



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO VALE DO SÃO FRANCISCO  
PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS NATURAIS DO SEMIÁRIDO**

**FERNANDA GRANJA DA SILVA OLIVEIRA**

**Influência do método extrativo sobre a produção de  
compostos fenólicos em *Hymenaea martiana* (Fabaceae) e  
controle de qualidade da droga vegetal**

**PETROLINA**

**2015**

**FERNANDA GRANJA DA SILVA OLIVEIRA**

**Influência do método extrativo sobre a produção de compostos fenólicos em *Hymenaea martiana* (Fabaceae) e controle de qualidade da droga vegetal**

**Dissertação apresentada à Universidade Federal do Vale do São Francisco, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Recursos Naturais do Semiárido, para obtenção do título de Mestre em Recursos Naturais do Semiárido.**

**Orientador: Prof. Dr. Jackson Roberto Guedes da Silva Almeida**

**PETROLINA**

**2015**

Oliveira, Fernanda Granja da Silva  
O48i Influência do método extrativo sobre a produção de compostos fenólicos em *Hymenaea martiana* (Fabaceae) e controle de qualidade da droga vegetal / Fernanda Granja da Silva Oliveira – Petrolina, 2015.  
XVII; 208f: il. 29 cm.

Dissertação (Mestrado em Recursos Naturais do Semiárido) - Universidade Federal do Vale do São Francisco, Campus Petrolina, Petrolina-PE, 2015.

Orientador: Prof. Dr. Jackson Roberto Guedes da Silva Almeida.

1. *Hymenaea martiana* 2. Compostos fenólicos. 3. Métodos de extração. I. Título. II. Universidade Federal do Vale do São Francisco  
CDD 581.192

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema Integrado de Biblioteca SIBI/UNIVASF  
Bibliotecário:

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO VALE DO SÃO FRANCISCO**  
**PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS NATURAIS DO SEMIÁRIDO**

Fernanda Granja da Silva Oliveira

**Influência do método extrativo sobre a produção de compostos  
fenólicos em *Hymenaea martiana* (Fabaceae) e controle de  
qualidade da droga vegetal**

Dissertação apresentada à Universidade Federal do Vale do São Francisco, como parte das exigências do Programa de Pós- Graduação em Recursos Naturais do Semiárido, para obtenção do título de Mestre em Recursos Naturais do Semiárido.

Aprovada em: 06 de março de 2015

**Banca Examinadora:**

---

Prof. Dr. Jackson Roberto Guedes da Silva Almeida  
(Universidade Federal do Vale do São Francisco)  
Orientador

---

Prof. Dr. Irinaldo Diniz Basílio Júnior  
(Universidade Federal de Alagoas)  
Examinador Externo

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Larissa Araújo Rolim  
(Universidade Federal do Vale do São Francisco)  
Examinadora Interna

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus pela dádiva da vida e perseverança para alcançar meus objetivos.

A meus pais, Edivânia Granja e Roberto de Oliveira pelo amor e apoio intelectual dedicado, pois sempre me ensinaram como bons exemplos de professores e cidadãos éticos a trabalhar com honestidade e determinação frente aos desafios. Ao meu noivo, Domingos Diletieri, pelo amor, apoio, paciência e dedicação, pelo constante incentivo para a realização deste e outros sonhos.

Ao professor Jackson Roberto, pela orientação, confiança e oportunidade dadas, que possibilitaram a realização deste trabalho.

À professora Ana Cláudia Dantas de Medeiros, pela amizade, apoio e colaboração no desenvolvimento deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela disponibilização de bolsa de estudos, que viabilizaram a dedicação necessária para o desenvolvimento do projeto.

À Universidade Federal do Vale do São Francisco, ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Naturais do Semiárido, e principalmente ao NEPLAME, pela disponibilização de laboratórios e materiais necessários para o desenvolvimento do trabalho.

A todas as parcerias, colaborações e contribuições de colegas, pesquisadores, universidades, empresas e professores, que participaram da elaboração deste trabalho.

## RESUMO

*Hymenaea martiana*, conhecida popularmente como “jatobá”, é uma espécie utilizada na medicina tradicional no tratamento de inflamações e reumatismo. O objetivo deste estudo foi avaliar a influência de diferentes métodos extrativos das cascas, folhas, frutos e sementes na produção de compostos fenólicos de *Hymenaea martiana* Hayne (Fabaceae). As cascas, folhas, frutos e sementes foram coletados em Petrolina-PE (exsicata nº 6444). Foi realizada extração para estudo preliminar das drogas vegetais por maceração, percolação e ultrassom, utilizando etanol 95% como solvente. Os extratos obtidos foram avaliados quanto ao rendimento, aspectos visuais, triagem fitoquímica, desrepliação, detecção de astilbina ou seus isômeros por CLAE-EM, determinação de compostos fenólicos e flavonoides totais, e da atividade fotoprotetora *in vitro*. As cascas foram escolhidas como a droga vegetal mais adequada e suas características físico-químicas foram determinadas. Um planejamento fatorial  $2^2$  foi desenvolvido, com três pontos centrais, e os fatores escolhidos foram a porcentagem de álcool e a relação droga:solvente, pelos métodos de maceração e turbólise. O rendimento e a determinação de compostos fenólicos e flavonoides totais foram as respostas utilizadas. A avaliação preliminar mostrou que os maiores rendimentos foram obtidos por maceração, e que cada parte vegetal influenciou nos aspectos visuais dos extratos. Os extratos apresentaram perfil fitoquímico semelhante a outras espécies do gênero, e a desrepliação revelou a presença de flavonoides importantes, como a astilbina. Adicionalmente, os valores de FPS e o teor de compostos fenólicos e flavonoides totais evidenciaram a influência dos métodos na determinação destes compostos. A droga vegetal escolhida, através de análise estatística, foi a casca do caule, que foi caracterizada físico-quimicamente, com resultados dentro do especificado na Farmacopeia Brasileira. O método de turbólise preparado com etanol a 50% e proporção 1:30 apresentou melhores resultados no planejamento fatorial e foi escolhido como a melhor condição extrativa. Os resultados deste estudo, obtidos de maneira racional e baseada em evidências científicas, fornecem informações importantes para o futuro desenvolvimento de produtos a partir de *Hymenaea martiana*.

**Palavras-chave:** *Hymenaea martiana*. Compostos Fenólicos. Métodos de extração.

## ABSTRACT

*Hymenaea martiana*, popularly known as "jatobá", is a species used in traditional medicine to treat inflammation and rheumatism. The aim of this study was to evaluate the influence of different extractive methods of bark, leaves, fruits and seeds in the production of phenolic compounds in *Hymenaea martiana* Hayne (Fabaceae). The bark, leaves, fruits and seeds were collected in Petrolina-PE (voucher specimen No. 6444). Extraction was performed for preliminary study of herbal drugs by maceration, percolation and ultrasound, using 95% ethanol as solvent. The extracts obtained were evaluated for yield, visual aspects, phytochemical screening, dereplication, astilbin or isomers detection by CLAE-EM, determination of phenolic compounds and total flavonoids, and photoprotective activity *in vitro*. The barks were chosen as the most suitable plant drug and its physicochemical characteristics were determined. A factorial design 2<sup>2</sup> was developed with three central points, and the factors chosen were the percentage of alcohol and relationship drug:solvent, by the methods of maceration and turbolysis. The yield and the determination of total flavonoids and phenolic compounds used were the responses. The preliminary evaluation showed that the highest yields were obtained by maceration, and each vegetable part influences the visual aspects of the extracts. The extracts showed phytochemical profile similar to other species of the genus, and the dereplication revealed the presence of important flavonoids, as astilbin. In addition, SPF values and the content of phenolic and total flavonoid compounds showed the influence of methods for the determination of these compounds. The chosen plant drug, through statistical analysis, was the stem bark, which was characterized for physicochemical aspects, with results within specified in the Brazilian Pharmacopoeia. The turbolysis method prepared with 50% ethanol and 1:30 ratio showed better results in experimental design and was chosen as the best extraction condition. The results, obtained in a rational and scientifically based way, provide important information for future product development from *Hymenaea martiana*.

**Key-words:** *Hymenaea martiana*. Phenolic compounds. Extraction methods.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

|           |   |    |
|-----------|---|----|
| Figura 1  | <i>Hymenaea martiana</i> , localidade Nova Descoberta, Petrolina, Pernambuco, Brasil.   | 44 |
| Figura 2  | Frutos de <i>Hymenaea martiana</i> .  | 44 |
| Figura 3  | Flores de <i>Hymenaea martiana</i> .  | 45 |
| Figura 4  | Substâncias já identificadas em <i>Hymenaea martiana</i>  | 49 |
| Figura 5  | Identificação botânica de <i>Hymenaea martiana</i> .  | 51 |
| Figura 6  | Aspectos visuais dos extratos obtidos por maceração.<br>Legenda: (A) maceração das cascas; (B) maceração das folhas; (C) maceração dos frutos; (D) maceração das sementes   | 67 |
| Figura 7  | Aspectos visuais dos extratos obtidos por percolação.<br>Legenda: (A) percolação das cascas; (B) percolação das folhas; (C) percolação dos frutos; (D) percolação das sementes  | 68 |
| Figura 8  | Aspectos visuais dos extratos obtidos por ultrassom.<br>Legenda: (A) ultrassom das cascas; (B) ultrassom das folhas; (C) ultrassom dos frutos; (D) ultrassom das sementes.  | 69 |
| Figura 9  | Placas de cromatografia em camada delgada dos extratos brutos dos materiais vegetais submetidos à extração por maceração (da esquerda para a direita: alcaloides, antracenos, cumarinas, flavonoides, lignanas, monoterpenos e diterpenos, naftoquinonas, saponinas e triterpenos) – cascas, folhas e frutos. | 73 |
| Figura 10 | Placas de cromatografia em camada delgada dos extratos brutos dos materiais vegetais submetidos à extração por maceração, após a aplicação dos reveladores – cascas, folhas e frutos.   | 74 |
| Figura 11 | Visualização das placas após a aplicação dos reveladores em câmara de luz UV, dos extratos brutos dos materiais vegetais submetidos à extração por maceração – cascas, folhas e frutos.   | 74 |

|           |   |    |
|-----------|---|----|
| Figura 12 | Visualização das placas após a aplicação dos reveladores em câmara de luz UV (365 nm), dos extratos brutos dos materiais vegetais submetidos à extração por maceração (sementes), percolação e ultrassom (cascas, folhas, frutos e sementes). | 75 |
| Figura 13 | Estrutura química da astilbina.   | 76 |
| Figura 14 | Estrutura química da isoastilbina.  | 77 |
| Figura 15 | Estrutura química da neoastilbina   | 77 |
| Figura 16 | Fragmentação da astilbina (a) em taxifolina (t) no modo negativo e positivo.  | 78 |
| Figura 17 | Padrão de fragmentação proposto de astilbina em taxifolina  | 79 |
| Figura 18 | Cromatograma do extrato obtido por maceração das cascas de <i>Hymenaea martiana</i> no modo negativo.   | 79 |
| Figura 19 | Espectros de massas, com detecção de astilbina (a) e taxifolina (t), no extrato obtido através de maceração das cascas de <i>Hymenaea martiana</i> , no modo negativo.  | 80 |
| Figura 20 | Cromatograma do extrato obtido por maceração das folhas de <i>Hymenaea martiana</i> no modo negativo.   | 80 |
| Figura 21 | Espectros de massas, com detecção de neoastilbina (n), astilbina (a) e isoastilbina (i) no extrato obtido através de maceração das folhas de <i>Hymenaea martiana</i> , no modo negativo.   | 80 |
| Figura 22 | Cromatograma do extrato obtido por maceração dos frutos de <i>Hymenaea martiana</i> no modo negativo.   | 83 |
| Figura 23 | Espectros de massas, com detecção de astilbina (a) e isoastilbina (i), taxifolina (t) e quercetina (q), no extrato obtido através de maceração dos frutos de <i>Hymenaea martiana</i> no modo negativo.                                       | 84 |
| Figura 24 | Cromatograma do extrato obtido por maceração das sementes de <i>Hymenaea martiana</i> no modo negativo.   | 85 |
| Figura 25 | Espectros de massas, com detecção de isoastilbina (i) e quercetina (q), no extrato obtido através de maceração das  | 86 |

|           |  |    |
|-----------|--|----|
|           | sementes de <i>Hymenaea martiana</i> no modo negativo.   |    |
| Figura 26 | Cromatograma do extrato obtido por percolação das cascas de <i>Hymenaea martiana</i> no modo negativo.   | 87 |
| Figura 27 | Espectro de massas, com detecção de astilbina (a) no extrato obtido através de percolação das cascas de <i>Hymenaea martiana</i> no modo negativo.                       | 88 |
| Figura 28 | Cromatograma do extrato obtido por percolação das folhas de <i>Hymenaea martiana</i> no modo negativo.   | 88 |
| Figura 29 | Espectros de massas, com detecção de neoastilbina (n), astilbina (a), no extrato obtido através de percolação das folhas de <i>Hymenaea martiana</i> no modo negativo.   | 89 |
| Figura 30 | Cromatograma do extrato obtido por percolação dos frutos de <i>Hymenaea martiana</i> no modo negativo.   | 90 |
| Figura 31 | Espectros de massas, com detecção de neoastilbina (n), isoastilbina (i) no extrato obtido através de percolação dos frutos de <i>Hymenaea martiana</i> no modo negativo. | 91 |
| Figura 32 | Cromatograma do extrato obtido por percolação das sementes de <i>Hymenaea martiana</i> no modo negativo.   | 91 |
| Figura 33 | Espectros de massas, com detecção de isoastilbina (i) no extrato obtido através de percolação das sementes de <i>Hymenaea martiana</i> no modo negativo.                 | 92 |
| Figura 34 | Cromatograma do extrato obtido por ultrassom das cascas de <i>Hymenaea martiana</i> no modo negativo.  | 92 |
| Figura 35 | Espectros de massas, com detecção de astilbina (a) no extrato obtido através de ultrassom das cascas de <i>Hymenaea martiana</i> no modo negativo.                       | 93 |
| Figura 36 | Cromatograma do extrato obtido por ultrassom das folhas de <i>Hymenaea martiana</i> no modo negativo.  | 93 |
| Figura 37 | Espectros de massas, com detecção de neoastilbina (n) no extrato obtido através de ultrassom das folhas de <i>Hymenaea martiana</i> no modo negativo.                    | 94 |
| Figura 38 | Cromatograma do extrato obtido por ultrassom dos frutos de <i>Hymenaea martiana</i> no modo negativo.  | 94 |

|           |   |     |
|-----------|---|-----|
| Figura 39 | Espectros de massas, com detecção de astilbina (a) e quercetina (q) no extrato obtido através de ultrassom dos frutos de <i>Hymenaea martiana</i> no modo negativo. | 95  |
| Figura 40 | Cromatograma do extrato obtido por ultrassom das sementes de <i>Hymenaea martiana</i> no modo negativo.   | 96  |
| Figura 41 | Espectros de massas, com detecção de astilbina (a) no extrato obtido através de ultrassom das sementes de <i>Hymenaea martiana</i> no modo negativo.                | 96  |
| Figura 42 | Varreduras de 260 a 400 nm, do extrato etanólico bruto de cascas de <i>Hymenaea martiana</i> .  | 102 |
| Figura 43 | Varredura de 260 a 400 nm, do extrato etanólico bruto de folhas de <i>Hymenaea martiana</i> .   | 102 |
| Figura 44 | Varredura de 260 a 400 nm, do extrato etanólico bruto de frutos de <i>Hymenaea martiana</i> .   | 103 |
| Figura 45 | Varredura de 260 a 400 nm, do extrato etanólico bruto de sementes de <i>Hymenaea martiana</i> .   | 103 |
| Figura 46 | Histograma de distribuição da granulometria de cascas de <i>Hymenaea martiana</i> .   | 105 |
| Figura 47 | Curva de retenção e passagem das cascas de <i>Hymenaea martiana</i> .   | 106 |
| Figura 48 | Superfície de resposta para o rendimento do processo extrativo maceração.   | 114 |
| Figura 49 | Superfície de resposta para o teor de compostos fenólicos do processo extrativo maceração.  | 115 |
| Figura 50 | Superfície de resposta para o teor de flavonoides totais do processo extrativo maceração.   | 116 |
| Figura 51 | Superfície de resposta para o rendimento do processo extrativo turbólise.   | 119 |
| Figura 52 | Superfície de resposta para o teor de compostos fenólicos do processo extrativo turbólise.  | 120 |
| Figura 53 | Superfície de resposta para o teor de flavonoides totais do processo extrativo turbólise.   | 121 |

## LISTA DE TABELAS

|           |   |     |
|-----------|---|-----|
| Tabela 1  | Atividades biológicas de <i>Hymenaea</i> .  | 31  |
| Tabela 2  | Sistemas de eluição e reveladores utilizados na triagem fitoquímica de <i>Hymenaea martiana</i> por CCD.  | 53  |
| Tabela 3  | Condições cromatográficas nos experimentos de CLAE-EM.  | 54  |
| Tabela 4  | Níveis para o desenho experimental para o estudo de métodos de extração com as cascas de <i>Hymenaea martiana</i> .                                       | 61  |
| Tabela 5  | Planejamento fatorial 2 <sup>2</sup> com três repetições no ponto central, para cada método extrativo realizado com as cascas de <i>Hymenaea martiana</i> | 62  |
| Tabela 6  | Rendimentos dos extratos obtidos de <i>Hymenaea martiana</i> .  | 64  |
| Tabela 7  | Aspectos visuais dos extratos obtidos de <i>Hymenaea martiana</i> .   | 66  |
| Tabela 8  | Triagem fitoquímica qualitativa dos materiais vegetais de <i>Hymenaea martiana</i> submetidos à extração por maceração.                                   | 70  |
| Tabela 9  | Triagem fitoquímica qualitativa dos materiais vegetais de <i>Hymenaea martiana</i> submetidos à extração por percolação.                                  | 71  |
| Tabela 10 | Triagem fitoquímica qualitativa dos materiais vegetais de <i>Hymenaea martiana</i> submetidos à extração por ultrassom.                                   | 72  |
| Tabela 11 | Detecção do padrão astilbina em ensaio de CLAE-EM.  | 78  |
| Tabela 12 | Detecção de astilbina em ensaio de CLAE-EM em diversas partes de <i>Hymenaea martiana</i> , no modo negativo [M-H] <sup>-</sup> .                         | 98  |
| Tabela 13 | Compostos fenólicos totais em extratos de diferentes partes de <i>Hymenaea martiana</i> .   | 99  |
| Tabela 14 | Flavonoides totais em extratos de diferentes partes de <i>Hymenaea martiana</i>   | 100 |

|           |  |     |
|-----------|--|-----|
| Tabela 15 | Valores de FPS na faixa de UVA (290-320 nm) dos extratos de diferentes partes de <i>Hymenaea martiana</i> , na concentração de 100 mg/L. | 104 |
| Tabela 16 | Análise físico-química das cascas de <i>Hymenaea martiana</i> .  | 107 |
| Tabela 17 | Análise de metais pesados em cascas de <i>Hymenaea martiana</i> .  | 109 |
| Tabela 18 | Resultados das análises com os extratos obtidos com as cascas, através do método maceração.  | 111 |
| Tabela 19 | Análise de variância (ANOVA) da influência das condições do método extrativo maceração no rendimento dos extratos.                       | 112 |
| Tabela 20 | Análise de variância (ANOVA) da influência das condições do método extrativo maceração no teor de compostos fenólicos dos extratos.      | 112 |
| Tabela 21 | Análise de variância (ANOVA) da influência das condições do método extrativo maceração no teor de flavonoides dos extratos.              | 113 |
| Tabela 22 | Resultados das análises com os extratos obtidos com as cascas através do método turbólise.   | 117 |
| Tabela 23 | Análise de variância (ANOVA) da influência das condições do método extrativo turbólise no rendimento dos extratos.                       | 118 |
| Tabela 24 | Análise de variância (ANOVA) da influência das condições do método extrativo turbólise no teor de compostos fenólicos dos extratos.      | 118 |
| Tabela 25 | Análise de variância (ANOVA) da influência das condições do método extrativo turbólise no teor de flavonoides totais dos extratos.       | 119 |

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

|                                |   |
|--------------------------------|---|
| ANOVA                          | Análise de variância  |
| ANVISA                         | Agência Nacional de Vigilância Sanitária  |
| CCD                            | Cromatografia em Camada Delgada   |
| CHCl <sub>3</sub>              | Clorofórmio   |
| CLAE                           | Cromatografia Líquida de Alta Eficiência  |
| CLAE-DAD                       | Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Detector de Arranjo de Diodos |
| CRAD                           | Centro de Referência para Recuperação de Áreas Degradadas da Caatinga             |
| EtOH                           | Etanol  |
| H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> | Ácido Sulfúrico   |
| H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> | Ácido Fosfórico   |
| HVASF                          | Herbário Vale do São Francisco  |
| CLAE-EM                        | Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de massas                         |
| MEOH                           | Metanol   |
| OMS                            | Organização Mundial da Saúde  |
| RDC                            | Resolução da Diretoria Colegiada  |
| RMN                            | Ressonância Magnética Nuclear   |
| UNIVASF                        | Universidade Federal do Vale do São Francisco                                     |
| UV                             | Ultravioleta  |
| UV-Vis                         | Ultravioleta visível  |

## LISTA DE SÍMBOLOS

|     |               |
|-----|---------------|
| °C  | Graus Celsius |
| mm  | Milímetros    |
| cm  | Centímetros   |
| %   | Por cento     |
| Kg  | Quilograma    |
| g   | Gramma        |
| mg  | Miligrama     |
| m   | Metro         |
| µL  | Microlitro    |
| =   | Igual         |
| x   | Vezez         |
| ±   | Mais ou menos |
| min | Minutos       |

## SUMÁRIO

|        |   |    |
|--------|---|----|
| 1      | <b>INTRODUÇÃO</b>   | 18 |
| 2      | <b>OBJETIVOS</b>  | 21 |
| 2.1    | <b>Objetivo Geral</b>   | 21 |
| 2.2    | <b>Objetivos Específicos</b>  | 21 |
| 3      | <b>FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b>  | 22 |
| 3.1    | <b>Plantas medicinais do Brasil: legislação brasileira para o registro de medicamentos fitoterápicos</b>  | 22 |
| 3.2    | <b>O gênero <i>Hymenaea</i></b>   | 23 |
| 3.2.1  | <i>Etnobotânica e farmacologia do gênero</i>  | 23 |
| 3.2.1  | <i>Fitoquímica do gênero</i>  | 34 |
| 3.3    | <b><i>Hymenaea martiana</i></b>   | 43 |
| 3.3.1  | <i>Etnobotânica e fitoquímica da espécie</i>  | 43 |
| 3.3.2  | <i>Fitoquímica da espécie</i>   | 47 |
| 4      | <b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>  | 50 |
| 4.1    | <b>Levantamento bibliográfico</b>   | 50 |
| 4.2    | <b>Obtenção das drogas vegetais</b>   | 50 |
| 4.3    | <b>Avaliação preliminar do método extrativo para diferentes drogas vegetais de <i>Hymenaea martiana</i></b>   | 51 |
| 4.3.1  | <i>Maceração</i>  | 51 |
| 4.3.2  | <i>Percolação</i>   | 52 |
| 4.3.3  | <i>Ultrassom</i>  | 52 |
| 4.3.4  | <i>Cálculo do rendimento de extração</i>  | 52 |
| 4.3.5  | <i>Avaliação dos aspectos visuais</i>   | 52 |
| 4.3.6  | <i>Triagem fitoquímica qualitativa</i>  | 53 |
| 4.3.7  | <i>Desreplicação e detecção do flavonoide astilbina e seus isômeros, através de análise por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (CLAE-EM)</i> | 53 |
| 4.3.8  | <i>Determinação do teor de compostos fenólicos totais</i>   | 55 |
| 4.3.9  | <i>Determinação do teor de flavonoides totais</i>   | 55 |
| 4.3.10 | <i>Determinação da atividade fotoprotetora UVB in vitro</i>   | 56 |
| 4.3.11 | <i>Escolha da droga vegetal com melhores resultados</i>   | 56 |
| 4.4    | <b>Caracterização físico-química da droga vegetal escolhida</b>   | 57 |
| 4.4.1  | <i>Determinação da granulometria dos pós</i>  | 57 |
| 4.4.2  | <i>Determinação do índice de espuma</i>   | 57 |
| 4.4.3  | <i>Determinação da perda por dessecação</i>   | 58 |
| 4.4.4  | <i>Determinação de cinzas totais e sulfatadas</i>   | 59 |
| 4.4.5  | <i>Ensaio limite para metais pesados (método semi-quantitativo)</i>   | 59 |
| 4.4.6  | <i>Ensaio limite para metais pesados (ICP)</i>  | 60 |
| 4.4.7  | <i>Determinação de pH em solução aquosa</i>   | 60 |
| 4.4.8  | <i>Determinação da densidade aparente não compactada</i>  | 61 |
| 4.5    | <b>Avaliação do método extrativo para cascas de <i>Hymenaea martiana</i></b>  | 61 |
| 4.5.1  | <i>Maceração</i>  | 62 |
| 4.5.2  | <i>Turbólise</i>  | 62 |
| 4.5.3  | <i>Cálculo do rendimento</i>  | 63 |
| 4.5.4  | <i>Determinação do teor de compostos fenólicos totais</i>   | 63 |
| 4.5.5  | <i>Determinação do teor de flavonoides totais</i>   | 63 |
| 4.5.6  | <i>Análise estatística</i>  | 63 |
| 5      | <b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>   | 64 |
| 5.1    | <b>Avaliação preliminar do método extrativo para diferentes drogas vegetais de <i>Hymenaea martiana</i></b>   | 64 |
| 5.1.1  | <i>Cálculo do rendimento de extração</i>  | 64 |
| 5.1.2  | <i>Avaliação dos aspectos visuais</i>   | 65 |

|            |  |     |
|------------|--|-----|
| 5.1.3      | <i>Triagem fitoquímica qualitativa</i>   | 69  |
| 5.1.4      | <i>Desreplicação e detecção do flavonoide astilbina e seus isômeros, através de análise por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (CLAE-EM).</i> | 75  |
| 5.1.4.1    | <i>Maceração das cascas</i>  | 79  |
| 5.1.4.2    | <i>Maceração das folhas</i>  | 80  |
| 5.1.4.3    | <i>Maceração dos frutos</i>  | 83  |
| 5.1.4.4    | <i>Maceração das sementes</i>  | 85  |
| 5.1.4.5    | <i>Percolação das cascas</i>   | 87  |
| 5.1.4.6    | <i>Percolação das folhas</i>   | 88  |
| 5.1.4.7    | <i>Percolação dos frutos</i>   | 90  |
| 5.1.4.8    | <i>Percolação das sementes</i>   | 91  |
| 5.1.4.9    | <i>Ultrassom das cascas</i>  | 92  |
| 5.1.4.10   | <i>Ultrassom das folhas</i>  | 93  |
| 5.1.4.11   | <i>Ultrassom dos frutos</i>  | 94  |
| 5.1.4.12   | <i>Ultrassom das sementes</i>  | 96  |
| 5.1.5      | <i>Determinação do teor de compostos fenólicos totais</i>  | 98  |
| 5.1.6      | <i>Determinação do teor de flavonoides totais</i>  | 99  |
| 5.1.7      | <i>Determinação da atividade fotoprotetora in vitro</i>  | 100 |
| 5.1.8      | <i>Escolha da droga vegetal com melhores resultados</i>  | 104 |
| <b>5.2</b> | <b>Caracterização físico-química da droga vegetal escolhida</b>  | 105 |
| 5.2.1      | <i>Determinação da granulometria dos pós</i>   | 105 |
| 5.2.2      | <i>Determinação do índice de espuma</i>  | 106 |
| 5.2.3      | <i>Determinação da perda por dessecação</i>  | 106 |
| 5.2.4      | <i>Determinação de cinzas totais e sulfatadas</i>  | 107 |
| 5.2.5      | <i>Determinação do pH em solução aquosa</i>  | 107 |
| 5.2.6      | <i>Determinação da densidade aparente não compactada</i>   | 108 |
| 5.2.7      | <i>Ensaio limite para metais pesados</i>   | 108 |
| <b>5.3</b> | <b>Avaliação do método extrativo para as cascas de <i>Hymenaea martiana</i></b>  | 110 |
| 5.3.1      | <i>Maceração</i>   | 111 |
| 5.3.1.1    | <i>Cálculo do rendimento de extração</i>   | 111 |
| 5.3.1.2    | <i>Determinação do teor de compostos fenólicos totais</i>  | 114 |
| 5.3.1.3    | <i>Determinação do teor de flavonoides totais</i>  | 115 |
| 5.3.2      | <i>Turbólise</i>   | 116 |
| 5.3.2.1    | <i>Cálculo do rendimento de extração</i>   | 117 |
| 5.3.2.2    | <i>Determinação de compostos fenólicos totais</i>  | 120 |
| 5.3.2.3    | <i>Determinação de flavonoides totais</i>  | 120 |
| <b>6</b>   | <b>CONCLUSÕES</b>  | 122 |
|            | <b>REFERÊNCIAS</b>   | 124 |
|            | <b>ANEXO A</b>   | 150 |
|            | <b>APÊNDICE A</b>  | 181 |

## 1 INTRODUÇÃO

As plantas medicinais têm tido papel importante na terapêutica desde a antiguidade, porém, seu valor como alternativa clínica vem ganhando destaque em políticas públicas de vários países ao redor do mundo, inclusive no Brasil, que vem se normatizando, especialmente em relação a alguns critérios, como segurança, eficácia e qualidade de medicamentos com matérias-primas ativas vegetais.

*Hymenaea* é um gênero da família Fabaceae, altamente distribuído da América Central à América do Sul, principalmente na bacia amazônica, com cerca de 25 espécies descritas nas Américas (PETTIT et al., 2003).

O gênero, caracterizado por sua distribuição neotropical, também inclui uma espécie de ocorrência no leste da África (MARTIN et al., 1974). Plantas do gênero *Hymenaea* são conhecidas no Brasil como “jatobá”, “jetaí”, “jataí-uva”, “jetaíba” (OLIVEIRA et al., 2012), e são comumente utilizadas na medicina tradicional brasileira para o tratamento de inflamações, infecções bacterianas, reumatismo e anemia (GAZZANEO et al., 2005; AGRA et al., 2007). Das cascas, uma resina é exudada e esta é utilizada na medicina tradicional para o tratamento de ferimentos, distúrbios gástricos e bronquite (MARSAIOLI et al., 1975). A característica principal das espécies de *Hymenaea* é a sua composição essencial de diterpenos nos extratos e resina das cascas do caule (DOMÉNECH-CARBÓ et al., 2009). Uma classe de diterpenos, *enantio*-labdanoicos, foram isolados, assim como diterpenos da classe clerodano (NOGUEIRA et al., 2001).

Dentre as plantas medicinais do gênero *Hymenaea*, destaca-se a *Hymenaea martiana* Hayne, conhecida popularmente no Nordeste brasileiro como “jatobá”. Shanley e Medina (2005) caracterizam esta planta como árvore de porte grande, com 15 a 20 metros de altura, possuindo copa arredondada com folhagem densa e casca espessa, tronco reto, com cerca de 2 metros de diâmetro. Esta planta é nativa da África, podendo ser encontrada no México, Cuba e América do Sul, apresentando grande distribuição no território brasileiro (SOUZA, 2008).

Os flavonoides destacam-se dentre as principais classes de produtos naturais, pertencendo à classe dos polifenóis. São compostos formados por um núcleo benzopirano ou cromano, ligado a um anel aromático, formando o núcleo fundamental “fenil-benzopirano”. Dentre as principais atividades farmacológicas associadas aos flavonoides, podem ser citadas a atividade antioxidante (ALMEIDA

et al., 2012), antifúngica (SOUZA et al., 2009), imunomoduladora, anti-inflamatória, bactericida, antiviral, hepatoprotetora e gastroprotetora (GUARDIA et al., 2001).

O uso tradicional do jatobá tem sido relatado, e o extrato alcoólico de *H. martiana* tem sido usado no tratamento de inflamações e de reumatismo, e ainda como antinociceptiva e analgésica (NEVES et al., 1993; GAZZANEO et al., 2005). Algumas substâncias que têm sido relacionadas às atividades farmacológicas são flavonoides (CARNEIRO et al., 1993; CLOSA et al., 1997; ALMEIDA et al., 2012).

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), através da Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 26 de 13/05/2014, define que fitoterápicos são os medicamentos produzidos com o emprego exclusivo de matérias-primas ativas vegetais, com eficácia e segurança baseada em evidências clínicas e que apresentam constância na sua qualidade. Portanto, para que uma planta medicinal possa ser utilizada como medicamento fitoterápico de forma segura, torna-se necessária a sua padronização, ou seja, a autenticidade da droga vegetal e seu teor de princípios ativos devem ser estabelecidos dentro dos critérios de qualidade (BRASIL, 2014).

O emprego de plantas medicinais, em países como o Brasil, possui grande importância, principalmente para a população de baixa renda, já que são eficientes e de baixo custo, além de possuir um aspecto cultural. A Organização Mundial de Saúde (OMS) vem recomendando internacionalmente a fitoterapia como um apoio terapêutico em políticas de saúde pública (OLIVEIRA; ARAÚJO, 2007).

Para a produção desta classe de medicamentos, a preparação do insumo farmacêutico ativo constitui etapa crítica, devido à influência de vários fatores, como a variação na produção dos princípios ativos pelo vegetal, condições extrativas, propriedades dos diversos solventes, bem como as variadas técnicas de extração disponíveis (BRASIL, 2011). A padronização e controle destes fatores na produção das drogas e derivados vegetais torna-se, então, imprescindível para a qualidade do produto fitoterápico. Neste caso, a elaboração do extrato vegetal seco apresenta inúmeras vantagens para a sua aplicação, como maior estabilidade química, facilidade de armazenamento, transporte e manuseio, podendo ser utilizado como matéria-prima ativa para produtos nas mais diversas formas farmacêuticas (FONSECA, 2009).

De acordo com um levantamento bibliográfico, ainda não foi encontrado estudo fitoquímico com as folhas, frutos e sementes de *Hymenaea martiana*.

Nesse contexto, este trabalho tem como objetivo a avaliação da influência de diferentes métodos extrativos em diferentes partes da espécie *Hymenaea martiana*, através da determinação de constituintes químicos dos extratos, caracterização físico-química, e da otimização da extração desta classe de compostos, através de planejamento fatorial.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Geral

Avaliar a influência de diferentes métodos extrativos das cascas, folhas, frutos e sementes na produção de compostos fenólicos em *Hymenaea martiana* Hayne (Fabaceae).

### 2.2 Específicos

- Realizar uma revisão bibliográfica, levando em consideração os aspectos fitoquímicos e farmacológicos do gênero *Hymenaea* nos principais bancos de dados disponíveis na área de produtos naturais;
- Preparar extratos a partir dos materiais vegetais (cascas, folhas, frutos e sementes) de *Hymenaea martiana*, utilizando métodos extrativos diversos, como maceração, percolação e ultrassom;
- Calcular o rendimento de cada extrato, bem como realizar uma avaliação de seus aspectos visuais;
- Realizar a triagem fitoquímica qualitativa dos extratos;
- Realizar a identificação de astilbina e outros flavonoides, através da análise em CLAE-EM;
- Avaliação do teor de metabólitos secundários, como compostos fenólicos totais e flavonoides totais;
- Realizar o controle de qualidade físico-químico da droga vegetal com melhores resultados nas avaliações;
- Realizar a otimização da extração, através da elaboração de planejamento fatorial  $2^2$  para a droga vegetal escolhida, e utilizando como fatores as concentrações da solução extrativa (porcentagem de álcool) e relação droga:solvente;
- Avaliar o teor de metabólitos secundários, como compostos fenólicos totais e flavonoides totais, e escolher o método extrativo mais eficiente.

---

### **3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA**

#### **3.1 Plantas medicinais no Brasil: legislação brasileira para o registro de medicamentos fitoterápicos**

O uso de plantas medicinais esteve presente durante toda a história da humanidade, não apenas para o uso alimentar, mas também para uso ritualístico e terapêutico. Durante longo período, as plantas medicinais constituíram o principal recurso terapêutico disponível, mas os avanços tecnológicos trouxeram as drogas sintéticas para o tratamento de enfermidades. Atualmente, a sociedade vem valorizando a utilização de produtos naturais com propriedades terapêuticas, provavelmente devido à busca por hábitos saudáveis, além de problemas com o tratamento eficiente de certas enfermidades, como a resistência bacteriana e efeitos colaterais dos medicamentos alopáticos (SOUZA, 2008).

Para o registro de medicamentos, é necessária a realização de testes que visam garantir a pureza e integridade da droga vegetal, além da avaliação de solventes e excipientes utilizados na extração do derivado, relação aproximada droga vegetal: derivado vegetal e testes de pureza e integridade do derivado vegetal. Para extratos secos, é exigida a determinação de água, densidade aparente, além da determinação de contaminantes, análise quantitativa de marcadores e perfil cromatográfico (BRASIL, 2014).

A ANVISA ainda define que marcador é a substância ou classe de substâncias que são utilizadas como referência no controle da qualidade da matéria-prima vegetal e do medicamento fitoterápico, que preferencialmente deve ter correlação com o efeito terapêutico (BRASIL, 2014). O doseamento e identificação dos marcadores químicos, com a devida rastreabilidade e confiabilidade, deve ser realizada com a utilização de métodos precisos e desenvolvidos com qualidade.

A grande biodiversidade brasileira, aliada à legislação atualizada para o registro de medicamentos fitoterápicos, consolida o uso de plantas como primeiro recurso utilizado no tratamento de diversas enfermidades, sendo muitas vezes, este uso feito de forma empírica, sem suas propriedades farmacológicas comprovadas (SILVA et al., 2012).

#### **3.2 O gênero *Hymenaea***

### 3.2.1 Etnobotânica e farmacologia do gênero

Muitas pesquisas objetivaram o estudo das espécies de *Hymenaea* em todo o mundo, devido ao seu uso tradicional destas plantas como uma alternativa terapêutica. Na Nicarágua, o uso tradicional foi relatado, e as partes vegetais citadas foram as cascas e folhas, utilizadas como fortificantes (BARRET, 1994). Na costa leste da África, duas espécies foram citadas - *Hymenaea gaertneriana* e *Hymenaea verrucosa*, e a sua utilização são relacionadas à resina como matéria-prima para a produção de vernizes (JOST et al., 1989). No Brasil, este gênero é citado em muitos estudos, principalmente na região Nordeste e Central. No Nordeste, há estudos etnofarmacológicos interessantes sobre as espécies de *Hymenaea*, que descrevem o seu uso na forma de decocções ou xaropes para tosse, anemia, (AGRA et al., 2007; CUNHA; BORTOLOTTI, 2011), bronquite, inflamação, antioxidante (CHAVES; BARROS, 2012; OLIVEIRA et al., 2012), sinusite, espasmos abdominais, problemas na próstata, asma, gripe comum e para problemas pulmonares, e a resina em forma de *patch* para cicatrização de ferimentos (CHAVES; BARROS, 2012).

Vários estudos farmacológicos descrevem as atividades de *Hymenaea* (Tabela 1). O gênero foi analisado quanto à sua atividade anticâncer e os resultados foram positivos (SAMPAIO et al., 1984). As plantas do gênero são utilizadas como chás e xaropes (LEITÃO et al., 2013), e os frutos e a farinha das sementes são utilizados (OLIVEIRA et al., 2012). Em alguns artigos, o gênero foi um dos mais citados em estudos etnofarmacológicos (CHAVES; BARROS, 2012; CUNHA; BORTOLOTTI, 2011; ALBUQUERQUE et al., 2007a; MENDES; CARLINI, 2007), nas duas regiões mencionadas e no sudeste (LEITÃO et al., 2013). As partes citadas da planta são as cascas, resina, galhos e epicarpo (AGRA et al., 2007; ALBUQUERQUE et al., 2007b). A resina de *Hymenaea* é encontrada na composição de âmbar (HEINRICHS et al., 2013). Uma publicação do século 19, escrita por um naturalista europeu, cita espécies de *Hymenaea* utilizadas no Brasil, o qual cita a utilização de frutos e sementes (OLIVEIRA et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2012).

Como uma espécie neotropical, *Hymenaea courbaril* apresenta essencialmente a distribuição do gênero na América, mas ocupa a maior parte dos habitats, e esta espécie é relada por ser tipicamente diferenciada. Existe uma hipótese de que um antecedente de *Hymenaea* da floresta tropical derivou nesta espécie, durante os períodos secos de meados da era Terciária. Subsequentemente, esta espécie irradiou em sua enorme variedade de habitats que ocupa hoje. *Hymenaea courbaril* é

considerada a principal espécie do gênero, ocorrendo em algumas áreas da América do Sul, principalmente no norte da Amazônia. Apresenta uma distribuição uniforme, e aproximadamente cinco variedades têm sido descritas nestas áreas (MARTIN et al., 1974).

*Hymenaea courbaril* é a planta mais estudada do gênero, com um grande número de artigos científicos relatando seu uso tradicional. Esta espécie é conhecida como “jatobá”, e tem sido citada como planta medicinal por várias comunidades, como tratamento para tosse, bronquite, gripe, fraqueza, anemia, doenças da próstata e gastrite (ALBUQUERQUE et al., 2007b), dores, febre, problemas respiratórios, diarreia (HEINRICH et al., 1992), partos e gravidez (COE; ANDERSON, 1996a). A planta ainda é relatada para cicatrização de ferimentos e anti-inflamatória (ARAÚJO et al., 2008), anti-reumatismo e uricosúrico (CÁCERES et al., 1987), leucorreia, vaginite (CÁCERES et al., 1991), como tônico durante a gestação (COE; ANDERSON, 1996b), malária (MILLIKEN, 1997), tônico em geral, fortificante, energizante, age restaurando a força orgânica e para melhorar a produção sanguínea, combatendo a fraqueza em crianças e em geral (MENDES; CARLINI, 2007; BARRET, 1994). Os frutos são comestíveis (CRUZ et al, 2013; DIAS et al, 2013). Todas as partes da planta são citadas, principalmente as cascas, folhas, galhos, resina, seiva e frutos (ALBUQUERQUE et al, 2007b; ARAÚJO et al, 2008; MENDES; CARLINI, 2007; BARRET, 1994; CHAVES; BARROS, 2012; CARTAXO et al., 2010).

Muitos estudos farmacológicos foram desenvolvidos utilizando amostras de *Hymenaea courbaril*, visando comprovar seu uso medicinal. Em 1970, Barros et al. desenvolveram uma prospecção farmacológica incluindo esta planta, e descobriram um alto grau de toxicidade em testes com ratos; efeito depressor na pressão sanguínea e respiração em gatos; efeito depressor em coração de tartarugas; efeito estimulante no tônus e motilidade em duodeno de coelhos; efeito inibidor em espasmos uterinos em ratos.

Em 1999, Antoun et al. conduziram um estudo que mostrou que esta espécie apresenta atividade contra o vírus HIV, com concentração inibitória de 21 µg/mL e em outro estudo em 2001, *H. courbaril* mostrou atividade antiplasmodial parcial (ANTOUN et al., 2001). Cecílio et al. (2012) também realizou uma prospecção para atividade antiviral contra rotavírus, e a espécie exibiu um dos maiores valores para atividade *in vitro*, dentre 14 plantas. A resina das folhas de *H. courbaril* inibiu o crescimento de

fungos *in vitro*, o que provavelmente pode ser relacionado à composição de sesquiterpenos (ARRHENIUS; LANGENHEIM, 1983).

Estudos recentes revelaram o forte poder de sequestro do radical DPPH, atividade miorelaxante em traqueia de ratos, utilizando o extrato etanólico bruto e frações, sendo a fração acetato de etila a fração mais eficiente. O mesmo estudo relatou a atividade miorelaxante da astilbina, isolada da fração bioativa acetato de etila, indicando que este flavonoide pode ser responsável pela atividade desta fração. A referida fração também reduziu contrações de canais de  $\text{Ca}^{2+}$  dependentes do fluxo de cátion divalente operados por voltagem (VOCCs) ou canais de  $\text{Ca}^{2+}$  operados por receptores (ROCCs), mas foi mais potente na inibição dos canais VOCC- do que as contrações dependentes dos canais ROCC- induzidos por adição de  $\text{Ca}^{2+}$  em meio livre de  $\text{Ca}^{2+}$  enriquecido por ACh. Pré-tratamento oral com a fração acetato de etila em animais sensibilizados com antígenos preveniu a hiperresposta de vias aéreas em contração induzidas por KCl, e reduziu o número total de células brancas, particularmente eosinófilos e neutrófilos em lavado broncoalveolar (BEZERRA et al., 2013).

A atividade inibitória da 5-lipoxigenase de *Hymenaea courbaril* foi testada, utilizando a resina desidratada das cascas e leucócitos de porcos. Esta planta apresentou 100% de inibição, em uma concentração de 19  $\mu\text{g/mL}$ , e foi a espécie mais ativa no estudo (BRAGA et al., 2000a). *H. courbaril* não inibiu a enzima conversora de angiotensina-I (BRAGA et al., 2000b).

A composição química dos tegumentos de sementes e folhas de *H. courbaril* foi analisada, utilizando etanol e acetona 70% como solventes. Após a partição, várias frações exibiram atividade antifúngica e anticolinesterásica, e a partir das folhas foram encontrados ácido isocítrico, ácido isopimárico, ácido oleico, ácido protocatecuico e quercetina. No tegumento das sementes, ácido gálico e ácido protocatecuico foram encontrados (TORRES et al., 2012).

Estudos têm demonstrado a atividade antifúngica de *H. courbaril* contra *Candida albicans* (CÁCERES et al., 1991), especialmente o extrato clorofórmico das cascas (RAHALISON et al., 1993), e o extrato clorofórmico de partes aéreas mostraram atividade contra *C. albicans* e *Cladosporium cucumerinum*, e atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* (VERPOORTE; DIHAL, 1987).

Os frutos de *H. courbaril* apresentam coloração escura com vagens rígidas, pó adocicado amarelado cobrindo as sementes rígidas e escuras, de coloração que varia de marrom claro a escuro, mas sementes alaranjadas já foram encontradas. As sementes são levemente achatadas, com formato elipsoide, oblonga e arredondado. Os frutos de *H. courbaril* foram considerados maiores, com um número maior de sementes por frutos e significativamente mais pesados do que os frutos de *H. martiana* (CUNHA-SILVA et al., 2012; ALMEIDA et al., 2011a). Em um estudo que avaliou o efeito inibitório da cicloxigenase e peroxidação lipídica dos frutos desta espécie, alguns compostos foram isolados e apresentaram inibição seletiva para estas enzimas. Ambas as atividades foram relacionadas aos terpenoides isolados (JAYAPRAKASAM et al., 2007). Estes resultados confirmam a utilização desta espécie como anti-inflamatória e fonte de antioxidantes.

Outro estudo promoveu o isolamento de terpenoides, que exibiram fraca atividade citotóxica frente a cepas mutantes de leveduras e linhagens celulares de câncer humano (KADER et al., 2002). Dados importantes são apresentados em uma prospecção para atividade anticâncer de plantas do Nordeste brasileiro, na qual *H. courbaril* apresentou 48% de inibição para tumores de Ehrlich, em uma dose diária de 73 mg/Kg, e foi caracterizada pelos autores como uma inibição significativa (MORAES et al., 1997). Nenhuma atividade contra *Biomphalaria glabrata* e *Biomphalaria straminea* foi encontrada em um estudo realizado em 1974, seguindo os protocolos da OMS de 1961, aplicando extração a quente das cascas de *H. courbaril* com água e álcool (1g de peso seco / L) (SOUZA; ROUQUAYROL, 1974). Adicionalmente, a atividade moluscicida da planta foi testada contra *B. glabrata*, nas diluições 1:2, 1:5 e 1:20 do óleo essencial, extraído por co-destilação, mas nenhuma resposta foi encontrada (ROUQUAYROL et al., 1980). Entretanto, em uma prospecção de plantas do Panamá para a atividade moluscicida, *Hymenaea courbaril* foi uma das plantas mais potentes dentre 15 extratos ativos das cascas e folhas contra *B. glabrata*. O extrato ativo foi preparado com metanol à temperatura ambiente, e a atividade moluscicida foi realizada em intervalos de 24 horas, em uma concentração de 100 ppm para as cascas e 400 mg para as folhas (MARSTON et al., 1996). Esta diferença nas respostas mostrou que a temperatura elevada de extração prejudicou a atividade moluscicida.

Utilizando vários extratos vegetais, a atividade leishmanicida foi avaliada (RIBEIRO et al., 2014) e *Hymenaea courbaril* foi uma das plantas mais potentes, com

os extratos etanólicos e hexânicos exibindo resultados de  $IC_{50} = 44,10 \mu\text{g/mL}$  e  $35,84 \mu\text{g/mL}$ , respectivamente. A atividade contra *Aedes aegypt* também foi avaliada, e a planta foi considerada ativa, utilizando a casca de frutos maduros e imaturos (AGUIAR et al., 2010).

Outra atividade interessante de *Hymenaea courbaril* foi avaliada em 1999, no Japão. O pericarpo do jatobá foi extraído com acetona aquosa 70% após o desengorduramento, e o extrato foi separado em coluna cromatográfica com sephadex LH-70, utilizando eluentes com gradiente de polaridade. As frações metanólica e acetona aquosa 70% exibiram alto efeito inibitório da tirosinase *in vitro*, e suprimiu a formação de melanina em crescimento de células de melanona em ratos B-16 (TAKAGI et al., 1999). O efeito anti-inflamatório e inibição da pigmentação também foi testado com o pericarpo desta planta, e a fração etanólica separada em coluna de sephadex dos extratos cetônicos e aquosos inibiram edema induzido por carragenina e a pigmentação induzida por UVB, sugerindo que o pericarpo de *Hymenaea courbaril* é um potente agente anti-inflamatório e clareador (TAKAGI et al., 2002).

Um polissacarídeo de *Hymenaea courbaril* tem sido estudado, a xiloglucana, que tem sido extraída dos cotilédones (BUCKERIDGE et al., 1997), sementes (LIMA et al., 1993; LIMA et al., 1995) e folhas (BUSATO et al., 2001). Como um dos principais polissacarídeos hemicelulosídicos, a xiloglucana está presente em paredes celulares primárias em dicotiledôneas (MCNEIL et al., 1984; FRY, 1989; CARPITA; GIBEAUT, 1993), mas também foi encontrada em gimnosperma (KAKEGAWA et al., 1998). Este carboidrato está relacionado a importantes funções, como o controle da expansão celular, efeitos no crescimento e como carboidrato de reserva em sementes (FRY, 1989; HAYASHI, 1989).

A xiloglucana extraída de *Hymenaea courbaril* foi analisada biologicamente, e apresentou uma interessante atividade imunomoduladora em macrófagos peritoniais. O maior aumento no número de macrófagos, de maneira dose-dependente, foi encontrado com a xiloglucana desta espécie, com 567% de aumento, com uma dose de 200 mg/Kg. O carboidrato também apresentou efeito na produção de  $O_2^-$ , então os autores relacionaram à sua atividade imunomoduladora (ROSÁRIO et al., 2008).

Em 2011, autores descobriram que a xiloglucana afetou a produção de várias citocinas por macrófagos, em diferentes proporções, e que esta promoveu um efeito significativo na produção de todas as citocinas testadas (ROSÁRIO et al., 2011).

Estudos recentes nos efeitos genéticos de *Hymenaea courbaril* analisaram seus efeitos tóxicos, genotóxicos, recombinogênicos e antígenotóxicos, utilizando o teste do micronúcleo em medula de ratos, e o teste de mutação e recombinação somática (SMART) em *Drosophila melanogaster*. Resultados interessantes foram encontrados, e a seiva de *H. courbaril* não exibiu efeitos tóxicos, clastrogênicos ou aneugênicos. Também exibiu efeitos anticitotóxicos, anticlastogênicos e antineugênico, e nenhum efeito mutagênico ou recombinogênico foi encontrado. Também concluiu-se que a planta apresentou-se como antimutagênico e antirecombinogênico (VALE et al., 2013). Todos esses dados mostram as importantes atividades farmacológicas da espécie.

*Hymenaea stagnocarpa* é outra importante planta do gênero *Hymenaea*. Conhecida como uma árvore indígena, com nome popular “jatobá”, e “jatobá-do-campo”, esta espécie é tradicionalmente utilizada para dores estomacais, adstringente e expectorante. A resina das cascas é utilizada como tratamento anti-úlcera (HIRSCHMANN; ARIAS, 1990). O fruto comestível de *H. stagnocarpa* é consumido na culinária regional do Cerrado, e a farinha é utilizada na preparação de bolos, pães, biscoitos e cereais quentes (SILVA et al., 2001).

Em uma prospecção etnofarmacológica, realizada na cidade de Alto do Paraíso, Goiás, Brasil, na região do Cerrado, *Hymenaea stagnocarpa* foi uma das 10 espécies mais citadas dentre 103 espécies, e sua utilização na medicina popular foi descrita como depurativa, anti-inflamatória, estimulante do apetite e fortificante rico em ferro (SOUZA et al., 2006). Em um estudo desenvolvido no estado do Mato Grosso, Brazil, dentre 138 espécies, *H. stagnocarpa* foi uma das plantas mais citadas pela população (PASA et al., 2005).

Nos livros de campo, escritos pelo naturalista francês Auguste de Saint-Hilaire, no século 19, *Hymenaea stagnocarpa* foi citada como uma planta brasileira utilizada. O nome original foi descrito como “jatobá”, e a resina foi citada por sua utilização interna para o tratamento de gonorreia, e juntamente com o óleo de copaíba, para o tratamento de fraturas (BRANDÃO et al., 2012).

*Leishmania amazonensis* foi exposto a 44 extratos e frações de plantas, em um estudo farmacológico controlado, e *H. stagnocarpa* foi uma das plantas mais potentes, com o extrato etanólicos apresentando  $IC_{50} = 4,69 \mu\text{g/mL}$  (RIBEIRO et al., 2014).

Uma análise farmacológica de *Hymenaea stagnocarpa* para avaliação dos efeitos antiulcerativos e diarreicos gástricos e duodenais em um modelo experimental

em roedores mostrou que a administração oral de 5.000 mg/Kg do extrato metanólico das cascas da planta não produziu nenhum efeito significativo de toxicidade aguda. Este extrato, na dose de 200 mg/Kg exibiu efeito antidiarreico e foi capaz de proteger a mucosa gástrica contra etanol absoluto, com resultado de 68% de proteção, e também contra o efeito irritativo de drogas anti-inflamatórias não esteroidais, com 86% de proteção. Este extrato também protegeu a mucosa duodenal contra irritações causados por cisteamina, com resultados de 98% de proteção, e contra ulceração gástrica induzida por reperfusão isquêmica induzida preveniu a diminuição da glutathione na mucosa gástrica. Óxido nítrico parece estar envolvido no efeito gastroprotetor. O extrato metanólico das cascas e a dieta com a polpa do fruto claramente demonstraram ações de cicatrização gástrica após tratamento por 7 (extrato apresentou 53% de inibição) ou 14 dias (extrato apresentou 60% de inibição e polpa dos frutos, 61%). O tratamento com a dieta com a polpa do fruto por 7 dias demonstrou uma significativa cicatrização duodenal, com 71% de inibição, sem nenhum sinal de toxicidade (ORSI et al., 2012).

Os mesmos autores também avaliaram a atividade anti-inflamatória intestinal do extrato metanólico das cascas de *H. stagnocarpa* e a dieta com a polpa do fruto, utilizando o modelo TNBS de inflamação intestinal em ratos. O efeito protetor foi detectado no tratamento com 100, 200 e 400 mg/Kg do extrato das cascas e com a farinha da polpa do fruto a 10%. Estes resultados foram acompanhados do efeito inibitório da peroxidação lipídica em membranas cerebrais de ratos (ORSI et al., 2014).

A atividade antimicrobiana de *Hymenaea stagnocarpa* foi avaliada e diferentes extratos obtidos das cascas foram ativos contra *Staphylococcus aureus*. A prospecção fitoquímica apresentou terpenos e cumarinas no extrato ciclohexânico, flavonoides e taninos condensados no extrato etanólico e hidroalcoólico e frações aquosas. Os extratos e frações com as maiores concentrações de taninos exibiram as melhores atividades. Perfis cromatográficos foram preparados, e sugerem a presença de astilbina e outros flavonoides nos extratos etanólicos e hidroalcoólicos. Neste estudo, os efeitos citológicos observados por microscopia eletrônica em diferentes concentrações do extrato hidroalcoólico evidenciou a atividade antibacteriana contra *S. aureus* (DIMECH et al., 2013).

A atividade antibacteriana também foi avaliada para extrato clorofórmico das folhas de *H. stignocarpa*, e o mesmo foi ativo contra *Staphylococcus aureus*, mas não apresentou atividade contra *Escherichia coli* (NOVAIS et al., 2003).

Seis flavonoides isolados das folhas de *Hymenaea palustris* apresentaram atividade de inibição do crescimento de células cancerígenas, em um ensaio biomonitorado (linhagem de células de leucemia linfocítica P388 e linhagem de células de câncer humano). Flavonas encontradas no estudo apresentaram atividade antibacteriana contra *Enterococcus faecalis* e *Neisseria gonorrhoeae* (PETTIT et al., 2003).

*Hymenaea intermedia* ocorre nas áreas secas da Amazônia central e do leste, e pode crescer até 39 metros de altura (LANGENHEIM; STUBBLEBLINE, 1983). Alguns autores estudaram os aspectos morfológicos de suas sementes e germinação desta espécie (MELO et al., 2004). As características biométricas dos frutos e sementes também foram estudadas, e o tamanho dos frutos varia 26,3 a 54,8 mm, com comprimento de 19,1 a 43,8 mm e espessura de 17,7 a 29,6 mm. Os frutos apresentam entre 1 a 3 sementes. O tamanho das sementes varia de 18,7 a 27,4 mm, comprimento entre 12,2 a 16,1 mm e espessura de 10,9 a 15,6 mm. *H. intermedia* apresenta as menores medições, se comparada com *H. courbaril* e *H. martiana* (CRUZ et al., 2001; CUNHA-SILVA et al., 2012).

