, CHIEN-CHIH, O, JUN-CHIH Flavonoid glycosides from *Terminalia catappa* L. **Journal of the Chinese Chemical Society**, v.47, p.253-256, 2000.

LIN, C. H., CHANG, C. Y., Textural change and antioxidant properties of broccoli under different cooking treatments. **Food Chemistry**, v. 90, p.9-15, 2005.

LINO, Cleide de Sousa. **Efeito antidiabética, antioxidante, analgésico e antiinflamatório da fração solúvel em metanol e tiramina isolados de *Cissus verticillata*.** Fortaleza, 2008. 190p. Tese (Doutorado) – Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal do Ceará.

LODYATO, V. I., YURKOVA, I. L., SOROKIN, V. L., SHADYRO, O. I., DOLGOPALET, V. I., KISEL, M. A., Novel (3,5-di-*ter*-butyl-2-hydroxy-phenylcarbomoyl)-alkanoic acid as potent antioxidants. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**. v. 14, p.4253-4256, 2004.

LONGHINI, Renata. **Avaliação de interações do ácido gálico frente a adjuvantes empregados em formas farmacêuticas sólidas.** Porto Alegre, 2006. 200p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

LOPES, E. M. C., CARREIRA, R. C., AGRIPINO, D. G., TORRES, L. M. B., CORDEIRO, I., BOLZANI, V. S., DIETRICH, S. M. C., YOUNG, M. C. M., Screening for antifungal, DNA-damaging and anticholinesterasic activities of Brazilian plants from the Atlantic Rainforest – Ilha do Cardoso State Park. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18 (supl.), p.655-660, 2008.

LUNA, J. S., SANTOS A. F., LIMA M. R. F., OMENA M.C, MENDONÇA F. A. C., BIEBER L. W., SANT'ANA, A. E. G.. A study of the larvicidal and molluscicidal activities of some medicinal plants from northeast Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v.97, p.199-206, 2005.

MACARI, P. A. T., EMERENCIANO, V. P., FERREIRA, Z. G. M. S. Identificação dos triterpenos de *Miconia albicans* Triana através de análise por microcomputador. **Química Nova**, v.13(4), p.260-262, 1990.

MACIEL, M. A. M., PINTO, A. C., VEIGA JR., V. F. Plantas Medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25, p.29-438, 2002.

MARLES, R. J.; FARNSWORTH, N. R. Antidiabetic plants and their active constituents. Review. **Phytomedicine**, v. 2, p. 137-189, 1995.

MARSTON, A., HOSTETTMANN, K. Plant molluscicides. **Phytochemistry**. v.24, p. 639-652, 1985.

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.

MAZZANTI, C. M., SCHOSSLER, D. R., FILAPPI, A., PRESTES, D., SILVA, A. C., CORREA, M., SCHETINGER, M. R. C., MORSCH, V. M., LUNKES, G., GONZAGA, W. A., CECIM, M. Efeito do extrato da casca *Syzygium cumini* sobre a atividade da acetilcolinesterase em ratos normais e diabéticos. **Ciência Rural**, v.34, n.3, p.803-807, 2004.

McGAM, L. J., RABE, T., SPARG, S. G., JÄGER, A. K., ELOFF, J. N., STADEN, J. V. An investigation on the biological activity of *Combretum* species. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 75, p.45-50, 2001.

MENSOR, L. L., MENEZES, F. S., LEITÃO, G. G., REIS, A. S., SANTOS, T. C., COUBE, C. S., LEITÃO, S. G. Screening of Brazilian plants extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytotherapy Research**, v.15, p.127-130, 2001.

MINETT, T. S. C., BERTOLUCCI, P. H. F. Terapia Colinérgica na Doença de Alzheimer. **Revista Neurociências**, v. 8(1), p.11-14, 2000.

MUKHERJEE, P. K., KUMAR, V., MAL, M., HOUGHTON, P. J. Acetylcholinesterase inhibitors from plants. **Phytomedicine**, v. 14, p.289-300, 2007.

NAGAPPA, A. N., THAKURDESAI, P. A., RAO, N. V., SINGH, J. Antidiabetic activity of *Terminalia catappa* Linn fruits. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 88, p.45-50, 2003.

NARVAEZ, A. J. R. Relação entre estrutura química e atividade biológica nos fármacos esquistossomicidas. **Química Nova**, v. 6, p.134-140, 1983.

NEGI, A. S., DAROKAR, M. P., CHATTOPADHYAY, S. K., GARG, A., BRATTACHARYA, A. K., SRIVASTAVA, V., KHANUJA, S. P. S. Synthesis of a novel plant growth promoter from gallic acid. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.15, p.1243-1247, 2005.

NEGRI, G., Diabetes melito: plantas e princípios ativos naturais hipoglicemiantes. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v.41, nº2, p.121-142, 2005.