*Hymenaea intermedia* é popularmente utilizada como decocto ou xarope, para o tratamento de tosse e anemia (AGRA et al., 2007). A seiva e cascas foram testadas contra *Mycobacterium tuberculosis*, porém foram inativas (OLIVEIRA et al., 2011).

A Tabela 1 apresenta as atividades biológicas relatadas na literatura científica em plantas do gênero *Hymenaea*.

Tabela 1 - Atividades biológicas de *Hymenaea*.

| Espécies              | Origem (Parte utilizada)     | Atividade                                     | Extrato                                    | Resultado              | Referências                 |
|-----------------------|------------------------------|---|--|------------------------|-----------------------------|
| <i>H. courbaril</i>   | Brasil (cascas)              | Antitumoral                                   | EtOH-H <sub>2</sub> O 50%                  | Inativo                | MORAES et al., 1997         |
|                       | Guatemala (cascas)           | Diurético                                     | Decocção                                   | Ativo                  | CÁCERES et al., 1987        |
|                       | Panamá (cascas)              | Antifúngico                                   | CHCl <sub>3</sub> / H <sub>2</sub> O/ MeOH | Inativo                | RAHALISON et al., 1993      |
|                       |                              | Moluscicida                                   | MeOH                                       | Ativo                  | MARSTON et al., 1996        |
|                       | Suriname (cascas)            | Antibacteriana                                | EtOH 95%                                   | Ativo                  | VERPOORTE; DIHAL, 1987      |
|                       |                              | Antifúngico                                   | EtOH 95%                                   | Inativo                | VERPOORTE; DIHAL, 1987      |
|                       | Brasil (cascas)              | Moluscicida                                   | Óleo Essencial                             | Inativo                | ROUQUAYROL et al., 1980     |
|                       |                              | México (folhas)                               | Antifúngico                                | Resina                 | Ativo                       |
|                       | Porto Rico (folhas)          |   | Antimicobacteriana<br>Antiplasmodial       | EtOH 95%               | Parcialmente ativo<br>Ativo |
|                       | Panamá (folhas)              | Antifúngico                                   | CHCl <sub>3</sub> / MeOH                   | Ativo                  | RAHALISON et al., 1993      |
|                       |                              |   | H <sub>2</sub> O                           | Inativo                | RAHALISON et al., 1993      |
|                       | Suriname (folhas)            | Citotóxica                                    | EtOAc                                      | Parcialmente ativo     | KADER et al., 2002          |
|                       | Não especificado (pericarpo) | Inibição da tirosinase                        | 70% Acetona aquosa                         | Ativo                  | TAKAGI et al., 1999         |
|                       |                              |   |  | Ativo                  |                             |
|                       | Não especificado (pericarpo) | Anti-inflamatória                             | EtOH 100%                                  | Ativo                  | TAKAGI et al., 2002         |
|                       |                              | Despigmentação                                | EtOH 100%                                  | Ativo                  | TAKAGI et al., 2002         |
|                       | Não especificado (resina)    | Alergênico                                    | Resina                                     | Parcialmente ativo     | JOST et al., 1989           |
|                       |                              |   |  | Ativo                  |                             |
|                       | Brasil (resina)              | Inibição da 5-lipoxigenase                    | Resina                                     | Ativo                  | BRAGA et al., 2000a         |
|                       | Brasil (resina)              | Inibição de enzima conversora de angiotensina | Resina                                     | Parcialmente ativo     | BRAGA et al., 2000b         |
| Suriname (resina)     | Antibacteriana               | EtOH 95%                                      | Inativo                                    | VERPOORTE; DIHAL, 1987 |                             |
|                       | Antifúngica                  | EtOH 95%                                      | Ativo                                      | VERPOORTE; DIHAL, 1987 |                             |
| México (sementes)     | Hemaglutinina                | H <sub>2</sub> O                              | Inativo                                    | GIRAL et al., 1978     |                             |
|                       | Inibição de tripsina         | H <sub>2</sub> O                              | Ativo                                      | GIRAL et al., 1978     |                             |
| Porto Rico (pecíolos) | Antiviral                    | Fração Aquosa                                 | Ativo                                      | ANTOUN et al., 1999    |                             |

|   |                            |  |                                 |             |                             |
|---|----------------------------|--|---------------------------------|-------------|-----------------------------|
|   |                            | Citotóxica   | Fração Aquosa                   | Inativo     | ANTOUN et al., 1999         |
|   | Brasil (folhas)            | Antiviral  | EtOH 95%                        | Ativo       | CECÍLIO et al., 2012        |
|   | Brasil (cascas)            | Estimulante uterino  | H <sub>2</sub> O                | Inativo     | BARROS et al., 1970         |
|   | Guatemala (cascas)         | Antifúngico  | EtOH 60%                        | Inativo     | CÁCERES et al., 1991        |
|   | Brasil (cascas)            | Moluscicida  | EtOH 95%                        | Inativo     | SOUZA; ROUQUAYROL, 1974     |
|   |                            |  | H <sub>2</sub> O                | Inativo     | SOUZA; ROUQUAYROL, 1974     |
|   | Brasil (cascas)            | Antioxidante Miorelaxante de traqueia de ratos                                     | EtOH EtOH                       | Ativo Ativo | BEZERRA et al., 2013        |
|   | Brasil (folhas e sementes) | Anticolinesterase  | 70% EtOH / 70% Acetona          | Ativo       | TORRES et al., 2012         |
|   |                            | Antifúngica  |                                 |             |                             |
|   |                            | Antioxidante   |                                 |             |                             |
|   | Jamaica (frutos)           | Inibição de ciclo-oxigenase e peroxidação lipídica                                 | <i>n</i> -Hexano / EtOAc / MeOH | Ativo       | JAYAPRAKASAM et al., 2007   |
|   | Brasil (folhas)            | Antileishmania   | Hexano / EtOH                   | Ativo       | RIBEIRO et al., 2014.       |
|   | Não especificado (frutos)  | Inseticida ( <i>Aedes aegypti</i> )  | Óleos essenciais                | Ativo       | AGUIAR et al., 2010         |
|   | Brasil (sementes)          | Imunomodulador   | MeOH:H <sub>2</sub> O           | Ativo       | ROSÁRIO et al., 2008        |
|   |                            | Ativador de macrófagos   | Aquoso                          | Ativo       | ROSÁRIO et al., 2011        |
|   | Brasil (resina do caule)   | Anticancerígena, Anticlastogênica Antineogênica Antimutagênica Antirecombinogênica | Resina                          | Ativo       | VALE et al., 2013           |
| <i>H. courbaril</i> var. <i>stilbocarpa</i> | Brasil (folhas)            | Antifúngica  | Resina                          | Ativo       | ARRHENIUS; LANGENHEIM, 1983 |
| <i>H. martiana</i>                          | Brasil (cascas)            | Analgésica   | EtOH-H <sub>2</sub> O 50%       | Ativo       | NEVES et al., 1993          |
|   |                            | Anti-inflamatória  | EtOH-H <sub>2</sub> O 50%       | Ativo       | NEVES et al., 1993          |
|   |                            | Espasmolítica  | Hidroalcoólico                  | Ativo       | CALIXTO et al., 1992a       |
|   |                            |  | EtOH-H <sub>2</sub> O (1:1)     | Ativo       | CALIXTO et al., 1992b       |
|   |                            | Aumento da permeabilidade vascular   | EtOH-H <sub>2</sub> O 50%       | Ativo       | NEVES et al., 1993          |
|   | Não especificado           | Antinociceptiva Anti-edematogênica   | Não especificado                | Ativo       | CECHINEL-FILHO et al., 2000 |

|                       |                           |                              |   |         |                       |
|-----------------------|---------------------------|------------------------------|---|---------|-----------------------|
|                       | Não especificado          | Hepatoprotetora              | Não especificado                              | Ativo   | CLOSA et al., 1997    |
|                       | Brasil (cascas)           | Antimicrobiana               | EtOH / H <sub>2</sub> O                       | Ativo   | SOUZA et al., 2009    |
| <i>H. palustris</i>   | Peru (folhas)             | Antitumoral                  | 1:1 CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH     | Ativo   | PETTIT et al., 2003   |
| <i>H. species</i>     | Brasil (Não especificado) | Citotóxica                   | H <sub>2</sub> O                              | Inativo | SAMPAIO et al., 1984  |
| <i>H. stignocarpa</i> | Brasil (cascas e frutos)  | Antiulcerogênica             | MeOH  | Ativo   | ORSI et al., 2012     |
|                       | Brasil (cascas e frutos)  | Antidiarreica                | MeOH  | Ativo   | ORSI et al., 2012     |
|                       |                           | Anti-inflamatório Intestinal |   |         | ORSI et al., 2014     |
|                       | Brasil (folhas)           | Antileishmania               | Hexano / EtOH                                 | Ativo   | RIBEIRO et al., 2014  |
|                       | Brasil (folhas e frutos)  | Fitotóxica                   | Aquoso / EtOH                                 | Ativo   | OLIVEIRA et al., 2002 |
|                       | Brasil (cascas)           | Antimicrobiana               | Ciclohexano / EtOAc / EtOH / H <sub>2</sub> O | Ativo   | DIMECH et al., 2013   |
|                       | Brasil (cascas)           | Antimicrobiana               | CHCl <sub>3</sub>                             | Ativo   | NOVAIS et al., 2003   |

### 3.2.2 Fitoquímica do gênero

A composição química do gênero *Hymenaea* tem sido descrita por vários estudos importantes (Anexo A). É considerado um gênero produtor de resina, e quando derivada de folhas e sementes, é composta principalmente por diterpenos. O extrato e a resina das cascas apresentam diterpenos do tipo *enantio*-labdanoico (CUNNINGHAM et al., 1973; CUNNINGHAM et al., 1974; MARSAIOLI et al., 1975; IMAMURA et al., 1977), e diterpenos do tipo *ent*-halimano são encontradas na resina das cascas das sementes (KHOO et al., 1973).

Pesquisas com *Hymenaea courbaril* mostram que esta espécie é composta principalmente por sesquiterpenos e diterpenoides. Xiloglucanas, flavonoides e biscumarinas também foram encontradas. A resina das folhas de *H. courbaril* (MARTIN et al., 1972) é constituída por sesquiterpenos e podem estar presentes sesquiterpenoides oxigenados. Esta resina apresentou propriedades antifúngicas contra o gênero *Pestalotia*, e o cariofileno presente pode ser convertido em epóxidos antifúngicos por oxidação *in vitro* (ARREHNIUS; LANGERHEIM, 1983).

Em 1976, Lopez e Schiff isolaram o flavonoide astilbina e o esteroide sitosterol dos galhos e folhas de *H. courbaril*. A variação da composição da resina foi investigada, utilizando diferentes tecidos e diferentes populações de *H. courbaril* e *H. verrucosa*. A resina de folhas, pecíolos e galhos foi analisada, e os pecíolos e galhos apresentaram resina com composição química similar, porém significativamente diferentes da composição total das folhas. Os componentes majoritários, cariofileno,  $\alpha$  e  $\beta$ -selineno e  $\beta$ -copaeno apresentaram variações dentre os tecidos estudados. Entretanto, todas as composições demonstraram variações mais significativas dentre as diferentes populações estudadas (LANGENHEIM et al., 1978).

Sesquiterpenos constituem os componentes majoritários em resinas de *Hymenaea courbaril*. Três compostos, cariofileno e os  $\alpha$ - and  $\beta$ -isômeros de selineno, selina-3,11-dieno e selina-4(14),11-dieno respectivamente, juntos constituem aproximadamente 60% ou mais dos sesquiterpenos da resina das folhas, virtualmente em toda população de *Hymenaea* estudada (MARTIN et al., 1974). A resina do caule também foi analisada, e o ácido labd-13-en-8-ol-15-oico foi isolado como o componente majoritário (CUNNINGHAM et al., 1974).

A resina das cascas das sementes de *Hymenaea courbaril* também foram estudadas, e quatro novos diterpenos bicarbocíclicos foram isolados, com rearranjos

de esqueletos (-) labdano. Sesquiterpenos também foram identificados como componentes majoritários, como o ciclosativeno, cariofileno,  $\alpha$ -himachaleno, selina-4(14),7(11)-dieno, enquanto que  $\beta$ -bourboneno, calareno, selina4(14)-7-dieno,  $\gamma$ -cadineno,  $\alpha$ -calacoreno e  $\alpha$ -muuroleno foram os componentes em menor proporção (KHOO et al., 1973).

O pó adocicado amarelado dos frutos de *H. courbaril* foi submetido à análise química e foram encontrados sucrose e ácido linolênico como componentes majoritários. As cascas dos frutos resultaram em diterpenoides labdanos, como crotomachlin, ácido labd-13*E*-en-8-ol-15-oico, ácido labdanólico, ácido (13*E*)-labda 7, 13 dien-15-oico e ácido labd-8(17),13*E*-dien-15-oico, e um sesquiterpeno foi encontrado, espatulenol. O conteúdo total de terpenoides nos frutos secos foi de aproximadamente 0,1%. Alguns destes terpenoides apresentaram atividade anti-inflamatória, utilizando as enzimas COX-1 e COX-2, e o metil éster do ácido labd-13*E*-en-8-ol-15-oico e o ácido labdanoico apresentaram seletividade para a inibição da enzima COX-2. Os compostos crotomachlin, ácido labd-13*E*-en-8-ol-15-oico, e o ácido (13*E*)-labda-7,13-dien-15-oico inibiram a peroxidação lipídica (JAYAPRAKASAM et al., 2007).

Das cascas de frutos maduros e imaturos, o óleo essencial foi extraído. Os componentes majoritários dos frutos maduros foram o  $\alpha$ -copaeno (11%), espatulenol (10,1%) e os componentes principais do óleo dos frutos imaturos foram  $\beta$ -selineno (8,2%), e o germacreno-*D* (31,9%),  $\beta$ -cariofileno (27,1%) e biciclogermacreno (6,5%) (AGUIAR et al., 2010).

Três novos diterpenos foram encontrados em frações do extrato metanólico de *H. courbaril*, o ácido (13*R*)-13-hydroxy-1(10),14-ent-halimadien-18-oico; o ácido (2*S*,13*R*)-2,13,dihydroxy-1(10),-14-ent-halimadien-18-oico, e o ácido (13*R*)-2-oxo-13-hydroxy-1(10),14-ent-halimadien-18-oico. Os compostos foram avaliados quanto à citotoxicidade frente à cepa mutante de levedura 1138 e a linhagem celular de câncer ovariano humano A2780, porém apenas o ácido (13*R*)-13-hydroxy-1(10),14-ent-halimadien-18-oico apresentou uma fraca atividade (KADER et al., 2002).

Algumas populações de *Hymenaea courbaril* difundidas geograficamente foram analisadas a respeito da sua variação quantitativa dos sesquiterpenos contidos na resina das folhas, e foi encontrada uma estabilidade quantitativa na composição das populações meso-americanas, contrastando com a alta variabilidade das populações

da América do Sul. Os principais sesquiterpenos encontrados neste estudo foram  $\alpha$ -cubebeno,  $\alpha$ -copaeno,  $\beta$ -copaeno, cariofileno,  $\beta$ -humuleno,  $\gamma$ -muuroleno,  $\alpha$ -selineno,  $\beta$ -selineno,  $\delta$ -cadineno,  $\gamma$ -cadineno (MARTIN et al., 1974).

Na mesma linha de estudo, sementes oriundas de cinco populações de *H. courbaril* difundidas geograficamente foram submetidas à germinação e crescimento durante um ano, submetidas a duas condições extremas de fotoperíodo. Entretanto, estas condições não obtiveram efeitos significativos na composição química da resina das folhas, mas o fotoperíodo mais longo promoveu o maior crescimento do vegetal. Este estudo também apresentou diferenças entre o crescimento vegetativo e a composição química dentre as populações. Nas cinco populações estudadas, aproximadamente 60-75% do total de sesquiterpenos da resina das folhas são constituídos de três componentes: cariofileno e  $\alpha$ - e  $\beta$ - isômeros de selineno (STUBBLEBINE et al., 1975).

O tipo clerodano, outra classe de diterpenos, também foi encontrada em *Hymenaea courbaril*, nas cascas das suas sementes. Foram encontrados três compostos conhecidos, o ácido (-)-óxico, ácido (-)-isoóxico e o ácido (-)-covalênico, e dois novos diterpenos: ácido (5*R*<sup>\*</sup>,8*S*<sup>\*</sup>,9*S*<sup>\*</sup>,10*R*<sup>\*</sup>)-cleroda-3,13*E*-dien-15-oico e (5*S*<sup>\*</sup>,8*S*<sup>\*</sup>,9*S*<sup>\*</sup>,10*R*<sup>\*</sup>)-cleroda-3,13*E*-dien-15-oato de metila (NOGUEIRA et al., 2001).

Substâncias isoladas de *Hymenaea courbaril* e *Hymenaea stigonocaropa* foram elucidadas por análise espectroscópica por RMN de <sup>13</sup>C, resultando em terpenoides da classe *ent*-labdano (IMAMURA et al., 1977).

Um novo diterpeno da classe *ent*-clerodano também foi identificado nas cascas do caule e das cascas da semente de *Hymenara courbaril* var. *altíssima*: (-)-(5*R*,8*S*,9*S*,10*R*)-clerod-3-en-15-oato de metila. Dois diterpenos conhecidos foram identificados como (-)-copalato de metila and (-)-eperuato de metila. No mesmo estudo, a partir do extrato das cascas das sementes obtido com acetato de etila, foi também isolado um diterpeno conhecido, o (-)-zanzibarato de metila (NOGUEIRA et al., 2002a; NOGUEIRA et al., 2002b).

Foram isoladas duas biscumarinas a partir das sementes de *Hymenaea courbaril*. Uma nova biscumarina, hymenaína, (éter 7-hidroxi-6,6'-dimetoxi-3,7'-dicumarinil), e a ipomosina, uma biscumarina conhecida. Estas duas substâncias apresentaram efeito sequestrante do radical DPPH, com IC<sub>50</sub> de 100 e 300 mM, respectivamente (SIMÕES et al., 2009).

Flavanóis constituíram a classe majoritária de frações ativas de *Hymenaea courbaril* e foram relacionadas à atividade inibitória da tirosinase *in vitro* e supressora de melanina em células de melanoma (TAKAGI et al., 1999).

Buckeridge et al. em 1997, utilizaram um processo enzimático de hidrólise ácida em xiloglucana de *H. courbaril* e sequenciaram os dois polissacarídeos principais detectados por CCD e HPAEC (do inglês “High-Performance Anion-Exchange Chromatography”, em português “Cromatografia de Troca Aniônica de Alta Performance”). As estruturas destas substâncias foram confirmadas RMN de  $H^1$  como XXXG (encontrado anteriormente em *Tamarindus indica* e *Copaifera langsdorffii*), e um novo oligossacarídeo XXXXG. As proporções relativas de XXXG e XXXXG indicam que aproximadamente metade das subunidades na xiloglucana de *Hymenaea* são baseadas no oligossacarídeo. Este fato sugere que a estrutura única da xiloglucana de *H. courbaril* pode ser relacionada às diferenças nas propriedades moleculares deste carboidrato e na sua conformação estrutural.

Outros pesquisadores isolaram e caracterizaram seis oligossacarídeos de xiloglucana extraída das sementes de *Hymenaea courbaril* var. *stilbocarpa*. O extrato aquoso obtido por refluxo por 10 minutos e submetido a extrações aquosas sequenciais resultou em uma fração de polissacarídeos, chamada B1, e foi hidrolisado, e seus produtos analisados foram glicose, xilose, galactose e arabinose, na proporção 50:35:13:2. Após fracionamento em coluna de DEAE-celulose, que foi eluída com água, uma fração B2 foi obtida. Esta segunda fração foi incubada com celulase comercial derivada de *Trichoderma* sp., e originou seis oligossacarídeos, os quais foram isolados por cromatografia preparativa em papel, e suas estruturas determinadas por cromatografia gás-líquido acoplada a espectrômetro de massas a partir de seus derivados parciais de acetatos de aditol O-metilados. As estruturas da xiloglucana puderam ser definidas com um esqueleto celulosídico  $\beta$ -D-glucana (1,4) ligado, parcialmente substituído com cadeias laterais em O6 por  $\alpha$ -D-xilopiranosose, nos quais alguns foram substituídos em O2 por unidades de  $\beta$ -D-galactopiranosose (LIMA et al., 1993; LIMA et al., 1995).

Busato et al. em 2001, isolaram uma xiloglucana fucosilada a partir das folhas de *Hymenaea courbaril*, utilizando extração alcalina, precipitação em etanol e cromatografia de troca iônica. Análises confirmadas por RMN apresentaram um

esqueleto de glucana altamente substituído por unidades *D*-xilopiranosil, e o polissacarídeo isolado apresentou a estrutura Glc:Xyl:Gal:Fuc.

As propriedades reológicas da xiloglucana de *H. courbaril* foram investigadas antes e após a remoção hidrolítica de galactose, e a gelatinização foi detectada quando 51% da galactose foi removida por  $\beta$ -galactosidase. As propriedades reológicas da xiloglucana antes da remoção de galactose foi caracterizada como uma solução viscoelástica, e após a remoção, a solução foi caracterizada como um gel verdadeiro (BUSATO et al., 2009).

A xiloglucana das sementes de *H. courbaril* foi oxidada na posição C-6, utilizando diferentes gradientes de oxidação, e rendimento alto. As propriedades foram analisadas, e diferentes estados de agregação foram encontrados, o que dependeu do grau de oxidação aplicado (LUCYSZYN et al., 2009).

Após extração aquosa de galactoxiloglucana de *Hymenaea courbaril*, as propriedades reológicas foram analisadas após a substituição com íons tetraborato, o que aumentou a viscosidade e os valores  $G'$ , mas a solução não formou gel (MARTIN et al., 2003).

A estrutura do referido carboidrato de reserva foi analisado por espectrometria de massas em eletrospray, e foi encontrado um esqueleto com unidades de xilocelulopantosil (XXXXG) e xilocelulohexaosil (XXXXXG), em adição à unidade mais comum de xilocelotetraosil (TINÉ et al., 2006).

A goma presente nas sementes de *Hymenaea courbaril* também foi estudada, e sua estrutura foi caracterizada. Esta goma apresentou solubilidade em água, e menos viscosidade do que a goma guar. O polissacarídeo isolado a partir desta goma continha galactose, glicose, xilose e arabinose, conforme descrito em outros estudos. O esqueleto estrutural apresentou-se como uma xilogalactana, com resíduos de  $\beta$ -*D*-galactose and  $\beta$ -*D*-xilose. Xilose, arabinose e galactose constituem as ramificações. Foram também observados resíduos de galactose 4,6-di-O substituídos (OMAIRA et al., 2007).

Para uma outra análise da xiloglucana presente em *H. courbaril*, uma análise SEC-MALLS foi realizada e sua viscosidade intrínseca apresentou um valor  $C^\infty$  maior, quando comparado a *Tamarindus indica*, e foi justificado pela sua estrutura única do oligossacarídeo (XXXXG) (FREITAS et al., 2005).

A análise da influência das condições de extração nas propriedades da xiloglucana apresentou que o aumento do tempo de extração levou ao aumento do teor de arabinose, contaminação protéica, além de aumentar a massa molar média e maior viscosidade em extrações de tempo prolongado, possivelmente devido à agregação da xiloglucana (KAI; PETKOWICZ, 2010).

Xiloglucana de *H. courbaril* foi adicionada a emulsões cosméticas, e a adição do polissacarídeo aumentou as propriedades viscoelásticas, e levou à melhor estabilidade após armazenamento por 20 dias. Este estudo demonstrou as aplicações da xiloglucana, visando à melhoria na estabilidade de emulsões O/A (VIANNA et al., 2013).

Alguns autores analisaram a xiloglucana a partir de três fontes, incluindo *Hymenaea courbaril*, através de método ESI e espectrometria de massas, e oligômeros desprotonados foram fragmentados pela perda das unidades de açúcar (VINUEZA et al., 2013).

Utilizando a extração por fluido supercrítico, compostos fenólicos foram obtidos a partir das cascas de *H. courbaril*. Utilizando CO<sub>2</sub> e água (9:1 v/v), a 323 K e 35 Mpa, os melhores resultados foram obtidos, com rendimento de 24% e a maior atividade antioxidante, com IC<sub>50</sub> = 0,2 mg/mL, teor de compostos fenólicos totais 335,0 mg TAE/g e taninos totais 1,8 g/100 g. O maior teor de compostos fenólicos foi relacionado com o maior teor de protocianidinas (VEGGI et al., 2014).

As folhas, cascas, sementes e polpa do fruto de *Hymenaea courbaril* e *Hymenaea stignocarpa* foram estudadas e suas atividades antioxidantes foram analisadas, além do teor de fenólicos e flavonoides totais nos extratos metanólicos e hidroalcoólicos. O extrato hidroalcoólico das sementes de *H. courbaril* apresentou os maiores teores de compostos fenólicos e flavonoides totais, com 464,34 mg GAE/g e 442,25 mg RE/g do extrato seco, respectivamente. Este extrato também promoveu a maior atividade de sequestro do radical DPPH, com IC<sub>50</sub> = 149,43 µg/mL (MELLO-PEIXOTO et al., 2013).

Alguns autores estudaram a composição química da polpa de frutos e o óleo de sementes de *Hymenaea courbaril*. O teor de lipídeos de ambos os materiais foi abaixo de 6%, porém, quantidades significantes de minerais foram encontradas, principalmente sódio, potássio e fósforo. O óleo da semente foi considerado de boa qualidade, e os compostos bioativos encontrados em ambos os materiais foram α and

$\gamma$ -tocoferol,  $\beta$ -sitosterol, campesterol, estigmasterol and estigmastanol. Ácido oleico e linolênico foram os ácidos graxos insaturados encontrados na polpa dos frutos. Os principais macronutrientes encontrados foram fibras e uma quantidade considerável de ácido ascórbico (vitamina C) foi encontrada em ambos os materiais, revelando a importância nutricional desta planta (DIAS et al., 2013).

As atividades antioxidante, antibacteriana e anticolinesterásica foram avaliadas em extratos de *Hymenaea courbaril*. A atividade antioxidante foi encontrada, porém nenhuma atividade antibacteriana ou anticolinesterásica (FARIAS et al., 2013a).

A atividade antioxidante também foi avaliada por diferentes métodos dentre várias espécies medicinais do Cerrado, e *Hymenaea stignocarpa* foi uma das espécies que apresentaram maiores valores (FARIAS et al., 2013b).

Em um estudo, quatro flavonoides foram isolados e identificados como os componentes majoritários das cascas do caule de *H. stignocarpa*: hultenina, taxifolina, quercetina e 7-metoxicatequina. O extrato acetato de etila e os flavonoides apresentaram atividade antioxidante e antitérmica (MARANHÃO et al., 2013).

Em um estudo recente com *Hymenaea stignocarpa*, Orsi et al. (2012) apresentou um perfil fitoquímico do extrato metanólico obtido com as cascas e polpa dos frutos, ambos apresentando a presença de compostos fenólicos (principalmente flavonoides e taninos condensados). Estes compostos foram relacionados às atividades anti-inflamatórias e efeitos antioxidantes (ORSI et al., 2014). A composição nutricional e química foi determinada em 2013 (CARDOSO et al., 2013), e *H. stignocarpa* foi considerada fonte de vitaminas C e E, folatos e fibras dietéticas.

Um estudo analisou sete frutos nativos do Brasil, e o extrato bruto obtido com a casca dos frutos de *H. stignocarpa* obteve um dos maiores resultados para atividade antioxidante. Foi detectado que este extrato apresentou apenas rutina, mas não apresentou quercetina (PERES et al., 2013).

Em um estudo analítico utilizando a resina das cascas do caule de *H. stignocarpa*, foi estudada a caracterização das principais mudanças químicas na resina, em sua preparação como um filme fino, exposto a efeitos atmosféricos. O estudo mostrou que os componentes majoritários foram o ácido eperúico seus isômeros  $\Delta 7$  e  $\Delta 8$ , além do ácido copálico. Outros compostos encontrados foram o ácido covalênico, ácido isoóxico e ácido epipinifólico, caracterizados como componentes minoritários. Esta composição contrasta com dados obtidos com outras

plantas do gênero, coletadas na região amazônica. A presença de um novo isômero do ácido eperúico foi relatada após aplicação de envelhecimento com luz UV, na resina preparada como um filme fino. Após o envelhecimento, foram também observadas mudanças relacionadas à composição dos componentes majoritários (DOMÉNECH-CARBÓ et al., 2009).

Um extrato preparado com as folhas de *Hymenaea palustris* foi analisado, e seis novos flavonoides foram encontrados, e uma nova flavolignana, chamada “palstatina” foi elucidada (PETTIT et al., 2003).

A variação na resina das folhas de *Hymenaea intermedia* foi analisada, e foram encontrados quatro tipos de composição. Os componentes majoritários foram cariofileno e  $\alpha$  e  $\beta$  selineno, similar a outras espécies do gênero (LANGENHEIM; STUBBLEBINE, 1983).

Amostras de *Hymenaea oblongifolia* infectadas por fungos foram analisadas, e alguns componentes foram encontrados, (3*R*)-8-hidroxi-3-metil-3,4-dihidroisocumarinas, 6-formil-7-hidroxi-5-metoxi-4-metil-ftalida, ácidos graxos e ésteres, bem como sitosterol, estigmasterol, e sitostenona (ALVARENGA et al., 1978).

Em uma pesquisa para a identificação e quantificação de açúcares livres e polióis no pericarpo de frutos de *H. oblongifolia*, *D*-frutose, *D*-glicose, ácido *D*-glicurônico e *L*-sorbose e sacarose foram encontrados (CHUNG et al., 1997).

Dois constituintes majoritários foram encontrados em *H. oblongifolia* através do método de cromatografia gasosa utilizando a resina das cascas: o ácido *enantio*-pinifólico (ácido *enantio*-labd-8(20)-en-15,18-dioico), que havia sido isolado anteriormente das cascas de *Trachylobium verrucosum*. Foi também isolado o ácido guamáico (ácido *enantio*-labd-8(20),13-dien-15,18dioico) (CUNNINGHAM et al., 1973).

Em um âmbar de 55 milhões de anos de *Hymenaea oblongifolia*, da região do Rio Oise em Paris, França, o diterpeno quesnoina foi isolado, o qual apresenta um esqueleto tetracíclico desconhecido, quesnano (JOSSANG et al., 2008).

O ácido *enantio*-13-epilabdanólico foi isolado como componente majoritário da resina das cascas de *Hymenaea parvifolia*, representando 62% do total de ácidos da resina, por cromatografia gás-líquido (CUNNINGHAM et al., 1973). Astilbina e neoastilbina foram isoladas a partir da fração acetato de etila do extrato etanólico,

obtido com as cascas *H. parvifolia*. Estes dois flavonoides apresentaram efeito inibitório da caseína quinase II, assim como a catequina (ISHIBASHI et al., 1999).

O gênero monotípico *Trachylobium*, com a espécie *Trachylobium verrucosa*, retornou para o gênero *Hymenaea*, como *Hymenaea verrucosa*, devido a algumas evidências (LANGENHEIM; LEE, 1974). A resina das cascas desta espécie foi analisada em 1977, e foram isolados polímeros, e os resultados sugeriram a presença de um sistema quinona-hidroquinona na porção não polimérica da resina. (CUNNINGHAM et al, 1977). Âmbares da República Dominicana e México foram analisados por RMN de  $^{13}\text{C}$  e infravermelho, e uma estrutura de polilabdano, além de modificações após envelhecimento foram encontradas, sugerindo uma relação entre as duas populações (CUNNINGHAM et al., 1983).

Âmbares de *H. verrucosa* oriundos da Colômbia, México, República Dominicana e Polônia foram analisadas, utilizando extração em fase sólida, RMN de  $^{13}\text{C}$ , e similaridades foram encontradas entre o âmbar colombiano e de outras espécies (MARTÍNEZ-RICHA et al., 2000).

Âmbares de várias plantas foram analisadas, incluindo *H. verrucosa*, e uma classificação foi proposta, baseada em seus perfis de análise térmica (RAGAZZI et al., 2003).

Sesquiterpenos foram quantificados de folhas de *H. verrucosa*. Populações oriundas do Quênia e Madagascar foram qualitativamente idênticas, porém diferiram quantitativamente. Os sesquiterpenos encontrados foram  $\alpha$ -cubebeno,  $\alpha$ -copaeno, copacafeno, cariofileno,  $\beta$ -humuleno,  $\gamma$ -muuruleno,  $\alpha$  e  $\beta$ -selineno and  $\delta$ -cadineno (MARTIN; LANGENHEIM, 1973).

Hugel et al. em 1966, isolaram sete novos diterpenos de *Hymenaea verrucosa*: (-)-18-hidroxi-13-epimanool, dimetil éster de *enantio*-labd-8(20)-en-18-ol-15-oato de metila, *enantio*-labd-8(20)-en-15,18-diol, *enantio*-18-acetoxi-l8(20),13-dien-15-oato de metila, *enantio*-labd-8(20)-en-18-ol-15-oato de metila, *enantio*-labd-8-beta-ol-15-oato de metila, *enantio*-labd-l3-en-8-beta-ol-15-oato de metila. Em 1974, o ácido *enantio*-8(17),13(16),14-labdatrien-18-oico foi isolado da resina das cascas *H. verrucosa* (MARTIN; LANGENHEIM, 1974).

Âmbares de *Hymenaea mexicana*, oriundas de Chiapa, México, foram analisadas e pétalas vistosas com base fixa e sem pelos foram utilizadas para identificar a espécie. A espécie existente mais próxima de *H. mexicana* é *H. verrucosa*.

Estes resultados desafiam visões anteriores de que os âmbares mexicanos seriam produzidos pelas espécies sul-americanas *H. courbaril* e *H. intermedia*, as quais pertencem a espécies mais atuais do gênero (POINAR-JR; BROWN, 2002).

*Hymenaea protera* é considerada uma espécie fóssil e um âmbar oriundo da República Dominicana já foi descrito como originado desta espécie. Esta espécie foi considerada similar à existente *Hymenaea verrucosa*, a qual ocorre no leste africano e ilhas adjacentes (POINAR-JR, 1991).

### **3.3 *Hymenaea martiana***

#### **3.3.1 *Etnobotânica e farmacologia da espécie***

*Hymenaea martiana* é uma árvore nativa da região Nordeste, conhecida popularmente como “jatobá”, utilizada na medicina tradicional para o tratamento de anemia e gastrite. Estudos etnobotânicos de plantas medicinais comercializadas em uma cidade da Paraíba, Brasil, mostraram que esta árvore foi uma das mais citadas (ANSELMO et al., 2012). Em outro estudo interessante, desenvolvido em 2005, esta espécie apresentou o terceiro maior valor de uso, que é calculado através de um método quantitativo que demonstra a importância relativa das espécies conhecidas localmente. Esta planta foi citada para o tratamento dos fluidos biológicos, inflamações e reumatismo, e foi destacada como a espécie de maior importância representativa de um grupo de plantas utilizadas para tratamentos de tecidos esqueléticos, músculos e conectivos. A planta é preparada principalmente como um extrato alcoólico, utilizando bebida destilada (“cachaça”), ou vinho (GAZZANEO et al., 2005).



Figura 1 - *Hymenaea martiana*, localidade Nova Descoberta, Petrolina, Pernambuco, Brasil. Fonte: Próprio autor.



Figura 2 - Frutos de *Hymenaea martiana*. Fonte: Próprio autor.



Figura 3 - Flores de *Hymenaea martiana*. Fonte: HVASF, 2014.

Outro estudo desenvolvido em Pernambuco, Brasil, mostrou que as comunidades utilizam a planta como alimentos, material de construção e como planta medicinal (SILVA; ANDRADE, 2005).

Um estudo anatômico mostra a anatomia e histoquímica de órgãos vegetativos, e a presença de cavidades secretórias de resina e grande quantidade de compostos fenólicos foi detectada, justificando parte de seu uso medicinal (SILVA et al., 2012). Os frutos de *H. martiana* apresentam coloração marrom escura quando maduros, contendo sementes marrom avermelhadas, com porções mais claras. As sementes são levemente achatadas, com formato elíptico arredondado. Os frutos de *H. martiana* exibiram maiores valores em uma biometria de sementes (comprimento, largura e espessura). As sementes foram maiores e mais robustas. A distinção entre as espécies *H. courbaril* e *H. martiana* é realizada também pela diferença entre os frutos (CUNHA-SILVA et al., 2012).

Algumas atividades biológicas têm sido avaliadas utilizando *Hymenaea martiana*. Em 1993, a atividade analgésica e anti-inflamatória do extrato hidroalcoólico foi avaliada. O estudo mostrou que a via intraperitoneal foi a mais potente, dentre vários métodos. O mecanismo sugerido, através do qual estes efeitos seriam possíveis, foi a inibição da geração dos produtos da via do ácido araquidônico, via lipoxigenase e/ou cicloxigenase (NEVES et al., 1993).

Calixo e colaboradores (1992a) estudaram os efeitos de *Hymenaea martiana* sob o músculo liso. O extrato hidroalcoólico causou deslocamento dependente de concentração na curva de resposta de vários neurotransmissores. Em útero de ratas,

o extrato causou contração em modelos induzidos por bradicinina, lisil-bradicinina e acetilcolina, em intervalos de concentração de 50 a 200 mg/mL. Ao contrário, nas mesmas condições, o extrato antagonizou as contrações induzidas por angiotensina II, de maneira concentração-dependente, mas de modo não competitivo. Em uma concentração maior (200 mg/mL), o extrato inibiu contrações induzidas por prostaglandina F<sub>2</sub> $\alpha$  e ocitocina, mas não afetou as contrações induzidas por serotonina. Em íleo de cobaias, o extrato, em concentrações de 50 a 100 mg/mL, causou discreto deslocamento da curva resposta obtida com bradicinina e acetilcolina. Depressão destes transmissores foi obtida por maiores concentrações do extrato, em concentrações de 200 mg/mL. Estes dados mostram a atividade potencial da planta contra contrações induzidas por alguns neurotransmissores não-vasculares em músculo liso (CALIXTO et al., 1992a).

Os efeitos do extrato hidroalcoólico de *Hymenaea martiana* também foram investigados através de respostas de relaxamento endotélio-dependente e independente, induzidos por alguns transmissores, como acetilcolina, histamina, ionóforo de cálcio e nitroprussiato de sódio, em anéis de aorta isolada de ratos e coelhos pré-contraídos. O extrato, em concentrações de 0,25 a 0,5 mg/mL, inibiu a resposta relaxante induzida por acetilcolina, de maneira concentração-dependente, em aorta de coelhos, e por histamina em aorta de ratos. Na aorta de ratos, mas não em coelhos, o relaxamento em resposta ao ionóforo de cálcio foi inibido. Em contraste, o extrato foi completamente inefetivo contra relaxamento independente do endotélio causado por nitroprussiato de sódio em aorta de coelhos. A ação do extrato sobre contrações induzidas por noradrenalina, angiotensina I e angiotensina II em aorta de coelhos foi também avaliada e concentrações de 0,5 a 1,0 mg/mL aumentaram significativamente a contração máxima induzida por noradrenalina em aorta de coelhos. Os dados obtidos no estudo exibem a seletividade na inibição de respostas vasorrelaxantes endotélio-dependentes, o que poderia ser explicado pela síntese de fatores derivados do endotélio e/ou sua inativação. Interferências com a enzima conversora de angiotensina também foram sugeridas (CALIXTO et al., 1992b).

Cechinel-Filho et al., em 2000, também investigou as propriedades antinociceptiva e anti-edematogênica da astilbina, componente majoritário isolado de *Hymenaea martiana*, e alguns derivados obtidos por modificação estrutural, como taxifolina e compostos relacionados. A avaliação foi desenvolvida por vários métodos,

como contorção induzido por ácido acético e teste de formalina, edema de pata induzido por carragenina, dextrana e bradicinina em ratos. Taxifolina e seus derivados tetrametilados exibiram potente atividade antinociceptiva dose-dependente no teste de contorção abdominais induzido por ácido acético (i.p.). Estas duas substâncias também foram potentes em atenuar a segunda fase do teste da formalina. Ambos os componentes exibiram efeito anti-edematogênico em edema de pata induzido por dextrana, e se mostraram mais potentes do que o ácido acetilsalicílico e paracetamol. A Taxifolina pentaacetilada, outro composto, inibiu o edema de pata induzido por bradicinina.

Astilbina (CARNEIRO et al., 1993; CECHINEL-FILHO et al., 2000), eucrifina e engelitina isoladas de *H. martiana* foram avaliadas farmacologicamente. Eucrifina e astilbina provocaram deslocamento concentração-dependente em contrações induzidas por bradicinina em úteros isolados de rata, porém, a engelitina não apresentou efeitos. Eucrifina e engelitina, em contrações induzidas por acetilcolina em útero de ratas, causaram um discreto deslocamento, mas isso não foi observado com a astilbina.

O efeito hepatoprotetor da astilbina isolada de cascas de *Hymenaea martiana* também foi avaliado, e as ações apresentadas foram maiores do que a vitamina E. Astilbina também foi capaz de restaurar lipoperóxidos e prostanoídes de tecido para níveis basais (CLOSA et al., 1997).

A atividade antimicrobiana de *Hymenaea martiana* foi testada contra fungos patogênicos. O extrato bruto e a fração hidroalcoólica apresentou alta atividade contra *Cryptococcus neoformans*, e as frações metanólicas e butanólicas foram mais ativas contra *Trichopyton rubrum*, *Trichopyton mentagrophytes* e *Microsporum canis* (SOUZA et al., 2009).

### 3.3.2 Fitoquímica da espécie

Alguns estudos têm demonstrado a composição química de *Hymenaea martiana*. Carneiro et al. (1993) realizou estudo com as cascas de *Hymenaea martiana*, e verificou a presença de compostos glicosídicos, como astilbina, eucrifina e engelitina, que foram capazes de antagonizar respostas da bradicinina. Este efeito pode explicar as ações analgésica e anti-inflamatória desta planta. Astilbina é um

flavonoide originalmente identificado como um ingrediente ativo presente no extrato bruto de cascas desta espécie, com atividade antioxidante.

O teor de compostos fenólicos totais de *Hymenaea martiana* foi determinado por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) com detecção de arranjo diodo (DAD) e teores consideráveis foram obtidos, com  $428,50 \pm 5,91$  de equivalentes de ácido gálico/g do extrato etanólico, e  $705,50 \pm 7,22$  mg de equivalentes de ácido gálico no extrato acetato de etila. O teor de flavonoides totais foi de  $394,90 \pm 8,43$  e  $479,60 \pm 10,38$  para os dois extratos, respectivamente. O extrato etanólico apresentou maior atividade antioxidante em relação ao ácido ascórbico e BHA, utilizando o método do sequestro do radical DPPH, com valores de IC<sub>50</sub> de  $0,84 \pm 0,26$  µg/mL (ALMEIDA et al, 2012).

*Hymenaea martiana* é uma árvore nativa na região Nordeste do Brasil, também conhecida como “jatobá”, pertencente ao gênero *Hymenaea*, que é um gênero que tem sido analisado, e sua composição química descrita por muitos estudos importantes. Este gênero é considerado um produtor de resina, e alguns estudos têm objetivado o estudo da sua composição. Investigações mostram que a resina de folhas, caule e extratos das cascas são compostas principalmente por diterpenos do tipo *enantio-labdanoico* (CUNNINGHAM et al., 1973; CUNNINGHAM et al., 1974; MARSAIOLI et al., 1975; IMAMURA et al., 1977), e diterpenos do tipo *ent-halimano* na resina de sementes (KHOO et al., 1973).

Algumas atividades biológicas da espécie têm sido estudadas, evidenciando a atividade anti-inflamatória, analgésica (NEVES et al., 1993), antinociceptiva, anti-edematogênica (CECHINEL-FILHO et al., in 2000), atividade no músculo liso (CALIXTO et al., 1992a; CALIXTO et al., 1992b; CARNEIRO et al., 1993), hepatoprotetora (CLOSA et al., 1997) e antimicrobiana (SOUZA, 2008; SOUZA et al., 2009; SILVA-JÚNIOR, 2014), com extratos brutos, frações e substâncias isoladas de *Hymenaea martiana*.

Vários estudos demonstram a composição química de *Hymenaea martiana*. Alguns flavonoides glicosídicos foram isolados e identificados a partir da espécie: astilbina, eucrifina e engelitina (CARNEIRO et al., 1993; CECHINEL-FILHO et al., 2000). Carneiro et al. (1993) demonstrou a presença de destes compostos nas cascas de *H. martiana*, e estes foram capazes de antagonizar as respostas da bradicinina. Este efeito pode explicar as ações anti-inflamatória e analgésica desta espécie.

A astilbina é um flavonoide originalmente identificado como o composto ativo presente no extrato bruto das cascas desta espécie, apresentando atividade antioxidante (CARNEIRO et al., 1993; CECHINEL-FILHO et al., 2000). O teor de compostos fenólicos totais, flavonoides totais, atividade antioxidante e caracterização qualitativa por HPLC foi desenvolvido com o extrato etanólico de *Hymenaea martiana*, e os resultados mostraram teores consideráveis de fenólicos e flavonoides totais, principalmente na fração AcOEt. O extrato etanólicos demonstrou atividade antioxidante mais eficiente do que o ácido ascórbico e BHA, através do método de sequestro do radical DPPH (ALMEIDA et al., 2012).

Estes compostos flavonoídicos têm sido relacionados como as substâncias ativas principais nas cascas desta espécie, e sua ocorrência tem sido relacionada com o seu uso medicinal (CARNEIRO et al., 1993; CECHINEL-FILHO et al., 2000).

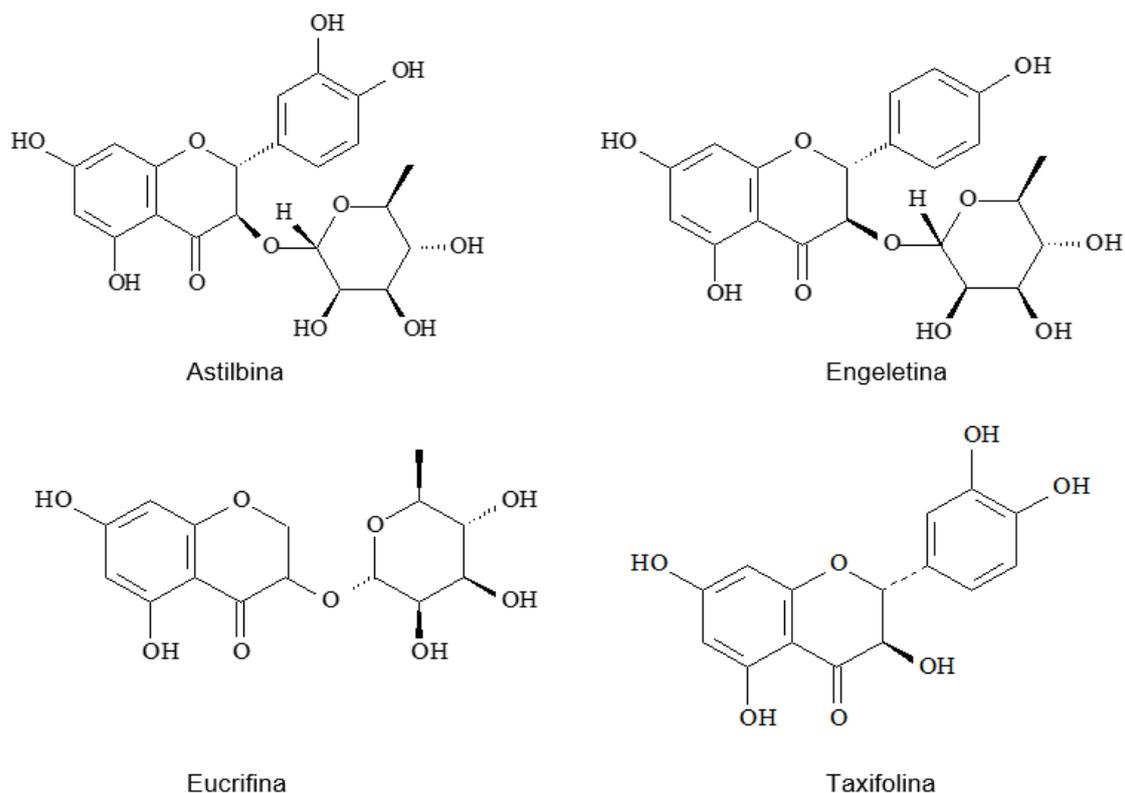


Figura 4 – Substâncias já identificadas em *Hymenaea martiana* (CARNEIRO et al., 1993; CECHINEL-FILHO et al., 2000; ALMEIDA et al., 2012).

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Levantamento bibliográfico

O levantamento bibliográfico foi realizado de forma constante durante toda a execução do trabalho, levando em consideração os aspectos fitoquímicos e farmacológicos do gênero *Hymenaea*, utilizando-se o Chemical Abstracts, Web of Science, portal de periódicos da CAPES e o banco de dados NAPRALERT (Natural Products ALERT), bem como através de pesquisas na internet e em anais de eventos nacionais e internacionais na área de produtos naturais.

### 4.2 Obtenção das drogas vegetais

Os materiais vegetais de *Hymenaea martiana* (cascas, folhas, frutos e sementes) foram coletados na cidade de Petrolina, Pernambuco, Brasil, no período entre maio e julho de 2015, e foram identificados pelo Herbário da Universidade Federal do Vale do São Francisco (HVASF), com exsicata nº 6444, coordenadas 09°11'04.30" S, 040°18'05.40" W, 357 m de altura.

Os materiais vegetais foram secos em temperatura média de 40 °C em estufa de circulação de ar (ETHIKTECHNO®, modelo 420 TD), por um período de 72 horas. Após a secagem e completa estabilização, o material foi pulverizado em moinho de facas QUIMIS®.



Figura 5 - Identificação botânica de *Hymenaea martiana*: Exsicata n<sup>o</sup> 6444. Fonte: Próprio autor / HVASF/CRAD.

### 4.3 Avaliação preliminar do método extrativo para diferentes drogas vegetais de *Hymenaea martiana*

As drogas vegetais (cascas, folhas, frutos e sementes) foram submetidas a três métodos extrativos:

#### 4.3.1 Maceração

Para a extração por maceração, 100 g de cada droga vegetal foram inseridos em recipientes âmbar com quantidade suficiente de etanol 95% para a extração dos metabólitos secundários. Cada recipiente foi reservado em lugar pouco iluminado, por três dias consecutivos, a temperatura ambiente ( $\pm 25$  °C) e com agitação diária. Após

o tempo de maceração, o resíduo foi filtrado. O procedimento foi repetido três vezes. Após o processo, a solução extrativa foi concentrada em evaporador rotativo FISATOM® a 50 °C (ALMEIDA et al., 2012; BRASIL, 2011).

#### 4.3.2 Percolação

Para a extração por percolação, 100 g de cada droga vegetal foram umedecidos com etanol 95% e deixados repousar por duas horas em recipiente fechado. As drogas umedecidas foram transferidas para o percolador, em camadas superpostas, aplicando leve e uniforme pressão sobre cada camada com o auxílio de um pistilo. A superfície foi forrada com camada de algodão. O líquido extrator (etanol 95%) foi colocado lentamente até que fosse eliminado o ar entre as partículas da droga e permaneça uma camada sobre a droga. O percolador foi reservado por 24 h. A percolação foi iniciada, adicionando o líquido extrator constantemente, tomando o cuidado de não deixá-lo desaparecer da superfície da droga antes de nova adição, até a extração máxima da droga. Após o processo, a solução extrativa foi concentrada em evaporador rotativo FISATOM® a 50 °C (BRASIL, 2011).

#### 4.3.3 Ultrassom

Para a extração por ultrassom, 10 g de cada droga vegetal foram adicionados a 100 mL de etanol 95% e inserido no equipamento de ultrassom LOGEN® modelo SB120DTN, durante 30 minutos a 25 °C. A solução extrativa foi filtrada, e o processo repetido três vezes. Após o processo, a solução extrativa foi concentrada em evaporador rotativo FISATOM® a 50 °C (CELEGHINI et al., 2007; VEGGI, 2013).

#### 4.3.4 Cálculo do rendimento de extração

O rendimento de extração foi expresso em percentagem e calculado como o peso do extrato obtido e concentrado, dividido pelo peso de droga vegetal utilizado, multiplicado por 100.

#### 4.3.5 Avaliação dos aspectos visuais

Os aspectos visuais foram avaliados em relação à cor, textura e coloração apresentada pelos extratos obtidos.

#### 4.3.6 Triagem fitoquímica qualitativa

Uma alíquota dos extratos de cada material vegetal foi solubilizada em clorofórmio, e foi submetida às análises em cromatografia em camada delgada com sílica gel 60 F254, com suporte de alumínio, aplicados com micropipeta e eluídos com diferentes sistemas de solventes, conforme descrito por Wagner & Bladt (1996), procurando destacar os principais grupos de metabólitos secundários (Tabela 2).

Tabela 2 - Sistemas de eluição e reveladores utilizados na triagem fitoquímica de *Hymenaea martiana* por CCD.

| Metabólitos Secundários  | Sistemas de eluição  | Reveladores                    |
|--------------------------|--|--------------------------------|
| Alcalóides               | Tolueno: acetato de etila: dietilamina (70:20:10, v/v)                           | Reagente de Dragendorff        |
| Derivados antracênicos   | Acetato de etila: metanol: água (100:13.5:10, v/v)                               | Reagente etanólico 10% KOH     |
| Cumarinas                | Tolueno: etil éter (1:1 saturado com ácido acético 10%, v/v)                     | Reagente etanólico 10% KOH     |
| Flavonóides e taninos    | Acetato de etila: ácido fórmico: ácido acético glacial: água (100:11:11:26, v/v) | Reagente NP + PEG              |
| Lignanais                | Clorofórmio: metanol: água (70:30:4, v/v)  | Reagente Fosfórico Vanilina    |
| Mono e diterpenos        | Tolueno: acetato de etila (93:7, v/v)  | Reagente Sulfúrico Vanilina    |
| Naftoquinonas            | Tolueno: ácido fórmico (99:1, v/v)   | Reagente etanólico 10% KOH     |
| Triterpenos e esteróides | Tolueno: clorofórmio : etanol (40:40:10, v/v)                                    | Reagente Lieberman-Burchard de |

Fonte: (Wagner; Bladt, 1996)

#### 4.3.7 Desrepliação e detecção do flavonoide astilbina e seus isômeros, através de análise por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (CLAE-EM).

As análises foram realizadas no NPPS-Ribeirão Preto, utilizando um equipamento de cromatografia líquida Shimadzu® modelo LC-20A com coluna (C-18) Shimadzu® modelo Shimpoek ODS (250 mm x 4,6 mm, 5 µm), fluxo de 1,0 mL/min e temperatura de 25 °C, acoplado a um espectrômetro de massas com ionização por eletrospray Bruker®, com analisador do tipo íon-trap e software de controle *Class-VP* versão 6.14.

As amostras e o padrão primário astilbina (AKTIN CHEMICALS®) foram dissolvidas em metanol grau HPLC, na concentração de 1 mg/mL e as misturas de água e ácido acético na proporção de (99:1) como solvente A e a mistura de acetonitrila e ácido acético na proporção de (99:1) como solvente B, foram utilizadas como eluente com gradiente descrito na tabela 3.

As análises de espectrometria de massas foram realizadas em um espectrômetro de massas Bruker Daltonics, modelo micrOTOF II - ESI-TOF Mass Spectrometer. Condições do experimento: bomba de infusão: fluxo 300 µl/h; fase móvel para a solubilização: H<sub>2</sub>O:ACN ou H<sub>2</sub>O:MeOH; modo de detecção: positivo e negativo; calibração interna com solução de NA-TFA a 10 mg/mL (TOF); voltagem do capilar: 3500 Volts; saída do capilar: 94.1 Volts; skimmer 1: 40.7 Volts; skimmer 2: 23 Volts; temperatura 220 °C; fluxo do gás de secagem 10 mL/min; pressão do gás de nebulização 6,0 Bar; gás: nitrogênio.

Tabela 3 - Condições cromatográficas nos experimentos de CLAE-EM.

| TEMPO (MIN) | PROPORÇÃO DE B (%) |
|-------------|--------------------|
| 0,01        | 10                 |
| 5,0         | 10                 |
| 50,0        | 15                 |
| 55,0        | 15                 |
| 65,0        | 20                 |
| 75,0        | 20                 |
| 80,0        | 100                |
| 85,0        | 100                |
| 90,0        | 10                 |
| 90,01       | Fim da análise     |

#### 4.3.8 Determinação do teor de compostos fenólicos totais

O teor de fenóis totais foi mensurado através do método colorimétrico que utiliza o reagente de Folin-Ciocalteu (SIGMA®) e ácido gálico (SIGMA®) como padrão, baseado no método descrito por Slinkard & Singleton (1977), apenas os volumes foram ajustados (ALMEIDA et al., 2011b). Para isso, uma alíquota (40 µL) dos extratos e fases diluídos foi adicionada a 3,16 mL de água destilada e 200 µL do reagente de Folin-Ciocalteu, sendo misturados logo em seguida. A mistura foi deixada em repouso por 6 minutos e posteriormente foram adicionados 600 µL de uma solução estoque de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (200 g/L) e homogeneizados. As soluções finais foram deixadas em repouso a 20 °C por 2 horas. Ao final do processo, a absorbância de cada solução foi determinada em espectrofotômetro (QUIMIS®) em 756 nm contra o branco (todos os componentes, exceto a amostra em análise) e os resultados foram plotados em um gráfico que correlaciona a absorbância da amostra com sua concentração. Assim, o teor de compostos fenólicos totais dos extratos foi expresso como mg de equivalentes de ácido gálico por grama de amostra (mg EqAG/g), através da curva de calibração do ácido gálico. A curva de calibração foi obtida em concentrações que variaram de 50 a 1000 mg/L, R<sup>2</sup> = 0,9975. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

#### 4.3.9 Determinação do teor de flavonoides totais

O teor de flavonoides totais foi determinado através do método colorimétrico por complexação metálica descrito anteriormente (MARQUES et al., 2012), utilizando a quercetina como padrão. Foi preparada uma solução padrão de quercetina de 5 mg/mL em etanol absoluto, e foi adicionado 0,2 mL de solução de AlCl<sub>3</sub> 2,5% alcoólico e 3,80 mL de EtOH absoluto. As soluções foram deixadas em repouso por 30 minutos a temperatura ambiente. Ao final do processo, a absorbância de cada solução foi determinada em espectrofotômetro (QUIMIS®) em 408 nm contra o branco (todos os componentes, exceto a amostra em análise) e os resultados foram plotados em um gráfico que correlaciona a absorbância da amostra com sua concentração. Assim, o teor de flavonoides totais dos extratos foi expresso como mg de equivalentes de quercetina por grama de amostra (mg EqQ/g), através da curva de calibração da quercetina. A curva de calibração foi obtida em concentrações que variaram de 2,5 a 20 µg/mL, com R<sup>2</sup> = 0,9930. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

#### 4.3.10 Determinação da atividade fotoprotetora UVB *in vitro*

A atividade fotoprotetora foi avaliada utilizando a leitura espectrofotométrica de soluções diluídas, de acordo com o Método de Mansur et al. (1986). Os extratos foram previamente secos em estufa a 40 °C por 60 minutos. Foram preparadas diluições com as concentrações de 5, 25, 50 e 100 mg/L. Varreduras de 260 a 400 nm, com intervalos de 5 nm foram realizadas. Foi utilizado um espectrofotômetro (QUIMIS®), com cubetas de quartzo de 1 cm de caminho óptico para aquisição dos espectros.

Os cálculos foram realizados considerando os intervalos de  $\lambda$  determinados por MANSUR et al. (1986), com base na equação:

$$FPS = FC \cdot \sum_{290}^{320} EE(\lambda) \cdot abs(\lambda) \quad (1)$$

Os valores de EE ( $\lambda$ ) e I( $\lambda$ ) utilizados para o cálculo do FPS (Fator de Proteção Solar) foram os mesmos usados da literatura. Aplicou-se o fator de diluição (Fd) para correção de equivalência dos FPS dos extratos com os valores de referência, onde FC = fator de correção (10), EE( $\lambda$ ) = efeito eritemogênico da radiação; I( $\lambda$ ) = intensidade do sol; abs ( $\lambda$ ) = leitura espectrofotométrica da absorbância da solução do filtro solar.

#### 4.3.11 Escolha da droga vegetal com melhores resultados

A droga vegetal com maiores teores de compostos fenólicos totais, flavonoides totais e atividade fotoprotetora foi escolhida para uma avaliação mais aprofundada em relação à extração de compostos fenólicos e flavonoides em *Hymenaea martiana*.

Todas as determinações foram realizadas em triplicata. Valores foram considerados significativamente diferentes quando  $p < 0,05$ . Foi utilizado o software GraphPad Prism® 5.0.

#### 4.4 Caracterização físico-química da droga vegetal escolhida

Com as cascas de *Hymenaea martiana*, foram realizados os ensaios físico-químicos de determinação do índice de espuma, determinação da granulometria dos pós, determinação da perda por dessecação, determinação de cinzas sulfatadas, ensaio limite para metais pesados, realizados conforme descrito na Farmacopeia Brasileira 5ª Edição (BRASIL, 2010). Adicionalmente, foram realizados os ensaios densidade aparente não compactada e determinação de pH em solução aquosa, segundo estudos encontrados na literatura (FONSECA, 2009).

##### 4.4.1 Determinação da granulometria dos pós

Para a determinação da granulometria, foram utilizados tamises com abertura de malha de 250, 300, 425, 500  $\mu\text{m}$  e 1,70 mm, em um tamisador Bertel®. Foram pesados 25,0 g da droga vegetal, e a amostra foi transferida para o tamis superior, distribuindo uniformemente o pó. O conjunto foi tampado, e o aparelho foi acionado, com vibração 4, durante 15 minutos. Após o término desse tempo, a amostra retida na superfície superior de cada malha foi pesada, inclusive do coletor. O percentual retido em cada tamis foi obtido, utilizando o seguinte cálculo:

$$\% \text{ Retida no tamis} = P1 / P2 \times 100 \quad (2)$$

Onde: P1 = Peso da amostra retida em cada tamis (em gramas); P2 = Soma dos pesos retidos em cada tamis e no coletor (em gramas); 100 = Fator de porcentagem.

##### 4.4.2 Determinação do índice de espuma

Foi pesado 1 g do material vegetal reduzido a pó fino (malha de 180  $\mu\text{m}$ ) e foi transferido para erlenmeyer contendo 50 mL de água fervente. A solução foi mantida sob fervura moderada durante 30 minutos. A solução foi então resfriada e filtrada para balão volumétrico de 100 mL. O volume foi completado através do filtro até 100 mL. O decocto obtido foi distribuído em 10 tubos de ensaio com tampa (16 mm de diâmetro por 16 cm de altura), em série sucessiva de 1, 2, 3, até 10 mL, e o volume do líquido em cada tubo foi ajustado para 10 mL com água destilada. Os tubos foram tampados e agitados com movimentos verticais por 15 segundos, com duas agitações por segundo. Os tubos foram deixados em repouso por 15 minutos e a

altura da espuma foi medida.

Se a altura da espuma de todos os tubos for inferior a 1,0 cm, o índice de espuma é menor do que 100. Se, em qualquer um dos tubos, a altura da espuma medida for 1,0 cm, a diluição do material vegetal nesse tubo (A) é o índice observado. Se esse tubo for o primeiro ou segundo na série, é necessário fazer uma diluição intermediária, pelo mesmo método descrito anteriormente, para obter um resultado mais preciso.

Se a altura da espuma for maior do que 1,0 cm em todos os tubos, o índice de espuma é maior do que 1000. Nesse caso, a determinação precisa ser feita com uma nova série de diluições do decocto para obter um resultado preciso.

O índice de espuma é calculado segundo a equação

$$\text{Índice de Espuma} = 1000/A \quad (3)$$

Onde: A = o volume, em mililitros, do decocto usado para preparação da diluição no tubo onde a espuma foi observada.

#### 4.4.3 Determinação da perda por dessecação

Foram pesados 2,0 g da droga vegetal e foi transferida para pesa-filtro chato previamente dessecado durante 30 minutos em estufa a 105 °C. Após resfriamento em dessecador, o pesa-filtro tampado foi pesado, contendo a amostra. A amostra foi distribuída da maneira mais uniforme possível. O pesa-filtro foi inserido na estufa com a tampa retirada, deixando-a também na estufa. A amostra foi seca a 105 °C por 2 horas, o pesa-filtro foi resfriado até temperatura ambiente em dessecador, e foi pesado. A operação foi repetida até peso constante. A perda por dessecação foi obtida, utilizando o seguinte cálculo:

$$\text{Perda por dessecação (\%)} = (P_u - P_s) / P_a \times 100 \quad (4)$$

Onde:  $P_a$  = peso da amostra;  $P_u$  = peso do pesa-filtro contendo a amostra antes da dessecação;  $P_s$  = peso do pesa-filtro contendo a amostra após a dessecação.

#### 4.4.4 Determinação de cinzas totais e sulfatadas

Para a determinação de cinzas totais, em um cadinho previamente tarado, 3,0 g da droga vegetal foi adicionada, distribuída uniformemente, e foi incinerada, aumentando gradativamente a temperatura até o máximo de  $600 \pm 25$  ° C, até que todo o carbono tivesse sido removido. A amostra foi resfriada em dessecador e pesada. A porcentagem de cinzas totais foi calculada em relação ao peso da droga vegetal.

Já para a determinação de cinzas sulfatadas, um cadinho de porcelana foi aquecido ao rubro por 10 minutos, em seguida foi resfriado em um dessecador e foi pesado. No cadinho previamente tarado, foi adicionado 1,0 g da droga, que foi umedecida com ácido sulfúrico concentrado e carbonizada em bico de Bunsen. A amostra foi umedecida novamente com ácido sulfúrico concentrado, carbonizada e incinerada com aquecimento gradativo até 800 °C. A amostra foi resfriada, pesada novamente, e incinerada por mais 15 minutos. O procedimento foi repetido até que a diferença entre duas pesagens sucessivas não fosse maior que 0,5 mg. A determinação de cinzas sulfatadas foi obtida utilizando o cálculo:

$$\% \text{ Cinzas Sulfatadas} = \frac{Pr - Pv}{Pa} \times 100 \quad (5)$$

Onde: Pr = peso do cadinho + resíduo da amostra; Pv = peso do cadinho vazio; Pa = peso da amostra.

#### 4.4.5 Ensaio limite para metais pesados (método semi-quantitativo)

O ensaio limite para metais pesados foi realizado com a colaboração do Laboratório Hebron, localizado na cidade de Caruaru – PE, e foi seguido o Método I da Farmacopeia Brasileira 5ª Edição (BRASIL, 2010). Os reagentes especiais foram preparados conforme descrito no compêndio citado.

A solução amostra foi realizada transferindo para tubo adequado 4 mg da droga vegetal e foi diluída com água para 25 mL.

O pH da solução foi ajustado entre 3,0 e 4,0 com ácido acético 1 M ou hidróxido de amônio 6 M utilizando papel indicador de faixa estreita como indicador externo. A solução foi diluída com água para aproximadamente 40 mL e foi homogeneizada.

A solução padrão foi realizada transferindo para tubo adequado 2 mL de solução padrão de chumbo (10 ppm Pb) e diluída para 25 mL com água. O pH foi

ajustado entre 3,0 e 4,0 com ácido acético 1 M ou hidróxido de amônio 6 M utilizando papel indicador de faixa estreita como indicador externo. A solução foi diluída com água destilada para aproximadamente 40 mL e foi homogeneizada.

A solução controle foi preparada transferindo para um terceiro tubo 2 mL solução da amostra preparada e foram adicionados 2 mL de solução padrão de chumbo (10 ppm Pb). O pH foi ajustado entre 3,0 e 4,0 com ácido acético 1 M ou hidróxido de amônio 6 M, utilizando papel indicador de faixa estreita como indicador externo. A solução foi diluída com água destilada para aproximadamente 40 mL e foi homogeneizada.

A cada uma das soluções, foram adicionados 2 mL de tampão acetato pH 3,5 e 1,2 mL de tioacetamida. A solução foi diluída com água destilada para 50 mL, homogeneizada e deixada em repouso por 2 minutos. Após 2 minutos, desenvolveu-se tonalidade que varia do amarelo ao preto. As preparações foram observadas de cima para baixo, segundo o eixo vertical do tubo, sobre fundo branco.

Para a aprovação do teste, qualquer coloração desenvolvida na solução amostra não deve ser mais intensa do que a coloração apresentada pela solução padrão.

#### 4.4.6 *Ensaio limite para metais pesados (ICP)*

O ensaio limite para metais pesados foi desenvolvido através de equipamento ICP-OES marca Perkin Elmer®, modelo OPTIMA 2100DV, e foi realizado com a colaboração do Laboratório Cifarma, localizado na cidade de Goiânia – GO, e foi seguido o Método de Espectrometria Atômica, descrito nos métodos gerais da Farmacopeia Brasileira 5ª Edição (BRASIL, 2010).

#### 4.4.7 *Determinação de pH em solução aquosa*

Uma solução aquosa a 10% foi preparada com a droga vegetal. Foram pesados 2,0 g do pó, e foram adicionados 20 mL de água destilada. A solução foi inserida em equipamento de ultrassom a 25 °C por 10 minutos para homogeneização, e filtrada em filtro de papel. As leituras de pH foram realizadas em equipamento da MS Tecnopon®. O eletrodo foi calibrado com solução tampão, e as leituras foram realizadas em triplicata.

#### 4.4.8 Densidade aparente não compactada

Para a determinação da densidade aparente não compactada, foi utilizado o método descrito por Fonseca, em 2009. Em uma proveta de 10 mL, previamente pesada, adicionou-se 1,0 g da droga vegetal, de modo que a relação entre o volume e a massa de pó constituiu a densidade aparente não compactada, descrita pelo cálculo:

$$\text{Densidade aparente (g/mL)} = \text{Massa (g)} / \text{Volume ocupado (mL)} \quad (6)$$

#### 4.5 Avaliação do método extrativo para cascas de *Hymenaea martiana*

Com as cascas de *Hymenaea martiana* devidamente caracterizada físico-quimicamente, foram realizadas extrações utilizando dois métodos extrativos, através de planejamento fatorial  $2^2$ , com três pontos centrais, com variações nas condições de extração (porcentagem de álcool e relação droga : solvente).

Tabela 4 - Níveis para o desenho experimental para o estudo de métodos de extração com as cascas de *Hymenaea martiana*

| Fatores                            | Nível |      |      |
|------------------------------------|-------|------|------|
|                                    | (-)   | (0)  | (+)  |
| Solução Hidroalcoólica (%)         | 50    | 60   | 70   |
| Relação droga : solvente<br>(g:mL) | 1:10  | 2:10 | 3:10 |

Tabela 5 - Planejamento fatorial 2<sup>2</sup> com três repetições no ponto central, para cada método extrativo realizado com as cascas de *Hymenaea martiana*.

| Amostra | Relação droga : solvente (g:mL) | Solução Hidroalcoólica (%) |
|---------|---------------------------------|----------------------------|
| 1       | - 1 (1:10)                      | - 1 (50)                   |
| 2       | - 1 (1:10)                      | + 1 (70)                   |
| 3       | + 1 (3:10)                      | - 1 (50)                   |
| 4       | + 1 (3:10)                      | + 1 (70)                   |
| 5       | 0 (2:10)                        | 0 (60)                     |
| 6       | 0 (2:10)                        | 0 (60)                     |
| 7       | 0 (2:10)                        | 0 (60)                     |

#### 4.5.1 Maceração

Foi transferida quantidade suficiente (de acordo com o planejamento fatorial realizado) das cascas de *Hymenaea martiana* secas e pulverizadas para um recipiente âmbar, bem fechado. A droga vegetal foi mantida em contato com álcool etílico na quantidade e concentrações previstas em planejamento fatorial, com agitação diária, por no mínimo, três dias consecutivos, em lugar pouco iluminado, à temperatura ambiente. Após o tempo de maceração, a mistura foi vertida num filtro e armazenada em recipiente âmbar (ALMEIDA et al., 2012; BRASIL, 2011), para posterior evaporação do solvente em estufa de circulação de ar (ETHIKTECHNO®, modelo 420 TD).

#### 4.5.2 Turbólise

Foi transferida quantidade prevista das cascas de *H. martiana* secas e pulverizadas para um recipiente adequado e foi adicionada quantidade prevista de álcool na quantidade e concentrações previstas em planejamento fatorial. A mistura foi submetida à agitação mecânica, em Ultraturrax IKA® modelo T25 digital, por 15 minutos, a uma rotação de 4.000 rpm. A solução extrativa foi filtrada, para posterior evaporação do solvente em estufa de circulação de ar (ETHIKTECHNO®, modelo 420 TD).

#### 4.5.3 *Cálculo do rendimento de extração*

Conforme item 4.3.4.

#### 4.5.4 *Doseamento do teor de compostos fenólicos totais*

Conforme item 4.3.8.

#### 4.5.5 *Doseamento do teor de flavonoides totais*

Conforme item 4.3.9.

#### 4.5.6 *Análise estatística*

Todas as determinações foram realizadas em triplicata. Valores foram considerados significativamente diferentes quando  $p < 0,05$ . Para a caracterização da droga vegetal, foram utilizados os softwares GraphPad Prism<sup>®</sup> 5.0, Microsoft Excel<sup>®</sup> 2013, e a avaliação estatística para o planejamento fatorial foi realizada no software Statistica<sup>®</sup> 10.0, através de análise do módulo DOE (Design Of Experiments).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Avaliação preliminar do método extrativo para diferentes drogas vegetais de *Hymenaea martiana*

Para a avaliação preliminar do método extrativo para diferentes drogas vegetais de *Hymenaea martiana*, foram obtidos os seguintes pesos dos materiais vegetais secos e pulverizados: 3,0 kg das cascas, 300 g de folhas, 1,5 kg de frutos e 1,0 kg de sementes de *Hymenaea martiana*.

#### 5.1.1 Cálculo do rendimento de extração

Os extratos foram obtidos com os seguintes rendimentos (% do peso da planta seca), conforme Tabela 6.

Tabela 6 - Rendimentos dos extratos obtidos de *Hymenaea martiana*.

| Material Vegetal | Maceração | Percolação | Ultrassom |
|------------------|-----------|------------|-----------|
| Cascas           | 17,51%    | 17,94%     | 13,52%    |
| Folhas           | 39,34%    | 37,39%     | 38,32%    |
| Frutos           | 24,63%    | 15,15%     | 22,53%    |
| Sementes         | 26,27%    | 14,18%     | 29,67%    |

Os métodos extrativos não apresentaram diferenças estatísticas nos rendimentos dos extratos realizados com diferentes partes de *Hymenaea martiana*, portanto, não foi observada influência estatística. Por outro lado, diferenças estatísticas foram consideradas significantes para as diferentes partes vegetais ( $p < 0,05$ , ANOVA two-way, Bonferroni, *post hoc*).

Os rendimentos obtidos mostram a influência dos órgãos vegetativos neste parâmetro. De acordo com os dados brutos e de forma descritiva, os maiores rendimentos foram observados com os extratos preparados a partir das macerações das folhas de *H. martiana*. O método de maceração é bastante utilizado, e o maior tempo de contato da droga vegetal com o solvente pode favorecer a extração de metabólitos secundários. Já o método de ultrassom apresentou rendimentos interessantes, pois este método é rápido e simples, com duração de 30 minutos, o que pode ser uma vantagem. Já a percolação, procedimento previsto na Farmacopeia Brasileira, apresentou os menores rendimentos para os materiais vegetais folhas,

frutos e sementes de *H. martiana*, exceto para as cascas. Isto pode ser relacionado ao tempo de contato entre a droga vegetal e o solvente, que é maior na maceração, enquanto na percolação o contato da droga vegetal com o solvente é relativamente menor.

#### 5.1.2 Avaliação dos aspectos visuais

Os extratos obtidos com os materiais vegetais de *H. martiana* pelos diferentes métodos foram analisados em relação aos aspectos visuais (Tabela 7). Em relação às cascas, a maceração apresentou-se como um material cristalizado, com consistência rígida, de coloração marrom escura a avermelhada, enquanto que os outros métodos apresentaram-se com consistência maleável. Já em relação às folhas, os métodos apresentaram-se de aspecto semelhante, como um material líquido, com consistência oleosa, de coloração verde escura, exceto para a percolação, que apresentou-se com aspecto gelatinizado e oleoso. Os extratos obtidos através da maceração dos frutos, por sua vez, apresentaram-se como um material granulado e gelatinizado, de consistência endurecida, de coloração marrom escura e de cheiro adocicado, enquanto que a percolação apresentou-se como um material líquido caramelizado, de coloração amarela e de cheiro adocicado, indicando diferenças nos aspectos dos extratos obtidos pelos diferentes métodos para este material vegetal. Em relação às sementes, os extratos obtiveram aspecto semelhante, apresentando-se como um material gelatinizado, de consistência endurecida, de coloração marrom escura.

Os aspectos visuais dos extratos obtidos se apresentaram com algumas diferenças entre os métodos extrativos (Figuras 6, 7 e 8), porém alguns materiais vegetais como as folhas e as sementes apresentaram aspectos visuais semelhantes, o que indica que cada parte vegetal se comporta de maneira diferente ao ser submetida aos diferentes métodos extrativos.

| <b>Material Vegetal</b> | <b>Maceração</b>   | <b>Percolação</b>  | <b>Ultrassom</b>   |
|-------------------------|--|--|--|
| Cascas                  | Material cristalizado de coloração marrom a avermelhada.       | Material pastoso, de coloração marrom a avermelhada.           | Material pastoso, de coloração marrom a avermelhada.           |
| Folhas                  | Material líquido e oleoso, de coloração verde escura.          | Material gelatinizado, oleoso, de coloração verde escura.      | Material líquido, oleoso, de coloração verde escura.           |
| Frutos                  | Material granulado, de coloração marrom escura.                | Material líquido caramelizado, de coloração amarela escura.    | Material gelatinizado, de coloração marrom escura.             |
| Sementes                | Material gelatinizado, enrijecido, de coloração marrom escura. | Material gelatinizado, enrijecido, de coloração marrom escura. | Material gelatinizado, enrijecido, de coloração marrom escura. |

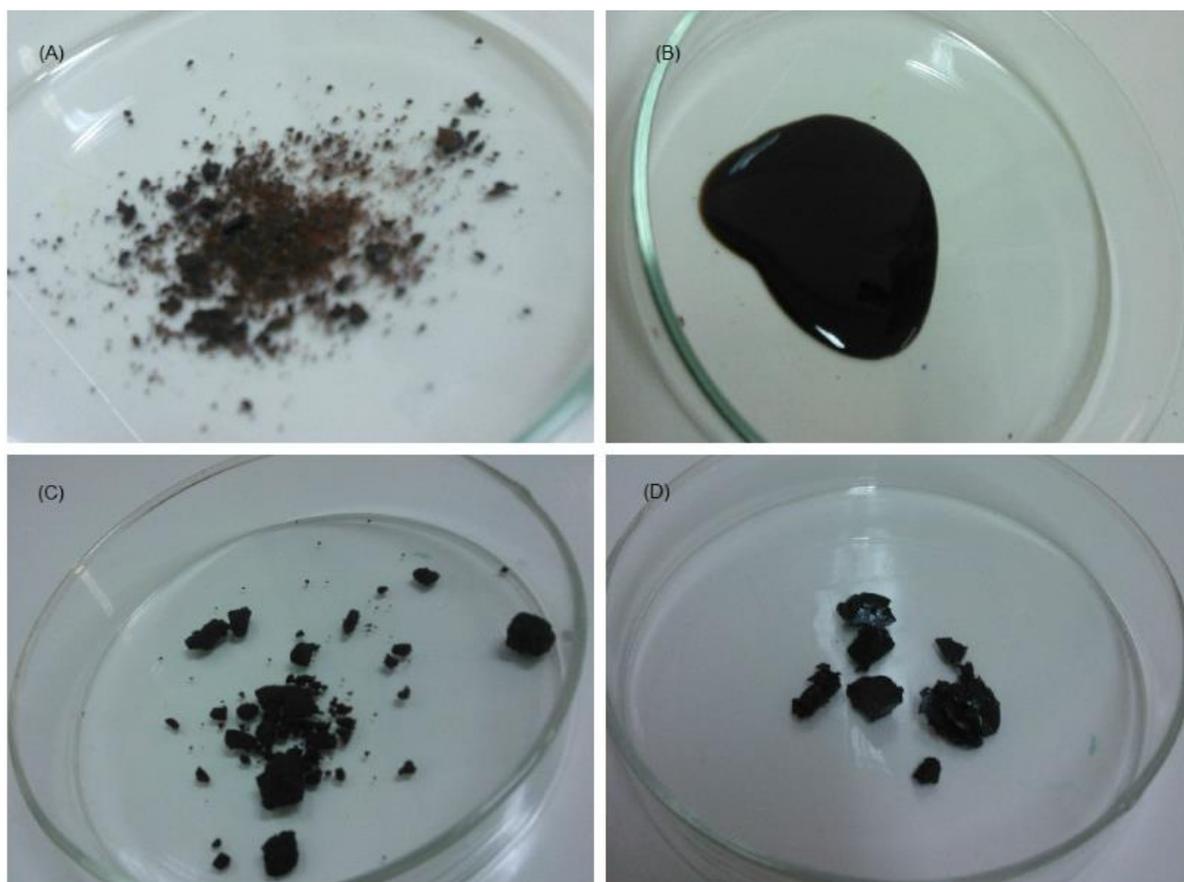


Figura 6 – Aspectos visuais dos extratos obtidos por maceração. Legenda: (A) maceração das cascas; (B) maceração das folhas; (C) maceração dos frutos; (D) maceração das sementes.

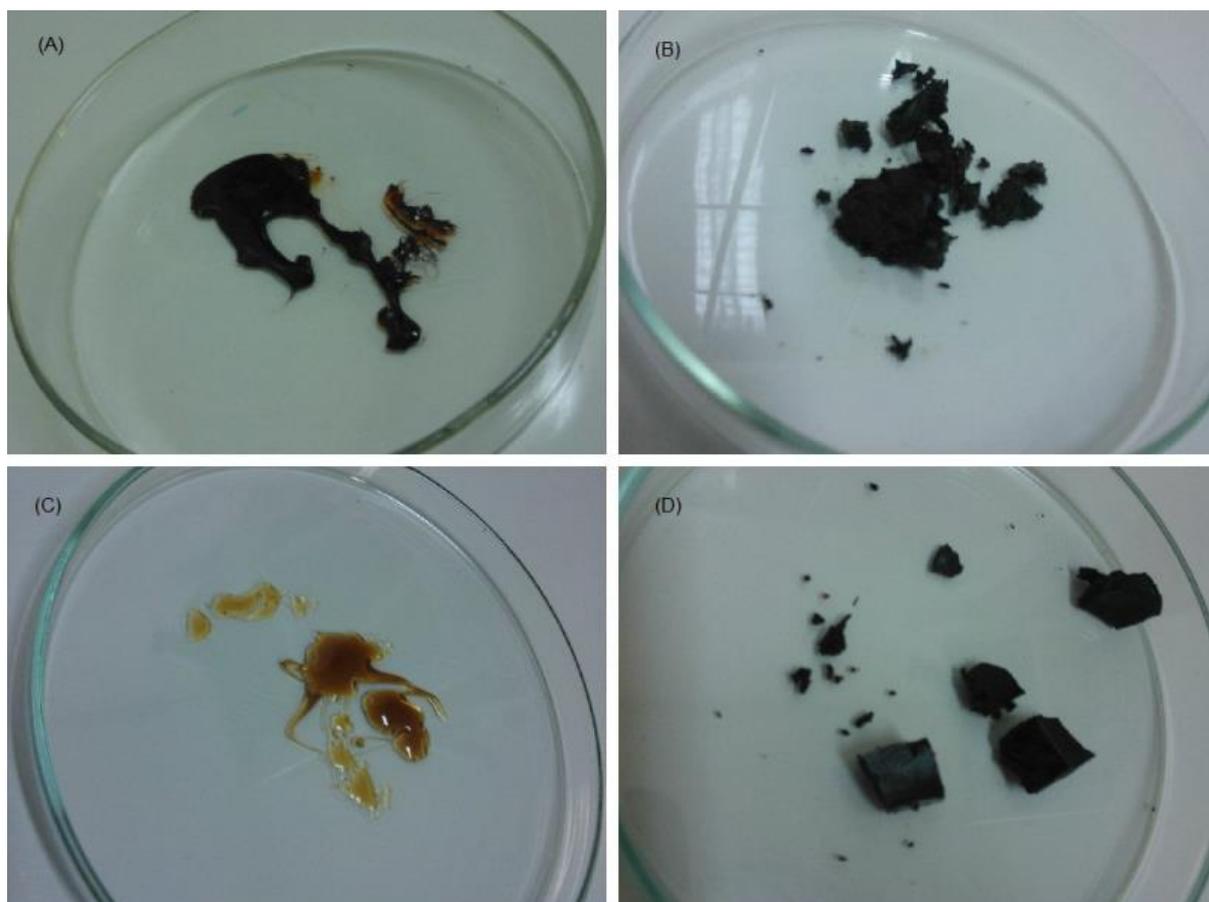


Figura 7 – Aspectos visuais dos extratos obtidos por percolação. Legenda: (A) percolação das cascas; (B) percolação das folhas; (C) percolação dos frutos; (D) percolação das sementes.



Figura 8 – Aspectos visuais dos extratos obtidos por ultrassom. Legenda: (A) ultrassom das cascas; (B) ultrassom das folhas; (C) ultrassom dos frutos; (D) ultrassom das sementes.

### 5.1.3 Triagem fitoquímica qualitativa

Foi realizada a triagem fitoquímica com os extratos obtidos, e as placas de cromatografia em camada delgada foram analisadas. A análise dos extratos obtidos pelo método de maceração das cascas de *H. martiana* indicou a presença de derivados antracênicos, flavonoides, monoterpênicos, diterpenos, naftoquinonas, saponinas, triterpenos e esteroides. Já a maceração das folhas da planta indicou presença de antracenos, flavonoides, naftoquinonas e saponinas. A maceração dos frutos indicou presença de antracenos, flavonoides, monoterpênicos, diterpenos e naftoquinonas, saponinas, e a maceração das sementes indicou presença de antracenos e flavonoides (Tabela 8).

Tabela 8 - Triagem fitoquímica qualitativa dos materiais vegetais de *Hymenaea martiana* submetidos à extração por maceração.

| <b>Metabólitos secundários</b> | <b>Extrato Cascas</b> | <b>Extrato Folhas</b> | <b>Extrato Frutos</b> | <b>Extrato Sementes</b> |
|--------------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-------------------------|
| Alcaloides                     | -                     | -                     | -                     | -                       |
| Derivados antracênicos         | +++                   | ++                    | +                     | +                       |
| Cumarinas                      | -                     | -                     | -                     | -                       |
| Flavonoides                    | +++                   | +++                   | +++                   | +                       |
| Lignanais                      | -                     | -                     | -                     | -                       |
| Monoterpenos e Diterpenos      | +                     | -                     | +++                   | -                       |
| Naftoquinonas                  | +++                   | +                     | +                     | -                       |
| Saponinas                      | +                     | +                     | +                     | -                       |
| Triterpenos e esteroides       | +                     | -                     | -                     | -                       |

Legenda: (-): Não detectado; (+): Fracamente positivo; (++) Moderadamente positivo; (+++) Fortemente positivo.

A análise dos extratos obtidos pelo método de percolação das cascas de *H. martiana* indicou a presença de derivados antracênicos, flavonoides, monoterpenos, diterpenos, naftoquinonas e saponinas, não indicando a presença de triterpenos e esteroides como na maceração. Já a percolação das folhas da planta indicou presença de derivados antracênicos, flavonoides, monoterpenos e diterpenos (compostos não apresentados na maceração) e naftoquinonas, não indicando a presença de saponinas, como na maceração. A percolação dos frutos indicou presença de flavonoides, monoterpenos, diterpenos, naftoquinonas, saponinas e triterpenos e esteroides (compostos não apresentados na maceração), não indicando a presença de derivados antracênicos como na maceração. Já a percolação das sementes indicou presença de derivados antracênicos, flavonoides e saponinas (composto não apresentado na maceração) (Tabela 9).

Tabela 9 - Triagem fitoquímica qualitativa dos materiais vegetais de *Hymenaea martiana* submetidos à extração por percolação.

| <b>Metabólitos secundários</b> | <b>Extrato Cascas</b> | <b>Extrato Folhas</b> | <b>Extrato Frutos</b> | <b>Extrato Sementes</b> |
|--------------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-------------------------|
| Alcaloides                     | -                     | -                     | -                     | -                       |
| Derivados antracênicos         | +++                   | ++                    | -                     | +                       |
| Cumarinas                      | -                     | -                     | -                     | -                       |
| Flavonoides                    | +++                   | +++                   | +++                   | +                       |
| Lignanais                      | -                     | -                     | -                     | -                       |
| Monoterpenos e Diterpenos      | ++                    | ++                    | +++                   | -                       |
| Naftoquinonas                  | +++                   | ++                    | +                     | -                       |
| Saponinas                      | +                     | -                     | +++                   | ++                      |
| Triterpenos e esteroides       | -                     | -                     | ++                    | -                       |

Legenda: (-): Não detectado; (+): Fracamente positivo; (++) Moderadamente positivo; (+++) Fortemente positivo.

Já a análise dos extratos obtidos pelo método de ultrassom das cascas de *H. martiana* indicou a presença de derivados antracênicos, flavonoides, monoterpenos, diterpenos, naftoquinonas e saponinas, conforme observado na maceração. Já a percolação das folhas da planta indicou presença de flavonoides, monoterpenos e diterpenos (compostos não apresentados na maceração) e naftoquinonas, não indicando a presença de derivados antracênicos e saponinas, como na maceração. A percolação dos frutos indicou presença de flavonoides, monoterpenos, diterpenos, naftoquinonas e saponinas, não indicando a presença de derivados antracênicos como na maceração, e triterpenos e esteroides, como na percolação. Já a percolação das sementes indicou presença de derivados antracênicos, flavonoides e saponinas (composto não apresentado na maceração) (Tabela 10).

Tabela 10 - Triagem fitoquímica qualitativa dos materiais vegetais de *Hymenaea martiana* submetidos à extração por ultrassom.

| <b>Metabólitos secundários</b> | <b>Extrato Cascas</b> | <b>Extrato Folhas</b> | <b>Extrato Frutos</b> | <b>Extrato Sementes</b> |
|--------------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-------------------------|
| Alcaloides                     | -                     | -                     | -                     |                         |
| Derivados antracênicos         | +++                   | -                     | -                     | +                       |
| Cumarinas                      | -                     | -                     | -                     | -                       |
| Flavonoides                    | +++                   | +++                   | +++                   | +                       |
| Lignanais                      | -                     | -                     | -                     | -                       |
| Monoterpenos e Diterpenos      | ++                    | +                     | +                     | -                       |
| Naftoquinonas                  | +++                   | +                     | +                     | -                       |
| Saponinas                      | ++                    | -                     | ++                    | +                       |
| Triterpenos e esteroides       | -                     | -                     | -                     | -                       |

Legenda: (-): Não detectado; (+): Fracamente positivo; (++) Moderadamente positivo; (+++) Fortemente positivo.

A triagem fitoquímica foi realizada conforme descrito por Wagner e Bladt (1996), e foram observadas diferenças nos resultados dos extratos obtidos, sendo então importante a escolha do método de acordo com as substâncias de interesse. A análise dos extratos das cascas indicou a presença de naftoquinonas, derivados antracênicos, terpenoides, esteroides, saponinas e flavonoides, o que está de acordo com outros estudos realizados com *Hymenaea martiana* e outras espécies do gênero (MARSAIOLI et al., 1975; CARNEIRO et al, 1993; NOGUEIRA et al., 2002). Já a análise dos extratos das folhas mostrou resultado positivo para derivados antracênicos, naftoquinonas, flavonoides, monoterpenos, diterpenos e saponinas. Outras espécies do gênero apresentaram flavonoides, diterpenos, esteroides e sesquiterpenos nas folhas (KADER et al., 2002; LOPEZ e SCHIFF-JR, 1976; PETTIT et al., 2003; MARTIN et al., 1972). A análise dos extratos dos frutos indicou presença de derivados antracênicos, flavonoides, monoterpenos, diterpenos, naftoquinonas, saponinas, triterpenos e esteroides. Apesar de não haver estudos com os frutos de *H.*

*martiana*, em estudos anteriores em frutos de outras espécies do gênero, foram encontrados os carboidratos *D*-frutose, *D*-glicose, ácido *D*-glicurônico, *L*-sorbose e sacarose, além de diterpenos nas vagens secas (ácido (5*R*-8*S*-10*R*)-cleroda-3-*trans*-13-dien-15-oico, ácido (-)-koyalênico, ácido (-)-óxico, ácido (-)-iso-óxico) (CHUNG et al., 1997; NOGUEIRA et al., 2001). A análise dos extratos das sementes indicou presença de derivados antracênicos, flavonoides, saponinas, porém foram encontrados estudos em outras espécies do gênero que indicaram apenas a presença de cumarinas (ipomopsina e himenaína) (SIMÕES et al., 2009), e xiloglucanas (LIMA et al., 1993; BUCKERIDGE et al., 1997).

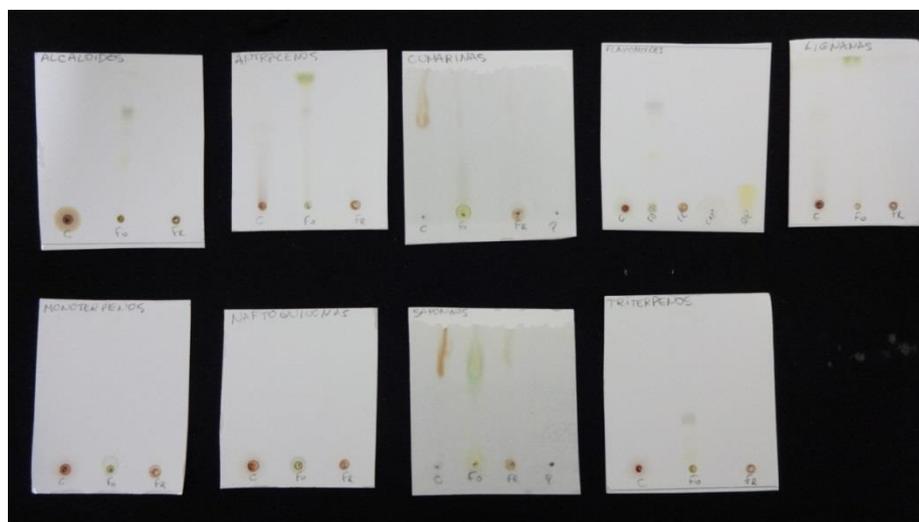


Figura 9 – Placas de cromatografia em camada delgada dos extratos brutos dos materiais vegetais submetidos à extração por maceração (da esquerda para a direita: alcaloides, derivados antracênicos, cumarinas, flavonoides, lignanas, monoterpênos e diterpenos, naftoquinonas, saponinas e triterpenos) – cascas, folhas e frutos.

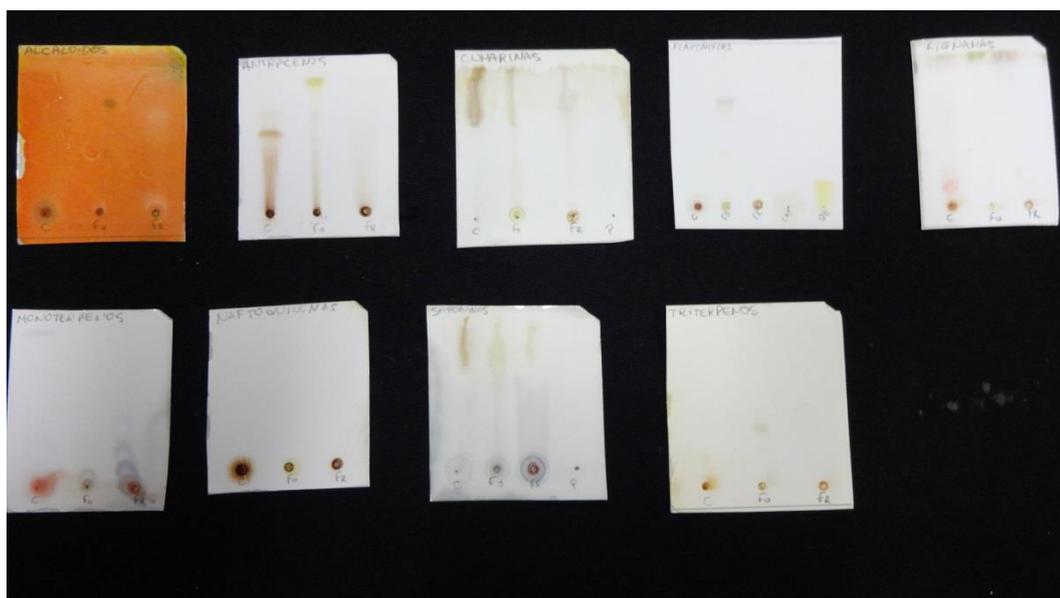


Figura 10 – Placas de cromatografia em camada delgada dos extratos brutos dos materiais vegetais submetidos à extração por maceração, após a aplicação dos reveladores – cascas, folhas e frutos.

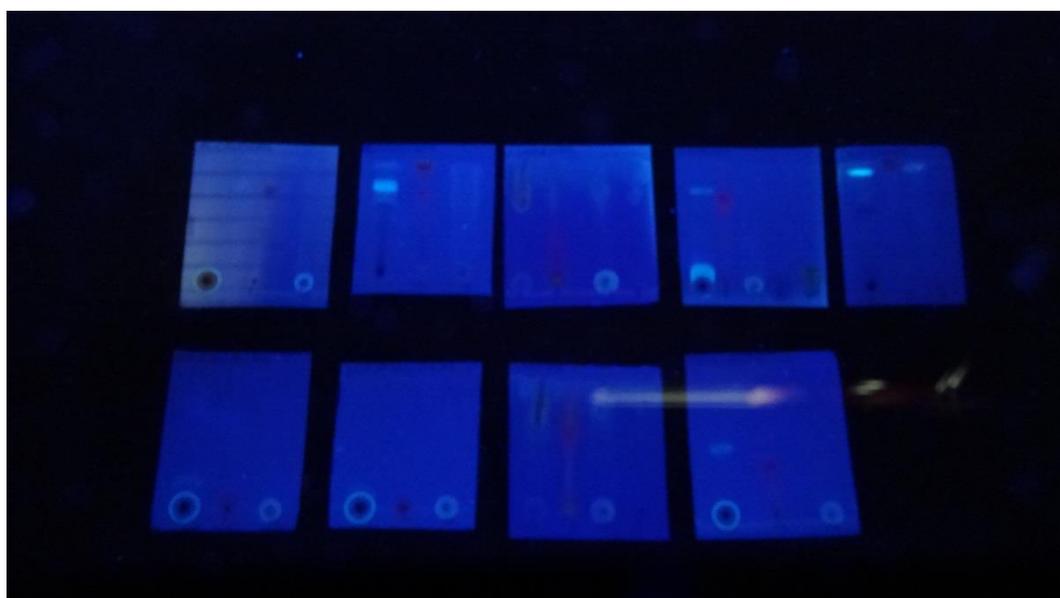


Figura 11 - Visualização das placas após a aplicação dos reveladores em câmara de luz UV, dos extratos brutos dos materiais vegetais submetidos à extração por maceração – cascas, folhas e frutos.

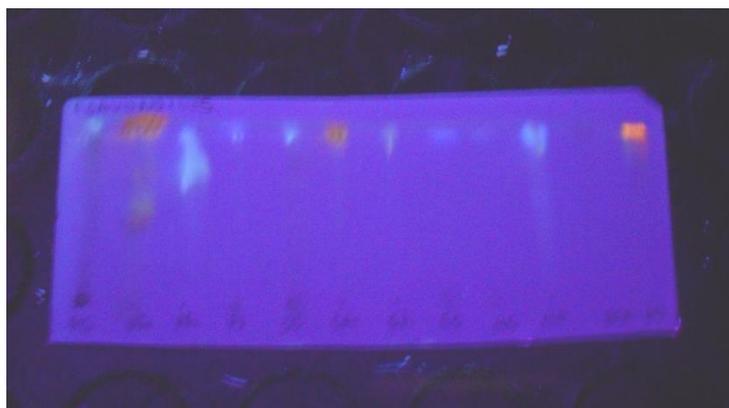


Figura 12 - Visualização das placas após a aplicação dos reveladores em câmara de luz UV (365 nm), dos extratos brutos dos materiais vegetais submetidos à extração por maceração (sementes), percolação e ultrassom (cascas, folhas, frutos e sementes).

#### *5.1.4 Desrepliação e detecção do flavonoide astilbina e seus isômeros, através de análise por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (CLAE-EM).*

Com o objetivo de evitar o re-isolamento e a determinação estrutural de substância já conhecida, a “desrepliação” (do inglês, dereplication) é caracterizada como uma etapa crucial no processo de triagem de extratos brutos (NG et al., 2009). Além de minimizar o consumo de droga vegetal e solvente, a desrepliação impede a repetição de trabalhos, otimizando o tempo necessário ao estudo de novos produtos naturais com atividade biológica (LANG et al., 2008).

Como os extratos vegetais são compostos por matrizes complexas, o processo de desrepliação envolve a separação dos componentes, com a utilização de métodos cromatográficos, além da obtenção de dados espectroscópicos e de bioatividade. Para isso, são utilizadas as chamadas técnicas hífenadas, constituídas pelo acoplamento (hifenação) de diferentes técnicas e/ou diferentes detectores. A análise é então baseada na comparação das informações obtidas em bases de dados, resultando na detecção de substâncias conhecidas ou elucidação estrutural de novos compostos (LANG et al., 2008).

O método de desrepliação já foi utilizado para a detecção de produtos naturais em diversos trabalhos, como flavonoides glicosilados (WARIDEL et al., 2001), derivados do ácido cafeico (PAULI et al., 1999), flavonoides e derivados de flavonoides (WOLFENDER et al., 2000) e isoflavonoides (LAMBERT et al., 2005).

A astilbina apresenta dois isômeros principais: neoastilbina e isoastilbina. A neoastilbina já foi isolada de outra planta do gênero, como das cascas de *Hymenaea parvifolia* (ISHIBASHI et al., 1999), além das raízes de *Heteropteris afrodisiaca*, da família Malpighiaceae (MARQUES et al., 2007), planta que também apresentou isoastilbina. Este isômero também foi identificado nas raízes de *Smilax glabra* (DU et al., 2005).

Em relação à diferenciação entre os isômeros, Marques et al. (2007), relataram, em análise por HPLC, em condições cromatográficas semelhantes às executadas neste estudo, que a neoastilbina apresentou o menor tempo de retenção, seguido da astilbina, e tendo a isoastilbina o maior tempo de retenção. Já Du et al. (2005), em condições também semelhantes, detectou primeiramente a astilbina, em seguida a isoastilbina, porém não foi encontrada neoastilbina. Apesar do fato de que técnicas mais específicas para a determinação das estruturas químicas seriam mais apropriadas, bem como a utilização de padrões analíticos específicos, estes estudos demonstram a diferença nos tempos de retenção entre os isômeros, podendo servir de base para estudos preliminares.

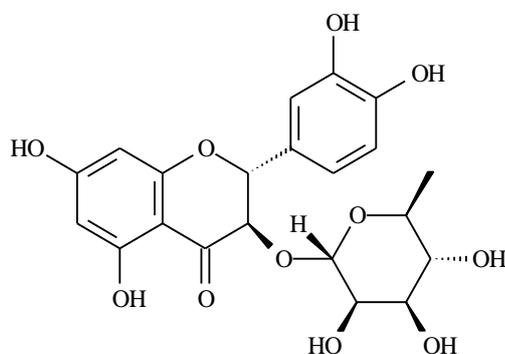


Figura 13 – Estrutura química da astilbina.

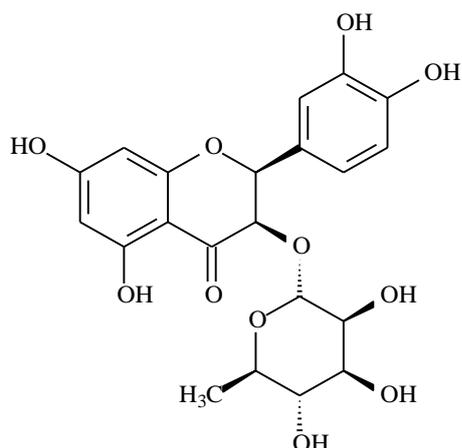


Figura 14 – Estrutura química da isoastilbina.

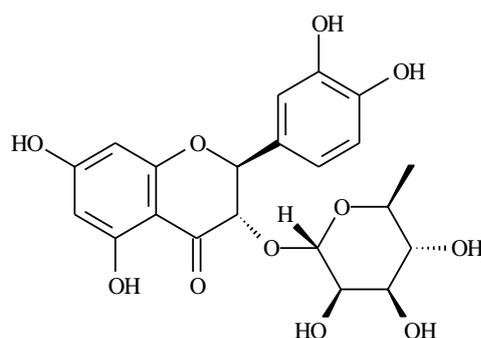


Figura 15 – Estrutura química da neoastilbina.

Na fragmentação do padrão astilbina, o íon atribuído a este flavonoide apresentou um fragmento principal com  $m/z$  449,1157 no modo negativo. Este modo foi escolhido por conta da estrutura química e ionização dos flavonoides. O espectro de massas da fragmentação do padrão astilbina estão mostrados na figura 16. A proposta dos padrões de fragmentação pode ser justificada pela perda da ramnose, e o aparecimento do fragmento  $[M-H]^-$ :  $m/z$  303,0660, referente à taxifolina (304,0582 Da), conhecido como a aglicona da astilbina (ZHANG et al., 2013a).

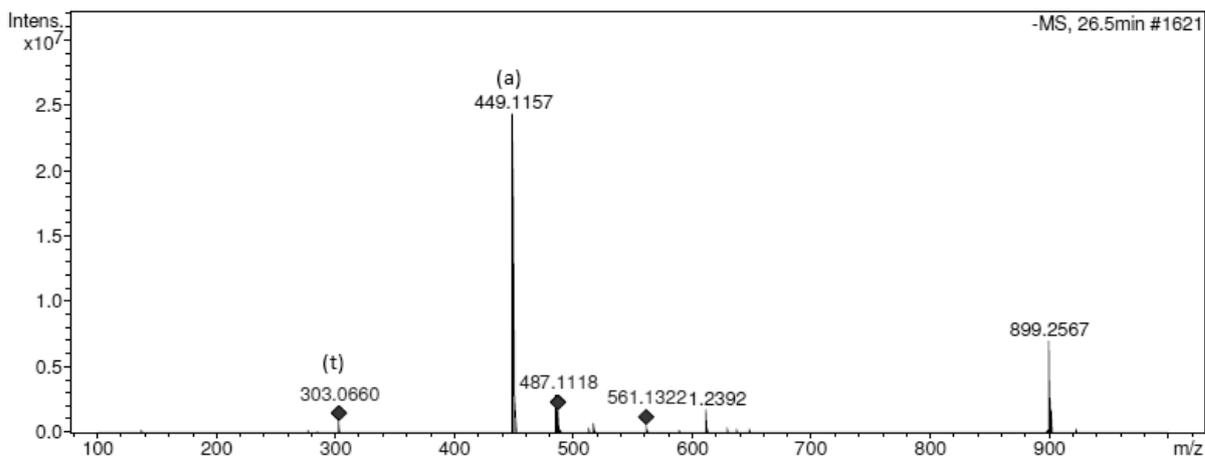


Figura 16 – Fragmentação da astilbina (a) em taxifolina (t) no modo negativo.

Tabela 11 – Detecção do padrão astilbina em ensaio de CLAE-EM, no modo negativo [M-H]<sup>-</sup>.

| Modo                        | m/z      | t <sub>R</sub> (minutos) |
|-----------------------------|----------|--------------------------|
| Positivo [M+H] <sup>+</sup> | 451,1411 | 26,2                     |
| Negativo [M-H] <sup>-</sup> | 449,1157 | 26,5                     |

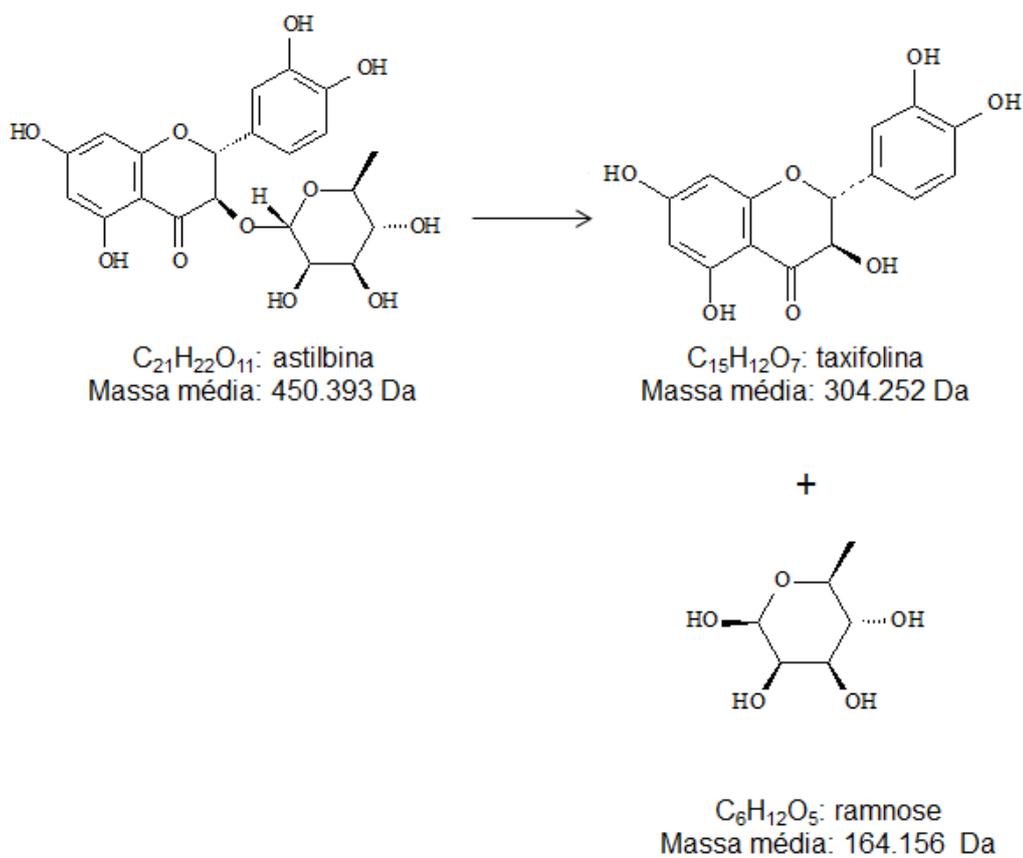


Figura 17 – Padrão de fragmentação proposto de astilbina em taxifolina.

#### 5.1.4.1 Maceração das cascas

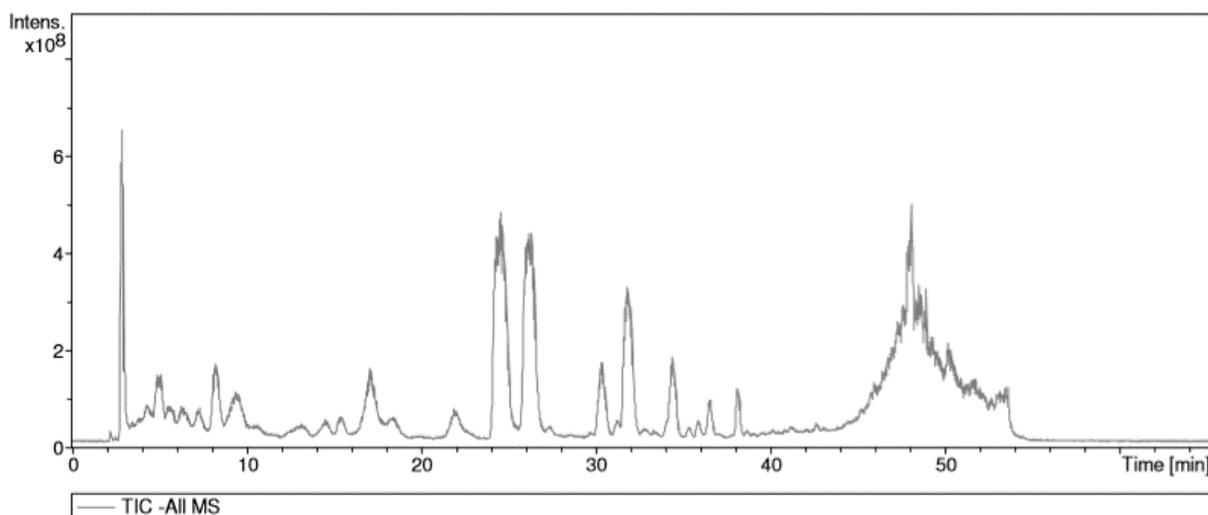


Figura 18 – Cromatograma do extrato obtido por maceração das cascas de *Hymenaea martiana* no modo negativo.

Íons observados  $[M-H]^-$ :  $m/z$  449,1126,  $t_R=$  24,4 min.

No extrato obtido através da maceração das cascas, foi observado um íon no modo negativo, com  $m/z$  449,1126 (Figura 19). Este íon foi atribuído à astilbina, pois o tempo de retenção foi semelhante ao encontrado na fragmentação do padrão (figura 16 e tabela 11).

No modo negativo foi observado um íon com  $m/z$  303,0704, o que pode sugerir a presença de taxifolina.

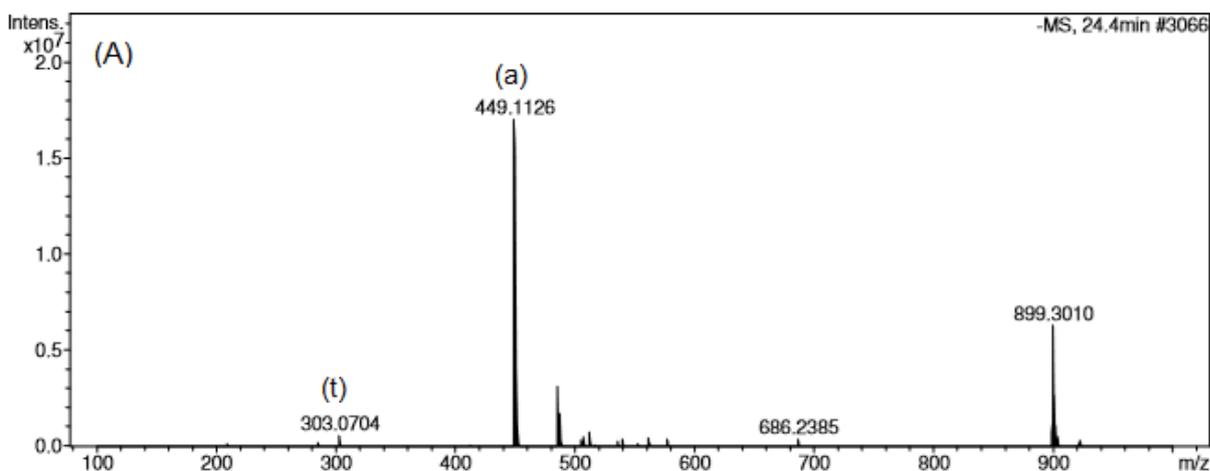


Figura 19 – Espectros de massas, com detecção de astilbina (a) e taxifolina (t), no extrato obtido através de maceração das cascas de *Hymenaea martiana*, no modo negativo.