NELSON, D. E., COX, M. M., **Lehninger – Princípios de Bioquímica**,. 4^a ed. 2005, 1119p.

NIÑO, J., HERNÁNDEZ, J. A., CORREA, Y. M., MOSQUERA, O. M. In vitro inhibition of acetylcholinesterase by crude plant extract from Colombia flora. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.101(7), p.783-785, 2006.

NIKI, E., Assesment of antioxidant capacity *in vitro* and *in vivo*. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 4C: 2,7, p.1-13, 2010.

OKYAR, A.; CAN, A.; AKEV, N.; BAKTIR, G.; SUTLÜPINAR, N. Effect of *Aloe vera* leaves on blood glucose level in type I and type II diabetic rat models. **Phytother. Res.**, v. 15, p. 157-161, 2001.

OLIVEIRA, E. A. S., Farmacologia: Insulina e Fármacos Hipoglicemiantes Orais (Apostila nº 6) – www.easo.com.br – 2008.

PERRET, S., WHITFIELD, P. Currently available molluscicides. **Parasitology Today** v. 12, p.56-159, 1996.

PIETROVSKI, Eveise Fernandes. **Avaliação da atividade antinoceptiva do extrato etanólico e de princípios ativos obtidos das flores de *Combretum leprosum* Mart.** Curitiba, 2004. 71p. Dissertação (Mestrado) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

PRATA A. **Esquistossomose mansoni. Em Doenças Infecciosas e Parasitárias.** 7ª ed. Rio de Janeiro, Guanabara, 1987. 920p.

RAO, B. K., SUDARSHAN, P. R., RAJASEKHAR, M. D., NAGARAJU, N., RAO, C. A. Antidiabetic activity of *Terminalia pallida* fruit in alloxan induced diabetic rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v.85, p.169-172, 2003.

RAO, N. K., NAMMI, S., Antidiabetic and renoprotective effects of the chloroform extracts of *Terminalia chebula* Retz. seeds in streptozotocin-induced diabetic rats. **BCM Complementary and Alternative Medicine**. v.6:17, p.1-6, 2006.

RATHI, S. S.; GROVER, J. K.; VATS, V. The effect of *Momordica charantia* and *Mucuna pruriens* in experimental diabetes and their effect on key metabolic enzymes involved in carbohydrate metabolism. **Phytother. Res.**, v. 16, p. 236-243, 2002a.

REDDY, L., ODHAV, B., BHOOLA, K. D., Natural products for câncer prevention: a global perspective. **Pharmacol & therapeutics**, v. 99, p.1-13, 2003.

ROCHA, R. F. A. Informação pessoal da Botânica do Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde. Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde – Universidade Federal de Alagoas, 2005.

RHEE, I. K., RIJN, R. M. V., VERPOORTE, R. Qualitative determination of false-positive effects in the acetylcholinesterase assay using thin layer chromatography. **Phytochemical Analysis**, v.14, p.127-131, 2003.

RUFINO, M. S. M., ALVES, R. E., BRITO, E. S., MORAIS, S. M., SAMPAIO, C. G., JIMENES, J. P., CALIXTO, F. D. S., eds. **Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total de frutas pela captura do radical livre ABTS**. Fortaleza, Comunicado Técnico 128, 2007.

SABU, M. C.; KUTTAN, R., Antidiabetic and antioxidant activity of *Terminalia bellerica* Roxb. **Indian Journal of Experimental Biology**, v.47, p.270-275, 2009.

SAID, O.; KHALIL, K.; FULDER, S.; AZAIZEH, H. Ethnopharmacological survey of medicinal herbs in Israel, the Golan Heights and the West Bank Region. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 83, p.251-265, 2002.

SANTOS, A. R. S. Antinociceptive properties of steroids from *Phyllanthus corcovadensis* in mice. **Planta Medica**, v.61, p.329-332, 1995.

SANTOS, Aldenir Feitosa dos. **Determinação da atividade anti-esquistossomótica de extratos e substâncias puras obtidas de plantas**. Maceió, 2005. 295p. Tese (Doutorado) – Instituto de Química e Biotecnologia, Universidade Federal de Alagoas.

SANTOS, A. F., SANT'ANA, A. E. G., The molluscicidal activity of plants used in the Brazilian folk medicine. **Phytomedicine**, v.6(6), p.431-438, 1999.

SANTOS, A. F. **Estudo de plantas com atividade nematocida e/ou moluscicida e re-exame da *Jatropha elliptica* Muell Arg**. Maceió, 1997. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Química e Biotecnologia, Universidade Federal de Alagoas.

SILVERSTEIN, R. M. et al. **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos**. Trad. de Ricardo Bicca de Alencastro. 5. ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan S. A., 1994.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos**. Trad. de Ricardo Bicca de Alencastro. 7. ed. Rio de Janeiro, LTC – Livros Técnicos e Científicos Editora S.A., 2007.