#### 5.1.4.2 Maceração das folhas

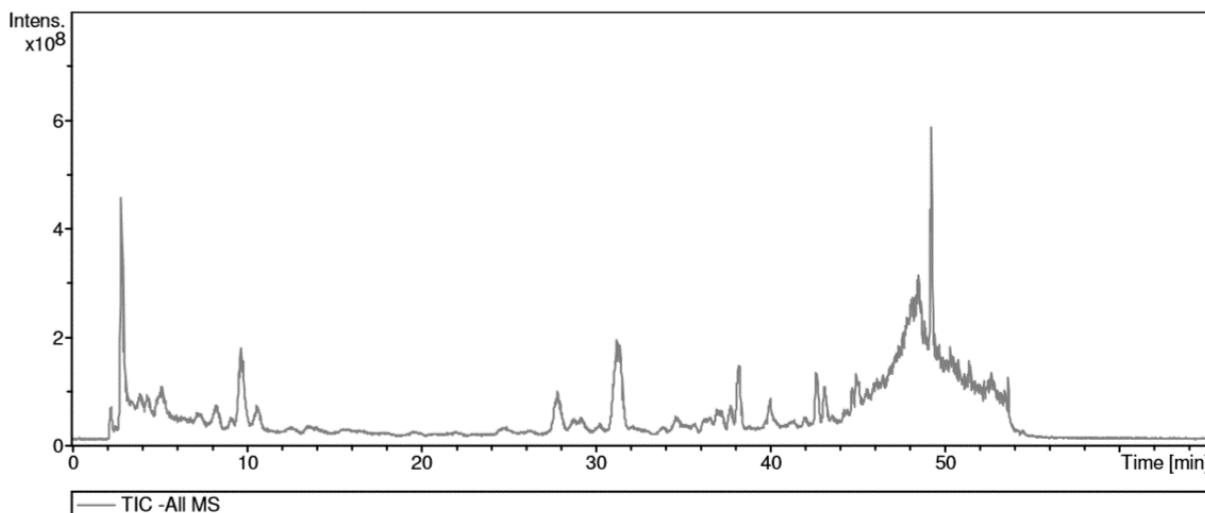


Figura 20 – Cromatograma do extrato obtido por maceração das folhas de *Hymenaea martiana* no modo negativo.

Íons observados [M-H]<sup>-</sup>:  $m/z$  449,2625,  $t_R$ = 21,9 min; [M-H]<sup>-</sup>: 449,1544,  $t_R$ = 8,5 min; [M-H]<sup>-</sup>: 449,0969,  $t_R$ = 29,2 min.

Já para a maceração das folhas, um íon foi observado no modo negativo, com  $m/z$  449,2625, que pode ser atribuído à astilbina, pois o tempo de retenção foi próximo ao encontrado na análise do padrão (figura 16 e tabela 11). Os espectros de massas para este extrato obtido através da maceração das folhas são apresentados na figura 21.

No espectro de massas no modo negativo, outro íon observado com  $m/z$  449,1544 pode ser relacionado à neoastilbina, visto que este apresentou tempo de retenção inferior ao relacionado à astilbina. Ainda no modo negativo, pode ser visualizado um íon com  $m/z$  449,0969, com tempo de retenção de 29,2 minutos, que pode ser relacionado à isoastilbina, pois em outros estudos esta substância teria tempo de retenção maior que a astilbina (MARQUES et al., 2007).

Até o presente momento, e conforme revisão bibliográfica, ainda não foi relatado nenhum estudo fitoquímico com as folhas de *H. martiana*, sendo este resultado importante para o estudo desta espécie. A astilbina já foi isolada das folhas de outra planta do gênero, *Hymenaea courbaril* (LOPEZ; SCHIFF, 1976). As folhas, como parte importante no uso tradicional de plantas medicinais, constituem então uma droga vegetal da espécie em estudo de relevante aspecto para futuros estudos fitoquímicos e farmacológicos.

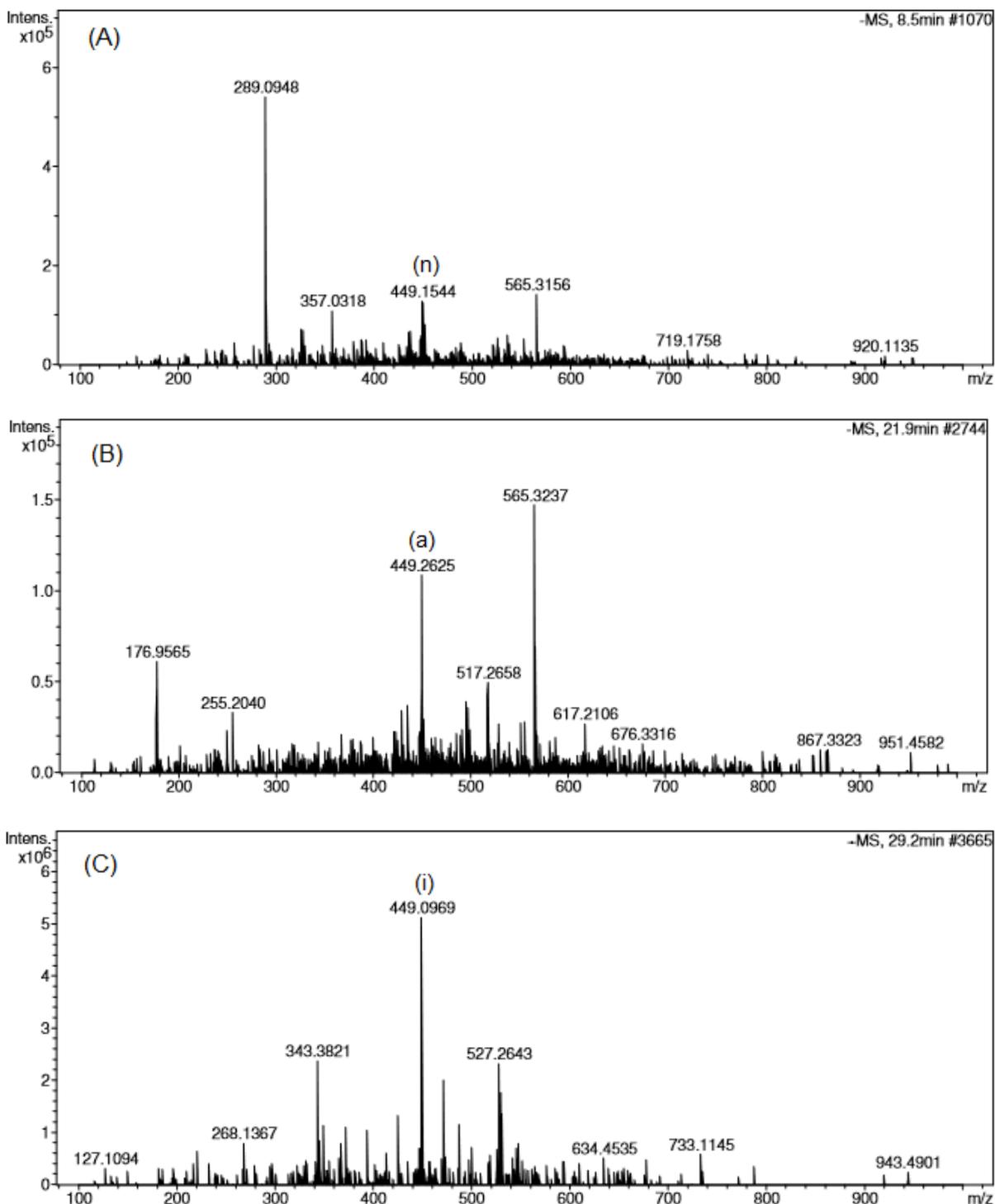


Figura 21 – Espectros de massas, com detecção de neoastilbina (n), astilbina (a) e isoastilbina (i) no extrato obtido através de maceração das folhas de *Hymenaea martiana*, no modo negativo.

### 5.1.4.3 Maceração dos frutos

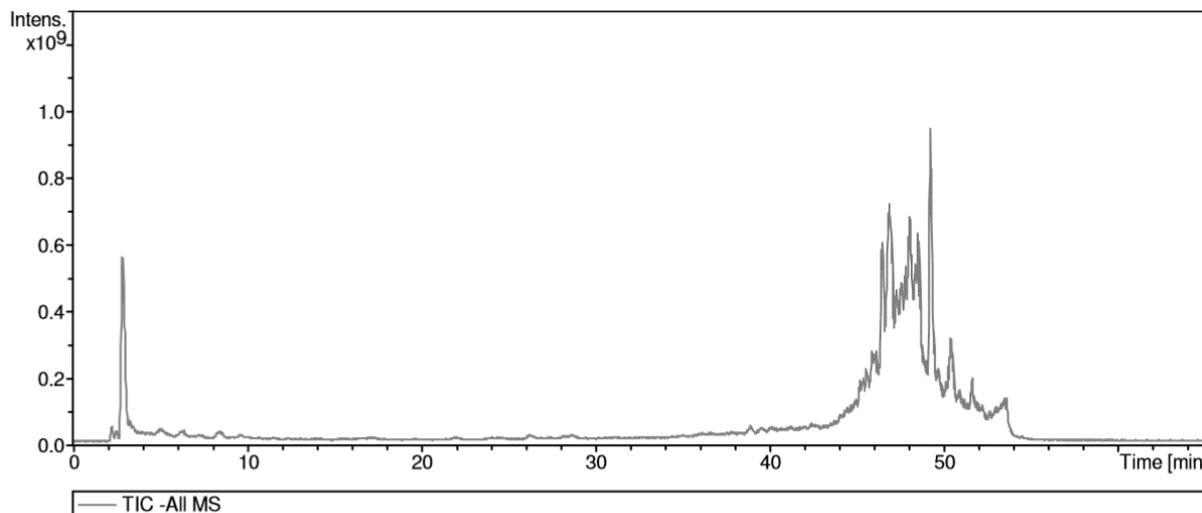


Figura 22 – Cromatograma do extrato obtido por maceração dos frutos de *Hymenaea martiana* no modo negativo.

Íons observados [M-H]<sup>-</sup>:  $m/z$  449,1392,  $t_R=$  26,2 min; [M-H]<sup>-</sup>:  $m/z$  449,1766,  $t_R=$  31,6 min.

Os extratos obtidos por maceração dos frutos de *Hymenaea martiana* apresentou um íon no modo negativo, com  $m/z$  449,1392. Este íon no modo negativo, com tempo de retenção de 26,4 minutos, pode ser atribuído à astilbina, baseado na fragmentação do padrão (figura 16).

No modo negativo, com tempo de retenção de 31,6 minutos, um íon pode ser observado com  $m/z$  449,1766, o que pode ser relacionado à isoastilbina, conforme relatado em estudos anteriores (MARQUES et al., 2007).

De acordo com espectro de massas no modo negativo, com tempo de retenção de 31,6 minutos (Figura 23), ainda pode ser observado um íon com  $m/z$  304,9293, que pode ser relacionado à taxifolina, conforme fragmentação do padrão astilbina (figura 16).

Em um dos espectros de massas, no modo negativo, pode ser observado um íon com  $m/z$  301,2274, que pode ser relacionado à quercetina, substância que ainda não havia sido relatada para a espécie.

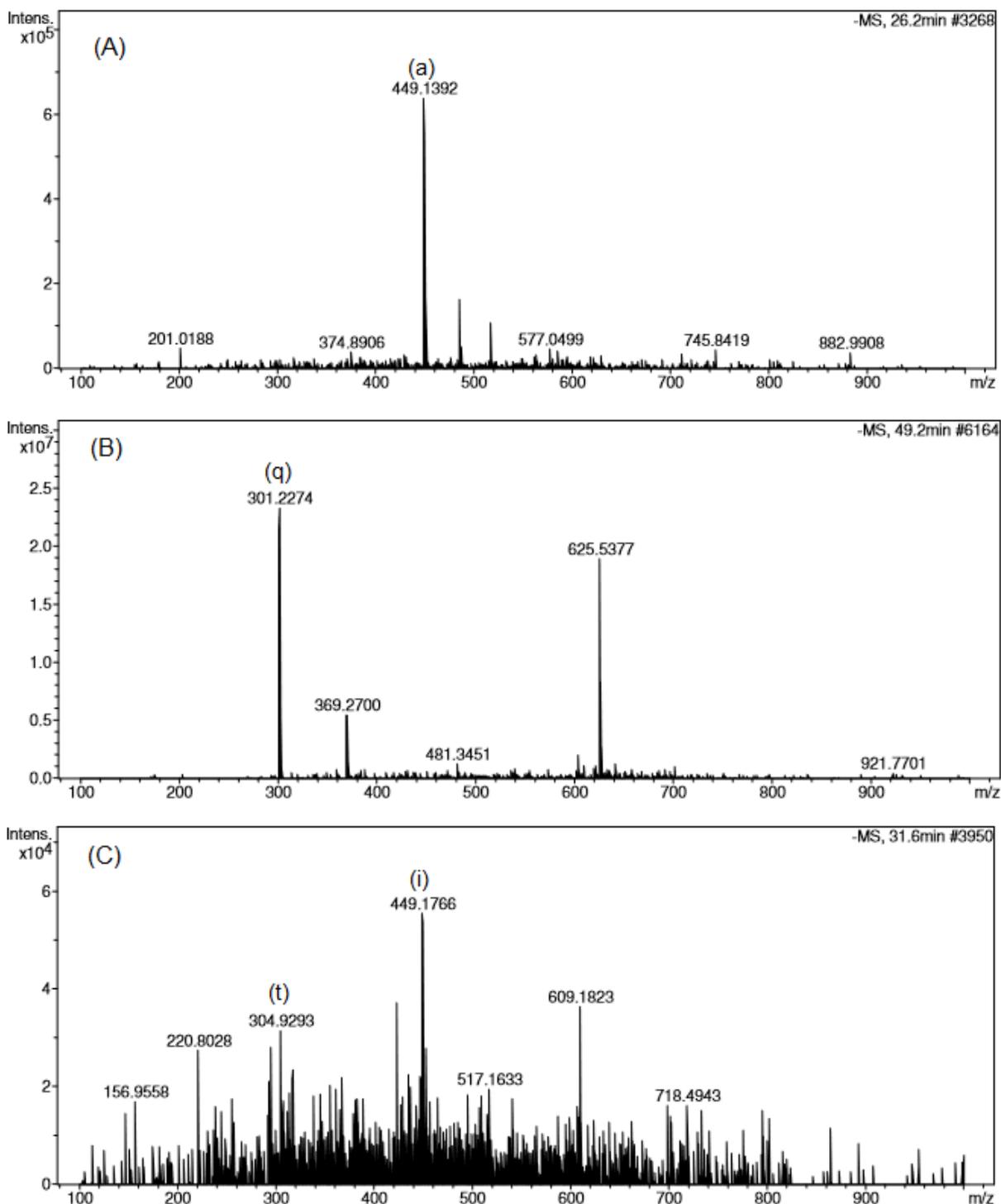


Figura 23 – Espectros de massas, com detecção de astilbina (a) e isoastilbina (i), taxifolina (t) e quercetina (q), no extrato obtido através de maceração dos frutos de *Hymenaea martiana* no modo negativo.

#### 5.1.4.4 Maceração das sementes

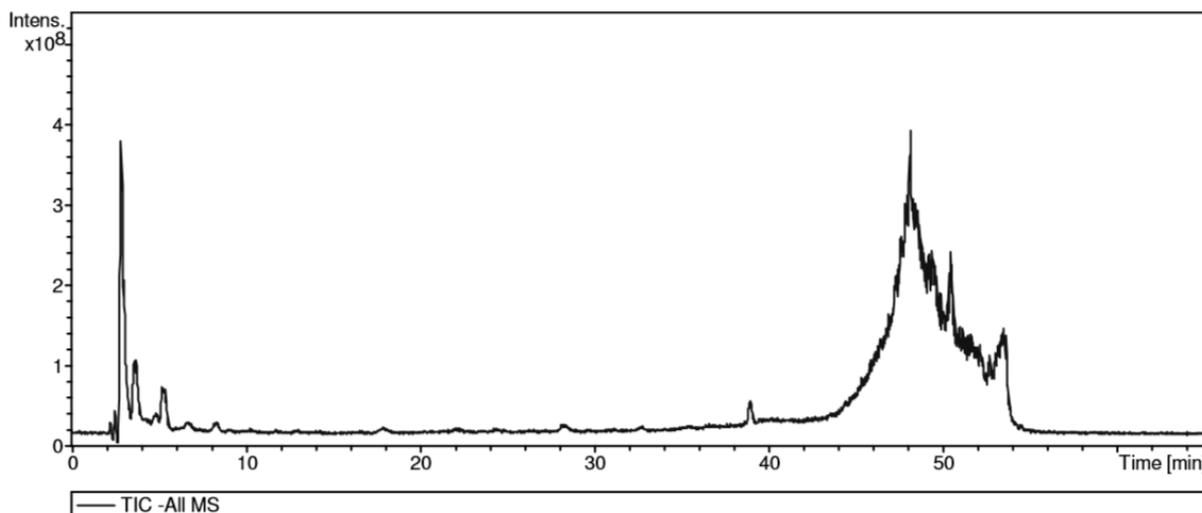


Figura 24 – Cromatograma do extrato obtido por maceração das sementes de *Hymenaea martiana* no modo negativo.

Íon observado [M-H]<sup>-</sup>:  $m/z$  449,0604,  $t_R$  = 38,9 min.

Na maceração das sementes, foi observado um íon no modo negativo com  $m/z$  449,0604, e tempo de retenção de 38,9 minutos (Figura 25).

De forma semelhante ao encontrado na maceração dos frutos, o tempo de retenção apresentado para este íon mostrou-se diferente do apresentado nos espectros de fragmentação do padrão astilbina (figura 16). De acordo com Marques et al. (2007), este íon poderia ser atribuído à isoastilbina, tomando apenas como base o tempo de retenção do estudo.

No modo negativo, pode ser observado um íon com  $m/z$  301,2468, que pode ser atribuído à quercetina, descrita anteriormente em cascas de *Hymenaea stignocarpa* (MARANHÃO et al., 2013).

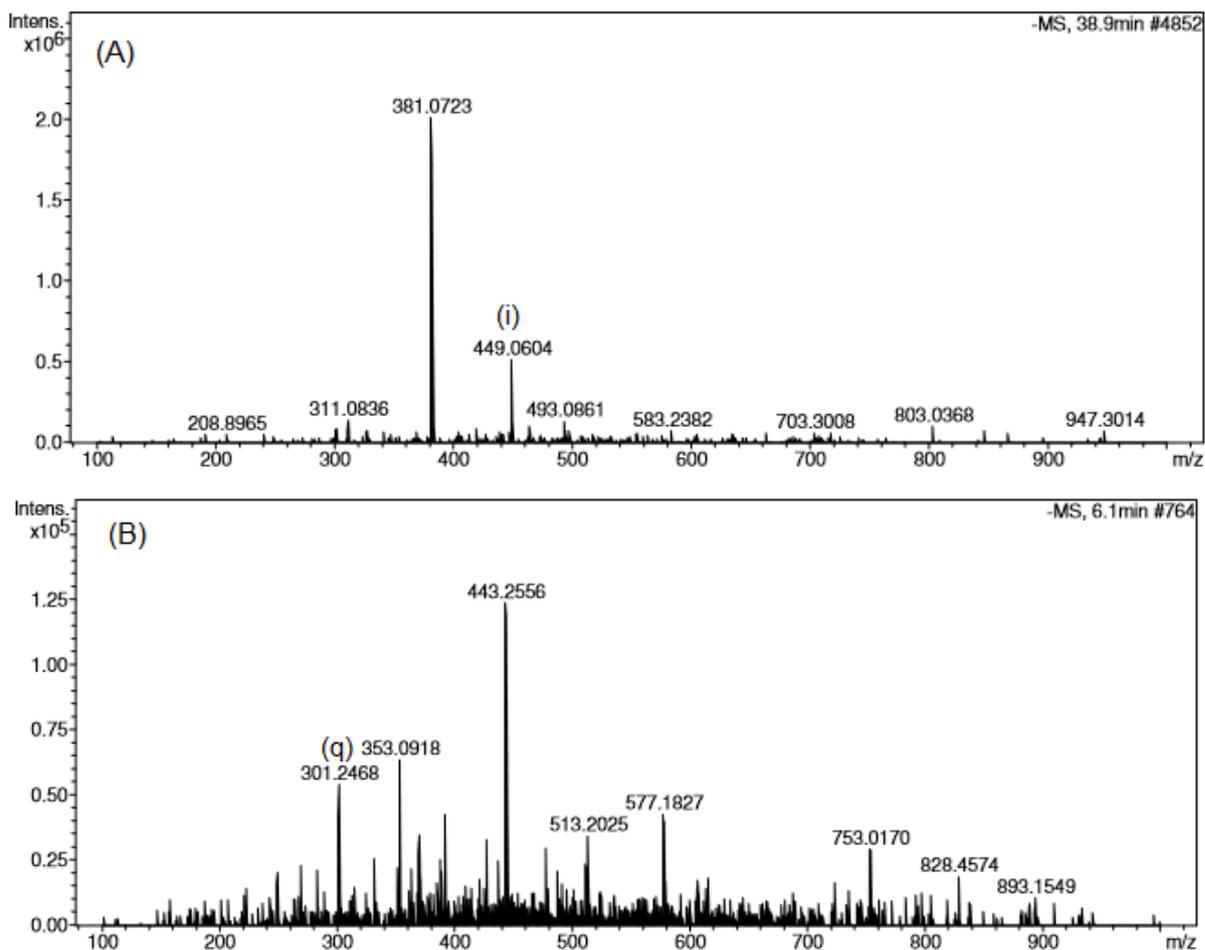


Figura 25 – Espectros de massas, com detecção de isoastilbina (i) e quercetina (q), no extrato obtido através de maceração das sementes de *Hymenaea martiana* no modo negativo.

#### 5.1.4.5 Percolação das cascas

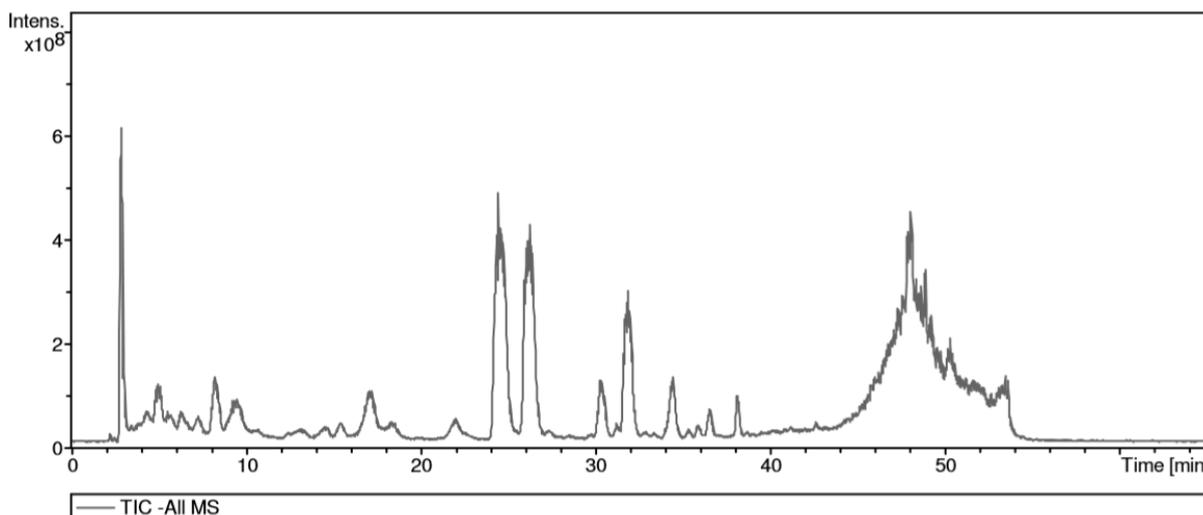


Figura 26 – Cromatograma do extrato obtido por percolação das cascas de *Hymenaea martiana* no modo negativo.

Íons observados [M-H]<sup>-</sup>: m/z 449,1442,  $t_R$ = 24,4 min.

No extrato obtido por percolação com as cascas de *Hymenaea martiana*, o íon observado no modo negativo pode ser atribuídos à astilbina (Figura 27).

A identificação da astilbina neste extrato confirma que a mudança no método extrativo para percolação não apresentou mudança na presença deste composto na amostra, reafirmando a sua potencial utilização como marcador químico da espécie. Com igual importância, a determinação da taxifolina pode corroborar estudos anteriores, visto esta substância foi encontrada em estudos anteriores em *H. martiana* (CECHINEL-FILHO et al., 2000).

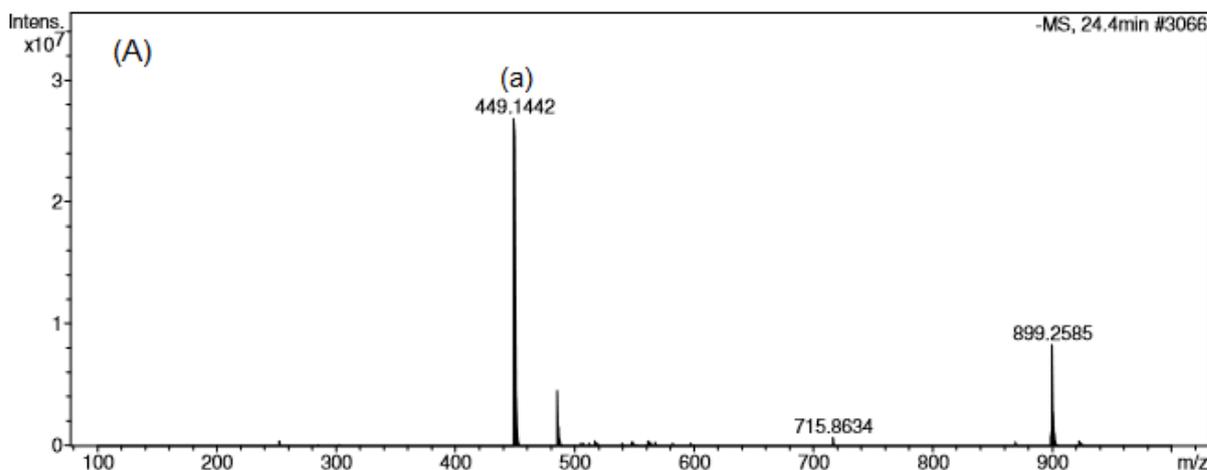


Figura 27 – Espectro de massas, com detecção de astilbina (a) no extrato obtido através de percolação das cascas de *Hymenaea martiana* no modo negativo.

#### 5.1.4.6 Percolação das folhas

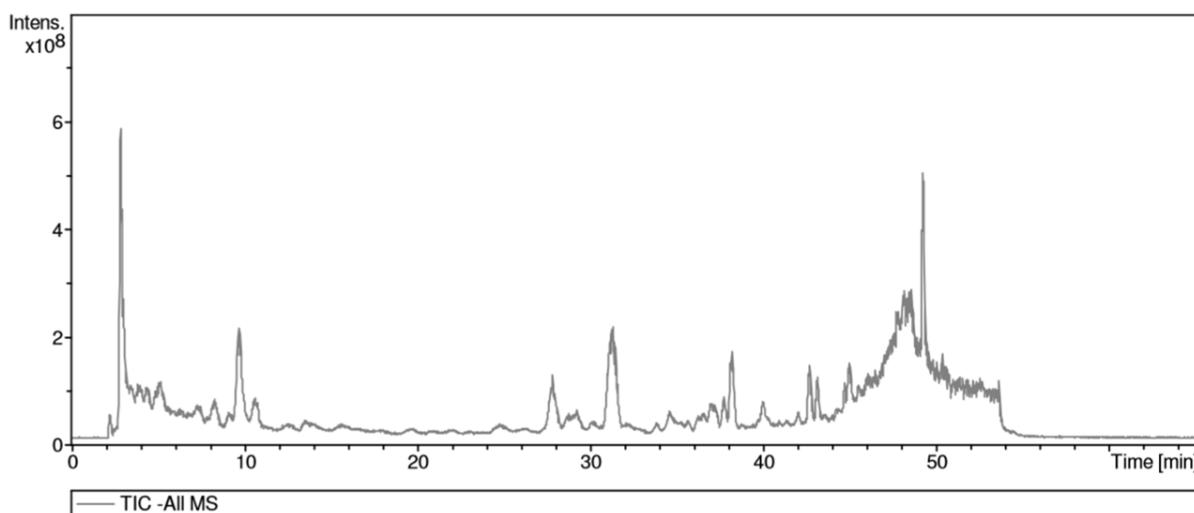


Figura 28 – Cromatograma do extrato obtido por percolação das folhas de *Hymenaea martiana* no modo negativo.

Íons observados  $[M-H]^-$ :  $m/z$  449,1592,  $t_R=$  8,3 min;  $[M-H]^-$ :  $m/z$  449,1840,  $t_R=$  24,3 min (Figura 29).

De forma semelhante que na percolação das cascas, a extração das folhas de *Hymenaea martiana* por este método apresentou íons no espectro de massas que puderam ser atribuídos à astilbina, conforme fragmentação do padrão (Figura 16).

No modo negativo, um íon pode ser observado com  $m/z$  449,1592 e tempo de retenção de 8,3 minutos, que pode ser atribuído à neoastilbina, conforme referência consultada (MARQUES et al., 2007).

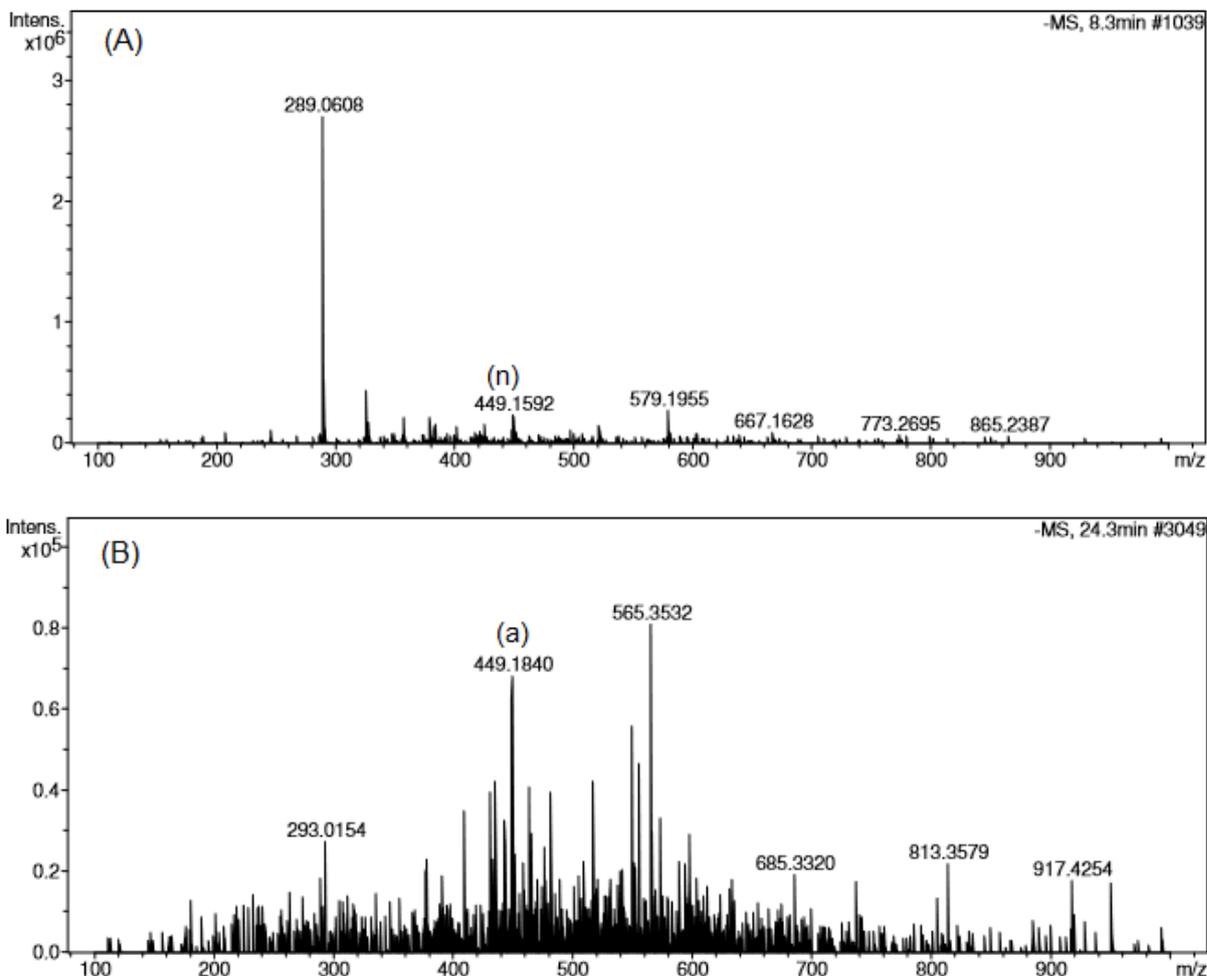


Figura 29 – Espectros de massas, com detecção de neoastilbina (n), astilbina (a), no extrato obtido através de percolação das folhas de *Hymenaea martiana* no modo negativo.

#### 5.1.4.7 Percolação dos frutos

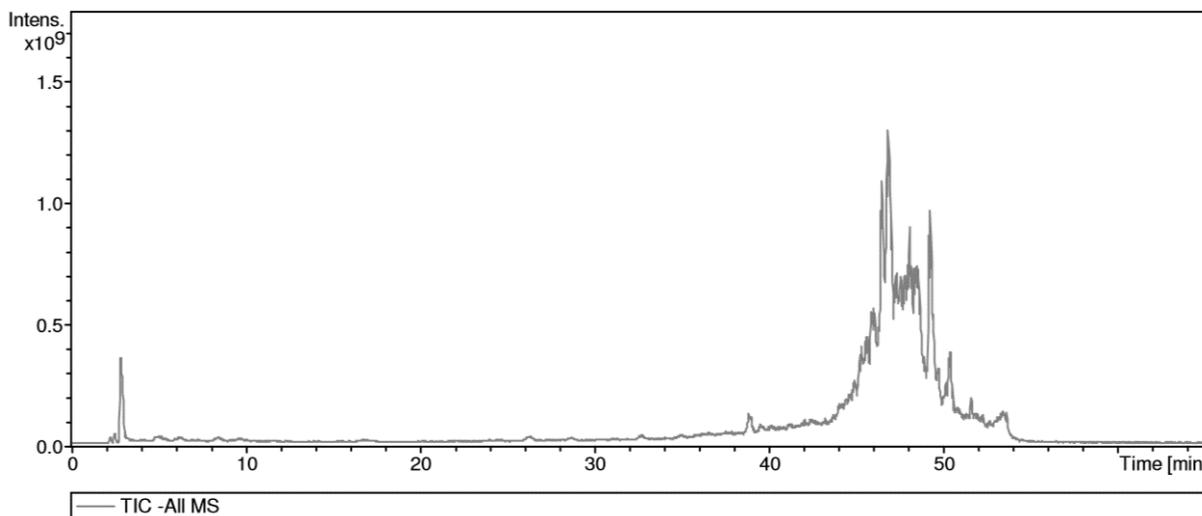
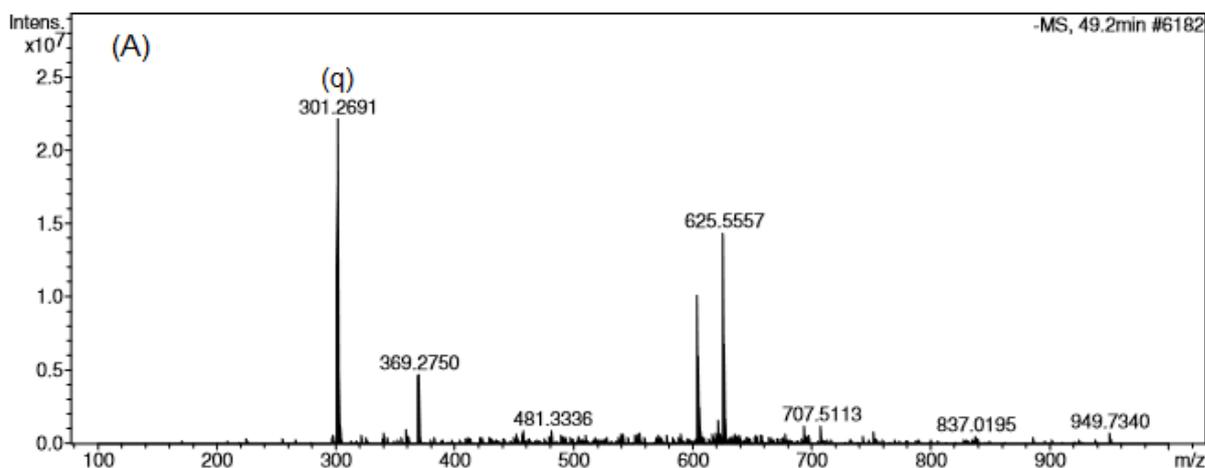


Figura 30 – Cromatograma do extrato obtido por percolação dos frutos de *Hymenaea martiana* no modo negativo.

Íon observado [M-H]<sup>-</sup>:  $m/z$  449,0094,  $t_R$  = 32,7 min.

Com os espectros de massas obtidos com a percolação dos frutos de *Hymenaea martiana*, o íon observado com  $m/z$  449,0094, no modo negativo, o tempo de retenção apresentou-se maior do que o encontrado com o padrão (figura 31), apresentado na figura 16, e pode ser atribuído à isoastilbina (MARQUES et al., 2007).

No modo negativo, um íon com  $m/z$  301,2691 pode ser observado, podendo ser relacionado com a quercetina, substância também encontrada na maceração dos frutos.



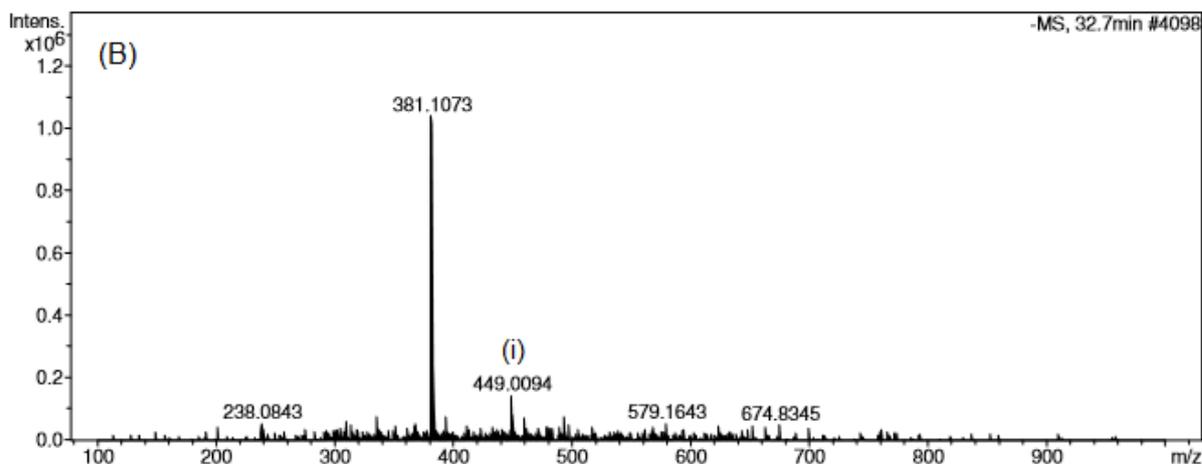


Figura 31 – Espectros de massas, com detecção de neoastilbina (n), isoastilbina (i) no extrato obtido através de percolação dos frutos de *Hymenaea martiana* no modo negativo.

#### 5.1.4.8 Percolação das sementes

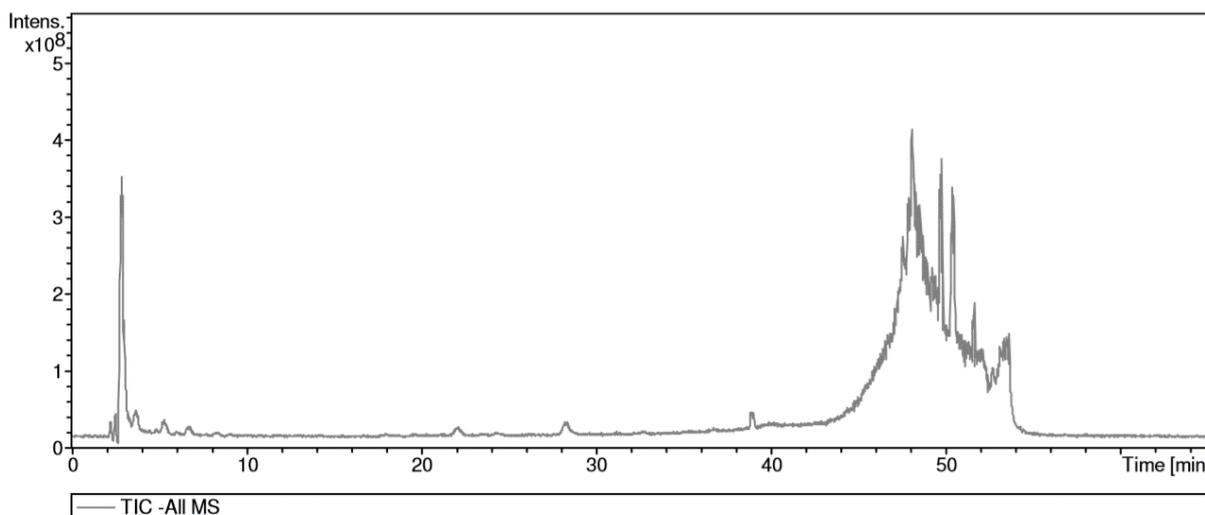


Figura 32 – Cromatograma do extrato obtido por percolação das sementes de *Hymenaea martiana* no modo negativo.

Íon observado  $[M-H]^-$ : 449,0743 m/z,  $t_R = 38,8$  min.

Os íons observados com os espectros de massas dos extratos obtidos com a percolação das sementes de *Hymenaea martiana* estão exibidos na figura 33. O íon com  $m/z$  de 449,0743 no modo negativo, apresenta tempo de retenção de 38,8 minutos, maior do que o tempo de retenção apresentado para a fragmentação do padrão, podendo ser relacionado à isoastilbina (MARQUES et al., 2007).

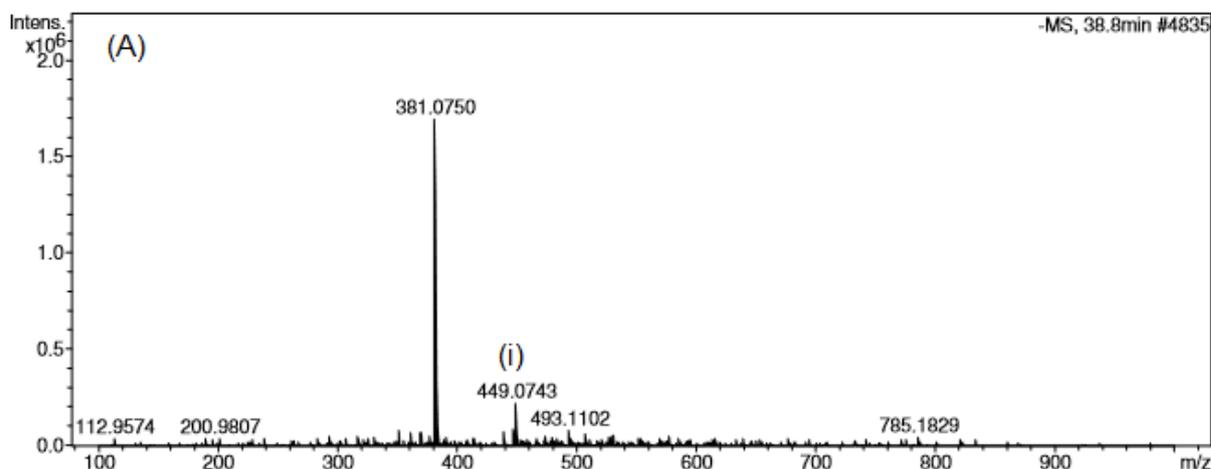


Figura 33 – Espectros de massas, com detecção de isoastilbina (i) no extrato obtido através de percolação das sementes de *Hymenaea martiana* no modo negativo.

#### 5.1.4.9 Ultrassom das cascas

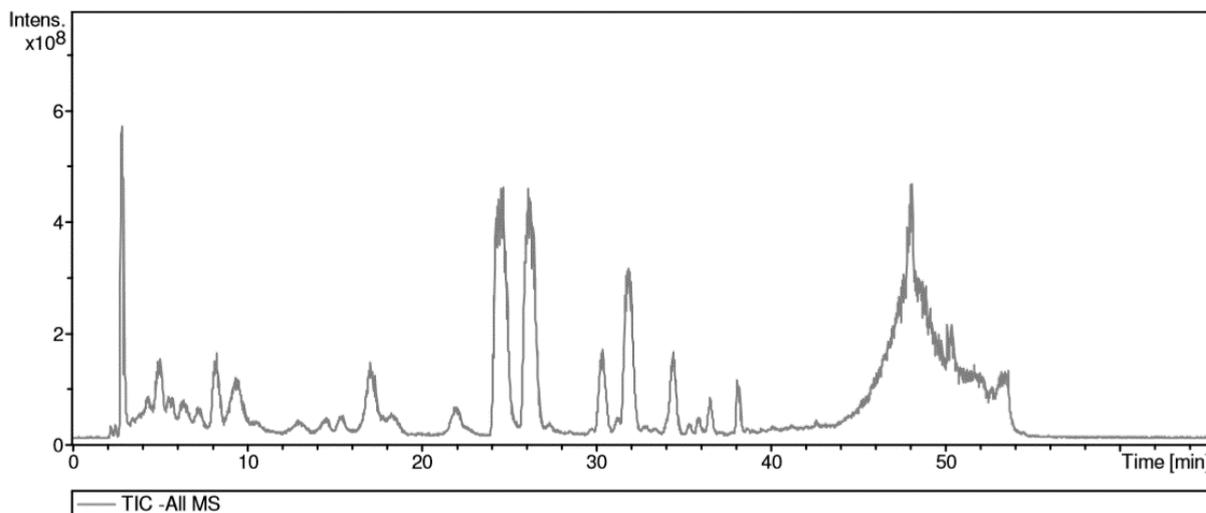


Figura 34 – Cromatograma do extrato obtido por ultrassom das cascas de *Hymenaea martiana* no modo negativo.

Íon observado [M-H]<sup>-</sup>: 449,1138 m/z, t<sub>R</sub>= 24,6 min.

Para a ultrassom das cascas, o tempo de retenção do íon observado encontra-se de acordo com os espectros de fragmentação do padrão (figura 35). Desta forma, este íon pode ser atribuído à astilbina.

Estes dados demonstram que não houve influência na extração da astilbina, e que todos os métodos testados foram eficientes em apresentar, pelo menos qualitativamente, este composto, que em estudos anteriores foi considerado um componente majoritário (MARQUES et al., 2007; CARNEIRO et al., 1993).

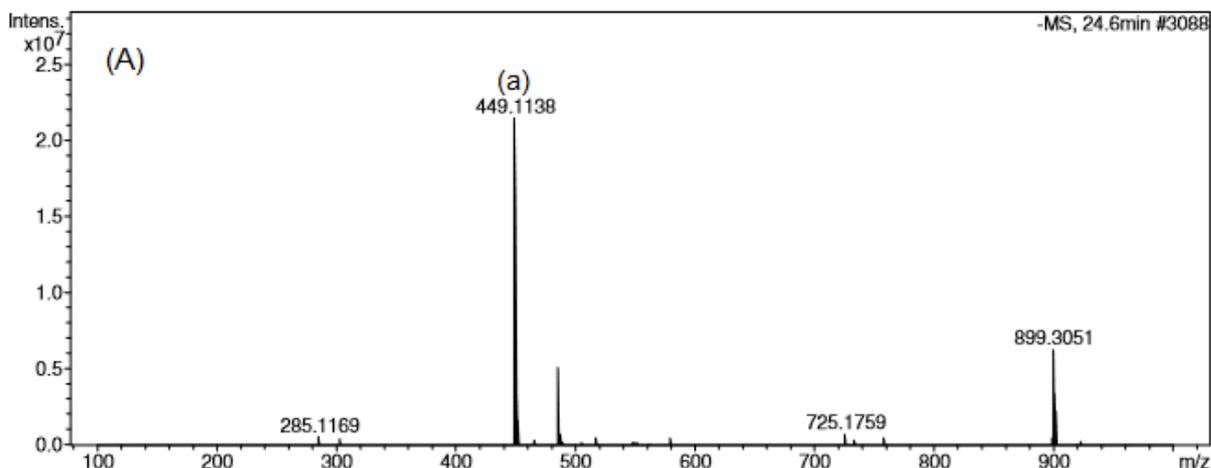


Figura 35 – Espectros de massas, com detecção de astilbina (a) no extrato obtido através de ultrassom das cascas de *Hymenaea martiana* no modo negativo.

#### 5.1.4.10 Ultrassom das folhas

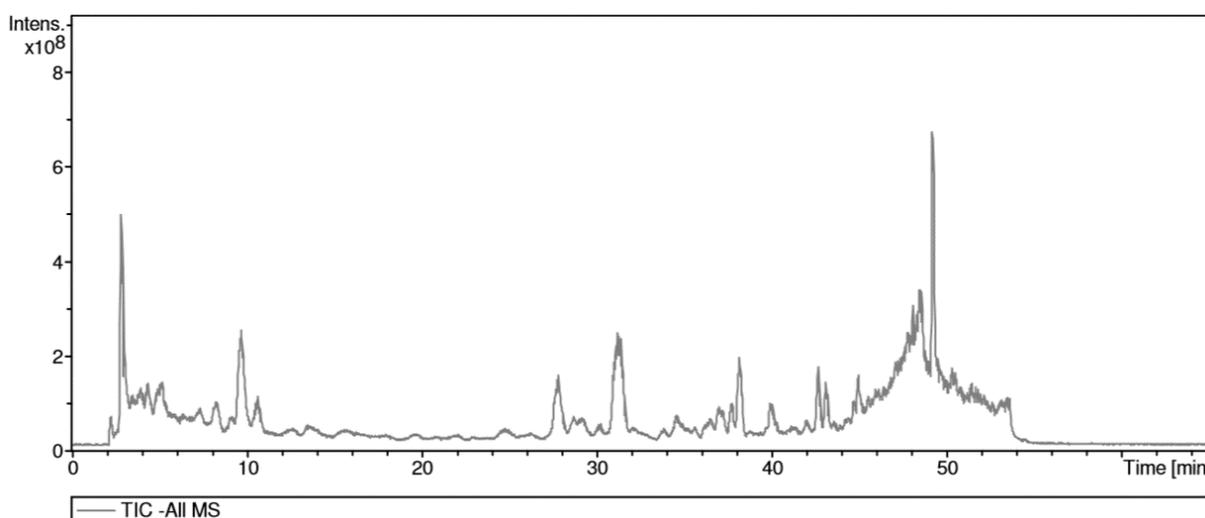


Figura 36 – Cromatograma do extrato obtido por ultrassom das folhas de *Hymenaea martiana* no modo negativo.

Íon observado [M-H]<sup>-</sup>: 449,1956 m/z, t<sub>R</sub>= 8,3 min.

A figura 37 apresenta os espectros de massas obtidos com os extratos preparados através do método de ultrassom com folhas de *Hymenaea martiana*.

O íon observado no modo negativo apresentou tempo de retenção que pode ser atribuído à neoastilbina, conforme Marques et al. (2007).

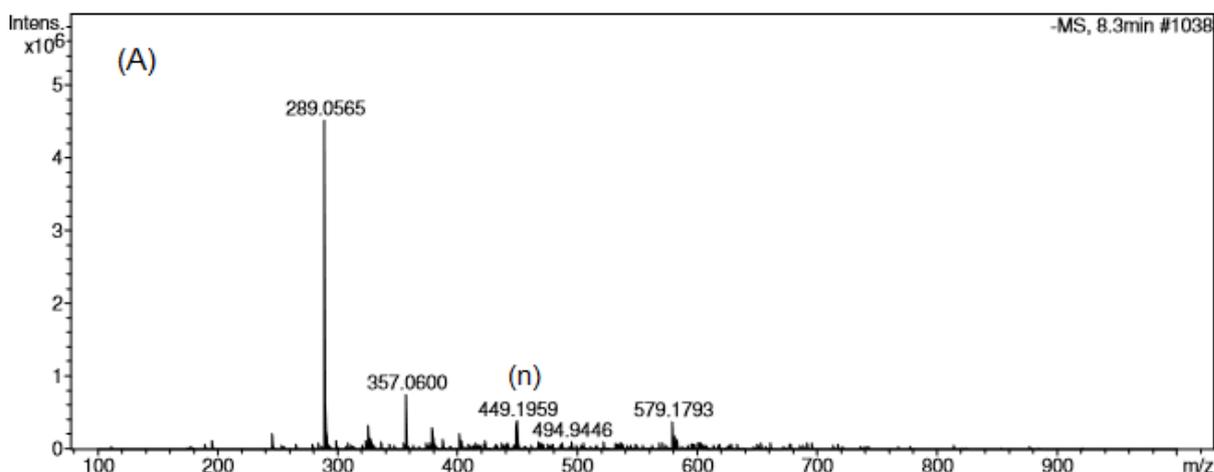


Figura 37 – Espectros de massas, com detecção de neoastilbina (n) no extrato obtido através de ultrassom das folhas de *Hymenaea martiana* no modo negativo.

#### 5.1.4.11 Ultrassom dos frutos

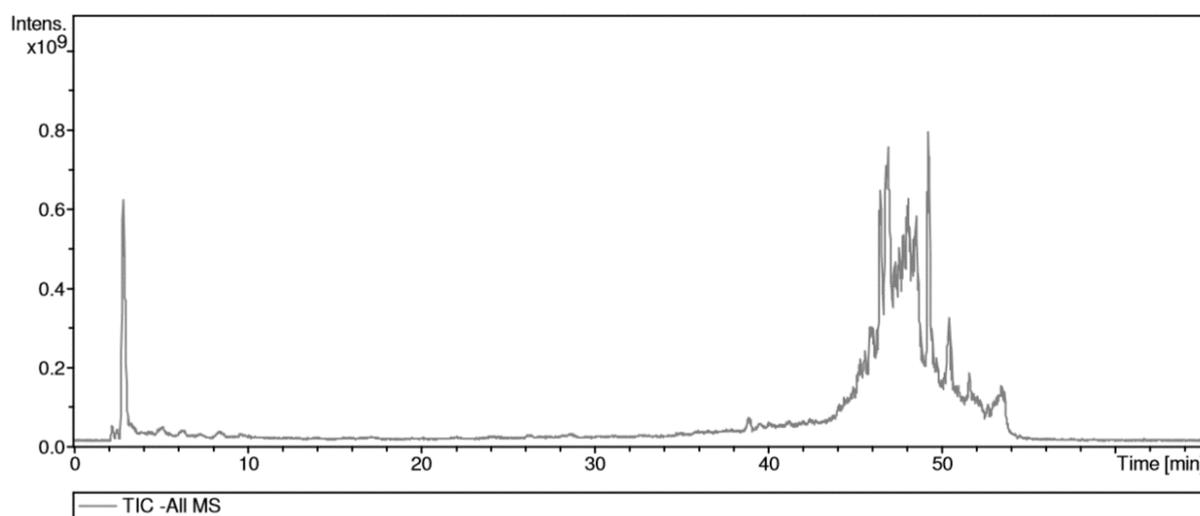


Figura 38 – Cromatograma do extrato obtido por ultrassom dos frutos de *Hymenaea martiana* no modo negativo.

Íon observado [M-H]<sup>-</sup>: 449,1635 m/z, t<sub>R</sub>= 26,2 min.

Os espectros de massas obtidos com os extratos preparados através do método de ultrassom com os frutos de *Hymenaea martiana* são apresentados na figura 39.

O íon observado no modo positivo, apresentou tempo de retenção semelhante ao exibido no espectro de fragmentação do padrão astilbina, podendo ser atribuído a este composto.

Adicionalmente, no espectro de massas obtido no modo negativo, apresentado na figura 25, com tempo de retenção de 26,2 minutos, há um íon com  $m/z$  301,1727, que pode ser sugerida a relação com quercetina, que apresenta massa molecular de 302,2360 Da. Esta informação apresenta relevância, visto que este flavonoide ainda não tinha sido relatado na espécie, e estudos anteriores com plantas do gênero relataram a detecção de quercetina apenas em cascas de *Hymenaea stagnocarpa* (MARANHÃO et al., 2013).

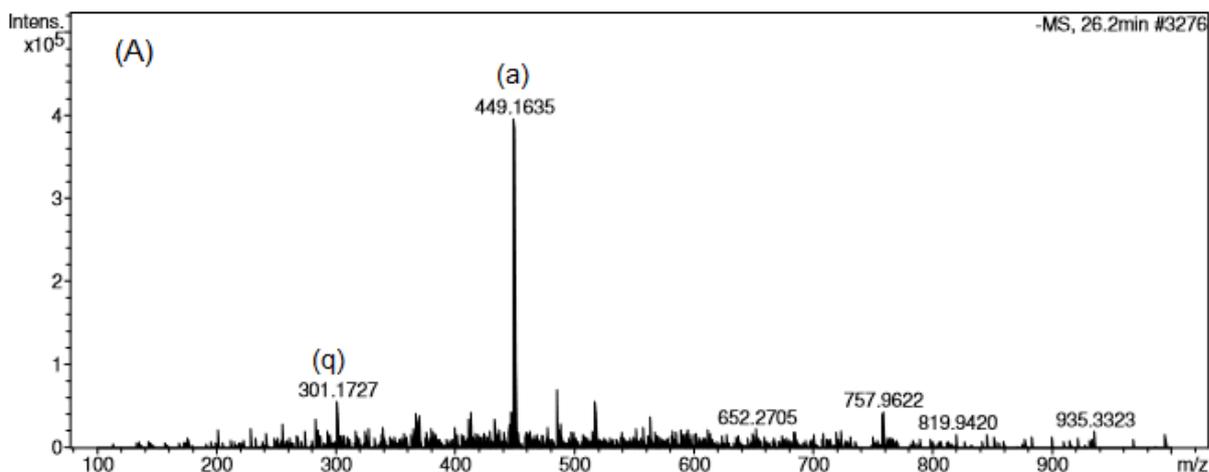


Figura 39 – Espectros de massas, com detecção de astilbina (a) e quercetina (q) no extrato obtido através de ultrassom dos frutos de *Hymenaea martiana* no modo negativo.

#### 5.1.4.12 Ultrassom das sementes

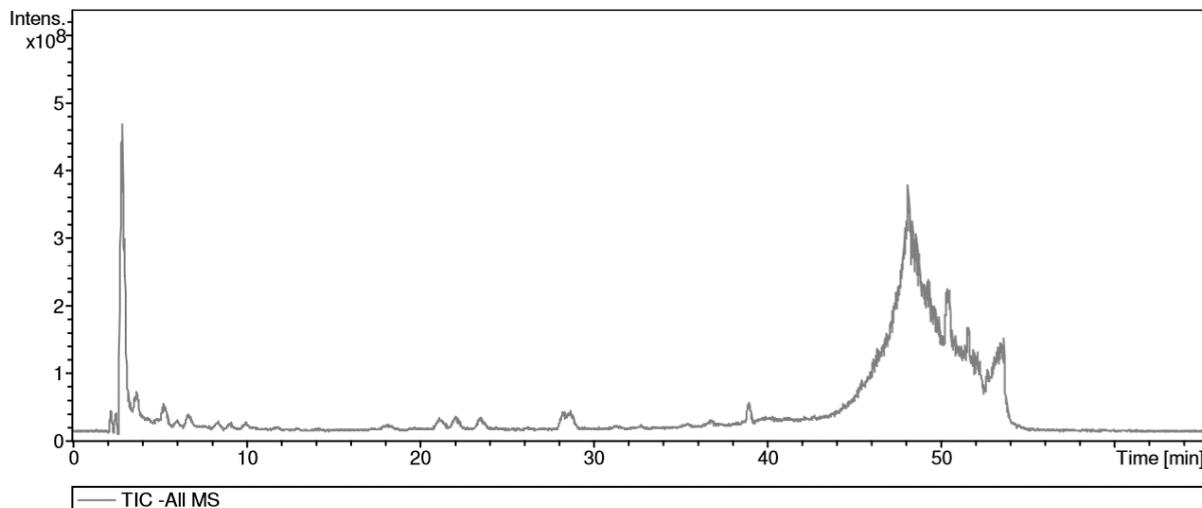


Figura 40 – Cromatograma do extrato obtido por ultrassom das sementes de *Hymenaea martiana* no modo negativo.

Íon observado [M-H]<sup>-</sup>: 449,1459 m/z, t<sub>R</sub>= 24,4 min.

No extrato obtido por ultrassom com as sementes de *Hymenaea martiana*, os íons observados nos espectros de massas (Figura 41) no modo negativo, o íon observado apresentou tempo de retenção semelhante ao apresentado na fragmentação do padrão, podendo ser relacionado à astilbina.

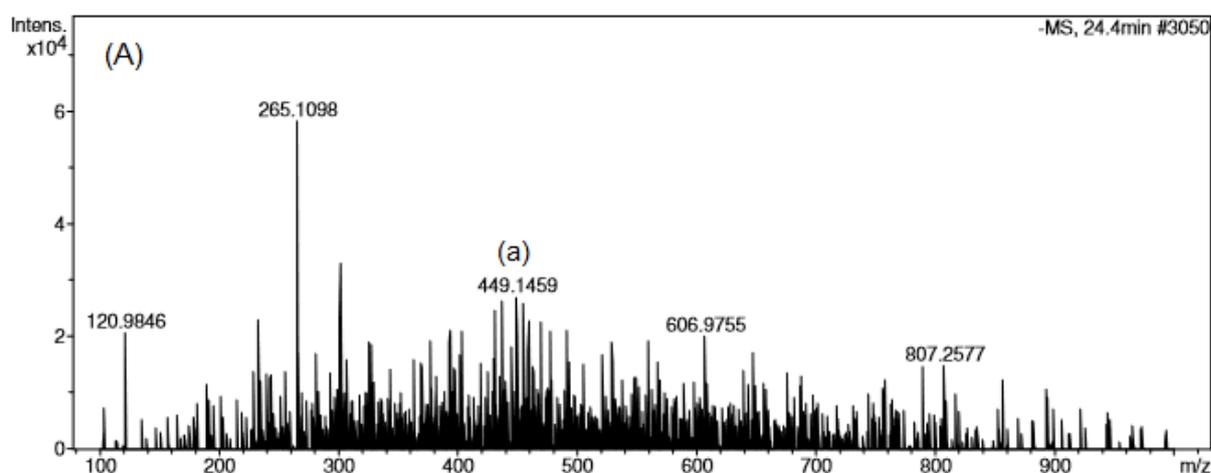


Figura 41 – Espectros de massas, com detecção de astilbina (a) no extrato obtido através de ultrassom das sementes de *Hymenaea martiana* no modo negativo.

A desreplicação desenvolvida com os extratos obtidos através de vários métodos extrativos, utilizando diferentes partes (cascas, folhas, frutos e sementes) de *Hymenaea martiana*, possibilitou evidenciar a influência dos métodos na presença de constituintes químicos importantes. A tabela 12 mostra os dados obtidos por desreplicação de forma resumida.

Flavonoides importantes tiveram sua presença propostas nos extratos estudados. A taxifolina, flavonoide relacionado estruturalmente à astilbina, se mostrou presente nos extratos por maceração, percolação e ultrassom das cascas da espécie estudada. Já em relação às folhas, frutos e sementes de *H. martiana*, apenas o método de maceração apresentou taxifolina como um possível composto. Este fato pode residir em propriedades técnicas específicas do método, como o tempo de contato entre a droga e o solvente ser maior para a maceração, em relação aos demais métodos.

A quercetina, flavonoide de importância terapêutica já conhecida, já foi identificada previamente no gênero *Hymenaea*, em cascas de *Hymenaea stignocarpa* (MARANHÃO et al., 2013), porém até o momento, não foi relatada sua ocorrência na espécie em estudo. A presença deste composto foi proposta para a maceração das cascas e das folhas de *H. martiana*. Todos os métodos extrativos utilizados nos frutos apresentaram quercetina como um possível componente químico, e para as sementes, apenas o método de ultrassom não demonstrou a presença deste composto.

A presença deste composto, bem como a sua devida padronização nos derivados vegetais, pode então servir como base para a sua utilização como um marcador químico da espécie, ou pelo menos da parte vegetal a ser utilizada. Este fato, juntamente com a identificação da taxifolina, corrobora os dados da literatura, e ainda mostra a presença deste flavonoide, que apesar da variação do método extrativo, o mesmo encontra-se presente nas cascas desta espécie, evidenciando o seu potencial uso como marcador quimiotaxonômico.

Estes efeitos na presença destes compostos nos diversos extratos de *Hymenaea martiana* corroboram a importância de estudos mais aprofundados para a determinação estrutural destes flavonoides, visando evidenciar de maneira mais apropriada, com a utilização de técnicas complementares para maior segurança no estudo fitoquímico da espécie, como a ressonância magnética nuclear, por exemplo.

Tabela 12 - Detecção de astilbina em diversas partes vegetais, no modo negativo [M-H].

| Método Extrativo | Droga    | m/z      | t <sub>R</sub> (min) |
|------------------|----------|----------|----------------------|
| Maceração        | Casca    | 449,1126 | 22,4                 |
|                  | Folhas   | 449,2625 | 21,9                 |
|                  | Frutos   | 449,1392 | 26,4                 |
|                  | Sementes | 449,0604 | 38,9                 |
| Percolação       | Casca    | 449,1442 | 24,4                 |
|                  | Folhas   | 449,1840 | 24,3                 |
|                  | Frutos   | 449,0094 | 32,7                 |
|                  | Sementes | 449,0743 | 38,8                 |
| Ultrassom        | Casca    | 449,1138 | 24,6                 |
|                  | Folhas   | 449,1956 | 8,3                  |
|                  | Frutos   | 449,1635 | 26,2                 |
|                  | Sementes | 449,1459 | 24,4                 |

#### 5.1.5 Determinação do teor de compostos fenólicos totais

A determinação de compostos fenólicos totais foi realizada de maneira a complementar a caracterização química dos extratos obtidos. Compostos fenólicos são metabólitos secundários originados de plantas e fungos, sendo constituídos de pelo menos um anel aromático substituído por pelo menos um grupamento hidroxila (SIMÕES et al., 2007). Apresentam diversas atividades biológicas já relatadas, como adstringente, atividade anti-inflamatória, antineoplásica, bacteriostática, antimelanogênica, e atividade antioxidante (HELENO et al., 2015).

A influência do método extrativo no teor de compostos fenólicos está descrita na Tabela 13. Tanto a parte vegetal quanto os diferentes métodos extrativos influenciaram significativamente nos teores ( $p < 0,05$ , ANOVA, Bonferroni, *post hoc*). Não foram detectados teores de compostos fenólicos totais nos extratos dos frutos nem das sementes.

De acordo com os dados, o maior teor de compostos fenólicos foi encontrado na maceração das cascas, com 586,50 mg EAG/g de extrato, teor ainda maior do que encontrado anteriormente em extrato etanólico bruto obtido através do mesmo método nas cascas (ALMEIDA et al., 2012).

A maceração já é um método bastante utilizado para a extração de compostos fenólicos (FONSECA, 2009; SILVA et al., 2014; ALMEIDA et al., 2012; VIOLANTE et al., 2009), e se mostrou eficiente para as cascas de *Hymenaea martiana*. As cascas desta planta são utilizadas para fins medicinais por comunidades tradicionais, e o teor de compostos fenólicos poderia justificar grande parte das atividades relatadas (NEVES et al, 1993; CECHINEL-FILHO et al, in 2000; CARNEIRO et al, 1993; CLOSA et al, 1997; SOUZA et al., 2009; SILVA-JÚNIOR, 2014).

Tabela 13 – Teor de compostos fenólicos totais em extratos de diferentes partes de *Hymenaea martiana*.

| Droga vegetal | Teor de compostos fenólicos (mg EAG/g de extrato) |               |                |
|---------------|---|---------------|----------------|
|               | Maceração   | Percolação    | Ultrassom      |
| Cascas        | 586,50 ± 9,61                                     | 359,28 ± 5,09 | 327,89 ± 16,84 |
| Folhas        | 180,25 ± 7,74                                     | 151,08 ± 5,09 | 116,50 ± 24,88 |
| Frutos        | N.D.  | N.D.          | N.D.           |
| Sementes      | N.D.  | N.D.          | N.D.           |

Legenda: EAG = Equivalentes de Ácido Gálico. N.D. = Não detectado.

#### 5.1.6 Determinação do teor de flavonoides totais

Polifenóis, especialmente os flavonoides, são metabólitos secundários de plantas biossintetizados a partir da via dos fenilpropanoides (SIMÕES et al., 2007) e definidos quimicamente como substâncias compostas por um núcleo comum de fenilcromanona com substituição em uma ou mais hidroxilas, incluindo derivados ligados a açúcares (BIRT et al., 2001).

A interação entre o método extrativo e as partes vegetais no teor de flavonoides totais estão apresentadas na Tabela 14. Não foram significativas as diferenças entre os teores ( $p < 0,05$ , ANOVA, Bonferroni, *post hoc*). A maior concentração de flavonoides totais foi encontrada no método por ultrassom das cascas, com 107,29 mg EQ/g de extrato, seguida da maceração das cascas. Já o método por percolação apresentou os menores resultados. Não foram detectados teores de flavonoides totais nos extratos dos frutos nem das sementes.

O método de extração por ultrassom, conforme descrito anteriormente, é uma técnica rápida e é baseada na formação de ondas ultrassônicas de alta frequência,

que provocam a ruptura na parede celular da matriz vegetal, o que propicia a penetração do solvente e a transferência de massa, podendo então favorecer a extração de determinados compostos.

O teor de flavonoides totais encontrados nos extratos estudados está abaixo do encontrado em estudos anteriores, com teor de  $394,90 \pm 8,43$  mg EC/g (ALMEIDA et al., 2012). Desta forma, pode-se verificar que a diferença entre os métodos de determinação de flavonoides apresentou diferenças no resultado, visto que o estudo anterior foi realizado utilizando a catequina como padrão.

De toda forma, os teores de flavonoides totais encontrados em *Hymenaea martiana* ainda são considerados relevantes, visto que o teor de  $107,29$  mg EQ/g de extrato equivale a aproximadamente 10,73% da amostra.

Tabela 14 - Flavonoides totais em extratos de diferentes partes de *Hymenaea martiana*

| Droga vegetal | Teor de flavonoides totais (mg EQ/g de extrato) |                   |                   |
|---------------|---|-------------------|-------------------|
|               | Maceração                                       | Percolação        | Ultrassom         |
| Cascas        | $106,20 \pm 0,37$                               | $103,85 \pm 1,98$ | $107,29 \pm 0,86$ |
| Folhas        | $100,02 \pm 1,95$                               | $99,97 \pm 2,82$  | $92,48 \pm 3,44$  |

Legenda: EQ = Equivalentes de Quercetina.

#### 5.1.7 Determinação da atividade fotoprotetora in vitro

As varreduras exibiram curvas para cada material vegetal (Figura 42 a 45). Na análise das varreduras realizadas com as cascas de *H. martiana* observou-se absorvância máxima em 285 nm para todos os métodos extrativos, em todas as concentrações. Já na análise das varreduras realizadas com as folhas, observou-se absorvância máxima em 280 nm para os extratos obtidos com os métodos de percolação e ultrassom para todas as concentrações, porém com os extratos obtidos por maceração com este material vegetal, obteve-se absorvância máxima em 280 nm para as concentrações de 5 e 100 mg/L, e as concentrações de 25 e 50 mg/L obtiveram absorvância máxima entre 260 e 285 nm.

Na análise das varreduras realizadas com os frutos, observaram-se absorvâncias máximas entre 260 e 285 nm, demonstrando diferenças entre as absorvâncias máximas dos extratos realizados pelos diferentes métodos. Da mesma

forma, as varreduras realizadas com as sementes demonstraram absorvâncias máximas entre 270 e 285 nm.

As varreduras obtidas com os extratos realizados com todos os materiais vegetais obtiveram absorvâncias máximas entre 260 e 285 nm, comprimentos de onda característicos dos raios UVC. Em dados da literatura (BOBIN et al., 1994), o espectro de absorção dos flavonoides quando dispersos em etanol apresenta-se tipicamente com dois picos, sendo um entre 240 a 280 nm e o outro nos comprimentos de 300 a 550 nm. Ao observar os espectros obtidos dos extratos etanólicos de *Hymenaea martiana*, apenas os extratos obtidos por percolação e ultrassom das sementes apresentou os dois picos característicos. Porém, de acordo com os valores de FPS calculados, os maiores valores encontrados foram nos extratos da casca, na concentração de 100 mg/L, com  $22,52 \pm 3,72$  para a extração por percolação, seguido de  $20,27 \pm 5,21$  para a maceração e  $16,46 \pm 2,08$  para ultrassom, seguidos pela maceração das sementes, na concentração de 50 mg/L, com valor  $10,44 \pm 0,72$ . Alguns autores mostram que as plantas que absorvem na região ultravioleta apresentaram uma complexidade de substâncias, destacando-se metabólitos secundários como compostos fenólicos (VIOLANTE et al., 2009), o que está de acordo com a triagem fitoquímica realizada com os extratos obtidos.

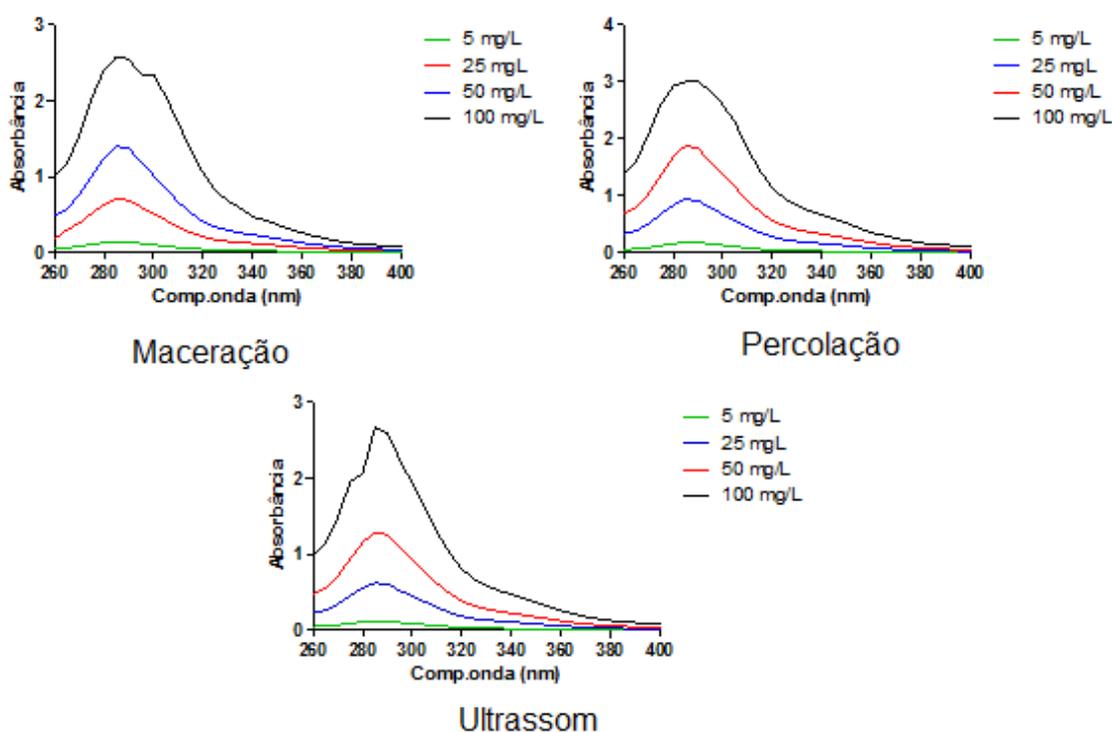


Figura 42 – Varreduras de 260 a 400 nm, dos extratos etanólicos das cascas de *Hymenaea martiana*.

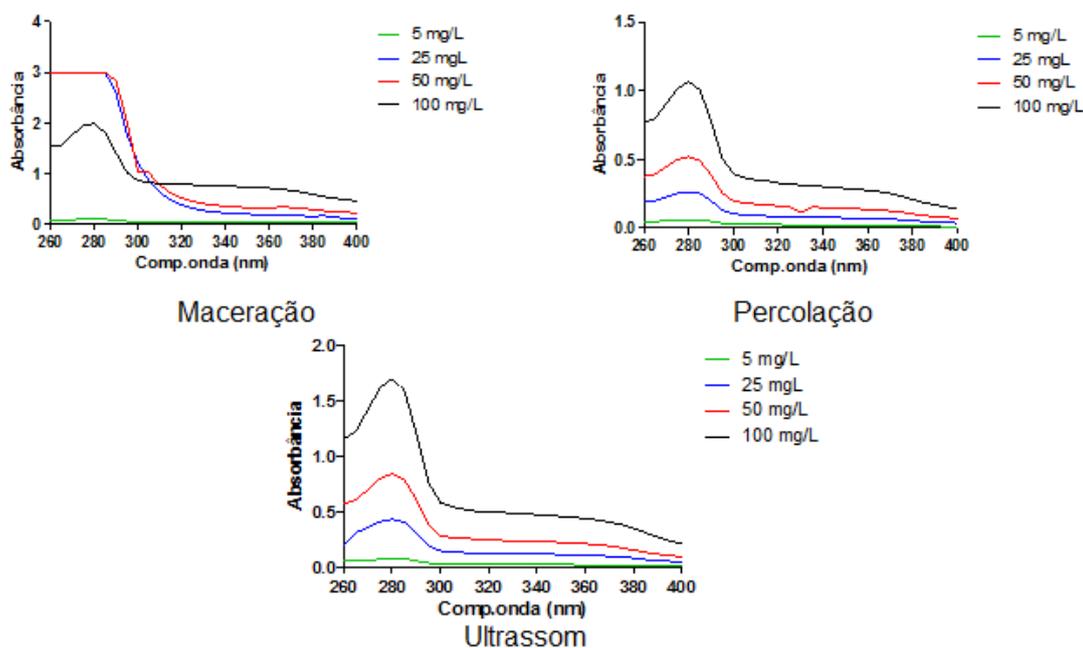


Figura 43 – Varredura de 260 a 400 nm, dos extratos etanólicos brutos de folhas de *Hymenaea martiana*.

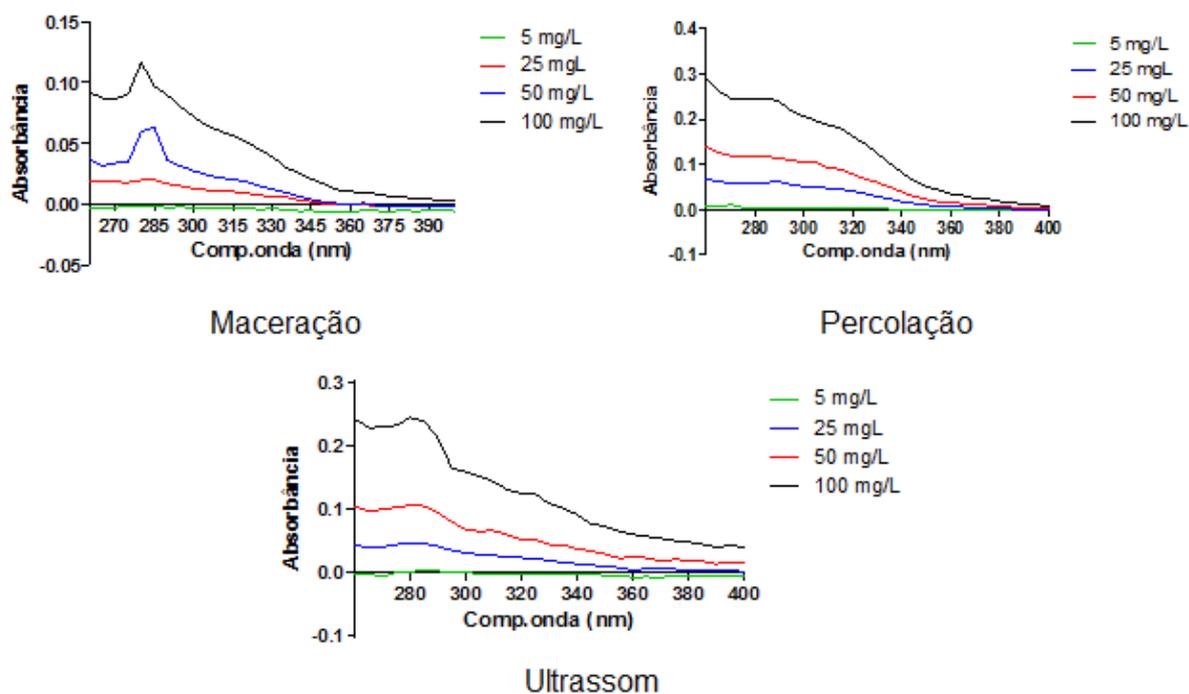


Figura 44 – Varredura de 260 a 400 nm, dos extratos etanólicos brutos de frutos de *Hymenaea martiana*.

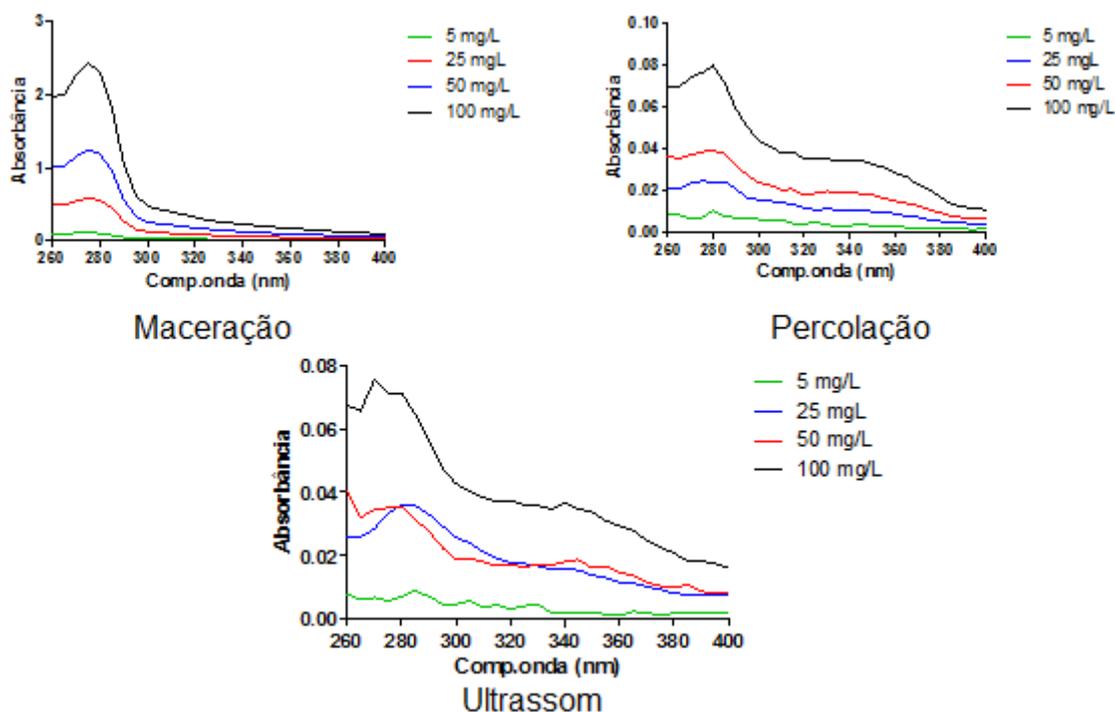


Figura 45 – Varredura de 260 a 400 nm, dos extratos etanólicos brutos de sementes de *Hymenaea martiana*.

Os valores de FPS foram calculados de acordo com Mansur et al. (1986) e são exibidos na Tabela 15. Os extratos realizados com as cascas de *H. martiana* mostraram os maiores valores de FPS dos extratos obtidos com diferentes partes da planta, nas concentrações de 100 mg/L, sendo  $22,52 \pm 3,72$  para o extrato realizado pelo método de percolação,  $20,27 \pm 5,21$  para o método de maceração e  $16,46 \pm 2,08$  para o extrato obtido por ultrassom. Para os extratos preparados com as folhas, o valor de FPS encontrado obteve valores de  $8,50 \pm 3,75$  com o extrato obtido por maceração, seguido pelo extrato obtido por ultrassom, com valor de  $5,72 \pm 1,25$ . Nos extratos obtidos a partir dos frutos, o maior valor obtido foi para a percolação, com  $1,98 \pm 0,70$ . Já os extratos obtidos com as sementes de *H. martiana* obtiveram os maiores valores de FPS com os extratos preparados pelo método de maceração, com valores de  $4,54 \pm 0,11$ . Segundo a ANVISA (BRASIL, 2012b), o valor mínimo para FPS é de 6,0, portanto, os extratos obtidos com as cascas e folhas apresentaram valores adequados para o desenvolvimento futuro de fotoprotetores.

Tabela 15 - Valores de FPS na faixa de UVA (290-320 nm) dos extratos de diferentes partes de *Hymenaea martiana*, na concentração de 100 mg/L.

| <b>Drogas vegetais</b> | <b>Maceração</b> | <b>Percolação</b> | <b>Ultrassom</b> |
|------------------------|------------------|-------------------|------------------|
| Cascas                 | 20,27 ± 5,21     | 22,52 ± 3,72      | 16,46 ± 2,08     |
| Folhas                 | 8,50 ± 3,75      | 3,87 ± 0,28       | 5,72 ± 1,25      |
| Frutos                 | 0,66 ± 0,41      | 1,98 ± 0,70       | 1,51 ± 0,63      |
| Sementes               | 4,54 ± 0,11      | 0,41 ± 0,15       | 0,41 ± 0,20      |

### 5.1.8 Escolha da droga vegetal com melhores resultados

De acordo com os resultados, da mesma forma que na determinação de compostos fenólicos, as cascas de *Hymenaea martiana* apresentaram os maiores teores de flavonoides totais, bem como os resultados para os valores de FPS obtidos. Estes dados indicam esta parte vegetal como a droga vegetal mais apropriada para a extração destas classes de compostos químicos, bem como o futuro desenvolvimento de produtos farmacêuticos e cosméticos.

## 5.2 Caracterização físico-química da droga vegetal escolhida

Para o registro de medicamentos no Brasil, a ANVISA exige a realização de testes que visam garantir a pureza e integridade da droga vegetal, acrescidos da avaliação de solventes e excipientes utilizados na extração do derivado vegetal, relação aproximada da droga : derivado vegetal, além da pureza e integridade do extrato (BRASIL, 2014a).

### 5.2.1 Determinação da granulometria dos pós

Os resultados obtidos com a determinação da granulometria das cascas de *H. martiana* (Figura 46) demonstram que a droga vegetal não apresenta uma distribuição homogênea, e que apresentaram diâmetro médio de 538 µm (Figura 47), representando 43,12% de todo o material.

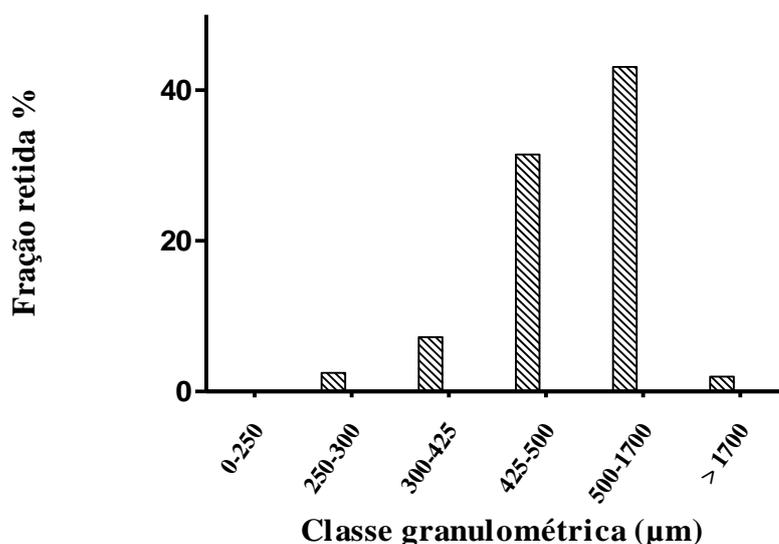


Figura 46 – Histograma de distribuição da granulometria de cascas de *Hymenaea martiana*.

De acordo com a Farmacopeia Brasileira (BRASIL, 2010), o pó das cascas pode ser caracterizado como pó grosso. Devido ao fato de que o tamanho médio das partículas de uma droga vegetal pode influenciar de forma direta a eficiência da extração de metabólitos secundários. Pós grossos ou moderadamente grossos são considerados apropriados, pois partículas muito finas podem aderir a partículas maiores, aumentando a viscosidade do meio e bloqueando a penetração do solvente (MARQUES et al., 2012).

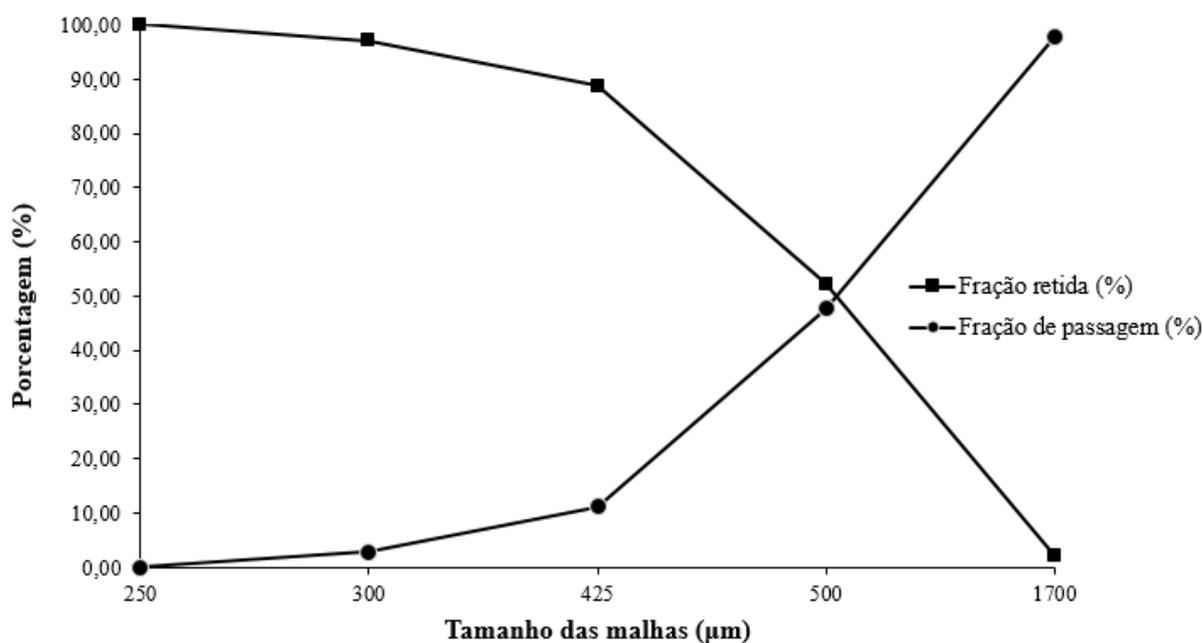


Figura 47 – Curva de retenção e passagem com as cascas de *Hymenaea martiana*.

### 5.2.2 Determinação do índice de espuma

Com o intuito de estimar a presença de saponina na droga vegetal, o índice de espuma (IE) foi avaliado, visando verificar a maior diluição em água que possibilita a formação de espuma com 1 cm. O IE obtido com as cascas foi de 333,33, e este valor foi considerado baixo quando comparados a outras plantas utilizadas como controle positivo em alguns estudos (OLIVEIRA et al., 2011). Apesar de ser um importante teste farmacopéico utilizado para a determinação de saponinas em drogas vegetais, este parâmetro ainda não tinha sido avaliado na planta em estudo, o que traz mais um dado relevante para o controle de qualidade da droga estudada.

### 5.2.3 Determinação da perda por dessecação

Os resultados para perda por dessecação, cinzas totais e sulfatadas, pH em solução aquosa e densidade aparente não compactada estão mostrados na Tabela 16.

A determinação do parâmetro perda por dessecação constitui importante passo para avaliar a qualidade de matérias-primas vegetais, pois teor de umidade acima do especificado possibilitaram o desenvolvimento de microrganismos, bem como atividade enzimática e hidrólise, com a possibilidade de deteriorização dos compostos químicos (BARNI et al., 2009).

Tabela 16 - Análise físico-química das cascas de *Hymenaea martiana*.

| <b>Parâmetros</b>                | <b>Resultados</b> |
|----------------------------------|-------------------|
| Diâmetro médio ( $\mu\text{m}$ ) | $538 \pm 1,00$    |
| Perda por dessecação (%)         | $8,50 \pm 1,16$   |
| Cinzas totais (%)                | $6,58 \pm 0,03$   |
| Cinzas sulfatadas (%)            | $9,16 \pm 0,05$   |
| pH em solução aquosa             | $5,66 \pm 0,33$   |

Densidade aparente não compactada (mg/mL)

0,45 ± 0,005

---

#### 5.2.4 Determinação de cinzas totais e sulfatadas

De acordo com a Farmacopeia Brasileira, o teor de cinzas totais e sulfadas consiste no resíduo não volátil obtido por incineração, na presença e ausência de ácido sulfúrico. Esta avaliação visa determinar o teor de impurezas inorgânicas e constituintes contidos em substâncias orgânicas. O tratamento prévio da amostra com ácido sulfúrico é recomendado para promover maior reprodutibilidade do método (HARTKE, 1986). As cascas de *Hymenaea martiana* apresentaram teor de cinzas totais e sulfatadas abaixo do especificado no compêndio para outras drogas vegetais (8 - 14%).

#### 5.2.5 Determinação do pH em solução aquosa

A determinação de pH em drogas vegetais consiste em uma informação importante sobre a natureza das moléculas presentes na solução, bem como traz informações relevantes relacionadas à estabilidade dos constituintes químicos. Neste estudo, o pH em solução aquosa das cascas de *Hymenaea martiana* estão de acordo com o esperado, sendo a solução aquosa caracterizada como ácida, e seus compostos terapêuticos já relatados relacionados às suas atividades farmacêuticas são compostos fenólicos, especificamente da classe dos flavonoides. Esta classe de metabólitos secundários apresenta caráter de ácidos fracos, o que está de acordo com o resultado obtido (BARREIROS et al., 2006).

#### 5.2.6 Determinação da densidade aparente não compactada

A densidade aparente não compactada consiste em importante parâmetro para o controle do processo de extração em matérias-primas vegetais, o que pode ser utilizado como base para predições sobre as propriedades de compactação e enchimento, assim como pode revelar informações importantes sobre o processo de secagem de extratos vegetais (FONSECA, 2009). De acordo com Prista et al. (1996), os valores de densidade aparente para certas preparações vegetais pode variar entre 0,87 e 0,98 mg/mL, podendo este valor apresentar-se de forma diferente, dependendo

do material e da espécie estudada. Enquanto não há parâmetros oficiais para a espécie em estudo, os valores encontrados podem ser considerados adequados.

#### 5.2.7 Ensaio limite para metais pesados

A determinação de metais pesados em drogas vegetais constitui exigência sanitária presente na legislação brasileira (BRASIL, 2014a). Os limites estabelecidos para metais pesados, bem como os resultados das análises estão expressos na tabela 16.

A análise de metais pesados, através do método semi-quantitativo, consiste na formação de partículas sólidas de sulfetos de metais pesados em suspensão, e a comparação visual da intensidade da coloração das soluções padrão e amostra, representando a soma de contaminantes na amostra. Para as cascas de *Hymenaea martiana*, o teste semi-quantitativo foi satisfatório, sendo aprovado no teste de metais pesados (resultado abaixo de 10 ppm).

Entretanto, na análise de metais pesados realizada em equipamento de espectrometria atômica (ICP), a concentração de mercúrio nas cascas da espécie em estudo foi acima do limite especificado para uso oral (Tabela 17), descrito pela Farmacopeia Brasileira (BRASIL, 2010). A contaminação de plantas por metais pesados pode ter diversas origens, como acidental, proposital, contaminação do solo com materiais de origem natural ou mineral, ou durante a manufatura (VEIGA-JÚNIOR et al., 2005). A proximidade de rodovias, bem como a qualidade da água que pode ser alterada por poluentes, e conseqüentemente conduzidas pela chuva, também podem afetar as plantas (FREIRE, 2005). O compêndio brasileiro apresenta especificações de metais pesados para uso oral e parenteral. O limite especificado para mercúrio em produtos tópicos é relatado na Farmacopeia Americana (United States Pharmacopoeia), sendo recomendados 15 ppm. Desta forma, a droga vegetal preparada com as cascas de *Hymenaea martiana* poderia ser utilizada em produtos tópicos, como cremes, pomadas e cosméticos (EUA, 2013).

A análise obtida por espectrometria atômica também determinou a concentração de ferro contido nas cascas da espécie em estudo, com  $32,280 \pm 0,402$  ppm. Este dado pode, adicionalmente, justificar o uso farmacológico das cascas desta e de outras espécies do gênero, citada para o tratamento de anemia, tendo em vista que as cascas de espécies de *Hymenaea* também são utilizadas na medicina popular

como tonificante, fortificante, energizante, restaurador da força orgânica e da produção de sangue, e no combate de fraqueza em crianças (MENDES; CARLINI, 2007; BARRET, 1994; ANSELMO et al., 2012; AGRA et al., 2007; ALBUQUERQUE et al., 2007).

Tabela 17 - Análise de metais pesados em cascas de *Hymenaea martiana*.

| Elementos | Limite máximo para uso oral<br>(ppm)* | Droga vegetal<br>(Cascas) |
|-----------|---------------------------------------|---------------------------|
| As        | 1,5                                   | 0,600 ± 0,0255            |
| Cd        | 0,5                                   | N.D.                      |
| Cu        | 250                                   | 1,649 ± 0,0197            |
| Hg        | 1,5                                   | 7,654 ± 0,3389            |
| Mg        | 250                                   | 45,610 ± 0,535            |
| Mo        | 25                                    | N.D.                      |
| Pb        | 1,0                                   | 0,470 ± 0,0399            |

Legenda: N.D.: Não detectado. \*Fonte: BRASIL, 2010.

### 5.3 Avaliação do método extrativo para as cascas de *Hymenaea martiana*

Com o intuito de avaliar a influência de alguns fatores na extração de compostos fenólicos das cascas de *Hymenaea martiana*, um planejamento fatorial 2<sup>2</sup> foi elaborado, elegendo dois fatores que foram considerados relevantes na extração de compostos fenólicos na droga vegetal escolhida. O planejamento fatorial facilita a organização e execução de experimentos, podendo ainda diminuir o número de amostras, viabilizando a análise (FONSECA, 2009).

Os fatores escolhidos foram a relação droga:solvente e a concentração da solução hidroalcoólica. A resposta consistiu no rendimento de extração, calculado com a relação entre o peso da droga vegetal a ser extraída e o peso do derivado vegetal obtido; no teor de compostos fenólicos totais, expressos em mg de EAG/g de extrato e no teor de flavonoides totais, expressos em mg de EQ/g de extrato.

A solubilidade dos constituintes químicos de interesse na planta medicinal é fator importante para a decisão a respeito do solvente ou mistura de solventes a serem

utilizados na extração (PRISTA et al., 2003). Compostos fenólicos apresentam caráter polar, e os solventes que foram mais eficientes para a extração destes compostos foram misturas hidroalcoólicas, preparadas com metanol e etanol, sendo este último preferido, pois é considerado mais seguro e de baixa toxicidade (RODRIGUEZ-ROJO et al., 2012; SPAGOLLA et al., 2009; CAVALHEIRO, 2013). Diante desse contexto, a concentração da solução hidroalcoólica foi utilizada como fator a ser analisados pelo planejamento fatorial, e foi considerada como ponto superior à concentração de 70%, como ponto central a concentração de 60% e como ponto inferior a concentração de 50%.

Os resultados para as análises realizadas de acordo com o planejamento fatorial para o método extrativo maceração estão apresentados na Tabela 18. De acordo com a tabela, o tratamento com melhor rendimento é o ensaio 1, utilizando relação droga:solvente 1:10 e solução hidroalcoólica a 50%, com rendimento de 12,55%. Já o ensaio 2 apresentou o melhor teor de compostos fenólicos, com 732,33 mg de EAG/g de extrato, com proporção 3:10 e solução hidroalcoólica a 50%. O ensaio 4 apresentou maior teor de flavonoides totais, com 378,44 mg de EQ/g de extrato, com proporção 3:10 e solução hidroalcoólica a 70%.

### 5.3.1 Maceração

#### 5.3.1.1 Cálculo do rendimento de extração

De acordo com a análise de variância (ANOVA), para o resultado de rendimento, foi verificada influência apenas da concentração da solução hidroalcoólica nos resultados ( $p < 0,05$ ) (Tabela 19). Tanto para o teor de compostos fenólicos quanto o teor de flavonoides totais, a variância entre os resultados para os fatores analisados não foi significativa, de acordo com a análise estatística (Tabela 20 e 21).

Tabela 18 – Resultados das análises com os extratos obtidos com as cascas, através do método maceração.

| Ensaio | Condições              |                            | Rendimento (%) | T.C.F.T (mg EAG/g) | T.F.T (mg EQ/g) |
|--------|------------------------|----------------------------|----------------|--------------------|-----------------|
|        | Relação droga:solvente | Solução hidroalcoólica (%) |                |                    |                 |

|   |      |    |       |        |        |
|---|------|----|-------|--------|--------|
| 1 | 1:10 | 50 | 12,55 | 700,38 | 307,73 |
| 2 | 3:10 | 50 | 11,19 | 732,33 | 324,83 |
| 3 | 1:10 | 70 | 2,96  | 652,88 | 337,95 |
| 4 | 3:10 | 70 | 3,20  | 495,94 | 378,44 |
| 5 | 2:10 | 60 | 9,19  | 372,88 | 332,81 |
| 6 | 2:10 | 60 | 10,26 | 400,11 | 317,73 |
| 7 | 2:10 | 60 | 9,52  | 494,00 | 310,24 |

Legenda: T.C.F.T = Teor de compostos fenólicos totais; T.F.T = Teor de flavonoides totais; EAG = Equivalentes de ácido gálico; EQ = Equivalentes de Quercetina.

Tabela 19 – Análise de variância (ANOVA) da influência das condições do método extrativo maceração no rendimento dos extratos.

| Fontes de variação                                  | SQ       | GL | MS       | F        | p-valor   |
|---|----------|----|----------|----------|-----------|
| Solução hidroalcoólica (%)                          | 77,26410 | 1  | 77,26410 | 26,46061 | 0,014237* |
| Relação droga: solvente                             | 0,31360  | 1  | 0,31360  | 0,10740  | 0,764664  |
| Solução hidroalcoólica x<br>Relação droga: solvente | 0,64000  | 1  | 0,64000  | 0,21918  | 0,671580  |
| Erro  | 8,75990  | 3  | 2,91997  | -        | -         |
| Total   | 86,97760 | 6  | -        | -        | -         |

Legenda: \*p<0,05; SQ: Soma dos quadrados; GL: Grau de liberdade; MS: Quadrado médio; F: Estatística F; p-valor: probabilidade exata.

Tabela 20 – Análise de variância (ANOVA) da influência das condições do método extrativo maceração no teor de compostos fenólicos dos extratos.

| Fontes de variação | SQ | GL | MS | F | p-valor |
|--------------------|----|----|----|---|---------|
|--------------------|----|----|----|---|---------|

|   |          |   |          |          |          |
|---|----------|---|----------|----------|----------|
| Solução hidroalcoólica (%)                          | 20148,4  | 1 | 20148,38 | 0,647404 | 0,479900 |
| Relação droga: solvente                             | 3905,6   | 1 | 3905,63  | 0,125495 | 0,746587 |
| Solução hidroalcoólica x<br>Relação droga: solvente | 8919,9   | 1 | 8919,86  | 0,286611 | 0,629543 |
| Erro  | 93365,5  | 3 | 31121,83 | -        | -        |
| Total   | 126339,3 | 6 | -        | -        | -        |

Legenda: SQ: Soma dos quadrados; GL: Grau de liberdade; MS: Quadrado médio; F: Estatística F; *p*-valor: probabilidade exata.

Tabela 21 – Análise de variância (ANOVA) da influência das condições do método extrativo maceração no teor de flavonoides dos extratos.

| Fontes de variação                                  | SQ       | GL | MS       | F           | <i>p</i> -valor |
|---|----------|----|----------|-------------|-----------------|
| Solução hidroalcoólica (%)                          | 1756,867 | 1  | 1756,867 | 6,94943315  | 0,077911        |
| Relação droga: solvente                             | 829,1520 | 1  | 829,152  | 3,27977919  | 0,167820        |
| Solução hidroalcoólica x<br>Relação droga: solvente | 136,7730 | 1  | 136,7730 | 0,541016977 | 0,515299        |
| Erro  | 758,4218 | 3  | 252,807  | -           | -               |
| Total   | 3481,214 | 6  | -        | -           | -               |

Legenda: SQ: Soma dos quadrados; GL: Grau de liberdade; MS: Quadrado médio; F: Estatística F; *p*-valor: probabilidade exata.

Os dados apresentados na análise estatística são corroborados pelo gráfico de superfície de resposta para o resultado de rendimento (Figura 48). O gráfico mostra que ao diminuir os níveis dos fatores empregados, há aumento no rendimento. Isto

quer dizer que a correlação é positiva para os níveis inferiores dos fatores empregados (proporção droga:solvente 1:10 e concentração da solução hidroalcoólica 50%).

Na aplicação do método extrativo maceração, o solvente entra em contato com a droga vegetal, viabilizando a dissolução dos compostos no solvente empregado. Como não há renovação do solvente de forma contínua, a solução torna-se saturada (PRISTA et al., 2003). Devido a este fato, a utilização das menores proporções, bem as menores concentrações de álcool viabilizam uma melhor dissolução e melhor contato entre o solvente e a droga vegetal, provocando um aumento no rendimento encontrado.

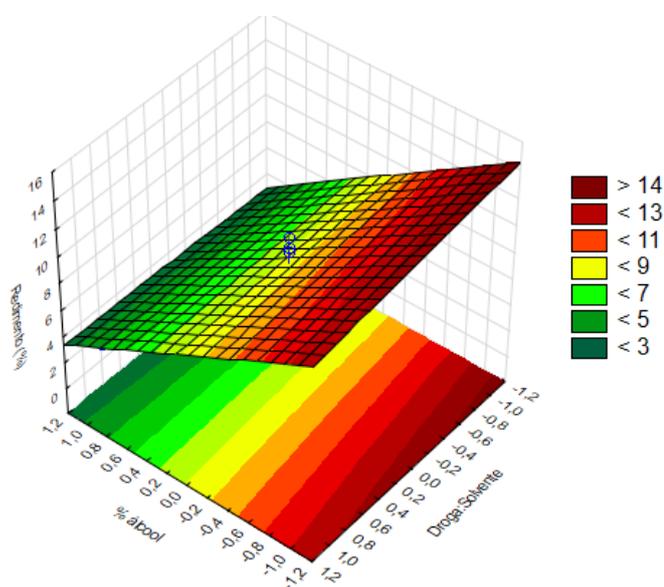


Figura 48 – Superfície de resposta para o rendimento do processo extrativo maceração.

### 5.3.1.2 Determinação do teor de compostos fenólicos totais

Já os teores de compostos fenólicos apresentaram maiores valores com a proporção 3:10 e solução hidroalcoólica a 50% (Figura 49). Os gráficos de superfície de resposta mostram que o melhor resultado foi encontrado com o nível inferior da solução hidroalcoólica e o nível superior da proporção droga:solvente. Os compostos fenólicos, como já citados, apresentam caráter polar, e uma maior quantidade de água favorece a sua devida extração. Este fato ressalta a importância do conhecimento a respeito das características químicas e físico-químicas dos componentes de interesse, visto que o futuro emprego dos extratos obtidos depende da solubilização do derivado

e sua aplicação nas diversas formas farmacêuticas, sobretudo orais ou tópicas (FONSECA, 2009).

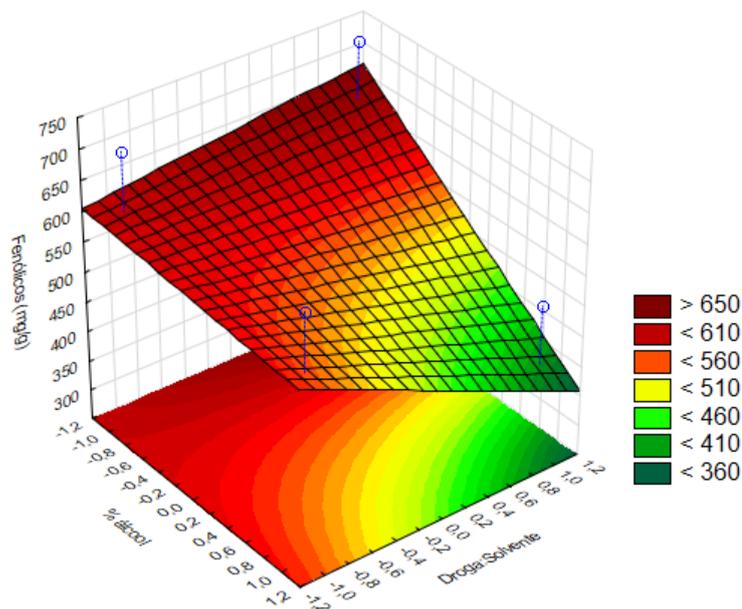


Figura 49 – Superfície de resposta para o teor de compostos fenólicos do processo extrativo maceração.

### 5.3.1.3 Determinação do teor de flavonoides totais

O teor de flavonoides totais apresentou melhores resultados nos níveis superiores dos fatores analisados (Figura 50). Os gráficos de superfície de resposta mostram que a correlação foi positiva para os níveis superiores, o que significa dizer que quanto maior a concentração da solução hidroalcoólica e proporção droga:solvente, maiores os teores de flavonoides totais. Esta classe de substâncias apresenta polaridade variando de alta a intermediária, e seu caráter químico como ácido ou fracamente ácido, conforme citado anteriormente. Desta forma, uma maior presença de álcool na solução extrativa favorece sua dissolução, provocando um aumento no teor de flavonoides totais durante a extração (BARREIROS et al., 2006).

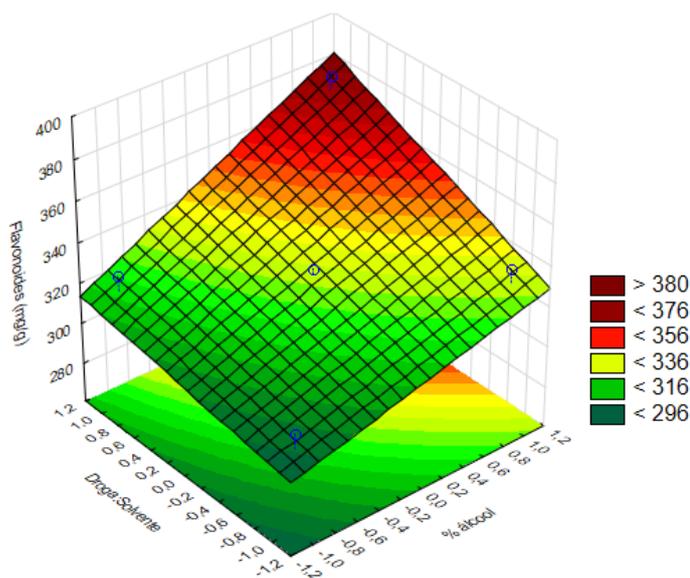


Figura 50 – Superfície de resposta para o teor de flavonoides totais do processo extrativo maceração.

Tomando como base os gráficos apresentados bem como a análise estatística realizada, para definição do melhor tratamento para o método extrativo maceração, visto que o fator proporção droga:solvente não apresentou influência nos resultados, e a concentração de 50% (nível inferior) da solução hidroalcoólica apresentou os maiores resultados para rendimento e teor de compostos fenólicos, o tratamento sugerido para este método extrativo foi o ensaio 1 (proporção 1:10 e concentração da solução extrativa de 50%). O nível inferior, além dos argumentos descritos, poderia ainda proporcionar redução nas quantidades de droga vegetal utilizada, além da redução da utilização de etanol, reduzindo, conseqüentemente, os custos da produção dos extratos (FONSECA, 2009).

### 5.3.2 Turbólise

Os resultados para as análises realizadas de acordo com o planejamento fatorial para o método extrativo TURBÓLISE estão apresentados na Tabela 22. De acordo com a tabela, o tratamento com melhor rendimento é o ensaio 1, utilizando relação droga:solvente 1:10 e solução hidroalcoólica a 50%, com rendimento de 43,56%. Este ensaio também foi o melhor em rendimento no método extrativo maeração, porém a turbólise apresentou rendimento bem maior. Já o ensaio 4 apresentou o melhor teor de compostos fenólicos, com 692,33 mg de EAG/g de

extrato, com proporção 3:10 e solução hidroalcoólica a 70%, o que diferiu do método por maceração. O ensaio 2 apresentou maior teor de flavonoides totais, com 323,25 mg de EQ/g de extrato, com proporção 3:10 e solução hidroalcoólica a 50%.

### 5.3.2.1 Cálculo do rendimento de extração

De acordo com a análise de variância (ANOVA), para o resultado de rendimento, foi verificada influência para ambos os fatores estudados apenas nos resultados de teor de compostos fenólicos ( $p < 0,05$ ) (Tabela 23, 24 e 25).