SIMÕES, C. M. O., MENTZ, L. A., SCHENKEL, E. P., IRGANG, B. E., STEHMANN, J. R. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 5ª ed. Porto Alegre, 2003. 633p.

SIMAS, N. K., LIMA, E. C., CONCEIÇÃO, S. R., KURSTER, R. M., OLIVEIRA FILHO, A. M. Produtos naturais para o controle da transmissão da dengue–atividade larvicida de *Myroxylon balsamum* (óleo vermelho) e de terpenóides e fenilpropanóides. **Química Nova**, v. 27, p.46-49, 2004.

SOLER-RIVAS, C., SPIN, J. C., WICHERS, H. J. Na easy and fast test to compare total free radical scavenger capacity of foodstuffs. **Phytochemical Analysis**. v.11, p.1-9, 2000.

SOUSA, C. M. M., SILVA, H. R., VIEIRA-JR, G. M., AYRES, M. C. C., COSTA, L. S. C., ARAÚJO, D. S., CAVALCANTE, L. C. D., BARROS, E. D. S., ARAÚJO, P. B. M., BRANDÃO, M. S., CHAVES, M. H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v.30, n.2, p.351-355, 2007.

SOONG, Y. Y., BARLOW, P. J. Quantification of gallic acid and ellagic acid from longan (*Dimocarpus longan* Lour.) seed and mango (*Mangifera indica* L.) kernel and their effects on antioxidant activity. **Food Chemistry**, v.97, p.524-530, 2006.

SUCAM/FUNASA. Estado de Alagoas- 24 Anos de Programa de Controle da Esquistossomose –Avaliação da Operação de Campo e Epidemiologia - **Resumo Histórico - Período de 1997 a 2000**. Palestra. Out. de 2002. CCBi/ UFAL.

SVS – Secretaria de Vigilância em Saúde – Balanço dengue janeiro a setembro de 2007 <<http://portal.saude.gov.br/portal/saude/area>> Data de acesso: Novembro de 2007.

TANG, X., GAO, J., WANG, Y., FAN, Y-M., XU, L-Z., ZHAO, X-N., XU, Q., QIAN, Z.M. 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, 2006.

TREVISAN, M. T. S., MACEDO, F. V. V. Seleção de plantas com atividade anticolinesterase para o tratamento da doença de Alzheimer. **Química Nova**, v. 26, p.301-304, 2003.

TREVISAN, M. T. S., BEZERRA, M. Z. B., SANTIAGO, G. M. P., FEITOSA, C. M. Atividades larvica e anticolinesterásica de plantas do gênero *Kalanchoe*. **Química Nova**, v. 29, p.415-418, 2006.

UCHÔA, Valdiléia Teixeira. **Estudo fitoquímico da *Cecropia pachystachya* guiado pelo bioensaio antimalárico *in vivo* e avaliação de algumas atividades biológicas dos extratos e frações das espécies *Cecropia pachystachya* Trec. (Cecropiaceae) e *Ximenia americana* L. (Olacaceae)**. Maceió, 2004. 98p. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Química e Biotecnologia, Universidade Federal de Alagoas.

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

VIEGAS JR, C., BOLZANI, V. S., FURLAN, M. Produtos naturais como candidatos á fármacos úteis no tratamento do Mal de Alzheimer. **Química Nova**, v. 27, p.655-660, 2004.

VIRDI, J.; SIVAKAMI, S.; SHAHANI, S.; SUTHAR, A. C.; BANAVALLIKAR, M. M.; BIYANI, M. K. Antihyperglycemic effects of three extracts from *Momordica charantia*. **J. Ethnopharmacol.**, v. 88, p.107-111, 2003.

VOLPATO, G. T.; DAMASCENO, D. C.; CALDERON, I. M. P.; RUDGE, M. V. C. Revisão de plantas brasileiras com comprovado efeito hipoglicemiante no controle do Diabetes mellitus. **Rev. Bras. Pl. Med.**, v. 4, p.35-45, 2002.

WHO-WORLD HEALTH ORGANIZATION *Health Topics Schistosomiasis*. <[http:// www.who. int/health/topics/schistosomiasis/en](http://www.who.int/health/topics/schistosomiasis/en)> . Data de acesso: Julho de 2002.

YADAVA, R. N., RATHORE K. A new cardenolide from the seeds of *Terminalia arjuna* (W&A). **Journal of Asian Natural Products Research**, v. 2 (2), p.97-101, 2000.

ZHANG, D., HAMAUZU, Y. Phenolic, ascorbic acid, carotenoids and antioxidant activity of broccoli and their change during conventional and microwave cooking. **Food Chemistry**. v. 88, p.503-509, 2004.

XIAO, S. H., BOOTH, M., TANNER, M. The prophylactic effects of artemether against *Schistosoma japonicum* infections. **Parasitology Today**, v.16, p.122-126, 2000.