Tabela 22 – Resultados das análises com os extratos obtidos com as cascas, através do método turbólise.

| Ensaio | Condições               |                            | Rendimento (%) | T.C.F.T (mg EAG/g) | T.F.T (mg EQ/g) |
|--------|-------------------------|----------------------------|----------------|--------------------|-----------------|
|        | Relação droga: solvente | Solução hidroalcoólica (%) |                |                    |                 |
| 1      | 1:10                    | 50                         | 43,56          | 409,83             | 304,12          |
| 2      | 3:10                    | 50                         | 31,49          | 617,33             | 323,25          |
| 3      | 1:10                    | 70                         | 22,88          | 630,66             | 320,19          |
| 4      | 3:10                    | 70                         | 27,61          | 692,33             | 293,41          |
| 5      | 2:10                    | 60                         | 23,57          | 653,16             | 271,50          |
| 6      | 2:10                    | 60                         | 26,58          | 569,83             | 307,78          |
| 7      | 2:10                    | 60                         | 25,64          | 604,83             | 274,56          |

Legenda: T.C.F.T = Teor de compostos fenólicos totais; T.F.T = Teor de flavonoides totais; EAG = Equivalentes de ácido gálico; EQ = Equivalentes de quercetina

Tabela 23 – Análise de variância (ANOVA) da influência das condições do método extrativo turbólise no rendimento dos extratos.

| Fontes de variação                                  | SQ       | GL | MS       | F        | p-valor  |
|---|----------|----|----------|----------|----------|
| Solução hidroalcoólica (%)                          | 150,7984 | 1  | 150,7984 | 6,557841 | 0,083154 |
| Relação droga: solvente                             | 13,4689  | 1  | 13,4689  | 0,585728 | 0,499775 |
| Solução hidroalcoólica x<br>Relação droga: solvente | 70,5600  | 1  | 70,5600  | 3,068476 | 0,178119 |
| Erro  | 68,9854  | 3  | 22,9951  | -        | -        |
| Total   | 303,8127 | 6  | -        | -        | -        |

Legenda: SQ: Soma dos quadrados; GL: Grau de liberdade; MS: Quadrado médio; F: Estatística F; p-valor: probabilidade exata.

Tabela 24 – Análise de variância (ANOVA) da influência das condições do método extrativo turbólise no teor de compostos fenólicos dos extratos.

| Fontes de variação                                  | SQ       | GL | MS       | F        | p-valor   |
|---|----------|----|----------|----------|-----------|
| Solução hidroalcoólica (%)                          | 21878,85 | 1  | 21878,85 | 15,22371 | 0,029886* |
| Relação droga: solvente                             | 18113,12 | 1  | 18113,12 | 12,60345 | 0,038087* |
| Solução hidroalcoólica x<br>Relação droga: solvente | 5316,60  | 1  | 5316,60  | 3,69939  | 0,150139  |
| Erro  | 4311,47  | 3  | 1437,16  | -        | -         |
| Total   | 49620,03 | 6  | -        | -        | -         |

Legenda: \*p<0,05; SQ: Soma dos quadrados; GL: Grau de liberdade; MS: Quadrado médio; F: Estatística F; p-valor: probabilidade exata.

Tabela 25 – Análise de variância (ANOVA) da influência das condições do método extrativo turbólise no teor de flavonoides totais dos extratos.

| Fontes de variação                                  | SQ       | GL | MS       | F        | p-valor  |
|---|----------|----|----------|----------|----------|
| Solução hidroalcoólica (%)                          | 47,403   | 1  | 47,4032  | 0,07515  | 0,801773 |
| Relação droga: solvente                             | 14,631   | 1  | 14,6306  | 0,023194 | 0,888619 |
| Solução hidroalcoólica x<br>Relação droga: solvente | 526,932  | 1  | 526,9320 | 0,835364 | 0,428120 |
| Erro  | 1892,345 | 3  | 630,7816 | -        | -        |
| Total   | 2481,311 | 6  | -        | -        | -        |

Legenda: SQ: Soma dos quadrados; GL: Grau de liberdade; MS: Quadrado médio; F: Estatística F; p-valor: probabilidade exata.

As superfícies de resposta (Figura 51) mostram que ao diminuir os níveis dos fatores empregados, há aumento no rendimento na extração por turbólise (proporção droga:solvente 1:10 e concentração da solução hidroalcoólica 50%). Este método extrativo emprega o uso de agitação mecânica, e ao utilizar os menores níveis dos fatores escolhidos, proporciona maior homogeneização da solução extrativa. Conforme visto para o método maceração, uma maior quantidade de água na solução hidroalcoólica aumenta o rendimento dos extratos, provavelmente devido ao caráter das substâncias majoritárias da planta em estudo.

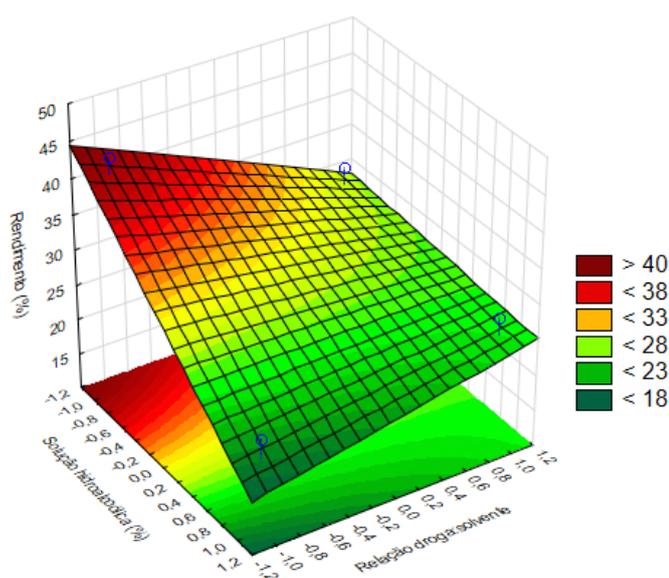


Figura 51 – Superfície de resposta para o rendimento do processo extrativo turbólise.

### 5.3.2.2 Determinação de compostos fenólicos totais

Os dados apresentados na análise estatística, que afirmam que os fatores empregados apresentam influência sobre o teor de compostos fenólicos são corroborados pela superfície de resposta para o método extrativo turbólise (Figura 52). O gráfico mostra que ao aumentar os níveis dos fatores empregados, há aumento no teor desta classe de compostos. Apesar de que grandes proporções em muitas situações não provoca o aumento no teor de compostos químicos específicos (FONSECA, 2009), o método de turbólise pareceu propiciar a retirada de compostos fenólicos das cascas de *Hymenaea martiana*, provavelmente devido à aplicação de agitação mecânica, que favorece a homogeneização e maior eficiência na dissolução de compostos e sua consequente extração.

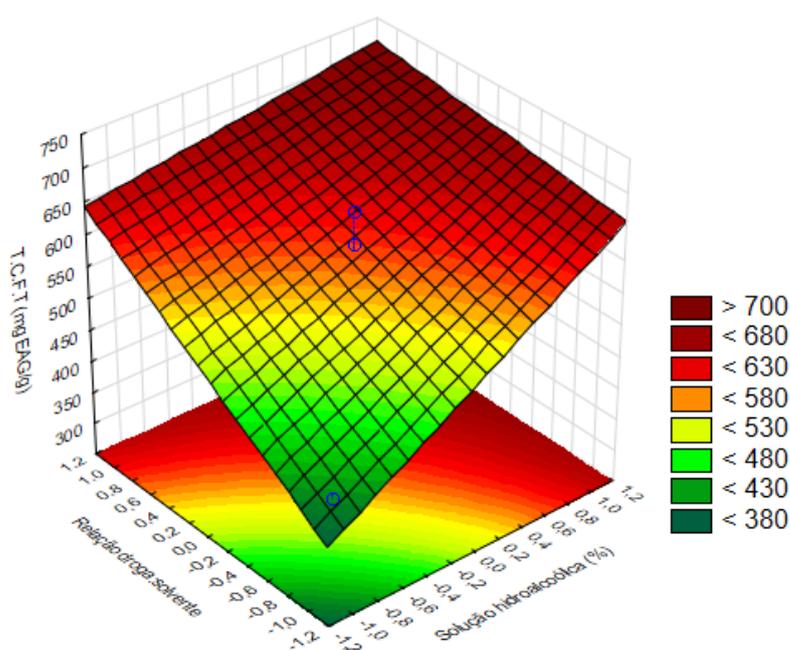


Figura 52 – Superfície de resposta para o teor de compostos fenólicos do processo extrativo turbólise.

### 5.3.2.3 Determinação de flavonoides totais

Da mesma forma que para os compostos fenólicos, o teor de flavonoides totais aumentou à medida que foi aumentada a proporção droga : solvente (Figura 53). Como os flavonoides constituem uma classe pertencente à classe dos compostos fenólicos, a agitação mecânica favoreceu a dissolução e consequente extração de ambas as classes. De forma diferente do método maceração, na turbólise o maior

teor de flavonoides foi observado com o menor nível de etanol na solução hidroalcoólica, provavelmente devido a diferenças nas técnicas extrativas, justificando as diferenças nas respostas encontradas.

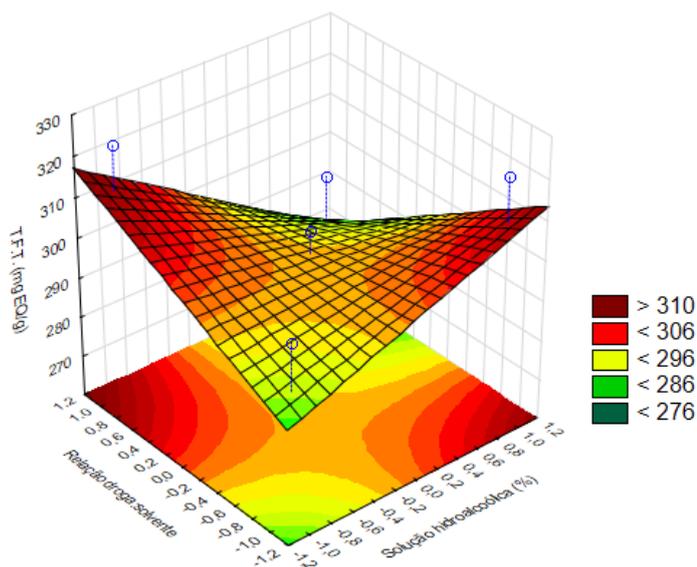


Figura 53 – Superfície de resposta para o teor de flavonoides totais do processo extrativo turbólise.

De acordo com os gráficos apresentados, bem como a análise estatística realizada, o melhor tratamento foi o método extrativo turbólise, visto que os fatores escolhidos apresentaram influência apenas na extração de compostos fenólicos, e a concentração de 70% (nível superior) da solução hidroalcoólica apresentou os maiores resultados para rendimento, e a proporção droga:solvente de 3:10 apresentou os maiores teores de compostos fenólicos. O tratamento sugerido para este método extrativo foi o ensaio 4 (proporção 3:10 e concentração da solução extrativa de 70%). O nível superior da concentração da solução hidroalcoólica poderia propiciar um melhor rendimento. Já a proporção 3:10, com a aplicação da agitação mecânica e uma melhor homogeneização, favoreceria uma melhor extração de compostos fenólicos.

Diante dos resultados apresentados por este estudo, o método de turbólise apresentou melhores resultados no planejamento fatorial e foi escolhido como a melhor condição extrativa, preparado com etanol a 70% e proporção 3:10.

## 6 CONCLUSÕES

Os dados obtidos evidenciaram a influência exercida pelos diferentes métodos extrativos na produção de compostos fenólicos em *Hymenaea martiana*.

Uma avaliação preliminar foi executada visando à escolha da parte vegetal mais apropriada para a obtenção de compostos fenólicos, especialmente os flavonoides.

A triagem fitoquímica desenvolvida evidenciou que os diferentes extratos apresentaram perfil fitoquímico semelhante a outras plantas do gênero.

Os maiores rendimentos foram obtidos por maceração, e cada parte vegetal influenciou nos aspectos visuais dos extratos.

A desreplicação por CLAE-EM revelou a presença de flavonoides importantes, como astilbina, isoastilbina, neoastilbina, quercetina e taxifolina.

Adicionalmente, os valores de FPS, os teores de compostos fenólicos e flavonoides totais evidenciaram a influência dos métodos na determinação destes compostos.

A droga vegetal escolhida, através de análise estatística, foi a casca do caule da espécie em estudo.

Como forma de padronizar a droga vegetal, caracterizações físico-químicas foram desenvolvidas com resultados dentro do especificado na Farmacopeia Brasileira.

Após o controle de qualidade das drogas vegetais, as condições extrativas foram submetidas a um processo de otimização. A avaliação do planejamento fatorial mostrou que os fatores influenciaram de maneira diferente para cada resposta e método extrativo analisado.

Como resultado final deste estudo, o método de turbólise apresentou melhores resultados no planejamento fatorial e foi escolhido como a melhor condição extrativa, preparado com etanol a 70% e proporção 3:10.

Os principais benefícios deste estudo residem na escolha racional das cascas como a parte vegetal mais apropriada para a extração de compostos fenólicos. Além disso, foram escolhidas condições otimizadas para o processo de extração. Este estudo também trouxe dados inéditos na literatura científica, com os primeiros relatos de estudos fitoquímicos com as folhas, frutos e sementes de *Hymenaea martiana*, bem como a padronização da droga vegetal escolhida. A presença de flavonoides

glicosídicos com atividade biológica já relatada enfatiza sua relevância para futuros estudos com esta planta medicinal.

Os resultados deste estudo fornecem informações importantes para o futuro desenvolvimento de produtos farmacêuticos e cosméticos utilizando como matéria-prima um derivado vegetal de *Hymenaea martiana* obtido de maneira racional e baseada em evidências científicas. Estes dados servirão de subsídios para futuros estudos fitoquímicos, espectroscópicos e farmacotécnicos mais aprofundados, para uma melhor discussão em relação aos parâmetros farmacêuticos desta planta, que pode ser caracterizada como um enorme potencial biotecnológico e terapêutico.

## REFERÊNCIAS

AGRA, M.F.; FREITAS, P.F.; BARBOSA-FILHO, J.M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 1, p. 114-140, 2007.

AGUIAR, J.C.; SANTIAGO, G.M.; LAVOR, P.L.; VERAS, H.N.; FERREIRA, Y.S.; LIMA, M.A.; ARRIAGA, A.M.; LEMOS, T.L.; LIMA, J.Q.; DE JESUS, H.C.; ALVES, P.B.; BRAZ-FILHO, R. Chemical constituents and larvicidal activity of *Hymenaea courbaril* fruit peel. **Natural Product Communications**, v. 5, n.12, p. 1977-1980, 2010.

ALBUQUERQUE, U.P.; MONTEIRO, J.M.; RAMOS, M.A.; AMORIM, E.L.C. Medicinal and magic plants from a public market in northeastern Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 110, p. 76–91, 2007a.

ALBUQUERQUE, U.P.; MEDEIROS, P.M.; ALMEIDA, A.L.S.; MONTEIRO, J.M.; LINS-NETO, E.M.F.; MELO, J.G.; SANTOS, J.P. Medicinal plants of the Caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: A quantitative approach. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 114, p. 325-354, 2007b.

ALMEIDA, M.B.; SOUZA, W.C.O.; GOMES, E.C.S.; VILAR, F.C.R. Descrição morfológica do fruto e semente do jatobá (*Hymenaea courbaril* L.). **Revista Semiárido De Visu**, v. 1, n. 2, p. 107-115, 2011a.

ALMEIDA, J.R.G.S.; OLIVEIRA, M.R.; GUIMARÃES, A.L.; OLIVEIRA, A.P.; RIBEIRO, L.A.A.; LÚCIO, A.S.S.C.; QUINTANS-JÚNIOR, L.J. Phenolic quantification and antioxidant activity of *Anaxagorea dolichocarpa* and *Duguetia chrysocarpa* (Annonaceae). **International Journal of Pharmacy and Biological Sciences**, v. 2, n. 4, p. 367-374, 2011b.

ALMEIDA, J.R.G.S.; SILVA, M.E.G.C.; GUIMARÃES, A.L.; OLIVEIRA, A.P.; ARAÚJO, C.S.; SIQUEIRA-FILHO, J.A.; FONTANA, A.P.; DAMASCENO, P.K.F.; BRANCO,

C.R.C.; BRANCO, A. HPLC-DAD analysis and antioxidant activity of *Hymenaea martiana* Hayne (Fabaceae). **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, v. 4, n. 2, p. 1160-1166, 2012.

ALVARENGA, M.A.; BRAZ-FILHO, R.; GOTTLIEB, O.R.; DIAS, J.P.P.; MAGALHÃES, A.F.; MAGALHÃES, E.G.; MAGALHÃES, G.C.; MAGALHÃES, M.T.; MAIA, J.G.S.; MARQUES, R.; MARSAIOLI, A.J.; MESQUITA, A.A.L.; MORAES, A.A.; OLIVEIRA, A.B.; OLIVEIRA, G.G.; PEDREIRA, G.; PEREIRA, S.A.; PINHO, S.L.V.; SANTANA, A.E.G.; SANTOS, C.C. Dihydroisocoumarins and phthalide from wood samples infested by fungi. **Phytochemistry**, v. 17, p. 511-516, 1978.

ANSELMO, A.F.; SILVA, C.G.; MARINHO, M.G.V.; ZANELLA, F.C.V.; XAVIER, D.A. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais comercializadas por raizeiros em uma feira livre no município de Patos – PB. **Biofar, Revista de Biologia e Farmácia**, v. Especial, p. 39-48, 2012.

ANTOUN, M.D.; MARTINEZ, E.; CABALLERO, R.; OQUENDO, I.; PROCTOR, G.R.; WEISLOW, O.S.; MCCLOUD, T.G.; KISER, R.; STALEY, P.; CLANTON, D. Evaluation of the flora of Puerto Rico for in vitro cytotoxic and anti-HIV activities. **Pharmaceutical Biology**, v. 37, n. 4, p. 277-280, 1999.

ANTOUN, M.D.; RAMOS, Z.; VAZQUES, J.; OQUENDO I.; PROCTOR, G.R.; GERENA, L.; FRANZBLAU, S.G. Evaluation of the flora of Puerto Rico for in vitro antiplasmodial and antimycobacterial activities. **Phytotherapy Research**, v. 15, n. 7, p. 638-624, 2001.

ARAÚJO, T.A.S.; ALENCAR, N.L.; AMORIM, E.L.C.; ALBUQUERQUE, U.P. A new approach to study medicinal plants with tannins and flavonoids contents from the local knowledge. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 120, p. 72–80, 2008.

ARRHENIUS, S.; LANGENHEIM, J.H. Inhibitory effects of *Hymenaea* and *Copaifera* leaf resins on the leaf fungus, *Pestalotia subcuticularis*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 11, n. 4, p. 361-366, 1983.

ARTAVIA, D.; BARRIOS, M.; CASTRO, O. A flavonol rhamnoside from *Hymenaea courbaril* leaves. **Fitoterapia**, v. 66, n. 1, p. 91-92, 1995.

BARNI, S.T.; CECHINE- FILHO, V.; COUTO, A.G. Caracterização química e tecnológica das folhas, caules e planta inteira da *Ipomoea pescaprae* (L.) R. Br., Convolvulaceae, como matéria prima farmacêutica. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 4, p. 865-870, 2009.

BARREIROS, A. L. B. S.; BARREIROS, M. L.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P.; QUEIROZ, L.P. Atividade antioxidante de substâncias presentes em *Dioclea violacea* e *Erythroxylum nummularia*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 13, supl. 2, p. 08-11, 2003.

BARREIROS, A.L.B.S.; DAVID, J.M.; DAVID, J.P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, n.1, p. 113-123, 2006.

BARRETT, B. Medicinal plants of Nicaragua's Atlantic coast. **Economic Botany**, v. 48, n. 1, p. 8-20, 1994.

BARROS, G.S.G.; MATOS, F.J.A.; VIEIRA, J.E.V.; SOUZA, M.P.; MEDEIROS, M.C. Pharmacological screening of some Brazilian plants. **Journal of Pharmacology and Pharmacotherapeutics**, v. 22, p. 116-122, 1970.

BATISTA, A.N.L.; BATISTA-JÚNIOR, J.M.; LÓPEZ, S.N.; FURLAN, M.; CAVALHEIRO, A.J.; SILVA, D.H.S.; BOLZANI, V.S.; NUNOMURA, S.M.; YOSHIDA, M. Aromatic compounds from three Brazilian Lauraceae species. **Química Nova**, v. 33, n. 2, p. 321-323, 2010.

BEZERRA, G.P.; GÓIS, R.W.S.; BRITO, T.S.; LIMA, F.J.B.; BANDEIRA, M.A.M.; ROMERO, N.R.; MAGALHÃES, P.J.C.; SANTIAGO, G.M.P. Phytochemical study guided by the miorelaxant activity of the crude extract, fractions and constituent from

stem bark of *Hymenaea courbaril* L. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 149, p. 62-69, 2013.

BIRT, D. F.; HENDRICH, S.; WANG, W. Dietary agents in cancer prevention: flavonóides and isoflavonoids. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 90, p. 157-177, 2001.

BOBIN, M. F.; RAYMOND, M.; MARTINI, M.C. UVA/UVB absorption properties of natural products. **Cosmetics & Toiletries**, v. 109, p. 63-78, 1994.

BRAGA, F.C.; WAGNER, H.; LOMBARDI, J.A.; OLIVEIRA, A.B. Screening Brazilian plant species for in vitro inhibition of 5-lipoxygenase. **Phytomedicine**, v. 6, n. 6, p. 447-452, 2000a.

BRAGA, F.C.; WAGNER, H.; LOMBARDI, J.A.; OLIVEIRA, A.B. Screening the Brazilian flora for antihypertensive plant species for in vitro angiotensin-I-converting enzyme inhibiting activity. **Phytomedicine**, v. 7, n. 3, p. 245-250, 2000b.

BRANDÃO, M.G.I.; PIGNAL, M.; ROMANIUC, S.; GRAEL, C.F.F.; FAGG, C.W. (). Useful Brazilian plants listed in the field books of the French naturalist Auguste de Saint-Hilaire (1779-1853). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 143, p. 488-500, 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Farmacopéia Brasileira**. 5ª Edição, ANVISA. Brasília, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Formulário de Fitoterápicos da Farmacopéia Brasileira**. 1ª Edição, ANVISA. Brasília, 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 30 de 1 de junho de 2012. Aprova o Regulamento Técnico Mercosul sobre Protetores Solares em Cosméticos e dá outras providências. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 26 de 13 de maio de 2014. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 2014.

BUCKERIDGE, M.S.; CROMBIE, H.J.; MENDES, C.J.M.; REID, J.S.G.; GIDLEY, M.J.; VIEIRA, C.C.J. (). A new family of oligosaccharides from the xyloglucan of *Hymenaea courbaril* L. (Leguminosae) cotyledons. **Carbohydrate Research**, v. 303, n. 2, p. 233-237, 1997.

BUSATO, A.P.; VARGAS-RECHIA, C.G.; REICHER, F. Xyloglucan from the leaves of *Hymenaea courbaril*. **Phytochemistry**, v. 58, n. 3, p. 525-531, 2001.

BUSATO, A.P.; REICHER, F.; DOMINGUES, R.; SILVEIRA, J.L.M. Rheological properties of thermally xyloglucan gel from the seeds of *Hymenaea courbaril*. **Materials Science and Engineering: C**, v. 29, p. 410-414, 2009.

CÁCERES, A.; GIRÓN, L.M.; MARTÍNEZ, A.M. Diuretic activity of plants used for the treatment of urinary ailments in Guatemala. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 19, n. 3, p. 233-245, 1987.

CÁCERES, A.; JAUREGUI, E.; HERRERA, D.; LOGEMANN, H. Plants used in Guatemala for the treatment of dermatomucosal infections. 1: Screening of 38 plant extracts for anticandidal activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 33, n. 3, p. 277-283, 1991.

CAI, Y.; CHEN, T.; XU, Q. Astilbin suppresses collagen-induced arthritis via the dysfunction of lymphocytes. **Inflammation Research**, v. 52, p. 334–340, 2003.

CALIXTO, J.B.; YUNES, R.A.; MEDEIROS, Y.S. Differential antagonistic effect of hydroalcoholic extract from *Hymenaea martiana* Hayne arzeik on kinin and other agonist-induced contractions of the isolated rat uterus and guinea-pig ileum. **Phytotherapy Research**, v. 6, n. 6, p. 322-326, 1992a.

CALIXTO, J.B.; YUNES, R.A.; MEDEIROS, Y.S. Vascular action of the crude hydroalcoholic extract from *Hymenaea martiana* on the isolated rat and rabbit aorta. **Phytotherapy Research**, v. 6, n. 6, p. 327-331, 1992b.

CARDOSO, L.M.; BEDETTI, S.F.; RIBEIRO, S.M.R.; ESTEVES, E.A.; SANT'ANA, H.M.P. 'Jatobá do cerrado' (*Hymenaea stignocarpa*): chemical composition, carotenoids and vitamins in an exotic fruit from the Brazilian Savannah. **Fruits**, v. 68, p. 95–107, 2013.

CARNEIRO, E.; CALIXTO, J.B.; DELLE MONACHE, F.; YUNES, R.A. Isolation chemical identification and pharmacological evaluation of eucryphin, astilbin and engelitin obtained from the bark of *Hymenaea martiana*. **International Journal of Pharmacognosy**, v. 31, n. 1, p. 38-46, 1993.

CARPITA, N.C.; GIBEAUT, D.M. Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. **The Plant Journal**, v. 3, n. 1, p. 1-30, 1993.

CARTAXO, S.L.; SOUZA, M.M.A.; ALBUQUERQUE, U.P. Medicinal plants with bioprospecting potential used in semi-arid Northeastern Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 131, p. 326-342, 2010.

CAVALHEIRO, C.V. **Extração de compostos fenólicos assistida por ultrassom e determinação de ácidos graxos e minerais em folhas de *Olea europaea* L.** Dissertação - Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos. Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria, 2013.

CECHINEL-FILHO, V.; VAZ, Z.R.; ZUNINO, L.; CALIXTO, J.B.; YUNES, R.A. Antinociceptive and anti-oedematogenic properties of astilbin, taxifolin and some related compounds. **Drug Research**, v. 50, n. 3, p. E281-E285, 2000.

CECÍLIO, A.B.; FARIA, D.B.; OLIVEIRA, P.C.; CALDAS, S.; OLIVEIRA, D.A.; SOBRAL, M.E.G.; DUARTE, M.G.R.; MOREIRA, C.P.S.; SILVA, C.G.; ALMEIDA, V.L.

Screening of Brazilian medicinal plants for antiviral activity against rotavirus. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 141, p. 975-981, 2012.

CELEGHINI, R.M.S.; YARIWAKE, J.H.; LANÇAS, F.M. Otimização das condições de extração hidroalcoólica das furanocumarinas de *Dorstenia brasiliensis* Lam. por maceração com ultrassom e análise quantitativa por CLAE-UV e fluorescência. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 9, n. 2, p. 61-66, 2007.

CHAVES, E.M.F.; BARROS, R.F.M. Diversidade e uso de recursos medicinais do carrasco na APA da Serra da Ibiapaba, Piauí, Nordeste do Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, n. 3, p. 476-486, 2012.

CHEN, T.; LI, J. CAO, J.; XU, Q.; KOMATSU, K.; NAMBA, T. A new flavanone isolated from *Rhizoma Smilacis Glabrae* and the structural requirements of its derivatives for preventing immunological hepatocyte damage. **Planta Medica**, v. 65, n. 1, p. 056-059, 1999.

CHUNG, M.S.; KIM, N.C.; LONG, L.; SHAMON, L.; AHMAD, W.Y.; NIEVES, L.S.; KARDONO, L.B.S.; KENNELLY, E.J.; PEZZUTO, J.M.; SOEJARTO, D.D.; KINGHORN, D. Dereplication of saccharide and polyol constituents of candidate sweet-tasting plants: isolations of the sesquiterpene glycoside mukurozioside iib as a sweet principle of *sapindus rarak*. **Phytochemical Analysis**, v. 8, p. 49-54, 1997.

CLOSA, D.; TORRES, M.; HOTTER, G.; BIOQUE, G.; LEON, S.; GELPI, E.; ROSELLÓ-CATAFAU, J. Prostanoids and free radicals in  $Cl_4C$ -induced hepatotoxicity in rats: effect of astilbin. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 56, n. 4, p. 331-334, 1997.

COE, F.G.; ANDERSON, G.J. Screening of medicinal plants used by the Garífuna of Eastern Nicaragua for bioactive compounds. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 53, p. 29-50, 1996a.

COE, F.G.; ANDERSON, G.J. Ethnobotany of the garifuna of eastern Nicaragua. **Economic Botany**, v. 50, n. 1, p. 71-107, 1996b.

CRUZ, E.D.; MARTINS, F.O.; CARVALHO, J.E.U. Biometria de frutos e sementes e germinação de jatobá-curuba (*Hymenaea intermedia* Ducke, Leguminosae - Caesalpinioideae). **Brazilian Journal of Botany**, v. 24, n. 2, p. 161-165, 2001.

CRUZ, M.P.; PERONI, N.; ALBUQUERQUE, U.P. Knowledge, use and management of native wild edible plants from a seasonal dry forest (NE, Brazil). **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, v. 9, p. 79, 2013.

CUNHA, A.S.; BORTOLOTTI, I.M. Etnobotânica de Plantas Medicinais no Assentamento Monjolinho, município de Anastácio, Mato Grosso do Sul, Brasil. **Acta Botanica Brasílica**, v. 25, n. 3, p. 685-698, 2011.

CUNHA-SILVA, G.R.; RODRIGUES, C.M.; MIRANDA, S.C. Dados biométricos de frutos e sementes de *Hymenaea courbaril* var. *stilbocarpa* (Hayne) Y. T. Lee & Langenh e H. martiana Hayne. **Biotemas**, v. 25, n. 3, p. 121-127, 2012.

CUNNINGHAM, A.; MARTIN, S.S.; LANGENHEIM, J.H. Resin acids from two Amazonian species of *Hymenaea*. **Phytochemistry**, v. 12, n. 3, p. 633-635, 1973.

CUNNINGHAM, A.; MARTIN, S.S.; LANGENHEIM, J.H. Labd-13-en-8-ol-15-oic acid in the trunk resin of Amazonian *Hymenaea courbaril*. **Phytochemistry**, v. 13, p. 294-295, 1974.

CUNNINGHAM, A.; WEST, P.R.; HAMMOND, G.S.; LANGENHEIM, J.H. The existence and photochemical initiation of free radicals in *Hymenaea* trunk resin. **Phytochemistry**, v. 16, n. 9, p. 1442-1443, 1977.

CUNNINGHAM, A.; GAY, I.D.; OEHLISCHLAGER, A.C.; LANGENHEIM, J.H. <sup>13</sup>C NMR and IR analyses of structure, aging and botanical origin of Dominican and Mexican ambers. **Phytochemistry**, v. 22, n. 4, p. 965 -968, 1983.

DIAS, L.S.; LUZIA, D.M.M.; JORGE, N. (). Physicochemical and bioactive properties of *Hymenaea courbaril* L. pulp and seed lipid fraction. **Industrial Crops and Products**, v. 49, p. 610-618, 2013.

DIMECH, G.S.; SOARES, L.A.L.; FERREIRA, M.A.; OLIVEIRA, A.G.V.; CARVALHO, M.C.; XIMENES, E.A. Phytochemical and antibacterial investigations of the extracts and fractions from the stem bark of *Hymenaea stignocarpa* Mart. ex Hayne and effect on ultrastructure of *Staphylococcus aureus* induced by hydroalcoholic extract. **The Scientific World Journal**, v. 2013, 2013.

DOMÉNECH-CARBÓ, M.T.; CRUZ-CAÑIZARES, J.L.; OSETE-CORTINA, L.; DOMÉNECH-CARBÓ, A.; DAVID, H. Aging behavior and analytical characterization of the Jatobá resin collected from *Hymenaea stignocarpa* Mart. **International Journal of Mass Spectrometry**, v. 284, p. 81-92, 2009.

DU, Q.; LI, L.; JERZ, G. Purification of astilbin and isoastilbin in the extract of *Smilax glabra* rhizome by high-speed counter-current chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1077, p. 98-110, 2005.

ESTADOS UNIDOS DA AMÉRICA. **The United States Pharmacopoeia**. General Methods, <232> Elemental Impurities – Limits, 37.ed. Rockville, 2013.

FARIAS, D.F.; SOUZA, T.M.; VIANA, M.P.; SOARES, B.M.; CUNHA, A.P.; VASCONSELOS, I.M.; RICARDO, N.M.P.S.; FERREIRA, P.M.P.; MELO, V.M.M.; CARVALHO, A.F.U. Antibacterial, Antioxidant, and anticholinesterase activities of plant deed extracts from Brazilian semiarid region. **BioMed Research International**, v. 2013, 2013a.

FARIAS, K.S.; SANTOS, T.S.N.; PAIVA, M.R.A.B.; ALMEIDA, S.M.L.; GUEDES, P.T.; VIANNA, A.C.A.; FAVARO, S.P.; BUENO, N.R.; CASTILHO, R.O. Antioxidant properties of species from the Brazilian cerrado by different assays. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 15, n. 4, p. 520-528, 2013b.

FONSECA, F.N. **Desenvolvimento tecnológico de fitoproduto a partir de *Justicia pectoralis* – Chambá**: obtenção de extrato seco padronizado (CLAE-DAD) e avaliação farmacológica. Dissertação - Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, 2009.

FREIRE, M.F.I. Metais pesados e plantas medicinais. **Revista de Ciências Agronômicas**, ano IV, n.08, 2005.

FREITAS, R.A.; MARTIN, S.; SANTOS, G.L.; VALENGA, F.; BUCKERIDGE, M.S.; REICHER, F.; SIERAKOWSKI, M.R. Physico-chemical properties of seed xyloglucan from different sources. **Carbohydrate Polymers**, v. 60, p. 507-514, 2005.

FRY, S.C. The structure and functions of xyloglucan. **Journal of Experimental Botany**, v. 40, n. 1, p. 1-11, 1989.

GAZZANEO, L.R.S.; LUCENA, R.F.P.; ALBUQUERQUE, U.P. Knowledge and use of medicinal plants by local specialists in a region of Atlantic Forest in the state of Pernambuco (Northeastern Brazil). **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, v. 1, n. 9, p. 1-9, 2005.

GUARDIA, T.; ROTELLI, A. E.; JUAREZ, A. O. PELZER, L.E. Anti-inflammatory properties of plant flavonoids. Effects of rutin, quercetin and hesperidin on adjuvant arthritis in rat. **II Farmaco**, v.56, p.683-687, 2001.

HAN, L.K.; NINOMIYA, H.; TANIGUCHI, M.; BABA, K.; KIMURA, Y.; OKUDA, H. Norepinephrine-augmenting lipolytic effectors from *Astilbe thunbergii* rhizomes. **Journal of Natural Products**, v. 61, p. 1006–1011, 1998.

HARTKE, K. *Deutschers Arzneibuch 9-Kommentar*. Stuttgart: Wissenschaftliche, Frankfurt: Govi, 1989. In: SIMÕES, C.M.O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6.ed. Porto Alegre: UFRGS, p. 277, 2007.

HAYASHI, T. Xyloglucans in the primary cell wall. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 40, p. 139-168, 1989.

HEINRICH, M.; RIMPLER, H.; BARRERA, N.A. Indigenous phytotherapy of gastrointestinal disorders in a lowland miki community (Oaxaca, Mexico): Ethnopharmacologic evaluation. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 36, n. 1, p. 63-80, 1992

HEINRICH, J.; VITT, D.H.; SCHÄFER-VERWIMP, A.; RAGAZZI, E.; MARZARO, G.; GRIMALDI, D.A.; NASCIMBENE, P.C.; FELDBERG, K.; SCHMIDT, A.R. The moss *Macromitrium richardii* (Orthotrichaceae) with sporophyte and calyptra enclosed in *Hymenaea* resin from the Dominican Republic. **Polish Botanical Journal**, v. 58, n. 1, p. 221–230, 2013.

HELENO, S.A.; MARTINS, A.; QUEIROZ, M.J.R.P.; FERREIRA, I.C.F.R. Bioactivity of phenolic acids: Metabolites versus parent compounds: a review. **Food Chemistry**, v. 173, p. 501-513, 2015.

HIRAGUCHI, H.; MOCHIDA, Y.; SAKAI, S.; MASUDA, H.; TAMURA, Y.; MIZUTANI, K.; TANAKA, O.; CHOU, W.H. Protection against oxidative damage by dihydroflavonols in *Engelhardtia chrysolepis*. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 60, p. 945–948, 1996.

HIRAGUCHI, H.; OHMI, I.; FUKUDA, A.; TAMURA, Y.; MIZUTANI, K.; TANAKA, O.; CHOU, W.H. Inhibition of aldose reductase and sorbitol accumulation by astilbin and taxifolin dihydroflavonols in *Engelhardtia chrysolepis*. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 61, p. 651–654, 1997.

HIRSCHMANN, G.S.; ARIAS, A.R. A survey of medicinal plants of Minas Gerais, Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 29, p. 159-172, 1990.

HOFFMANN, E.; STROOBANT, V. **Mass spectrometry: principles and applications**. Chichester: John Wiley & Sons, 502 p., 2007.

HUGEL, G.; OEHLISCHLAGER, A.C.; OURWON, G. The structure and stereochemistry of diterpenes from *Trachylobium verrucosum* Oliv. **Tetrahedron**, v. 8, part I, p. 203-216, 1966.

HVASF - **Herbário Vale do São Francisco**. Disponível na internet: < [www.univasf.edu.br/~hvasf/](http://www.univasf.edu.br/~hvasf/)>. Acesso em 23 de novembro de 2014.

IMAMURA, P.M.; MARSAIOLI, A.J.; BARATA, L.E.S.; RÚVEDA, E.A. <sup>13</sup>C NMR spectral analysis of eperuane diterpenes. **Phytochemistry**, v. 16, p. 1842-1844, 1977.

ISHIBASHI, M.; ODA, H.; MITAMURA, M.; OKUYAMA, E.; KOMIYAMA, K.; KAWAGUCHI, K.; WATANABE, T.; ALVES, S.M.; MAEKAWA, T.; OHTSUKI, K. Casein kinase II inhibitors isolated from two brazilian plants *Hymenaea parvifolia* and *Wulffia baccata*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 9, n. 15, p. 2157-2160, 1999.

JAYAPRAKASAM, B.; ALEXANDER-LINDO, R.L.; DEWITT, D.L.; NAIR, M.G. (). Terpenoids from Stinking toe (*Hymenaea courbaril*) fruits with cyclooxygenase and lipid peroxidation inhibitory activities. **Food Chemistry**, v. 105, p. 485-490, 2007.

JOSSANG, J.; BEL-KASSAOUI, H.; JOSSANG, A.; SEULEIMAN, M.; NEL, A. Quesnoin, a novel pentacyclic ent-diterpene from 55 million years old Oise amber. **Journal of Organic Chemistry**, v. 73, p. 412-417, 2008.

JOST, T.; SELL, Y.; FOUSSEREAU, J. Contact allergy to manilla resin. Nomenclature and physico-chemistry of manilla, kauri, dammar and copal resins. **Contact Dermatitis**, v. 21, n. 4, p. 228-238, 1989.

KADER, M.A.; BERGER, J.M.; SLEBODNICK, C.; HOCH, J.; MALONE, S.; WISSE, J.H.; WERKHOVEN, M.C.M.; MAMBER, S.; KINGSTON, D.G.I. Isolation and absolute

configuration of ent-halimane diterpenoids from *Hymenaea courbaril* from the Suriname rain forest. **Journal of Natural Products**, v. 65, n. 1, p. 11-15, 2002.

KAI, K.C.; PETKOWICZ, C.L.O. Influence of extraction conditions on properties of seed xyloglucan. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 46, p. 223-228, 2010.

KAKEGAWA, K.; EDASHIGEA, Y.; SHII, T. Xyloglucan from xylem-differentiating zones of *Cryptomeria japonica*. **Phytochemistry**, v. 47, n. 5, p. 767-771, 1998.

KHOO, S.F.; OEHLISCHLAGER, A.C.; OURISSON, G. Structure and stereochemistry of the diterpenes of *Hymenaea courbaril* (Caesalpinioideae) seed pod resin. **Tetrahedron**, v. 29, p. 3379-3388, 1973.

LAMBERT, M.; STRK, D.; HANSEN, S. H.; SAIRAFIANPOUR, M.; JAROSZEWSKI, J. W. Rapid extract dereplication using HPLC-SPE-NMR: analysis of isoflavonoids from *Smirnowia iranica*. **Journal of Natural Products**, v. 68, p. 1500-1509, 2005.

LANG, G.; MAYHUDIN, N. A.; MITOVA, M. I.; SUN, L.; VAN DER SAR, S.; BLUNT, J. W.; COLE, A. L. J.; ELLIS, G.; LAATSCH, H.; MUNRO, M. H. G. Evolving trends in the dereplication of natural product extracts: new methodology for rapid, small-scale investigation of natural product extracts. **Journal of Natural Products**, v. 71, p. 1595-1599, 2008.

LANGENHEIM, J.H.; STUBBLEBINE, W.H.; LINCOLN, D.E.; FOSTER, C.E. (1978). Implications of variation in resin composition among organs, tissues and populations in the tropical legume *Hymenaea*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 6, p. 299-313, 1978.

LANGENHEIM, J.H.; LEE, Y.T. Reinstatement of the genus *Hymenaea* (Leguminosae: Caesalpinioideae) in Africa. **Brittonia**, v. 26, p. 3-21, 1974.

LANGENHEIM, J.H.; STUBBLEBINE, W.H. Variation in leaf resin composition between parent tree and progeny in *Hymenaea*: implications for herbivory in the humid tropics. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 11, n. 2, p. 97-106, 1983.

LEITÃO, F.; LEITÃO, S.G.; ALMEIDA, M.Z.; CANTOS, J.; COELHO, T.; SILVA, P.E.A. Medicinal plants from open-air market in the state of Rio de Janeiro, Brazil, as potential source of new antimycobacterial agents. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 149, p. 513-521, 2013.

LI, X; Zhao, Y.; HUANG, R.; ZHU, W.; ZENG, X.; ZHAO, J.; FENG, Y.; HE, R. Simultaneous quantification of 17 bioactive constituents in *Sarcandra glabra* by liquid chromatography-electrospray ionisation-mass spectrometry. **Analytical Methods**, v. 6, p. 7989-7995, 2014.

LIMA, N.N.; REICHER, F.; CORRÊA, J.B.C.; GANTER, J.L.M.S.; SIERAKOWSKI, M.R. Partial structure of a xyloglucan from the seed of *Hymenaea courbaril* var. *stilbocarpa* (jatobá). **Ciência e Cultura**, v. 45, n. 1, p. 22-26, 1993.

LIMA, N.N.; RECHIA, C.G.V.; GANTER, J.L.M.S.; REICHER, F.; SIERAKOWSKI, M.R. Oligosaccharides derived from the xyloglucan isolated from the seeds of *Hymenaea courbaril* var. *stilbocarpa*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 17, n. 6, p. 413-415, 1995.

LOPES, G. C.; BLAINSKI, A., SANTOS, P. V. P.; DICIAULA, M. C.; MELLO, J. C. P. Development and validation of an HPLC method for the determination of epicatechin in *Maytenus ilicifolia* (Schrad.) Planch., Celastraceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, p. 789-795, 2010.

LOPEZ, J.A.; SCHIFF, P.L.J.R. Isolation of astilbin and sitosterol from *Hymenaea courbaril*. **Phytochemistry**, v. 15, p. 2025-2028, 1976.

LUCYSZYN, N.; LUBAMBO, A.F.; MATOS, K.F.; MARVILLA, I.; SOUZA, C.F.; SIERAKOWSKI, M.R. Specific modification of xyloglucan from *Hymenaea courbaril* seeds. **Materials Science and Engineering: C**, v. 29, p. 552–558, 2009.

MACHADO, H.; NAGEM, T.J.; PETERS, V.M.; FONSECA, C.S.; OLIVEIRA, T.T. Flavonóides e seu potencial terapêutico. **Boletim do Centro de Biologia da Reprodução**, v.27, n.1/2, p.33-39, 2008.

MANSUR, J.S.; BREDER, M.V.R.; MANSUR, M.C.A.; AZULAY, R.D. Determinação do fator de proteção solar por espectrofotometria. **Anais Brasileiros De Dermatologia**, v.61, p. 121-124, 1986.

MARANHÃO, C.A.; PINHEIRO, I.O.; SANTANA, A.L.B.D.; OLIVEIRA, L.S.; NASCIMENTO, M.S.; BIEBER, L.W. Antitermic and antioxidant activities of heartwood extracts and main flavonoids of *Hymenaea stignocarpa* Mart. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 79, p. 9-13, 2013.

MARQUES, L.C.; PIERI, C.; ROMAN-JÚNIOR, W.A.; CARDOSO, M.L.C.; MILANEZE-GUTIERRE, M.A.; MELLO, J.C.P. Controle farmacognóstico das raízes de *Heteropteris aphrodisiaca* O. Mach. (Malpighiaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 4, p. 604-615, 2007.

MARQUES, G. S.; MONTEIRO, R. P. M; LEÃO, W. F.; LYRA, M. A. M.; PEIXOTO, M. S.; ROLIM-NETO, P. J.; XAVIER, H. S.; SOARES, L. A. L. Avaliação de procedimentos para quantificação espectrofotométrica de flavonoides totais em folhas de *Bauhinia forficata* Link. **Química Nova**, v. 35, n. 3, p. 517-522, 2012.

MARSAIOLI, A.J.; LEITÃO-FILHO, H.F.; CAMPELLO, J.P. Diterpenes in the bark of *Hymenaea courbaril*. **Phytochemistry**, v. 14, n. 8, p. 1882-1883, 1975.

MARSTON, A.; DUDAN, G.; GUPTA, M.P.; SOLIS, P.N.; CORREA, M.D.; HOSTETTMANN, K. Screening of Panamanian plants for molluscicidal activity. **International Journal of Pharmacognosy**, v. 34, n. 1, p. 15-18, 1996.

MARTIN, S.S.; LANGENHEIM, J.H.; ZAVARIN, E. Sesquiterpenes in leaf pocket resin of *Hymenaea courbaril*. **Phytochemistry**, v. 11, p. 3049-3051, 1972.

MARTIN, S.S.; LANGENHEIM, J.H.; ZAVARIN, E. Quantitative variation in leaf pocket resin composition in *Hymenaea courbaril*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 2, p. 75-87, 1974.

MARTIN, S.S.; LANGENHEIM, J.H.; ZAVARIN, E (1976). Biosynthesis of sesquiterpenes in *Hymenaea* inferred from their quantitative co-occurrence. **Phytochemistry**, v. 15, p. 113-119, 1976.

MARTIN, S.; FREITAS, R.A.; OBAYASHI, E.; SIERAKOWSKI, M.R. Physico-chemical aspects of galactoxyloglucan from the seeds of *Hymenaea courbaril* and its tetraborate complex. **Carbohydrate Polymers**, v. 54, p. 287-295, 2003.

MARTIN, S.S.; LANGENHEIM, J.H. Compositional Variation of Leaf Pocket Sesquiterpenes in *Trachylobium verrucosum*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 1, p. 35-37, 1973.

MARTIN, S.S.; LANGENHEIM, J.H. Enantio-8(17),13(16),14-labdatrien-18-oic acid from trunk resin of Kenyan *Hymenaea verrucosa*. **Phytochemistry**, v. 13, p. 523-525, 1974.

MARTÍNEZ-RICHA, A.; VERA-GRAZIANO, R.; RIVERA, A.; JOSEPH-NATHAN, P. A solid-state <sup>13</sup>C NMR analysis of ambers. **Polymer**, v. 41, p. 743-750, 2000.

MCNEIL, M.; DARVILL, A.G.; FRY, S.C.; ALBERSHEIM, P. Structure and function of the primary cell walls of plants. **Annual Review of Biochemistry**, v. 53, p. 625-663, 1984.

MELLO-PEIXOTO, E.C.; FIGUEIREDO, P.A.; SILVA, L.P.; SILVA, R.M. Antioxidant activity and phenol content and flavonoids total of the *Hymenaea stignocarpa* Mart and *Hymenaea courbaril* L. **Planta Medica**, v. 79, p. PF7, 2013.

MELO, M.G.G.; MENDONÇA, M.S.; MENDES, A.M.S. Morphological analysis of seeds, germination, and seedlings of jatobá (*Hymenaea intermedia* Ducke var. adenotricha (Ducke) Lee & Lang.) (Leguminosae-caesalpinioideae). **Acta Amazonica**, v. 34, n. 1, p. 9–14, 2004.

MENDES, R.F.; CARLINI, E.A. Brazilian plants as possible adaptogens: An ethnopharmacological survey of books edited in Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 109, p. 493-500, 2007.

MILLIKEN, W. Traditional anti-malarial medicine in Roraima, Brazil. **Economic Botany**, v. 51, n. 3, p. 212-237, 1997.

MORAES, M.O.; FONTELES, M.C.; MORAES, M.E.A.; MACHADO, M.I.L.; MATOS, F.J.A. Screening for anticancer activity of plants from the northeast of Brazil. **Fitoterapia**, v. 68, n. 3, p. 235-239, 1997.

MOULARI, B.; PELLEQUER, Y.; LBOUTOUNNE, H.; GIRARD, C.; CHAUMONT, J.P.; MILLET, J.; MUYARD, F. Isolation and in vitro antibacterial activity of astilbin, the bioactive flavanone from leaves of *Harungana madagascariensis* Lam. ex Poir. (Hypericaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 106, p. 272-278, 2006.

NEVES, M.C.A.; NEVES, P.C.A.; ZANINI, J.C.; MEDEIROS, Y.S.; YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. Analgesic and anti-inflammatory activities of the crude hydroalcoholic extract obtained from the bark of *Hymenaea martiana*. **Phytotherapy Research**, v. 7, n. 5, p. 356-362, 1993.

NG, J.; BANDEIRA, N.; LIU, W-T.; GHASSEMIAN, M.; SIMMONS, T. L.; GERWICK, W. H.; LININGTON, R.; DORRESTEIN, P. C.; PEVZNER, P. A. Dereplication and de novo sequencing of nonribosomal peptides. **Nature Methods**, v. 6, p. 596-599, 2009.

NOGUEIRA, R.T.; SHEPHERD, G.J.; LAVERDE-JR, A.; MARSAIOLI, A.J.; IMAMURA, P.M. Clerodane-type diterpenes from the seed pods of *Hymenaea courbaril* var. *stilbocarpa*. **Phytochemistry**, v.58, n.8, p. 1153-1157, 2001.

NOGUEIRA, R.T.; GIACOMINI, R.A.; SHEPHERD, J.G.; IMAMURA, P.M. A new ent-clerodane diterpene from *Hymenaea courbaril* var. *altissima*. **Journal of Brazilian Chemistry Society**, v.13, n.3, p. 389-391, 2002a.

NOGUEIRA, R.T.; QUEIROZ, S.C.N.; IMAMURA, P.M. Semi-preparative HPLC separation of terpenoids from the seed pods of *Hymenaea courbaril* var. *stilbocarpa*. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 25, n. 1, p. 59-67, 2002b.

NOVAIS, T.S.; COSTA, J.F.O.; DAVID, J.P.L.; DAVID, J.M.; QUEIROZ, L.P.; FRANÇA, F.; GIULIETTI, A.M.; SOARES, M.B.P.; SANTOS, R.R. Atividade antibacteriana em alguns extratos de vegetais do semiárido brasileiro. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 13, n. 2, p. 05-08, 2003.

OLIVEIRA, D.R.; LEITÃO, G.G.; COELHO, T.S.; SILVA, P.E.A.; LOURENÇO, M.C.S.; ARQMO; LEITÃO, S.G. Ethnopharmacological versus random plant selection methods for the evaluation of the antimycobacterial activity. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 21, n. 5, p. 793-806, 2011.

OLIVEIRA, V.B.; YAMADA, L.T.; FAGG, C.W.; BRANDÃO, M.G.I. Native foods from Brazilian biodiversity as a source of bioactive compounds. **Food Research International**, v. 48, p. 170–179, 2012.

OLIVEIRA, C. J.; ARAÚJO, T. L. Plantas medicinais: usos e crenças de idosos portadores de hipertensão arterial. **Revista Eletrônica de Enfermagem**, v. 09, p.93-105, 2007.

OMAIRA, A.; GLADYS, L.P.; MARITZA, M.; OMAIRA, G.; LILIAN, S. Structural features of a xyloglucan isolated from *Hymenaea courbaril* gum. **Food Hydrocolloids**, v. 21, p. 1302-1309, 2007.

ORSI, P.R.; BONAMIN, F.; SEVERI, J.A.; SANTOS, R.C.; VILEGAS, W.; HIMURA-LIMA, C.A.; STASI, L.C.D. *Hymenaea stignocarpa* Mart. ex Hayne: A Brazilian medicinal plant with gastric and duodenal anti-ulcer and antidiarrheal effects in experimental rodent models. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 143, p. 81-90, 2012.

ORSI, P.R.; SEITO, L.N.; STASIN, L.C.D. *Hymenaea stignocarpa* Mart. ex Hayne: A tropical medicinal plant with intestinal anti-inflammatory activity in TNBS model of intestinal inflammation in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 151, p. 380-385, 2014.

PASA, M.C.; SOARES, J.J.; GUARIM-NETO, G. Estudo etnobotânico na comunidade de Conceição-Açu (alto da bacia do rio Aricá Açu, MT, Brasil). **Acta Botanica Brasilica**, v. 19, n. 2, p. 195-207, 2005.

PAULI, G. F.; KUCZKOWIAK, U.; NAHRSTEDT, A. Solvent effects in the structure dereplication of caffeoyl quinic acids. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 37, p. 827-836, 1999.

PERES, M.T.L.P.; LOPES, J.R.R.; SILVA, C.B.; CÂNDIDO, A.C.S.; SIMIONATTO, E.; CABRAL, M.R.P.; OLIVEIRA, R.M.; FACCO, J.T.; CARDOSO, C.A.L.; SIMAS, P.H. Phytotoxic and antioxidant activity of seven native fruits of Brazil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 27, n. 4, p. 836-846, 2013

PETTIT, G.R.; MENG, Y.; STEVENSON, C.A.; DOUBEK, D.L.; KNIGHT, J.C.; CICHACZ, Z.; PETTIT, R.K.; CHAPUIS, J.C.; SCHIMIDT, J.M. Isolation and structure of palstatin from the amazon tree *Hymenaea palustris*. **Journal of Natural Products**, v. 66, n. 2, p. 259-262, 2003.

PIZZOLATTI, M. G.; CUNHA-JR, A.; SZPOGANICZ, B.; SOUZA, E.; BRAZ-FILHO, R.; SCHRIPSEMA, J. Flavonoides glicosilados das folhas e flores de *Bauhinia forficata* (Leguminosae). **Química Nova**, v. 26, n. 4, p. 466-469, 2003.

POINAR-JR, G. *Hymenaea protera* sp. nov. (Leguminosae, Caesalpinioideae) from Dominican amber has African affinities. **Experientia**, v. 47, p. 1075-1082, 1991.

POINAR-JR, G.; BROWN, A.E. *Hymenaea mexicana* sp. nov. (Leguminosae: Caesalpinioideae) from Mexican amber indicates Old World connections. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 139, p. 125–132, 2002.

POPIM, R. C.; CORRENTE, J. E.; MARINO, J. A. G.; SOUZA, C. A. Câncer de pele: uso de medidas preventivas e perfil demográfico de um grupo de risco na cidade de Botucatu. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 13, n.4, p. 1331-1336, 2008.

POZZI, A. C. S.; YARIWAKE, J. H. **Desenvolvimento de método de análise espectrofotométrica de flavonoides do “maracujá”**. Dissertação de mestrado. Universidade de São Paulo, Instituto de Química de São Carlos, 2007.

PRISTA, L.N.; ALVES, A.C.; MORGADO, R. **Tecnologia Farmacêutica**. 6 ed., Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2003.

RODRIGUES, M.I.; IEMMA, A.F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos**. 2ª ed. Campinas: Casa do Espírito Amigo Fraternidade Fé e Amor, 2009. 358 p.

RODRIGUES, P. O.; GONÇALVES, T. C.; SILVA, W. B. Influência de diferentes sistemas de solventes no processo de extração de *Calendula officinalis* L. (Asteraceae). **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 23, n. 1, p. 27-31, 2004.

RODRIGUEZ-ROJO, S.; VISENTIN, A.; MAESTRI, D.; COCERO, M.J. Assisted extraction of rosemary antioxidants with green solvents. **Journal of Food Engineering**, v. 109, p. 98-103, 2012.

ROSÁRIO, M.M.T.; NOLETO, G.R.; BENTO, J.F.; REICHER, F.; OLIVEIRA, M.B.M.; PETKOWICZ, C.L.O. Effect of storage xyloglucans on peritoneal macrophages. **Phytochemistry**, v. 69, p. 464-472, 2008.

ROSÁRIO, M.M.T.; KANGUSSU-MARCOLINO, M.M.; AMARAL, A.E.; NOLETO, G.R.; PETKOWICZ, C.L.O. Storage xyloglucans: Potent macrophages activators. **Chemico-Biological Interactions**, v. 189, p.127-133, 2011.

ROUQUAYROL, M.Z.; FONTELES, M.C.; ALENCAR, J.E.; MATOS, F.J.A.; CRAVEIRO, A.A. Molluscicidal activity of essential oils from northeastern Brazilian plants. **Revista Brasileira de Pesquisas Médicas e Biológicas**, v. 13, p. 135-143, 1980.

SAMPAIO, M.R.F.P.; NAKAMURA, I.T.; OLIVEIRA-JR, B.S.; OLIVEIRA, M.M. Modification of the dipaolo and Moore method for testing extracts and anticancer substances. Part I. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 51, n. 1/4, p. 35-39, 1984.

SHANLEY P, Medina G. **Árvores frutíferas e plantas úteis na vida amazônica**. Belém: CIFOR, Imazon, 2005.

SILVA, M.R.; SILVA, M.S.; MARTINS, K.A.; BORGES, S. Utilização tecnológica dos frutos de jatobá-do-cerrado e de jatobá-da-mata na elaboração de biscoitos fontes de fibra alimentar e isentos de açúcares. **Food Science and Technology**, v. 21, n. 2, p. 176-182, 2001.

SILVA, M.S.; LEITE, K.R.B.; SABA, M.D. Anatomia dos órgãos vegetativos de *Hymenaea martiana* Hayne (Caesalpinioideae- Fabaceae): espécie de uso medicinal em Caetité-BA. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, n. 4, p. 673-679, 2012.

SILVA, A.J.R.; ANDRADE, L.H.C. Etnobotânica nordestina: estudo comparativo da relação entre comunidades e vegetação na Zona do Litoral - Mata do Estado de Pernambuco, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 19, n. 1, p. 45-60, 2005.

SILVA-JÚNIOR, E. B. **Atividade in vitro das frações do extrato vegetal de *Hymenaea martiana* Hayne e do antimicrobiano doxicilina contra bactérias da microbiota cérvico-vaginal de ovinos.** Dissertação. Programa de Pós-graduação em Recursos Naturais do Semiárido. Universidade Federal do Vale do São Francisco. Petrolina, 2014.

SIMÕES, C.M.O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** 6.ed. Porto Alegre: UFRGS; Florianópolis: UFSC, 2007. p. 277.

SIMÕES, et al. Ipomopsin and hymenain, two biscoumarins from seeds of *Hymenaea courbaril*. **Phytochemistry Letters**, v.2, p. 59–62, 2009.

SLINKARD, K.; SINGLETON, V. L. Total phenol analyses: automation and comparison with manual methods. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 28, p. 49-55, 1977.

SOUZA, C.D.; FELFILI, J.M. Uso de plantas medicinais na região de Alto Paraíso de Goiás, GO, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 20, n. 1, p. 135-142, 2006.

SOUZA, A. C. M. SILVA, M. R. R. **Potencial antifúngico de extratos de *Hymenaea martiana*.** Dissertação de Mestrado. Medicina Tropical - Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública. Universidade Federal de Goiás. Goiânia, 2008.

SOUZA, A.C.M.; KATO, L.; SILVA, C.C.; CIDADE, A.F.; OLIVEIRA, C.M.A.; SILVA, M.R.R. Antimicrobial activity of *Hymenaea martiana* towards dermatophytes and *Cryptococcus neoformans*. **Mycoses**, v. 53, p. 500–503, 2009.

SOUZA, M.P.; ROUQUAYROL, M.Z. Molluscicidal activity of plants from Northeast Brazil. **Revista Brasileira de Pesquisas Médicas e Biológicas**, v. 7, n. 4, p. 389-394, 1974.

SPAGOLLA, L.C.; SANTOS, M.M.; PASSOS, L.M.L.; AGUIAR, C.L. Extração alcoólica de fenólicos e flavonoides totais de mirtilo “Rabbiteye” (*Vaccinium ashei*) e sua atividade antioxidante. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 30, n.2, p.187-191, 2009.

STUBBLEBINE, W.; LANGENHEIM, J.H.; LINCOLN, D. Vegetative growth and leaf resin composition in *Hymenaea courbaril* under photoperiodic extremes. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 3, p. 219-228, 1975.

TAKAGI, K.; SHIMOMURA, K.; KOIZUMI, Y.; MITSUNAGA, T.; ABE, I. (). Tyrosinase inhibitors from the pericarp of jatobá (*Hymenaea courbaril* L.). **Journal of Natural Medicines**, v. 53, n. 1, p. 15-21, 1999.

TAKAGI, K.; CHUJOH, S.I.; SHIOHARA, S.N.; YAMADA, S.I.; NOMURA, S.; SHIMOMURA, K.; OHNISHI, K. Anti-inflammatory effect and pigmentation inhibitory effect of the pericarp of jatobá (*Hymenaea courbaril* L.). **Journal of Natural Medicines**, v. 56, n. 3, p. 108-112, 2002.

TINÉ, M.A.S.; SILVA, C.O.; LIMA, D.U.; CARPITA, N.C.; BUCKERIDGE, N.S. (). Fine structure of a mixed–oligomer storage xyloglucan from seeds of *Hymenaea courbaril*. **Carbohydrate Polymers**, v. 66, p. 444–454, 2006.

TORRES, L.M.B.; SOUZA, D.J.; PIGLIUCCI, T.F.; SAAD, J.S.; CENTENO, D.C. (). Biologic activities and chemical composition of the *Hymenaea courbaril* var. *stilbocarpa* (Jatobá) extracts. **Planta Medica**, v. 78, p. PI201, 2012.

VALE, C.R.; SILVA, C.R.; OLIVEIRA, C.M.A.; SILVA, A.L.; CARVALHO, S.; CHEN-CHEN, L. Assessment of toxic, genotoxic, antigenotoxic, and recombinogenic activities

of *Hymenaea courbaril* (Fabaceae) in *Drosophila melanogaster* and mice. **Genetics and Molecular Research**, v. 12, n. 3 p. 2712-2724, 2013.

VEGGI, P.C. Obtenção de compostos fenólicos de plantas brasileiras via tecnologia supercrítica utilizando cossolventes e extração assistida por ultrassom. Tese - Doutorado. Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2013.

VEGGI, P.C.; PRADO, J.M.; BATAGLION, G.A.; EBERLIN, M.N.; MEIRELES, M.A.A. Obtaining phenolic compounds from Jatobá (*Hymenaea courbaril* L.) bark by supercritical fluid extraction. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 89, p. 68-77, 2014.

VEIGA-JÚNIOR, V.F.; PINTO, A.C.; MACIEL, M.A.M. Plantas medicinais: cura segura? **Química Nova**, v. 28, n. 3, p. 519-528, 2005.

VERPOORTE, R.; DIHAL, P.P. Medicinal plants of Surinam. IV. Antimicrobial activity of some medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 21, n. 3, p. 315-318, 1987.

VIANNA-FILHO, R.P.; PETKOWICZ, C.L.O.; SILVEIRA, J.L.M. Rheological characterization of O/W emulsions incorporated with neural and charged polysaccharides. **Carbohydrate Polymers**, v. 93, p. 266-272, 2013.

VINUEZA, N.R.; GALLARDO, V.A.; KLIMEK, J.F.; CARPITA, N.C.; KENTTÄMAA, H.I. Analysis of xyloglucans by ambient chloride attachment ionization tandem mass spectrometry. **Carbohydrate Polymers**, v. 98, p. 1203-1213, 2013.

VIOLANTE, et al. Avaliação in vitro da atividade fotoprotetora de extratos vegetais do cerrado de Mato Grosso. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 2A, p. 452-457, 2009.

WAGNER, H.; BLADT, S. **Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas**. Berlim Heidelberg: Springer Verlag., p. 384, 1996.

WARIDEL, P.; WOLFENDER, J-L.; NDJOKO, K.; HOBBY, K. R.; MAJOR, H. J.; HOSTETTMANN, K. Evaluation of quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry and ion-trap multiple-stage mass spectrometry for the differentiation of C-glycosidic flavonoid isomers. **Journal of Chromatography A**, v. 926, p. 29-41, 2001.

WOLFENDER, J-L.; WARIDEL, P.; NDJOKO, K.; HOBBY, K. R.; MAJOR, H. J.; HOSTETTMANN, K. Evaluation of Q-ToF-MS/MS and multiple stage IT-MSn for the dereplication of flavonoids and related compounds in crude plant extracts. **Analysis**, v. 28, p. 895-906, 2000.

WOLFENDER, J-L. HPLC in natural product analysis: the detection issue. **Planta Medica**, v. 75, p. 719-734, 2009.

XU, Q.; WU, F.; CAO, J.; CHEN, T.; JIANG, J.; SAIKI, I. KODA, A. Astilbin selectively induces dysfunction of liver-infiltrating cells — novel protection from liver damage. **European Journal of Pharmacology**, v. 377, p. 93–100, 1999.

YAN, R.; XU, Q. Astilbin selectively facilitates the apoptosis of interleukin-2-dependent phytohemagglutinin-activated jurkat cells. **Pharmacological Research**, v. 44, n. 2, 2001.

YANG, X.; SUN, Y.; XU, Q.; GUO, Z. Synthesis and immunosuppressive activity of L-rhamnopyranosyl flavonoids. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 4, p. 2483–2491, 2006.

ZHANG, Q.F.; LI, S.C.; LAI, W.P.; CHEUNG, H.Y.  $\beta$ -Cyclodextrin facilitates simultaneous analysis of six bioactive components in *Rhizoma Smilacis Glabrae* by capillary zone electrophoresis. **Food Chemistry**, v. 113, 684–691, 2009.

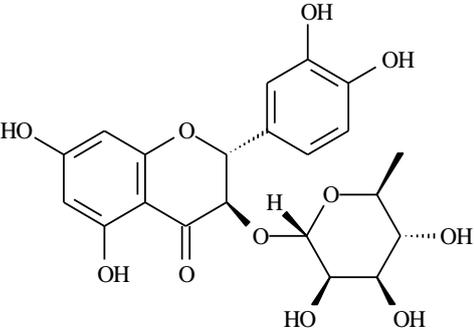
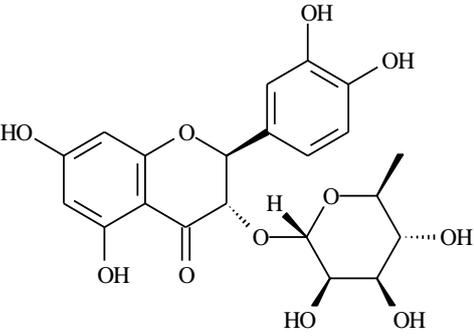
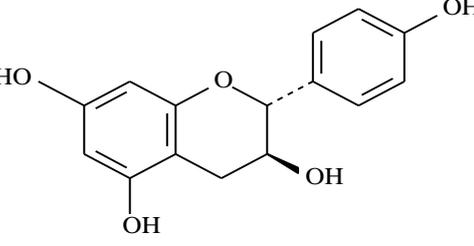
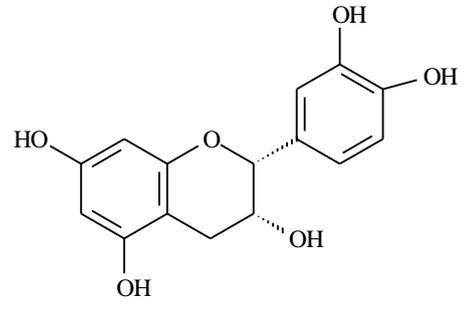
ZHANG, Q.F.; CHEUNG, H.Y. The content of astilbin and taxifolin in concentrated extracts of *Rhizoma Smilacis Glabrae* and turtle jelly vary significantly. **Food Chemistry**, v. 119, 907–912, 2010.

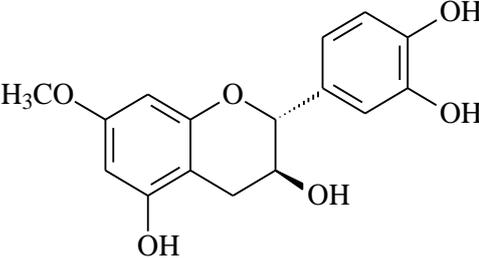
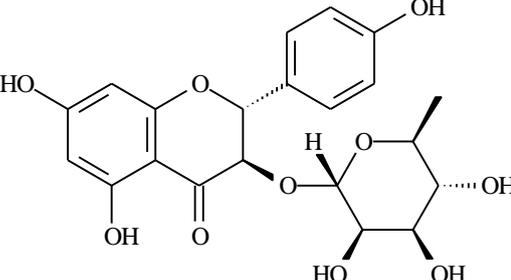
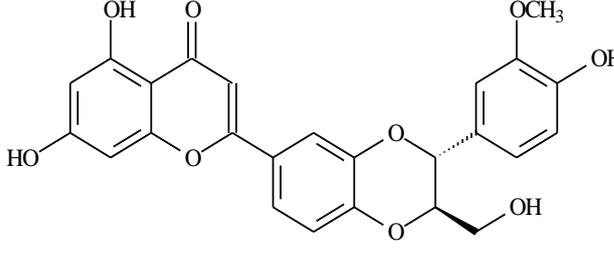
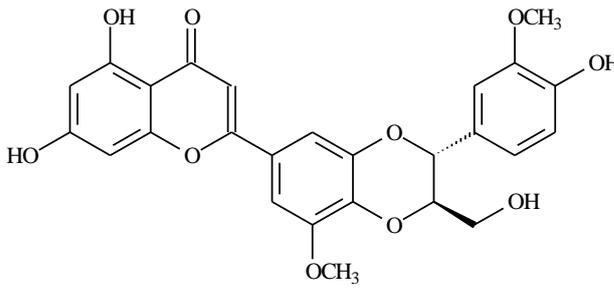
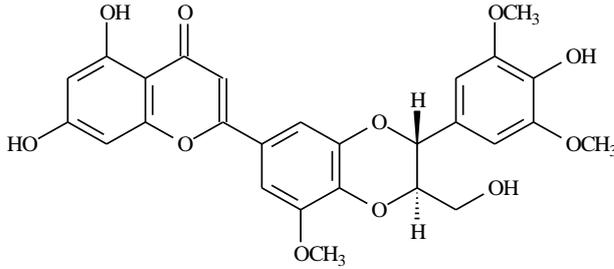
ZHANG, Q.F.; CHEUNG, H.Y.; ZENG, L.B. Development of HPLC fingerprint for species differentiation and quality assessment of *Rhizoma Smilacis Glabrae*. **Journal of Natural Medicines**, v. 67, p. 207–211, 2013a.

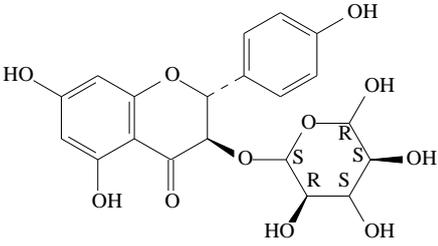
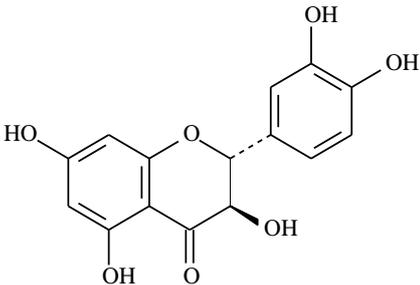
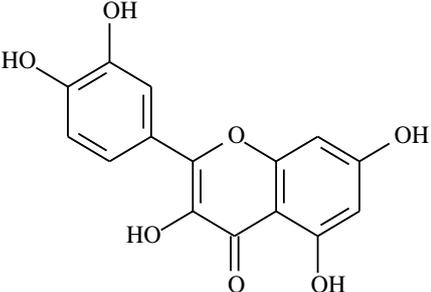
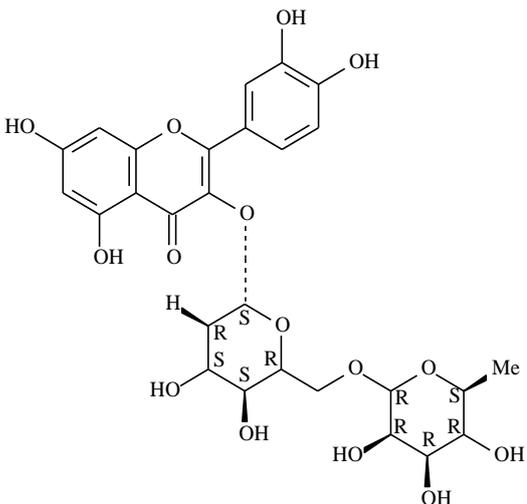
ZHANG, Q.F.; NIE, H.C.; SHANNUANG, X.C.; YIN, Z.P.; ZHENG, G.D.; CHEN, J.G. Aqueous solubility and stability enhancement of astilbin through complexation with cyclodextrins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.61, 151–156, 2003.

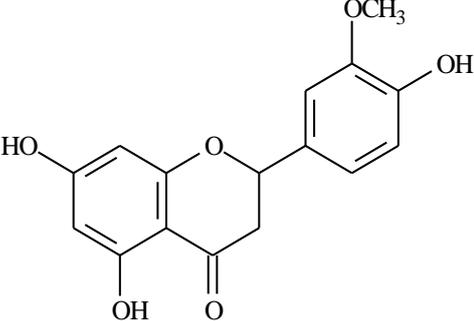
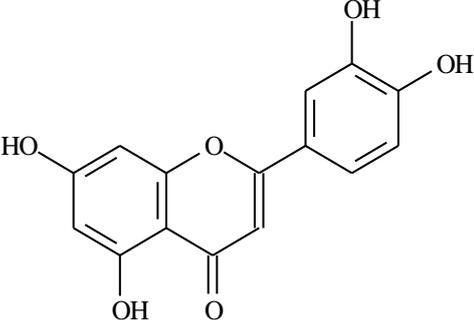
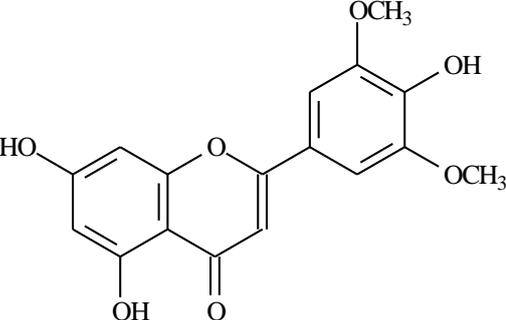
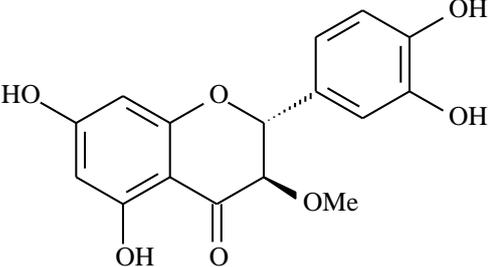
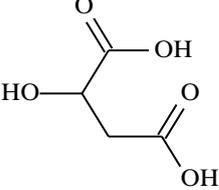
ZHANG, Q.F.; FU, Y.J.; HUANG, Z.W.; SHANNUANG, X.C.; YU, X.G. aqueous stability of astilbin: effects of ph, temperature, and solvent. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.61, p. 12085–12091, 2013.

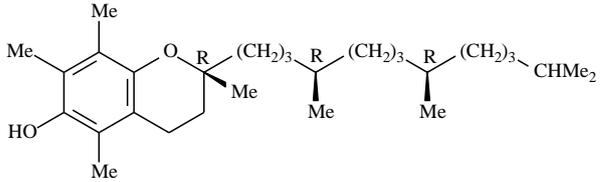
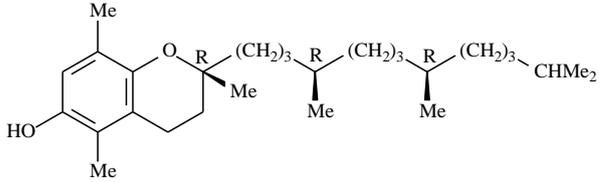
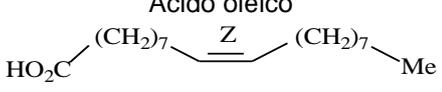
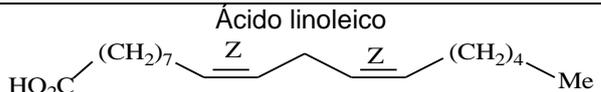
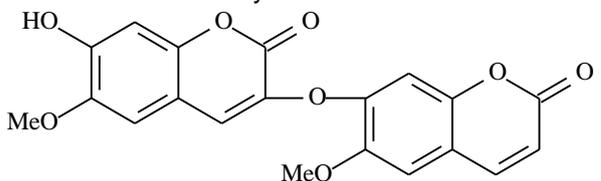
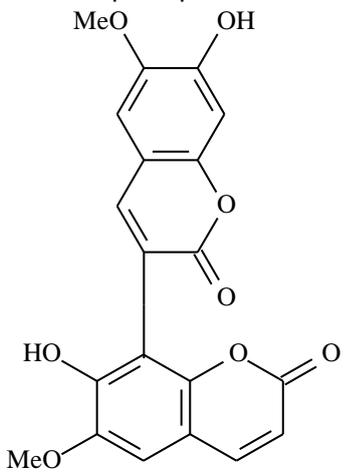
**ANEXO A - Constituintes químicos de *Hymenaea*.**

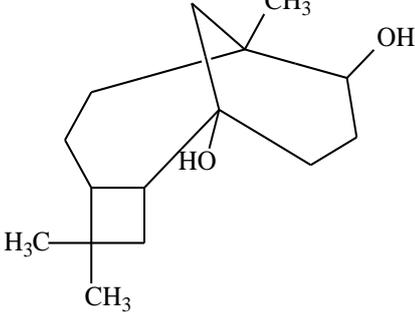
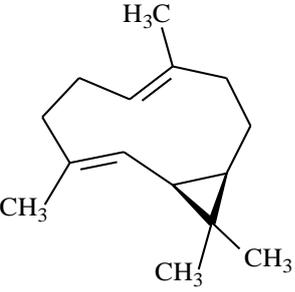
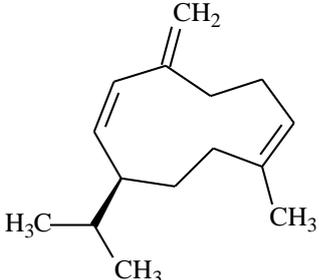
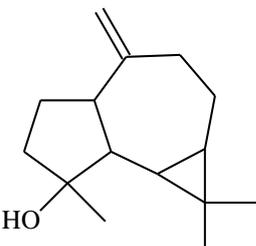
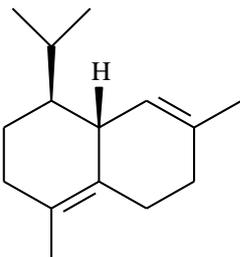
| Substância (estrutura)   | Espécie   | Localidade (parte utilizada)       | Referências                 |
|--|---|------------------------------------|-----------------------------|
| <p>Astilbina</p>            | <i>Hymenaea courbaril</i>                         | Não especificado (Folhas + galhos) | LOPEZ; SCHIFF, 1976         |
|  |   | Costa Rica (Folhas)                | ARTAVIA et al., 1995        |
|  | <i>Hymenaea martiana</i>                          | Brasil (Casca)                     | CARNEIRO et al., 1993       |
|  |   | Brasil (Casca)                     | CECHINEL-FILHO et al., 2000 |
|  | <i>Hymenaea parvifolia</i>                        | Brasil (Casca)                     | ISHIBASHI et al., 1999      |
| <p>Neo-astilbina</p>       | <i>Hymenaea parvifolia</i>                        | Brasil (Casca)                     | ISHIBASHI et al., 1999      |
| <p>D-(+)-Catequina</p>    | <i>Hymenaea courbaril</i> var. <i>stilbocarpa</i> | Brasil (Casca)                     | VEGGI et al., 2014          |
| <p>(-) epi-Catequina</p>  | <i>Hymenaea parvifolia</i>                        | Costa Rica (Folhas)                | ARTAVIA et al., 1995        |
|  | <i>Hymenaea courbaril</i> var. <i>stilbocarpa</i> | Brasil (Casca)                     | VEGGI et al., 2014          |

|   |  |                           |                                  |
|---|--|---------------------------|----------------------------------|
| <p>7-metoxi-catequina</p>          | <p><i>Hymenaea<br/>stignocarpa</i></p> | <p>Brasil<br/>(Casca)</p> | <p>MARANHÃO et<br/>al., 2013</p> |
| <p>Engeletina</p>                  | <p><i>Hymenaea<br/>martiana</i></p>    | <p>Brasil<br/>(Casca)</p> | <p>CARNEIRO et<br/>al., 1993</p> |
| <p>(±)-Hidnocarpina D</p>         | <p><i>Hymenaea<br/>palustris</i></p>   | <p>Peru<br/>(Folhas)</p>  | <p>PETTIT et al.,<br/>2003</p>   |
| <p>5'-metoxi-hidnocarpina D</p>  | <p><i>Hymenaea<br/>palustris</i></p>   | <p>Peru<br/>(Folhas)</p>  | <p>PETTIT et al.,<br/>2003</p>   |
| <p>Palstatina</p>                | <p><i>Hymenaea<br/>palustris</i></p>   | <p>Peru<br/>(Folhas)</p>  | <p>PETTIT et al.,<br/>2003</p>   |

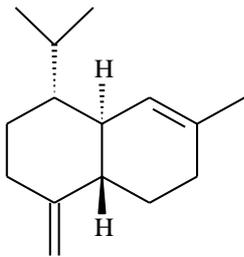
|   |  |                                  |                                     |
|---|--|----------------------------------|-------------------------------------|
| <p>Dihidrokaempferol glucosídeo</p>  <p>The structure shows a flavanone core with a 3,4,5-trihydroxyphenyl group at the 2-position and a glucose moiety at the 3-position. The glucose is in its pyranose form with hydroxyl groups at C2, C3, and C6.</p>               | <p><i>Hymenaea courbaril</i> var. <i>stilbocarpa</i></p> | <p>Brasil (Casca)</p>            | <p>VEGGI et al., 2014</p>           |
| <p>Taxifolina</p>  <p>The structure shows a flavanone core with a 3,4,5-trihydroxyphenyl group at the 2-position and a hydroxyl group at the 3-position.</p>   | <p><i>Hymenaea courbaril</i> var. <i>stilbocarpa</i></p> | <p>Brasil (Casca)</p>            | <p>VEGGI et al., 2014</p>           |
|   | <p><i>Hymenaea stignocarpa</i></p>                       | <p>Brasil (Casca)</p>            | <p>MARANHÃO et al., 2013</p>        |
|   | <p><i>Hymenaea martiana</i></p>                          | <p>Brasil (Casca)</p>            | <p>CECHINEL-FILHO et al., 2000.</p> |
| <p>Quercetina</p>  <p>The structure shows a flavon-3-ol core with hydroxyl groups at positions 2, 3, 5, and 7, and a 3,4,5-trihydroxyphenyl group at the 4-position.</p>  | <p><i>Hymenaea stignocarpa</i></p>                       | <p>Brasil (Casca)</p>            | <p>MARANHÃO et al., 2013</p>        |
| <p>Rutina</p>  <p>The structure shows a flavon-3-ol core with hydroxyl groups at positions 2, 3, 5, and 7, a 3,4,5-trihydroxyphenyl group at the 4-position, and a glucose moiety at the 3-position. The glucose is linked to a rhamnose moiety at the 6-position.</p> | <p><i>Hymenaea stignocarpa</i></p>                       | <p>Brasil (Frutos)</p>           | <p>PERES et al., 2013</p>           |
|   | <p>Crisoeriol</p>  | <p><i>Hymenaea palustris</i></p> | <p>Peru (Folhas)</p>                |

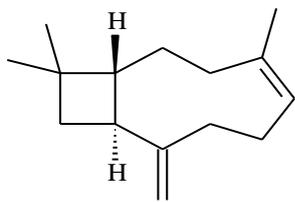
|   |  |   |                                  |
|---|--|---|----------------------------------|
|  <p>The structure shows a flavone core with hydroxyl groups at positions 5 and 7 on the A-ring, and a 3,4-dihydroxyphenyl group at position 2 on the C-ring. A methoxy group is attached to the 7-position of the A-ring.</p>                    |  |   |                                  |
| <p>Luteolina</p>  <p>The structure shows a flavone core with hydroxyl groups at positions 5 and 7 on the A-ring, and a 3,4-dihydroxyphenyl group at position 2 on the C-ring.</p>  |  | <p>Peru<br/>(Folhas)</p>                        | <p>PETTIT et al.,<br/>2003</p>   |
| <p>Tricina</p>  <p>The structure shows a flavone core with hydroxyl groups at positions 5 and 7 on the A-ring, and a 3,4,5-trimethoxyphenyl group at position 2 on the C-ring.</p>   |  | <p>Peru<br/>(Folhas)</p>                        | <p>PETTIT et al.,<br/>2003</p>   |
| <p>Hultenina</p>  <p>The structure shows a flavone core with hydroxyl groups at positions 5 and 7 on the A-ring, and a 3,4-dihydroxyphenyl group at position 2 on the C-ring. A methoxy group is attached to the 6-position of the A-ring.</p> | <p><i>Hymenaea<br/>stignocarpa</i></p>                           | <p>Brasil<br/>(Casca)</p>                       | <p>MARANHÃO et<br/>al., 2013</p> |
| <p>(±)- Ácido málico</p>  <p>The structure shows a four-carbon chain with hydroxyl groups on the second and third carbons, and carboxylic acid groups on the first and fourth carbons.</p>   | <p><i>Hymenaea<br/>courbaril</i> var.<br/><i>stilbocarpa</i></p> | <p>Brasil<br/>(Casca)</p>                       | <p>VEGGI et al.,<br/>2014</p>    |
| <p>α-tocoferol</p>  | <p><i>Hymenaea<br/>courbaril</i></p>                             | <p>Brasil (Polpa<br/>e óleo da<br/>semente)</p> | <p>DIAS et al.,<br/>2013</p>     |

|   |   |                   |                       |
|---|---|-------------------|-----------------------|
|  <p>The structure shows a chromanol ring with methyl groups at positions 2, 4, and 8, and a hydroxyl group at position 6. The side chain at position 2 consists of a saturated ring with a methyl group, followed by two chiral centers (each with a methyl group and a (CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub> group), and a terminal (CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-CHMe<sub>2</sub> group.</p> |   |                   |                       |
| <p><b>β-tocoferol</b></p>    | <i>Hymenaea courbaril</i>                         |                   | DIAS et al., 2013     |
| <p><b>Ácido oléico</b></p>  <p>HO<sub>2</sub>C—(CH<sub>2</sub>)<sub>7</sub>—<u>Z</u>—(CH<sub>2</sub>)<sub>7</sub>—Me</p>   | <i>Hymenaea stignocarpa</i>                       | Brasil (Casca)    | MARANHÃO et al., 2013 |
| <p><b>Ácido palmítico</b></p> <p>HO<sub>2</sub>C—(CH<sub>2</sub>)<sub>14</sub>—Me</p>   | <i>Hymenaea stignocarpa</i>                       | Brasil (Casca)    | MARANHÃO et al., 2013 |
| <p><b>Ácido linoleico</b></p>  <p>HO<sub>2</sub>C—(CH<sub>2</sub>)<sub>7</sub>—<u>Z</u>—(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>—<u>Z</u>—(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>—Me</p>   | <i>Hymenaea stignocarpa</i>                       | Brasil (Casca)    | MARANHÃO et al., 2013 |
| <p><b>Ácido esteárico</b></p> <p>HO<sub>2</sub>C—(CH<sub>2</sub>)<sub>16</sub>—Me</p>   | <i>Hymenaea stignocarpa</i>                       | Brasil (Casca)    | MARANHÃO et al., 2013 |
| <p><b>Hymenaina</b></p>  <p>The structure consists of two coumarin units linked at their 3-positions. The left coumarin has a hydroxyl group at position 7 and a methoxy group at position 8. The right coumarin has a methoxy group at position 8.</p>  | <i>Hymenaea courbaril</i> var. <i>stilbocarpa</i> | Brasil (Sementes) | SIMÕES et al., 2009   |
| <p><b>Ipomopsina</b></p>  <p>The structure is a dimeric coumarin. It features a central coumarin core with a hydroxyl group at position 7 and a methoxy group at position 8. This core is linked at its 3-position to another coumarin unit that has a hydroxyl group at position 7 and a methoxy group at position 8.</p>   |   | Brasil (Sementes) | SIMÕES et al., 2009   |

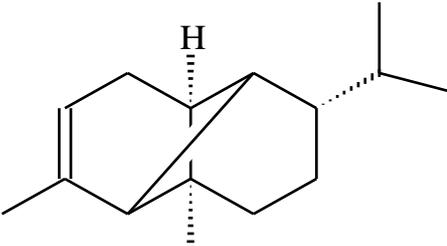
|   |                                  |   |  |
|---|----------------------------------|---|--|
| <p>Cariolano-1,9beta-diol</p>    |                                  | <p>Não especificado (Óleo essencial de frutos maduros)</p>  | <p>AGUIAR et al., 2010.</p>  |
| <p>Biciclogermacreno (1S,2E,10R)-3,7,11,11-Tetrametilbiciclo-undeca-2,6-dieno)</p>  |                                  | <p>Não especificado (Óleo essencial de frutos imaturos)</p>   | <p>AGUIAR et al., 2010.</p>  |
| <p>Germacreno-D</p>    |                                  | <p>Não especificado (Óleo essencial de frutos imaturos)</p>   | <p>AGUIAR et al., 2010.</p>  |
| <p>Espatulanol</p>   | <p><i>Hymenaea courbaril</i></p> | <p>Jamaica (Frutos)</p> <p>Não especificado (Óleo essencial de frutos imaturos)</p>   | <p>JAYAPRAKAS AM et al., 2007</p> <p>AGUIAR et al., 2010.</p>  |
| <p>δ-Cadineno</p>    | <p><i>Hymenaea courbaril</i></p> | <p>México (Folhas)</p> <p>Não especificado (Folhas)</p> <p>Guadeloupe (Resina de sementes)</p> <p>México, Costa Rica, Brasil (Folhas,</p> | <p>MARTIN et al., 1972</p> <p>STUBBLEBINE et al., 1975</p> <p>KHOO et al., 1973</p> <p>LANGENHEIM et al., 1978</p> |

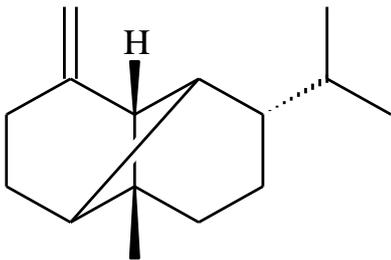
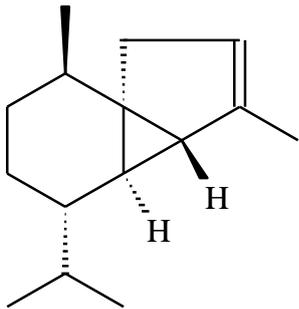
|   |                              |                               |
|---|------------------------------|-------------------------------|
|   | pecíolos, galhos)            |                               |
|   | Brasil (Resina de folhas)    | LANGENHEIM; STUBBLEBINE, 1983 |
|   | Venezuela (Resina de folhas) | LANGENHEIM; STUBBLEBINE, 1983 |
| <i>Hymenaea courbaril</i> var. <i>altissima</i>   | Brasil (Folhas)              | MARTIN et al., 1974           |
| <i>Hymenaea courbaril</i> var. <i>courbaril</i>   | México (Folhas)              | MARTIN et al., 1974           |
|   | Honduras (Folhas)            | MARTIN et al., 1974           |
|   | Costa Rica (Folhas)          | MARTIN et al., 1974           |
|   | Porto Rico (Folhas)          | MARTIN et al., 1974           |
|   | Venezuela (Folhas)           | MARTIN et al., 1974           |
|   | Brasil (Folhas)              | MARTIN et al., 1974           |
|   | Brasil (Resina de folhas)    | LANGENHEIM; LEE, 1974         |
| <i>Hymenaea courbaril</i> var. <i>stilbocarpa</i> | Brasil (Folhas)              | MARTIN et al., 1974           |
|   | Brasil (Folhas)              | MARTIN et al., 1976           |
|   | Brasil (Folhas)              | ARRHENIUS; LANGENHEIM, 1983   |
|   | Brasil (Resina de folhas)    | LANGENHEIM; STUBBLEBINE, 1983 |
| <i>Hymenaea courbaril</i> var. <i>subsessilis</i> | Brasil (Folhas)              | MARTIN et al., 1974           |
|   | Brasil (Resina de folhas)    | LANGENHEIM; STUBBLEBINE, 1983 |
|   | Brasil (Resina de folhas)    | LANGENHEIM; LEE, 1974         |
| <i>Hymenaea</i> sp.                               | Costa Rica (Folhas)          | MARTIN et al., 1974           |
| <i>Hymenaea intermedia</i>                        | Brasil (Resina de folhas)    | LANGENHEIM; STUBBLEBINE, 1983 |
| <i>Hymenaea parvifolia</i>                        | Brasil (Resina de folhas)    | LANGENHEIM; STUBBLEBINE, 1983 |

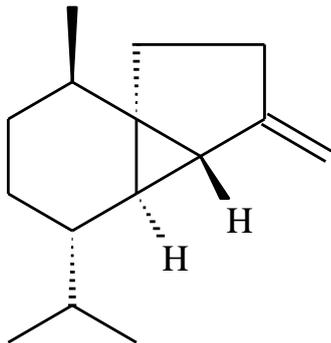
|  |   |   |                                   |
|--|---|---|-----------------------------------|
|  | <i>Hymenaea oblongifolia</i>                      | Brasil<br>(Resina de folhas)  | LANGENHEIM;<br>LEE, 1974          |
|  | <i>Hymenaea verrucosa</i>                         | Quênia<br>(Resina de folhas)  | LANGENHEIM;<br>LEE, 1974          |
|  |   | Madagascar<br>(Resina das folhas)                                   | LANGENHEIM;<br>LEE, 1974          |
|  | <i>Hymenaea verrucosa</i>                         | Quênia<br>(Resina de folhas)  | MARTIN;<br>LANGENHEIM,<br>1973.   |
|  |   | Madagascar<br>(Resina das folhas)                                   | MARTIN;<br>LANGENHEIM,<br>1973.   |
| <p style="text-align: center;">γ-Cadineno</p>  | <i>Hymenaea courbaril</i>                         | Não especificado<br>(Folhas)  | STUBBLEBINE<br>et al., 1975       |
|  | <i>Hymenaea courbaril</i> var. <i>altissima</i>   | Brasil<br>(Folhas)  | MARTIN et al.,<br>1974            |
|  | <i>Hymenaea courbaril</i> var. <i>courbaril</i>   | México<br>(Folhas)  | MARTIN et al.,<br>1974            |
|  |   | Honduras<br>(Folhas)  | MARTIN et al.,<br>1974            |
|  |   | Costa Rica<br>(Folhas)  | MARTIN et al.,<br>1974            |
|  |   | Porto Rico<br>(Folhas)  | MARTIN et al.,<br>1974            |
|  |   | Venezuela<br>(Folhas)   | MARTIN et al.,<br>1974            |
|  |   | Brasil<br>(Folhas)  | MARTIN et al.,<br>1974            |
|  |   | México,<br>Costa Rica,<br>Brasil<br>(Folhas,<br>pecíolo,<br>galhos) | LANGENHEIM<br>et al, 1978         |
|  |   | Brasil<br>(Resina de folhas)  | LANGENHEIM;<br>LEE, 1974          |
|  | <i>Hymenaea courbaril</i> var. <i>stilbocarpa</i> | Brasil<br>(Folhas)  | MARTIN et al.,<br>1974            |
|  |   | Brasil<br>(Folhas)  | ARRHENIUS;<br>LANGENHEIM,<br>1983 |
|  | <i>Hymenaea courbaril</i> var. <i>subsessilis</i> | Brasil<br>(Folhas)  | MARTIN et al.,<br>1974            |
| <i>Hymenaea</i> sp.  | Costa Rica<br>(Folhas)                            | MARTIN et al.,<br>1974  |                                   |

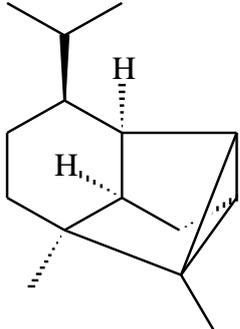
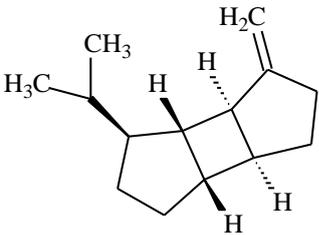
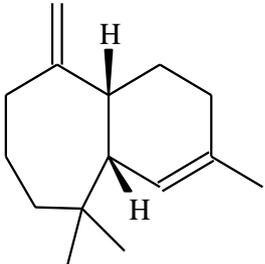
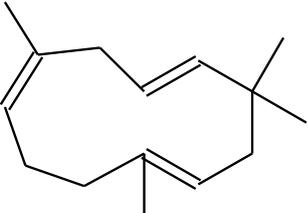
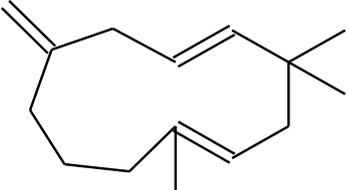
|  |   |   |                               |
|--|---|---|-------------------------------|
| <p style="text-align: center;">Cariofileno</p>  | <i>Hymenaea courbaril</i>                         | México (Folhas)                                       | MARTIN et al., 1972           |
|  |   | Não especificado (Folhas)                             | STUBBLEBINE et al., 1975      |
|  |   | Guadelupe (Resina de sementes)                        | KHOO et al., 1973             |
|  |   | México, Costa Rica, Brasil (Folhas, pecíolos, galhos) | LANGENHEIM et al., 1978       |
|  |   | Brasil (Resina de folhas)                             | LANGENHEIM; STUBBLEBINE, 1983 |
|  | <i>Hymenaea courbaril</i> var. <i>altissima</i>   | Brasil (Folhas)                                       | MARTIN et al., 1974           |
|  | <i>Hymenaea courbaril</i> var. <i>courbaril</i>   | México (Folhas)                                       | MARTIN et al., 1974           |
|  |   | Honduras (Folhas)                                     | MARTIN et al., 1974           |
|  |   | Costa Rica (Folhas)                                   | MARTIN et al., 1974           |
|  |   | Puerto Rico (Folhas)                                  | MARTIN et al., 1974           |
|  |   | Venezuela (Folhas)                                    | MARTIN et al., 1974           |
|  |   | Brasil (Folhas)                                       | MARTIN et al., 1974           |
|  |   | Brazil (Resina de folhas)                             | LANGENHEIM; LEE, 1974         |
|  | <i>Hymenaea courbaril</i> var. <i>stilbocarpa</i> | Brasil (Folhas)                                       | MARTIN et al., 1974           |
|  |   | Brasil (Folhas)                                       | ARRHENIUS; LANGENHEIM, 1983   |
|  |   | Brasil (Resina de folhas)                             | LANGENHEIM; STUBBLEBINE, 1983 |
|  |   | Brasil (Folhas)                                       | MARTIN et al., 1976           |
|  | <i>Hymenaea courbaril</i> var. <i>subsessilis</i> | Brasil (Folhas)                                       | MARTIN et al., 1974           |
|  |   | Brasil (Resina de folhas)                             | LANGENHEIM; STUBBLEBINE, 1983 |
|  |   | Brasil (Resina de folhas)                             | LANGENHEIM; LEE, 1974         |
| <i>Hymenaea</i> sp.  | Costa Rica (Folhas)                               | MARTIN et al., 1974                                   |                               |

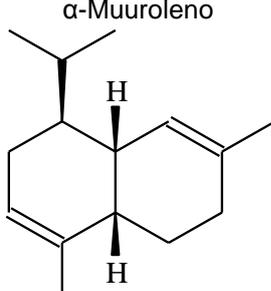


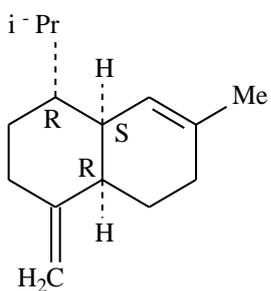
|   |   |  |                             |
|---|---|--|-----------------------------|
|  |   | México, Costa Rica, Brasil (Folhas, pecíolos, galhos)              | LANGENHEIM et al., 1978     |
|   |   | Non specified<br>Non specified (Óleo essencial de frutos imaturos) | AGUIAR et al., 2010.        |
|   |   | Brasil (Folhas)  | ARRHENIUS; LANGENHEIM, 1983 |
|   | <i>Hymenaea courbaril</i> var. <i>courbaril</i>   | Brasil (Resina de folhas)  | LANGENHEIM; LEE, 1974       |
|   | <i>Hymenaea courbaril</i> var. <i>stilbocarpa</i> | Brasil (Folhas)  | ARRHENIUS; LANGENHEIM, 1983 |
|   |   | Brasil (Folhas)  | ARRHENIUS; LANGENHEIM, 1983 |
|   | <i>Hymenaea courbaril</i> var. <i>subsessilis</i> | Brasil (Folhas)  | ARRHENIUS; LANGENHEIM, 1983 |
|   |   | Brasil (Resina de folhas)  | LANGENHEIM; LEE, 1974       |
|   | <i>Hymenaea intermedia</i>                        | Brasil (Folhas)  | ARRHENIUS; LANGENHEIM, 1983 |
|   | <i>Hymenaea parvifolia</i>                        | Brasil (Folhas)  | ARRHENIUS; LANGENHEIM, 1983 |
|   | <i>Hymenaea oblongifolia</i>                      | Brasil (Resina de folhas)  | LANGENHEIM; LEE, 1974       |
|   | <i>Hymenaea verrucosa</i>                         | Quênia (Resina de folhas)  | LANGENHEIM; LEE, 1974       |
|   |   | Madagascar (Resina de folhas)                                      | LANGENHEIM; LEE, 1974       |
|   | <i>Hymenaea verrucosa</i>                         | Quênia (Resina de folhas)  | MARTIN; LANGENHEIM, 1973.   |
|   |   | Madagascar (Resina de folhas)                                      | MARTIN; LANGENHEIM, 1973.   |
| β-Copaeno   | <i>Hymenaea courbaril</i>                         | México (Folhas)  | MARTIN et al., 1972         |
|   |   | Não especificado (Folhas)  | STUBBLEBINE et al., 1975    |

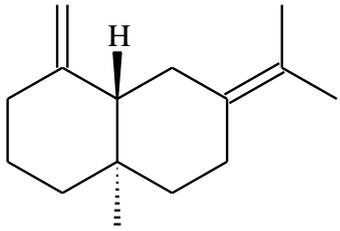
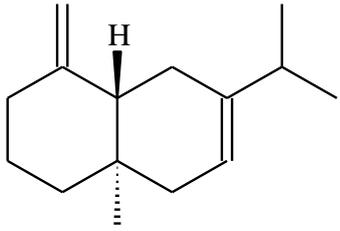
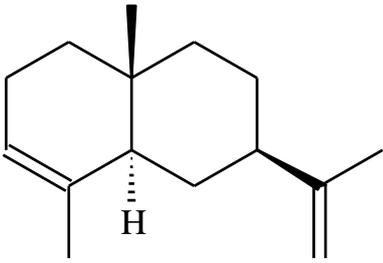
|   |   |   |                             |
|---|---|---|-----------------------------|
|    |   | México, Costa Rica, Brasil (Folhas, pecíolos, galhos) | LANGENHEIM et al., 1978     |
|   | <i>Hymenaea courbaril</i> var. <i>altissima</i>   | Brasil (Folhas)                                       | MARTIN et al., 1974         |
|   | <i>Hymenaea courbaril</i> var. <i>courbaril</i>   | México (Folhas)                                       | MARTIN et al., 1974         |
|   |   | Honduras (Folhas)                                     | MARTIN et al., 1974         |
|   |   | Costa Rica (Folhas)                                   | MARTIN et al., 1974         |
|   |   | Porto Rico (Folhas)                                   | MARTIN et al., 1974         |
|   |   | Venezuela (Folhas)                                    | MARTIN et al., 1974         |
|   |   | Brasil (Folhas)                                       | MARTIN et al., 1974         |
|   | <i>Hymenaea courbaril</i> var. <i>stilbocarpa</i> | Brasil (Folhas)                                       | MARTIN et al., 1974         |
|   |   | Brasil (Folhas)                                       | ARRHENIUS; LANGENHEIM, 1983 |
|   | <i>Hymenaea courbaril</i> var. <i>subsessilis</i> | Brasil (Folhas)                                       | MARTIN et al., 1974         |
|   | <i>Hymenaea</i> sp.                               | Costa Rica (Folhas)                                   | MARTIN et al., 1974         |
| <p style="text-align: center;">α-Cubebeno</p>  | <i>Hymenaea courbaril</i>                         | México (Folhas)                                       | MARTIN et al., 1972         |
|   |   | Não especificado (Folhas)                             | STUBBLEBINE et al., 1975    |
|   |   | México, Costa Rica, Brasil (Folhas, pecíolos, galhos) | LANGENHEIM et al., 1978     |
|   | <i>Hymenaea courbaril</i> var. <i>altissima</i>   | Brasil (Folhas)                                       | MARTIN et al., 1974         |
|   | <i>Hymenaea courbaril</i> var. <i>courbaril</i>   | México (Folhas)                                       | MARTIN et al., 1974         |
|   |   | Honduras (Folhas)                                     | MARTIN et al., 1974         |
|   |   | Costa Rica (Folhas)                                   | MARTIN et al., 1974         |
|   |   | Porto Rico (Folhas)                                   | MARTIN et al., 1974         |
|   |   | Venezuela (Folhas)                                    | MARTIN et al., 1974         |

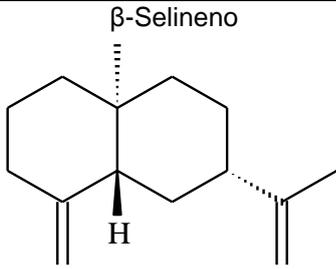
|   |   |                               |                             |
|---|---|-------------------------------|-----------------------------|
|   |   | Brasil (Folhas)               | MARTIN et al., 1974         |
|   |   | Brasil (Resina de folhas)     | LANGENHEIM; LEE, 1974       |
|   | <i>Hymenaea courbaril</i> var. <i>stilbocarpa</i> | Brasil (Folhas)               | MARTIN et al., 1974         |
|   |   | Brasil (Folhas)               | ARRHENIUS; LANGENHEIM, 1983 |
|   | <i>Hymenaea courbaril</i> var. <i>subsessilis</i> | Brasil (Folhas)               | MARTIN et al., 1974         |
|   |   | Brasil (Resina das folhas)    | LANGENHEIM; LEE, 1974       |
|   | <i>Hymenaea</i> sp.                               | Costa Rica (Folhas)           | MARTIN et al., 1974         |
|   | <i>Hymenaea oblongifolia</i>                      | Brasil (Resina das folhas)    | LANGENHEIM; LEE, 1974       |
|   | <i>Hymenaea verrucosa</i>                         | Quênia (Resina de folhas)     | LANGENHEIM; LEE, 1974       |
|   |   | Madagascar (Resina de folhas) | LANGENHEIM; LEE, 1974       |
|   | <i>Hymenaea verrucosa</i>                         | Quênia (Resina de folhas)     | MARTIN; LANGENHEIM, 1973.   |
|   |   | Madagascar (Resina de folhas) | MARTIN; LANGENHEIM, 1973.   |
| <p style="text-align: center;">β-Cubebeno</p>  | <i>Hymenaea courbaril</i> var. <i>altissima</i>   | Brasil (Folhas)               | MARTIN et al., 1974         |
|   | <i>Hymenaea courbaril</i> var. <i>courbaril</i>   | México (Folhas)               | MARTIN et al., 1974         |
|   |   | Honduras (Folhas)             | MARTIN et al., 1974         |
|   |   | Costa Rica (Folhas)           | MARTIN et al., 1974         |
|   |   | Porto Rico (Folhas)           | MARTIN et al., 1974         |
|   |   | Venezuela (Folhas)            | MARTIN et al., 1974         |
|   |   | Brasil (Folhas)               | MARTIN et al., 1974         |
|   | <i>Hymenaea courbaril</i> var. <i>stilbocarpa</i> | Brasil (Folhas)               | MARTIN et al., 1974         |
|   | <i>Hymenaea courbaril</i> var. <i>subsessilis</i> | Brasil (Folhas)               | MARTIN et al., 1974         |
|   | <i>Hymenaea</i> sp.                               | Costa Rica (Folhas)           | MARTIN et al., 1974         |

|   |   |   |                          |
|---|---|---|--------------------------|
| <p>Ciclosativeno</p>                               | <i>Hymenaea courbaril</i>                       | Guadelupe (Resina de sementes)                        | KHOO et al., 1973        |
| <p><math>\beta</math>-Bourboneno</p>               | <i>Hymenaea courbaril</i>                       | Guadelupe (Resina de sementes)                        | KHOO et al., 1973        |
| <p><math>\alpha</math>-Himachaleno</p>           | <i>Hymenaea courbaril</i>                       | Guadelupe (Resina de sementes)                        | KHOO et al., 1973        |
| <p>Humuleno ou <math>\alpha</math>-Humuleno</p>  | <i>Hymenaea courbaril</i>                       | Guadelupe (Resina de sementes)                        | KHOO et al., 1973        |
|   |   | México (Folhas)                                       | MARTIN et al., 1972      |
| <p><math>\beta</math>-Humuleno</p>               | <i>Hymenaea courbaril</i>                       | Não especificado (Folhas)                             | STUBBLEBINE et al., 1975 |
|   |   | México (Folhas)                                       | MARTIN et al., 1972      |
|   |   | México, Costa Rica, Brasil (Folhas, pecíolos, galhos) | LANGENHEIM et al., 1978  |
|   | <i>Hymenaea courbaril</i> var. <i>altissima</i> | Brasil (Folhas)                                       | MARTIN et al., 1974      |

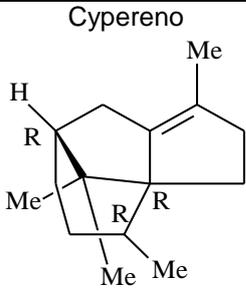
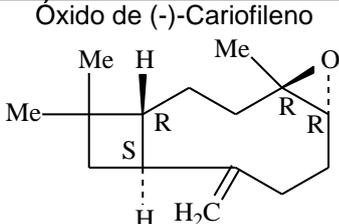
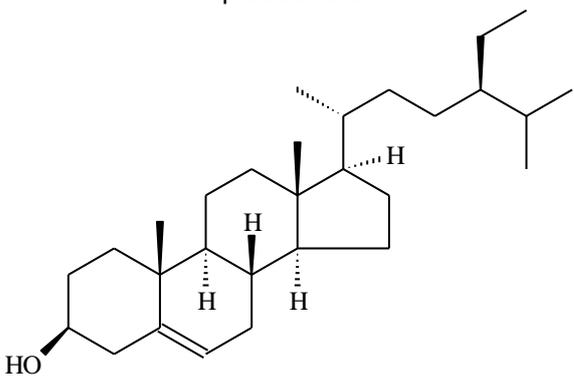
|  |   |                                |                             |
|--|---|--------------------------------|-----------------------------|
|  | <i>Hymenaea courbaril</i> var. <i>courbaril</i>   | México (Folhas)                | MARTIN et al., 1974         |
|  |   | Honduras (Folhas)              | MARTIN et al., 1974         |
|  |   | Costa Rica (Folhas)            | MARTIN et al., 1974         |
|  |   | Porto Rico (Folhas)            | MARTIN et al., 1974         |
|  |   | Venezuela (Folhas)             | MARTIN et al., 1974         |
|  |   | Brasil (Folhas)                | MARTIN et al., 1974         |
|  |   | Brasil (Resina de folhas)      | LANGENHEIM; LEE, 1974       |
|  | <i>Hymenaea courbaril</i> var. <i>stilbocarpa</i> | Brasil (Folhas)                | MARTIN et al., 1974         |
|  |   | Brasil (Folhas)                | ARRHENIUS; LANGENHEIM, 1983 |
|  | <i>Hymenaea courbaril</i> var. <i>subsessilis</i> | Brasil (Folhas)                | MARTIN et al., 1974         |
|  |   | Brasil (Resina de folhas)      | LANGENHEIM; LEE, 1974       |
|  | <i>Hymenaea</i> sp.                               | Costa Rica (Folhas)            | MARTIN et al., 1974         |
|  | <i>Hymenaea oblongifolia</i>                      | Brasil (Resina de folhas)      | LANGENHEIM; LEE, 1974       |
|  | <i>Hymenaea verrucosa</i>                         | Quênia (Resina de folhas)      | LANGENHEIM; LEE, 1974       |
|  |   | Madagascar (Resina de folhas)  | LANGENHEIM; LEE, 1974       |
|  | <i>Hymenaea verrucosa</i>                         | Quênia (Resina de folhas)      | MARTIN; LANGENHEIM, 1973.   |
|  |   | Madagascar (Resina das folhas) | MARTIN; LANGENHEIM, 1973.   |
| <p style="text-align: center;">α-Muuroleno</p>  | <i>Hymenaea courbaril</i>                         | Guadelupe (Resina de sementes) | KHOO et al., 1973           |
| <p style="text-align: center;">γ-Muuroleno</p>   | <i>Hymenaea courbaril</i>                         | México (Folhas)                | MARTIN et al., 1972         |

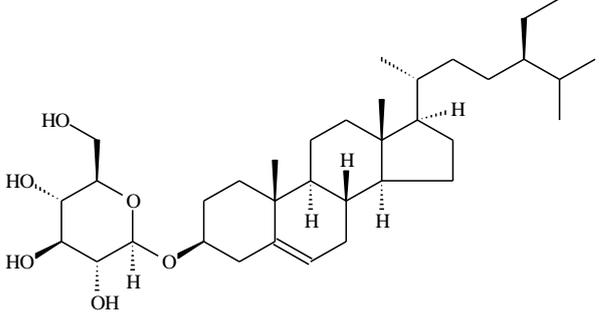
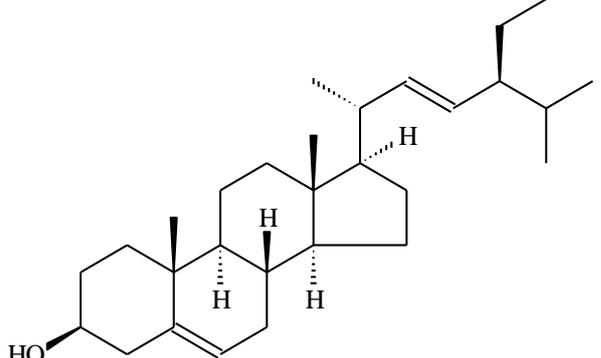
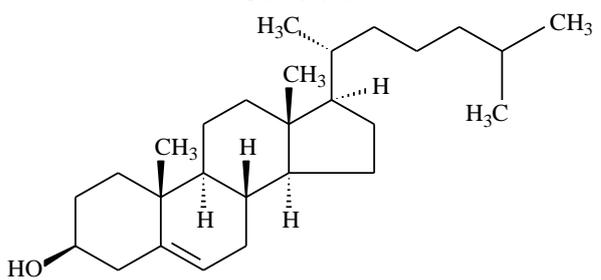
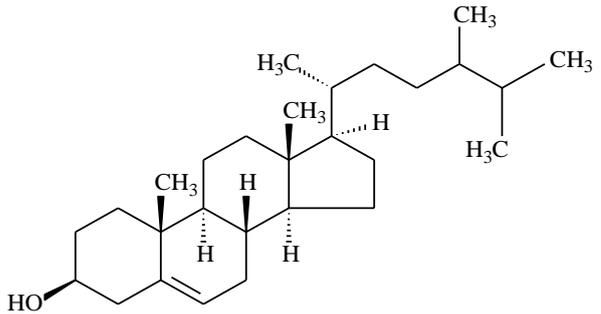
|   |   |   |                              |
|---|---|---|------------------------------|
|  |   | México, Costa Rica, Brasil (Folhas, pecíolos, galhos) | LANGENHEIM et al., 1978      |
|   | <i>Hymenaea courbaril</i> var. <i>altissima</i>   | Brasil (Folhas)                                       | MARTIN et al., 1974          |
|   | <i>Hymenaea courbaril</i> var. <i>courbaril</i>   | México (Folhas)                                       | MARTIN et al., 1974          |
|   |   | Honduras (Folhas)                                     | MARTIN et al., 1974          |
|   |   | Costa Rica (Folhas)                                   | MARTIN et al., 1974          |
|   |   | Porto Rico (Folhas)                                   | MARTIN et al., 1974          |
|   |   | Venezuela (Folhas)                                    | MARTIN et al., 1974          |
|   |   | Brasil (Folhas)                                       | MARTIN et al., 1974          |
|   |   | Brasil Resina de folhas                               | LANGENHEIM; LEE, 1974        |
|   | <i>Hymenaea courbaril</i> var. <i>stilbocarpa</i> | Brasil (Folhas)                                       | MARTIN et al., 1974          |
|   |   | Brasil (Folhas)                                       | MARTIN et al., 1976          |
|   |   | Brasil (Folhas)                                       | ARRHENIUS; LANGENHEIM, 1983. |
|   | <i>Hymenaea courbaril</i> var. <i>subsessilis</i> | Brasil (Folhas)                                       | MARTIN et al., 1974          |
|   |   | Brasil (Resina de folhas)                             | LANGENHEIM; LEE, 1974        |
|   | <i>Hymenaea</i> sp.                               | Costa Rica (Folhas)                                   | MARTIN et al., 1974          |
|   | <i>Hymenaea oblongifolia</i>                      | Brasil (Resina de folhas)                             | LANGENHEIM; LEE, 1974        |
|   | <i>Hymenaea verrucosa</i>                         | Quênia (Resina de folhas)                             | LANGENHEIM; LEE, 1974        |
|   |   | Madagascar (Resina de folhas)                         | LANGENHEIM; LEE, 1974        |
|   | <i>Hymenaea verrucosa</i>                         | Quênia (Resina de folhas)                             | MARTIN; LANGENHEIM, 1973.    |
|   |   | Madagascar (Resina de folhas)                         | MARTIN; LANGENHEIM, 1973.    |
| Selina-4(14)-7(11)-diene  | <i>Hymenaea courbaril</i>                         | Guadelupe (Resina de sementes)                        | KHOO et al., 1973            |

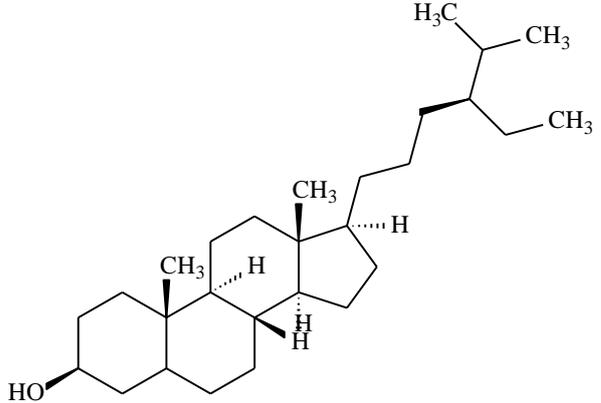
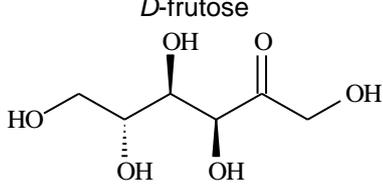
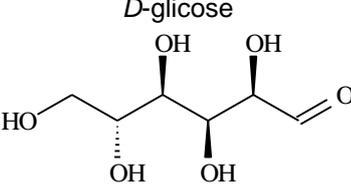
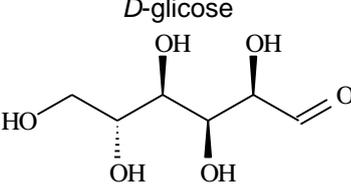
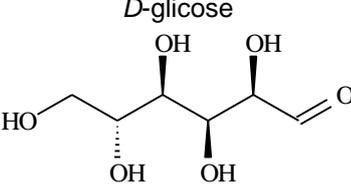
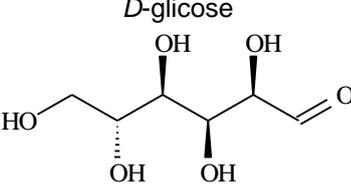
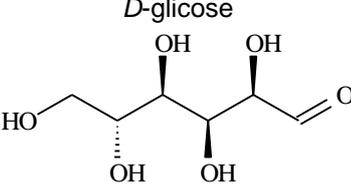
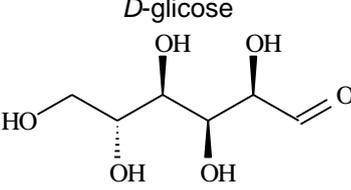
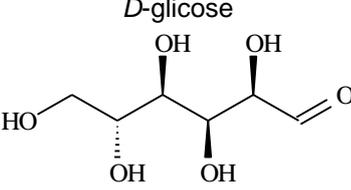
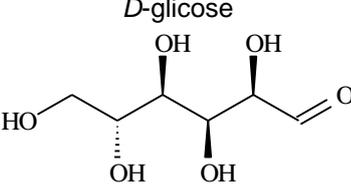
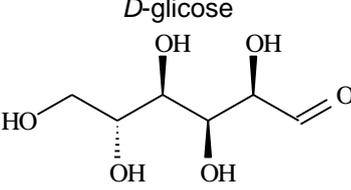
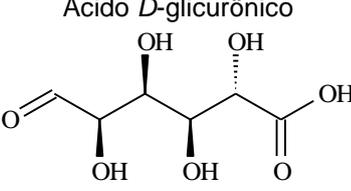
|  |  |  |   |
|--|--|--|---|
|                                       |  |  |   |
| <p>Selina-4(14)-7-dieno</p>           |  | <p>Guadelupe<br/>(Resina de<br/>sementes)</p>                                    | <p>KHOO et al.,<br/>1973</p>                  |
| <p><math>\alpha</math>-Selineno</p>  | <p><i>Hymenaea<br/>courbaril</i></p>                             | <p>México<br/>(Folhas)</p>   | <p>MARTIN et al.,<br/>1972</p>                |
|  |  | <p>Não<br/>especificado<br/>(Folhas)</p>   | <p>STUBBLEBINE<br/>et al., 1975</p>           |
|  |  | <p>México,<br/>Costa Rica,<br/>Brasil<br/>(Folhas,<br/>peciolos,<br/>galhos)</p> | <p>LANGENHEIM<br/>et al, 1978</p>             |
|  |  | <p>Brasil<br/>(Resina de<br/>folhas)</p>   | <p>LANGENHEIM;<br/>STUBBLEBINE<br/>, 1983</p> |
|  | <p><i>Hymenaea<br/>courbaril</i> var.<br/><i>altissima</i></p>   | <p>Brasil<br/>(Folhas)</p>   | <p>MARTIN et al.,<br/>1974</p>                |
|  | <p><i>Hymenaea<br/>courbaril</i> var.<br/><i>courbaril</i></p>   | <p>México<br/>(Folhas)</p>   | <p>MARTIN et al.,<br/>1974</p>                |
|  |  | <p>Honduras<br/>(Folhas)</p>   | <p>MARTIN et al.,<br/>1974</p>                |
|  |  | <p>Costa Rica<br/>(Folhas)</p>   | <p>MARTIN et al.,<br/>1974</p>                |
|  |  | <p>Porto Rico<br/>(Folhas)</p>   | <p>MARTIN et al.,<br/>1974</p>                |
|  |  | <p>Venezuela<br/>(Folhas)</p>  | <p>MARTIN et al.,<br/>1974</p>                |
|  |  | <p>Brasil<br/>(Folhas)</p>   | <p>MARTIN et al.,<br/>1974</p>                |
|  |  | <p>Brasil<br/>(Resina de<br/>folhas)</p>   | <p>LANGENHEIM;<br/>LEE, 1974</p>              |
|  | <p><i>Hymenaea<br/>courbaril</i> var.<br/><i>stilbocarpa</i></p> | <p>Brasil<br/>(Folhas)</p>   | <p>MARTIN et al.,<br/>1974</p>                |
|  | <p>Brasil<br/>(Resina de<br/>folhas)</p>                         | <p>LANGENHEIM;<br/>STUBBLEBINE<br/>, 1983</p>                                    |   |

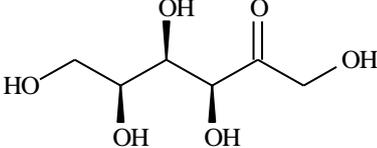
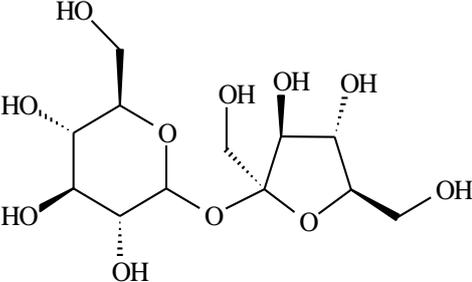
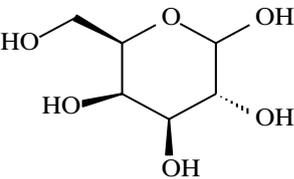
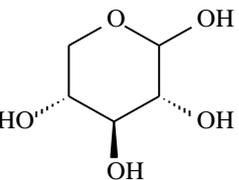
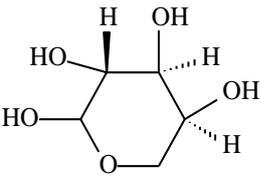
|   |   |   |                               |
|---|---|---|-------------------------------|
|   |   | Brasil (Folhas)                                       | ARRHENIUS; LANGENHEIM, 1983.  |
|   |   | Brasil (Folhas)                                       | MARTIN et al., 1976           |
|   | <i>Hymenaea courbaril</i> var. <i>Subsessilis</i> | Brasil (Folhas)                                       | MARTIN et al., 1974           |
|   |   | Brasil (Resina de folhas)                             | LANGENHEIM; STUBBLEBINE, 1983 |
|   |   | Brasil (Resina de folhas)                             | LANGENHEIM; LEE, 1974         |
|   | <i>Hymenaea</i> sp.                               | Costa Rica (Folhas)                                   | MARTIN et al., 1974           |
|   | <i>Hymenaea intermedia</i>                        | Brasil (Resina de folhas)                             | LANGENHEIM; STUBBLEBINE, 1983 |
|   | <i>Hymenaea parvifolia</i>                        | Brasil (Resina de folhas)                             | LANGENHEIM; STUBBLEBINE, 1983 |
|   | <i>Hymenaea oblongifolia</i>                      | Brasil (Resina de folhas)                             | LANGENHEIM; LEE, 1974         |
|   | <i>Hymenaea verrucosa</i>                         | Quênia (Resina de folhas)                             | LANGENHEIM; LEE, 1974         |
|   |   | Madagascar (Resina de folhas)                         | LANGENHEIM; LEE, 1974         |
|   | <i>Hymenaea verrucosa</i>                         | Quênia (Resina de folhas)                             | MARTIN; LANGENHEIM, 1973.     |
|   |   | Madagascar (Resina de folhas)                         | MARTIN; LANGENHEIM, 1973.     |
| <p style="text-align: center;">β-Selineno</p>  | <i>Hymenaea courbaril</i>                         | Não especificado (Folhas)                             | STUBBLEBINE et al., 1975      |
|   |   | México (Folhas)                                       | MARTIN et al., 1972           |
|   |   | México, Costa Rica, Brasil (Folhas, pecíolos, galhos) | LANGENHEIM et al, 1978        |
|   |   | Não especificado (Óleo essencial de frutos imaturos)  | AGUIAR et al., 2010.          |
|   |   | Brasil (Resina de folhas)                             | LANGENHEIM; STUBBLEBINE, 1983 |

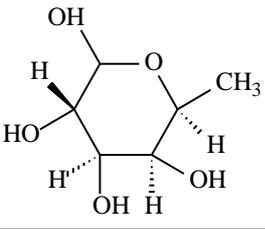
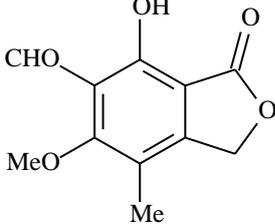
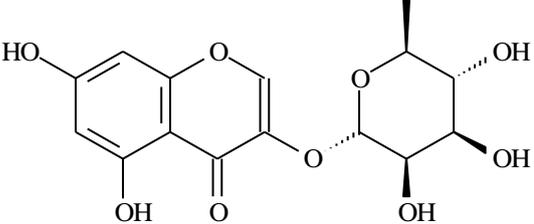
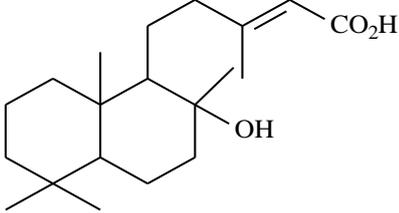
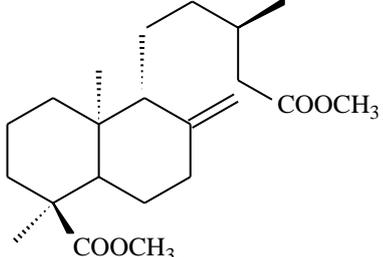
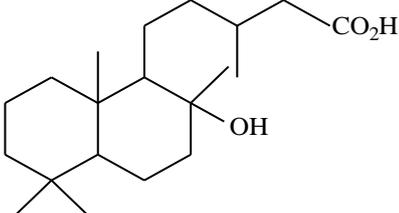
|  |   |                               |                               |
|--|---|-------------------------------|-------------------------------|
|  | <i>Hymenaea courbaril</i> var. <i>altissima</i>   | Brasil (Folhas)               | MARTIN et al., 1974           |
|  | <i>Hymenaea courbaril</i> var. <i>courbaril</i>   | México (Folhas)               | MARTIN et al., 1974           |
|  |   | Honduras (Folhas)             | MARTIN et al., 1974           |
|  |   | Costa Rica (Folhas)           | MARTIN et al., 1974           |
|  |   | Porto Rico (Folhas)           | MARTIN et al., 1974           |
|  |   | Venezuela (Folhas)            | MARTIN et al., 1974           |
|  |   | Brasil (Folhas)               | MARTIN et al., 1974           |
|  |   | Brasil (Resina de folhas)     | LANGENHEIM; LEE, 1974         |
|  | <i>Hymenaea courbaril</i> var. <i>stilbocarpa</i> | Brasil (Folhas)               | MARTIN et al., 1974           |
|  |   | Brasil (Folhas)               | ARRHENIUS; LANGENHEIM, 1983.  |
|  |   | Brasil (Folhas)               | MARTIN et al., 1976           |
|  |   | Brasil (Resina de folhas)     | LANGENHEIM; STUBBLEBINE, 1983 |
|  | <i>Hymenaea courbaril</i> var. <i>subsessilis</i> | Brasil (Folhas)               | MARTIN et al., 1974           |
|  |   | Brasil (Resina de folhas)     | LANGENHEIM; STUBBLEBINE, 1983 |
|  |   | Brasil (Resina de folhas)     | LANGENHEIM; LEE, 1974         |
|  | <i>Hymenaea</i> sp.                               | Costa Rica (Folhas)           | MARTIN et al., 1974           |
|  | <i>Hymenaea intermedia</i>                        | Brasil (Resina de folhas)     | LANGENHEIM; STUBBLEBINE, 1983 |
|  | <i>Hymenaea parvifolia</i>                        | Brasil (Resina de folhas)     | LANGENHEIM; STUBBLEBINE, 1983 |
|  | <i>Hymenaea oblongifolia</i>                      | Brasil (Resina de folhas)     | LANGENHEIM; LEE, 1974         |
|  | <i>Hymenaea verrucosa</i>                         | Quênia (Resina de folhas)     | LANGENHEIM; LEE, 1974         |
|  |   | Madagascar (Resina de folhas) | LANGENHEIM; LEE, 1974         |

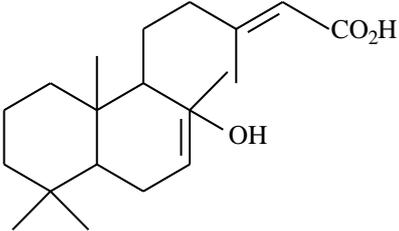
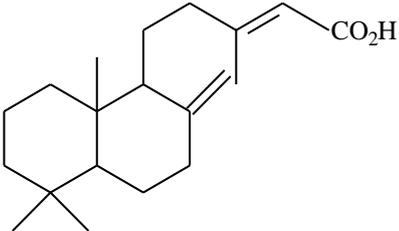
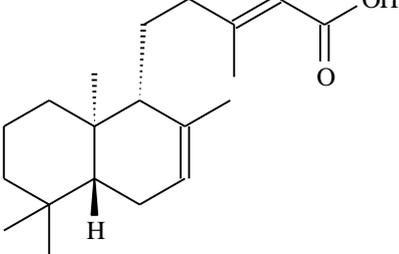
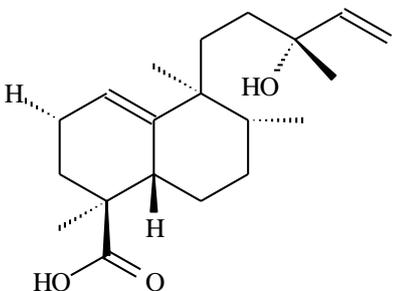
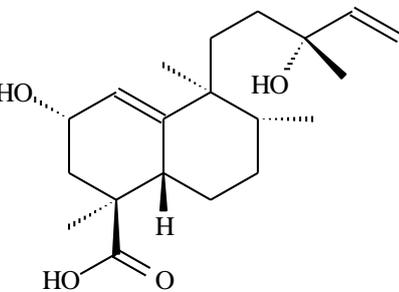
|  |   |   |                               |
|--|---|---|-------------------------------|
|  | <i>Hymenaea verrucosa</i>                         | Quênia (Resina de folhas)                   | MARTIN; LANGENHEIM, 1973.     |
|  |   | Madagascar (Resina de folhas)               | MARTIN; LANGENHEIM, 1973.     |
| <p>Cypereno</p>                         | <i>Hymenaea courbaril</i>                         | Brasil (Resina de folhas)                   | LANGENHEIM; STUBBLEBINE, 1983 |
|  | <i>Hymenaea courbaril</i> var. <i>stilbocarpa</i> | Brasil (Folhas)                             | ARRHENIUS; LANGENHEIM, 1983.  |
|  |   | Brasil (Resina de folhas)                   | LANGENHEIM; STUBBLEBINE, 1983 |
|  | <i>Hymenaea courbaril</i> var. <i>subsessilis</i> | Brasil (Resina de folhas)                   | LANGENHEIM; STUBBLEBINE, 1983 |
|  | <i>Hymenaea intermedia</i>                        | Brasil (Resina de folhas)                   | LANGENHEIM; STUBBLEBINE, 1983 |
|  | <i>Hymenaea parvifolia</i>                        | Brasil (Resina de folhas)                   | LANGENHEIM; STUBBLEBINE, 1983 |
| <p>Óxido de (-)-Cariofileno</p>       | <i>Hymenaea courbaril</i> var. <i>stilbocarpa</i> | Brasil (Folhas)                             | ARRHENIUS; LANGENHEIM, 1983.  |
| <p><math>\beta</math>-Sitosterol</p>  | <i>Hymenaea courbaril</i>                         | Não especificado (Folhas e galhos)          | LOPEZ; SCHIFF, 1976           |
|  |   | Brasil (Polpa de frutos e óleo de sementes) | DIAS et al., 2013             |
|  | <i>Hymenaea oblongifolia</i>                      | Brasil (Casca de caule infectado por fungo) | ALVARENGA et al., 1978        |
| Daucosterol  | <i>Hymenaea martiana</i>                          | Brasil (Casca)                              | CARNEIRO et al., 1993         |

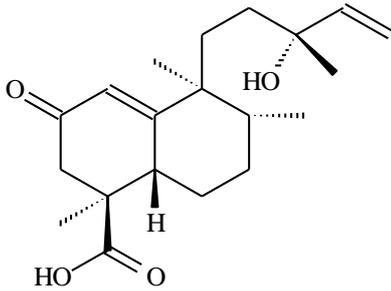
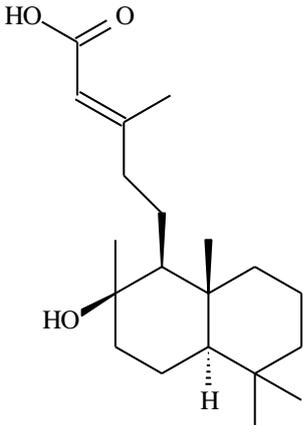
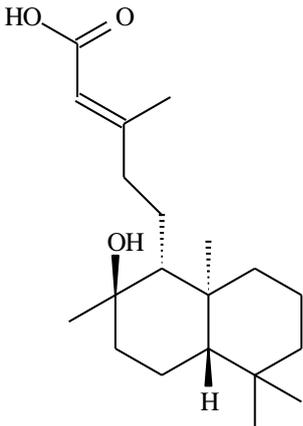
|  |                                     |  |                               |
|--|-------------------------------------|--|-------------------------------|
|   |                                     |  |                               |
| <p style="text-align: center;">Stigmasterol</p>   | <p><i>Hymenaea oblongifolia</i></p> | <p>Brasil (Casca de caule infectado por fungo)</p> | <p>ALVARENGA et al., 1978</p> |
|   | <p><i>Hymenaea courbaril</i></p>    | <p>Brasil (Polpa de frutos e óleo de sementes)</p> | <p>DIAS et al., 2013</p>      |
| <p style="text-align: center;">Campesterol</p>  | <p><i>Hymenaea courbaril</i></p>    | <p>Brasil (Polpa de frutos e óleo de sementes)</p> | <p>DIAS et al., 2013</p>      |
| <p style="text-align: center;">Stigmasterol</p>  | <p><i>Hymenaea courbaril</i></p>    | <p>Brasil (Polpa de frutos e óleo de sementes)</p> | <p>DIAS et al., 2013</p>      |

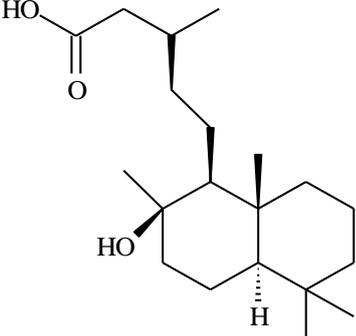
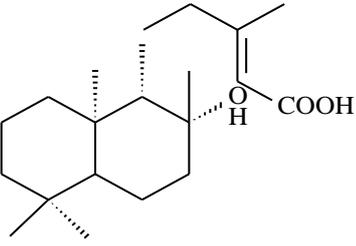
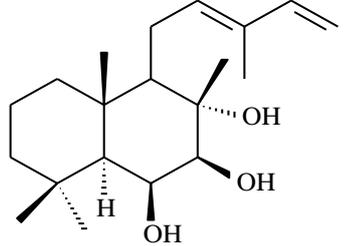
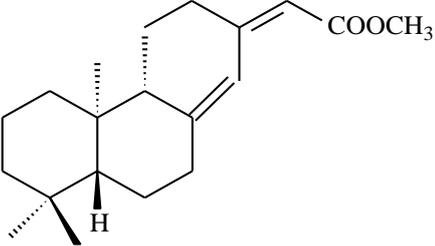
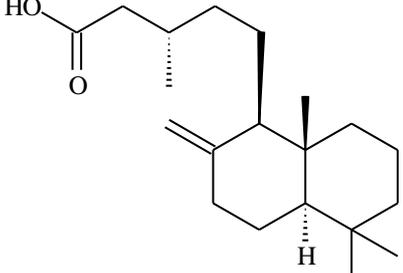
|   |  |                          |                              |
|---|--|--------------------------|------------------------------|
|    |  |                          |                              |
| <p style="text-align: center;"><i>D</i>-frutose</p>              | <p><i>Hymenaea courbaril</i> var. <i>stilbocarpa</i></p> | <p>Brasil (Casca)</p>    | <p>VEGGI et al., 2014</p>    |
| <p style="text-align: center;"><i>D</i>-glicose</p>            | <p><i>Hymenaea courbaril</i> var. <i>palustris</i></p>   | <p>Peru (Pericarpo)</p>  | <p>CHUNG et al., 1997</p>    |
| <p style="text-align: center;"><i>D</i>-glicose</p>            | <p><i>Hymenaea courbaril</i></p>                         | <p>Brasil (Folhas)</p>   | <p>BUSATO et al., 2001</p>   |
| <p style="text-align: center;"><i>D</i>-glicose</p>            |  | <p>Brasil (Sementes)</p> | <p>BUSATO et al., 2009</p>   |
| <p style="text-align: center;"><i>D</i>-glicose</p>            |  | <p>Brasil (Sementes)</p> | <p>MARTIN et al., 2003</p>   |
| <p style="text-align: center;"><i>D</i>-glicose</p>            |  | <p>Brasil (Sementes)</p> | <p>OMAIRA et al., 2007</p>   |
| <p style="text-align: center;"><i>D</i>-glicose</p>            |  | <p>Brasil (Sementes)</p> | <p>KAI; PETKOWICZ, 2010.</p> |
| <p style="text-align: center;"><i>D</i>-glicose</p>            | <p><i>Hymenaea courbaril</i> var. <i>palustris</i></p>   | <p>Peru (Pericarpo)</p>  | <p>CHUNG et al., 1997</p>    |
| <p style="text-align: center;"><i>D</i>-glicose</p>            | <p><i>Hymenaea courbaril</i> var. <i>stilbocarpa</i></p> | <p>Brasil (Sementes)</p> | <p>LIMA et al., 1993.</p>    |
| <p style="text-align: center;"><i>D</i>-glicose</p>            |  | <p>Brasil (Casca)</p>    | <p>VEGGI et al., 2014</p>    |
| <p style="text-align: center;">Ácido <i>D</i>-glicurônico</p>  | <p><i>Hymenaea courbaril</i> var. <i>palustris</i></p>   | <p>Peru (Pericarpo)</p>  | <p>CHUNG et al., 1997</p>    |
| <p style="text-align: center;"><i>L</i>-sorbose</p>   | <p><i>Hymenaea courbaril</i> var. <i>palustris</i></p>   | <p>Peru (Pericarpo)</p>  | <p>CHUNG et al., 1997</p>    |

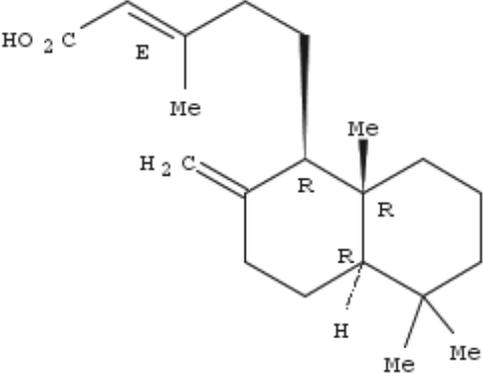
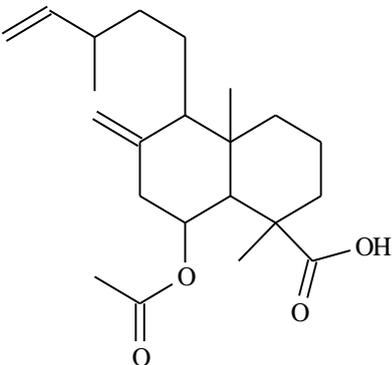
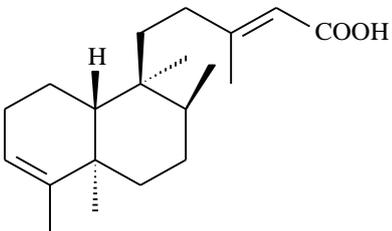
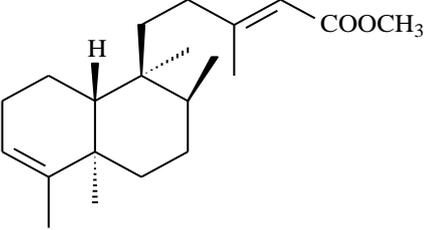
|  |  |                              |                                      |
|--|--|------------------------------|--------------------------------------|
|   |  |                              |                                      |
| <p style="text-align: center;">Sacarose</p>     | <p><i>Hymenaea courbaril</i> var. <i>palustris</i></p>   | <p>Peru<br/>(Pericarpo)</p>  | <p>CHUNG et al.,<br/>1997</p>        |
|  | <p><i>Hymenaea courbaril</i> var. <i>stilbocarpa</i></p> | <p>Brasil<br/>(Casca)</p>    | <p>VEGGI et al.,<br/>2014</p>        |
| <p style="text-align: center;">Galactose</p>    | <p><i>Hymenaea courbaril</i></p>                         | <p>Brasil<br/>(Folhas)</p>   | <p>BUSATO et al.,<br/>2001</p>       |
|  |  | <p>Brasil<br/>(Sementes)</p> | <p>BUSATO et al.,<br/>2009</p>       |
|  |  | <p>Brasil<br/>(Sementes)</p> | <p>MARTIN et al.,<br/>2003</p>       |
|  |  | <p>Brasil<br/>(Sementes)</p> | <p>OMAIRA et al.,<br/>2007</p>       |
|  |  | <p>Brasil<br/>(Sementes)</p> | <p>KAI;<br/>PETKOWICZ,<br/>2010.</p> |
|  | <p><i>Hymenaea courbaril</i> var. <i>stilbocarpa</i></p> | <p>Brasil<br/>(Sementes)</p> | <p>LIMA et al.,<br/>1993</p>         |
| <p style="text-align: center;">Xilose</p>     | <p><i>Hymenaea courbaril</i></p>                         | <p>Brasil<br/>(Folhas)</p>   | <p>BUSATO et al.,<br/>2001</p>       |
|  |  | <p>Brasil<br/>(Sementes)</p> | <p>BUSATO et al.,<br/>2009</p>       |
|  |  | <p>Brasil<br/>(Sementes)</p> | <p>MARTIN et al.,<br/>2003</p>       |
|  |  | <p>Brasil<br/>(Sementes)</p> | <p>OMAIRA et al.,<br/>2007</p>       |
|  |  | <p>Brasil<br/>(Sementes)</p> | <p>KAI;<br/>PETKOWICZ,<br/>2010.</p> |
|  | <p><i>Hymenaea courbaril</i> var. <i>stilbocarpa</i></p> | <p>Brasil<br/>(Sementes)</p> | <p>LIMA et al.,<br/>1993</p>         |
| <p style="text-align: center;">Arabinose</p>  | <p><i>Hymenaea courbaril</i></p>                         | <p>Brasil<br/>(Sementes)</p> | <p>OMAIRA et al.,<br/>2007</p>       |
|  |  | <p>Brasil<br/>(Sementes)</p> | <p>KAI;<br/>PETKOWICZ,<br/>2010.</p> |
|  | <p><i>Hymenaea courbaril</i> var. <i>stilbocarpa</i></p> | <p>Brasil<br/>(Sementes)</p> | <p>LIMA et al.,<br/>1993</p>         |
| <p style="text-align: center;">Fucose</p>  | <p><i>Hymenaea courbaril</i></p>                         | <p>Brasil<br/>(Folhas)</p>   | <p>BUSATO et al.,<br/>2001</p>       |

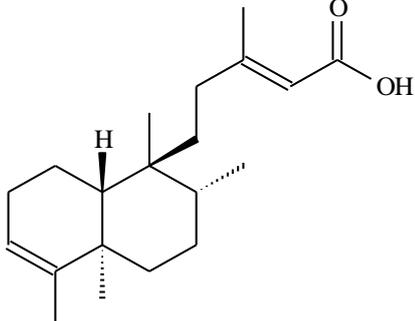
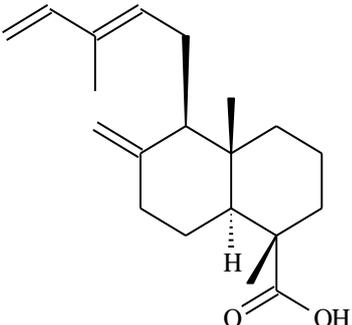
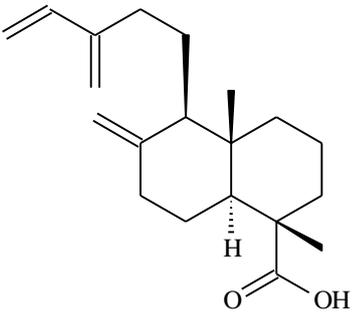
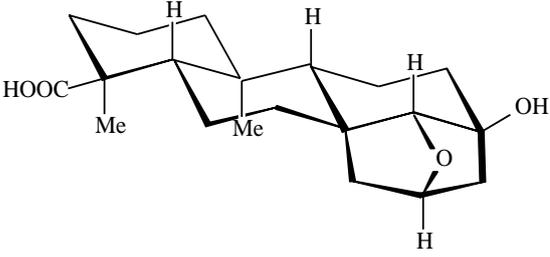
|   |                                     |   |   |
|---|-------------------------------------|---|---|
|    |                                     |   |   |
| <p>6-formil-7-hidroxi-5-metoxi-4metil-phthalide</p>  | <p><i>Hymenaea oblongifolia</i></p> | <p>Brasil<br/>(Casca<br/>infectadas<br/>por fungos)</p> | <p>ALVARENGA<br/>et al., 1978</p>           |
| <p>Eucrifina</p>                                    | <p><i>Hymenaea martiana</i></p>     | <p>Brasil<br/>(Casca)</p>                               | <p>CARNEIRO et<br/>al., 1993</p>            |
| <p>Ácido labd-13E-en-8-ol-15-oico</p>              | <p><i>Hymenaea courbaril</i></p>    | <p>Jamaica<br/>(Frutos)</p>                             | <p>JAYAPRAKAS<br/>AM et al., 2007</p>       |
| <p>Ácido epipinifólico</p>                         | <p><i>Hymenaea stignocarpa</i></p>  | <p>Brasil<br/>(Resina de<br/>casca)</p>                 | <p>DOMÉNECH-<br/>CARBÓ et al.,<br/>2009</p> |
| <p>Ácido labdanólico</p>                           | <p><i>Hymenaea courbaril</i></p>    | <p>Jamaica<br/>(Frutos)</p>                             | <p>JAYAPRAKAS<br/>AM et al., 2007</p>       |
| <p>Ácido (13E)-labda7,13-dien-15-oico</p>   | <p><i>Hymenaea courbaril</i></p>    | <p>Jamaica<br/>(Frutos)</p>                             | <p>JAYAPRAKAS<br/>AM et al., 2007</p>       |

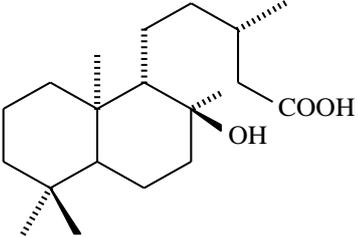
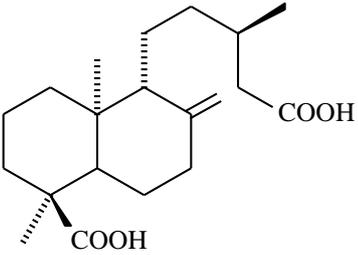
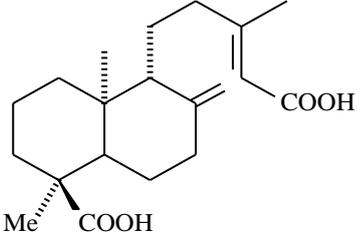
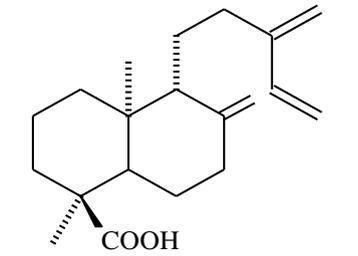
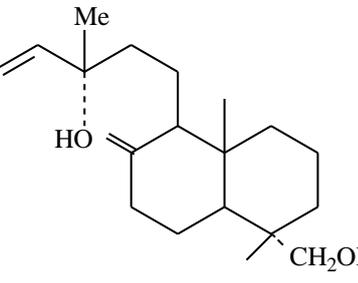
|   |                                  |   |                                   |
|---|----------------------------------|---|-----------------------------------|
|    |                                  |   |                                   |
| <p>Ácido labd-8(17),13E-dien-15-oico</p>                               | <p><i>Hymenaea courbaril</i></p> | <p>Jamaica (Frutos)</p>                     | <p>JAYAPRAKAS AM et al., 2007</p> |
| <p>Ácido eperua-7-13-dien-15-oico</p>                                 |                                  | <p>Brasil (Casca)</p>                       | <p>MARSAIOLI et al., 1975</p>     |
|   |                                  | <p>Brasil (Casca)</p>                       | <p>IMAMURA et al., 1977.</p>      |
| <p>Ácido 13(R)-hidroxi-1(10)-14-ent-halimadien-18-oico</p>           |                                  | <p>Suriname (Folhas, galhos e pecíolos)</p> | <p>KADER et al., 2002</p>         |
| <p>Ácido 2(S)-13(R)-dihidroxi-1(10)-(14)-ent-halimadien-18-oico</p>  |                                  | <p>Suriname (Folhas, galhos e pecíolos)</p> | <p>KADER et al., 2002</p>         |
| <p>Ácido 2-oxo-13(R)-hidroxi-1(10)-14-ent-halimadien-18-oico</p>  |                                  | <p>Suriname (Folhas, galhos e pecíolos)</p> | <p>KADER et al., 2002</p>         |

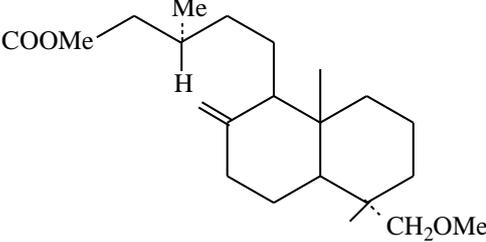
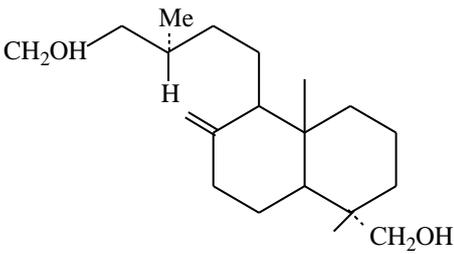
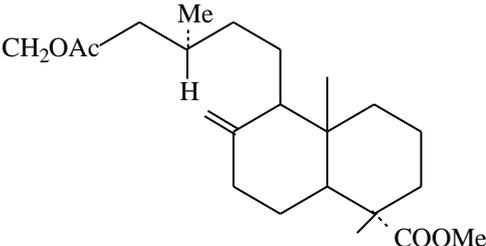
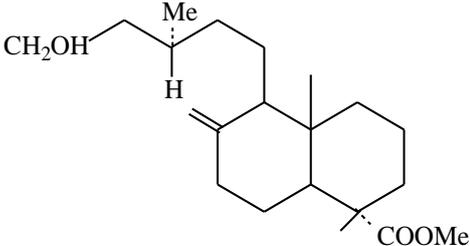
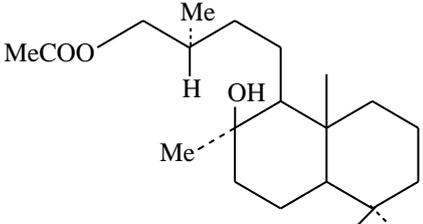
|  |  |                            |                                |
|--|--|----------------------------|--------------------------------|
|   |  |                            |                                |
| <p>Ácido ent-lab-13-en-8-β-ol-15-oico</p>  |  | <p>Brasil<br/>(Casca)</p>  | <p>MARSAIOLI et al., 1975</p>  |
| <p>Ácido labd-13-en-8β-ol-15-oico</p>     |  | <p>Brasil<br/>(Resina)</p> | <p>CUNNINGHAM et al., 1974</p> |
| <p>Ácido ent-labdan-8-β-ol-15-oico</p>   |  | <p>Brasil<br/>(Casca)</p>  | <p>MARSAIOLI et al., 1975</p>  |

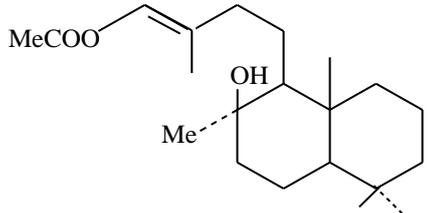
|   |  |                                       |                                    |
|---|--|---------------------------------------|------------------------------------|
|  <p>Chemical structure of ent-labd-13-en-8β-oic acid, a labdane-type diterpene with a carboxylic acid group at C-13 and a hydroxyl group at C-8.</p>                 |  |                                       |                                    |
| <p>Ácido ent-labd-13-en-8β-oico</p>  <p>Chemical structure of ent-labd-13-en-8β-oic acid, showing the carboxylic acid group and the hydroxyl group.</p>              |  | <p>Brasil<br/>(Casca)</p>             | <p>IMAMURA et al., 1977</p>        |
| <p>Crotomachlin</p>  <p>Chemical structure of Crotomachlin, a labdane-type diterpene with multiple hydroxyl groups and a long side chain.</p>                      | <p><i>Hymenaea courbaril</i></p>                       | <p>Jamaica<br/>(Frutos)</p>           | <p>JAYAPRAKAS AM et al., 2007.</p> |
| <p>Ácido (-)-copálico</p>  <p>Chemical structure of (-)-copalic acid, a labdane-type diterpene with a methyl ester group at C-13.</p>                              | <p><i>Hymenaea courbaril</i> var. <i>altissima</i></p> | <p>Brasil<br/>(Casca)</p>             | <p>NOGUEIRA et al., 2002a</p>      |
|   | <p><i>Hymenaea stignocarpa</i></p>                     | <p>Brasil<br/>(Resina)</p>            | <p>DOMÉNECH-CARBÓ et al., 2009</p> |
| <p>Ácido (-) eperuico</p>  <p>Chemical structure of (-) eperuic acid, a labdane-type diterpene with a carboxylic acid group at C-13 and a vinyl group at C-14.</p> | <p><i>Hymenaea courbaril</i> var. <i>altissima</i></p> | <p>Brasil<br/>(Casca)</p>             | <p>NOGUEIRA et al., 2002a</p>      |
|   | <p><i>Hymenaea stignocarpa</i></p>                     | <p>Brasil<br/>(Resina das cascas)</p> | <p>DOMÉNECH-CARBÓ et al., 2009</p> |

|  |   |  |                             |
|--|---|--|-----------------------------|
|   |   |  |                             |
| <p>Ácido (-) zanzibárico</p>                                       | <i>Hymenaea stagnocarpa</i>                       | Brasil (Sementes)                                    | NOGUEIRA et al., 2002a      |
|  | <i>Hymenaea courbaril</i>                         | Não especificado (Óleo essencial de frutos imaturos) | AGUIAR et al., 2010         |
| <p>Ácido (5S*,8S*,9S*,10R*)-cleroda-3,13E-dien-15-oico</p>        | <i>Hymenaea courbaril</i> var. <i>stilbocarpa</i> | Brasil (Sementes)                                    | NOGUEIRA et al., 2001       |
|  |   | Brasil (Sementes)                                    | NOGUEIRA et al., 2002b      |
| <p>Ácido (-)- (5R*, 8S*,9S*,10R*)-cleroda-3,13E-dien-15-oico</p>  |   | Brasil (Sementes)                                    | NOGUEIRA et al., 2001       |
|  |   | Brasil (Sementes)                                    | NOGUEIRA et al., 2002b      |
| <p>Ácido (-) covalênico</p>  |   | Brasil (Sementes)                                    | NOGUEIRA et al., 2001       |
|  |   | Brasil (Sementes)                                    | NOGUEIRA et al., 2002b      |
|  | <i>Hymenaea stagnocarpa</i>                       | Brasil (Resina das cascas)                           | DOMÉNECH-CARBÓ et al., 2009 |

|   |                                     |   |                                    |
|---|-------------------------------------|---|------------------------------------|
|                              |                                     |   |                                    |
| <p>Ácido (-) ózico</p>       |                                     | <p>Brasil<br/>(Sementes)</p>                                      | <p>NOGUEIRA et al., 2001</p>       |
| <p>Ácido (-) isoózico</p>  |                                     | <p>Brasil<br/>(Sementes)</p>                                      | <p>NOGUEIRA et al., 2001</p>       |
|   | <p><i>Hymenaea courbaril</i></p>    | <p>Não especificado<br/>(Óleos essenciais de frutos imaturos)</p> | <p>AGUIAR et al., 2010</p>         |
|   | <p><i>Hymenaea stagnocarpa</i></p>  | <p>Brasil<br/>(Resina das cascas)</p>                             | <p>DOMÉNECH-CARBÓ et al., 2009</p> |
| <p>Quesnoína</p>           | <p><i>Hymenaea oblongifolia</i></p> | <p>França<br/>(Resina de âmbar)</p>                               | <p>JOSSANG et al., 2008</p>        |

|   |                                     |                                       |                                 |
|---|-------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------|
| <p>Ácido enantio-13-epilabdanólico</p>                     | <p><i>Hymenaea parvifolia</i></p>   | <p>Brasil<br/>(Resina das cascas)</p> | <p>CUNNINGHAM et al., 1973</p>  |
| <p>Ácido enantio-pinifólico</p>                            | <p><i>Hymenaea oblongifolia</i></p> | <p>Brasil<br/>(Resina das cascas)</p> | <p>CUNNINGHAM et al., 1973</p>  |
| <p>Ácido guamáico</p>                                     | <p><i>Hymenaea oblongifolia</i></p> | <p>Brasil<br/>(Resina das cascas)</p> | <p>CUNNINGHAM et al., 1973</p>  |
| <p>Ácido enantio-8(17),13(16),14-labdatrien-18-oico</p>  | <p><i>Hymenaea verrucosa</i></p>    | <p>Quênia<br/>(Resina das cascas)</p> | <p>MARTIN; LANGENHEIM, 1974</p> |
| <p>(-) 18-hidroxi-13-epimanool</p>                       | <p><i>Hymenaea verrucosa</i></p>    | <p>Borneo<br/>(Resina das cascas)</p> | <p>HUGEL et al., 1966</p>       |
| <p>Dimetil ester do enantio-labd- 8(20)-en-18-ol-15-oato de metila</p>  | <p><i>Hymenaea verrucosa</i></p>    | <p>Borneo<br/>(Resina das cascas)</p> | <p>HUGEL et al., 1966</p>       |

|   |                                  |                                   |                           |
|---|----------------------------------|-----------------------------------|---------------------------|
|  <p>COOMe</p> <p>Me</p> <p>H</p> <p>CH<sub>2</sub>OMe</p>  |                                  |                                   |                           |
| <p>Enantio-labd-8(20)-en-15, 18-diol</p>  <p>CH<sub>2</sub>OH</p> <p>Me</p> <p>H</p> <p>CH<sub>2</sub>OH</p>           | <p><i>Hymenaea verrucosa</i></p> | <p>Borneo (Resina das cascas)</p> | <p>HUGEL et al., 1966</p> |
| <p>Enantio-18-acetoxy-18(20), 13-dien-15-oato de metila</p>  <p>CH<sub>2</sub>OAc</p> <p>Me</p> <p>H</p> <p>COOMe</p> | <p><i>Hymenaea verrucosa</i></p> | <p>Borneo (Resina das cascas)</p> | <p>HUGEL et al., 1966</p> |
| <p>Enantio-labd- 8(20)-en-18-ol-15-oato de metila</p>  <p>CH<sub>2</sub>OH</p> <p>Me</p> <p>H</p> <p>COOMe</p>       | <p><i>Hymenaea verrucosa</i></p> | <p>Borneo (Resina das cascas)</p> | <p>HUGEL et al., 1966</p> |
| <p>Enantio-labd-8-β-ol-15-oato de metila</p>  <p>MeCOO</p> <p>Me</p> <p>H</p> <p>OH</p> <p>Me</p>                    | <p><i>Hymenaea verrucosa</i></p> | <p>Borneo (Resina das cascas)</p> | <p>HUGEL et al., 1966</p> |

|  |                                  |                                       |                               |
|--|----------------------------------|---------------------------------------|-------------------------------|
| <p>Enantio-labd-13-en-8-β-ol-15-oato de metila</p>  | <p><i>Hymenaea verrucosa</i></p> | <p>Borneo<br/>(Resina das cascas)</p> | <p>HUGEL et al.,<br/>1966</p> |
|--|----------------------------------|---------------------------------------|-------------------------------|



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO VALE DO SÃO FRANCISCO - UNIVASF**  
IV Simpósio de Plantas Medicinais do Vale do São Francisco – PLAMEVASF

18 a 21 de Setembro de 2013, Juazeiro-BA

**TRIAGEM FITOQUÍMICA COMPARATIVA DE EXTRATOS OBTIDOS DE DIFERENTES PARTES DE *HYMENAEA MARTIANA* HAYNE (FABACEAE)**

**FERNANDA GRANJA DA SILVA OLIVEIRA<sup>1</sup>; ANA PAULA DE OLIVEIRA<sup>1</sup>; AMANDA LEITE GUIMARÃES<sup>1</sup>; SUZANA VIEIRA RABÊLO<sup>1</sup>; XIRLEY PEREIRA NUNES<sup>1</sup>; JACKSON ROBERTO GUEDES DA SILVA ALMEIDA<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>NEPLAME, Universidade Federal do Vale do São Francisco.

**Introdução:** *Hymenaea martiana* é uma espécie pertencente à família Fabaceae, conhecida popularmente como “jatobá”, cujo uso tradicional tem sido relatado no tratamento de inflamações, reumatismo, e com atividade antinociceptiva e anti-inflamatória. **Objetivos:** Realizar uma triagem fitoquímica comparativa entre os extratos etanólicos obtidos de diferentes partes de *H. martiana*. **Metodologia:** O material vegetal (cascas, folhas e frutos) foi coletado na cidade de Petrolina-PE, e a exsiccata da espécie foi depositada no HVASF (número 6444). Foi realizada extração por maceração utilizando etanol 95%, e os extratos obtidos foram avaliados em placas de cromatografia em camada delgada para verificação da presença das principais classes de metabólitos secundários de plantas. **Resultados:** A análise do extrato das cascas indicou a presença de naftoquinonas, derivados antracênicos, terpenoides, esteroides, saponinas e flavonoides, o que está de acordo com outros estudos realizados com outras espécies do gênero. Já a análise do extrato das folhas mostrou resultado positivo para antracenos, naftoquinonas, flavonoides e saponinas. Outras espécies do gênero apresentaram diterpenos e esteroides nas folhas, o que contrasta com os resultados do nosso trabalho. A análise do extrato dos frutos indicou forte presença de monoterpênicos, diterpenos, antracenos, flavonoides, naftoquinonas e saponinas, resultado compatível com estudos anteriores de outras espécies do gênero, e reação negativa para cumarinas. Em estudos anteriores é relatada a presença de cumarinas em sementes de outras espécies de *Hymenaea*. **Conclusões:** Os resultados deste estudo demonstram que os materiais vegetais de *Hymenaea martiana* coletados em Petrolina-PE possuem um perfil fitoquímico semelhante a outras espécies do gênero *Hymenaea*. Um estudo fitoquímico mais aprofundado torna-se necessário para uma melhor discussão em relação aos constituintes químicos desta planta, por fazer parte da cultura da região e apresentar um enorme potencial terapêutico.

**Palavras-chave:** Fitoquímica; *Hymenaea martiana*; Jatobá.

**Apoio Financeiro:** CNPQ/FACEPE/CAPES



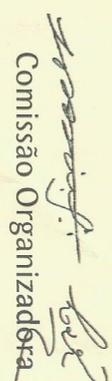
**FESBE**

**IX Reunião Regional**  
29 a 31 de maio de 2014  
João Pessoa - PB

**Certificamos que**

o resumo 10.023 - TRIAGEM FITOQUÍMICA E ATIVIDADE FOTOPROTETORA DE EXTRATOS OBTIDOS DE DIFERENTES PARTES DE *HYMENAEA MARTIANA* HAYNE (FABACEAE). OLIVEIRA, F.G.S.; RABELLO, S.V.; NUNES, X.P.; ALMEIDA, J.R.G.S.; - Programa de pós-graduação em Recursos Naturais - UNIVASF, foi apresentado sob a forma de painel na

IX Reunião Regional da Federação de Sociedades de Biologia Experimental - FesBE, realizada no Centro de Convenções do Hotel Tropical Tambaú, João Pessoa - PB, de 29 a 31 de maio de 2014.

  
Comissão Organizadora

## TRIAGEM FITOQUÍMICA E ATIVIDADE FOTOPROTETORA DE EXTRATOS OBTIDOS DE DIFERENTES PARTES DE *HYMENAEA MARTIANA* HAYNE (FABACEAE)

<sup>1</sup>Oliveira, F.G.S.; <sup>1</sup>Rabêlo, S. V.; <sup>1</sup>Nunes, X.P.; <sup>1</sup>Almeida, J.R.G.S. <sup>1</sup>NEPLAME, Universidade Federal do Vale do São Francisco, Petrolina/PE.

**Introdução:** *Hymenaea martiana*, conhecida popularmente como “jatobá”, é uma espécie utilizada na medicina tradicional no tratamento de inflamações, reumatismo, e com atividade antinociceptiva e anti-inflamatória.

**Objetivos:** O objetivo desta pesquisa foi realizar uma triagem fitoquímica e estudar o potencial fotoprotetor dos extratos etanólicos obtidos de diferentes partes de *H. martiana*.

**Metodologia:** O material vegetal (cascas, folhas, frutos e sementes) foi coletado na cidade de Petrolina-PE, e a exsiccata da espécie foi depositada no HVASF (número 6444). Foi realizada extração por maceração, utilizando etanol 95%, e o solvente foi evaporado em evaporador rotativo. Os extratos obtidos foram avaliados em placas de cromatografia em camada delgada para verificação da presença das principais classes de metabólitos secundários. A absorvância dos extratos etanólicos secos foram medidas em diferentes concentrações entre os comprimentos de onda de 260 a 400 nm, para verificar a absorção nas regiões ultravioleta A e B, e o foi realizado o cálculo de FPS, segundo método de Mansur. As análises foram realizadas em triplicata.

**Resultados:** A análise do extrato das cascas indicou a presença de naftoquinonas, derivados antracênicos, terpenoides, esteroides, saponinas e flavonoides, o que está de acordo com outros estudos realizados com outras espécies do gênero. Já a análise do extrato das folhas mostrou resultado positivo para antracenos, naftoquinonas, flavonoides e saponinas, porém outras espécies do gênero apresentaram diterpenos e esteroides. A análise do extrato dos frutos indicou forte presença de monoterpenos, diterpenos, antracenos, flavonoides, naftoquinonas e saponinas, resultado compatível com estudos anteriores de outras espécies do gênero, e reação negativa para cumarinas, porém em estudos anteriores é relatada a presença desta classe de substâncias em sementes de outras espécies de *Hymenaea*. Os extratos apresentaram absorvância máxima entre 260 e 285 nm, e o maior valor de FPS foi encontrado no extrato da casca, na concentração de 100 mg/L, com  $20,27 \pm 5,21$ , seguidos pelo extrato das folhas, na concentração de 50 mg/L, com valor  $10,44 \pm 0,72$ . Os valores de FPS para o extrato dos frutos foi de  $0,66 \pm 0,41$ , e de  $4,54 \pm 0,11$  para o extrato das sementes, na maior concentração. Alguns autores mostram que as plantas que absorvem na região ultravioleta apresentaram uma complexidade de substâncias, destacando-se metabólitos secundários como flavonoides, taninos, antraquinonas, alcaloides e compostos fenólicos, o que está de acordo com a triagem fitoquímica realizada com os extratos obtidos com os materiais vegetais de *Hymenaea martiana*.

**Conclusões:** Os resultados deste estudo demonstram que os materiais vegetais de *Hymenaea martiana* coletados em Petrolina-PE possuem um perfil fitoquímico semelhante a outras espécies do gênero *Hymenaea* e apresentam potencial fotoprotetor. Um estudo fitoquímico mais aprofundado torna-se necessário para uma melhor discussão em relação aos constituintes químicos desta planta, bem como suas atividades biológicas, evidenciando o seu potencial terapêutico.

**Apoio Financeiro:** CNPQ/FACEPE/CAPES

## **Physicochemical and phytochemical characterization of barks and leaves of *Hymenaea martiana* Hayne (Fabaceae)**

**Fernanda Granja da Silva Oliveira<sup>1</sup>; Sarah Raquel Gomes de Lima-Saraiva<sup>1</sup>; Silvio Alan Gonçalves Bonfim Reis<sup>1</sup>; Larissa Bandeira Freire<sup>2</sup>; Jorge Fernando Ferreira Gomes<sup>2</sup>; Daniela Gonçalves de Macêdo Melo<sup>2</sup>; Edna Maria Honorato Pereira Pontes Farias<sup>3</sup>; Diego Igor Alves Fernandes de Araújo<sup>3</sup>; Weverton Magno Alves da Silva<sup>3</sup>; Alessandra Ferrari Furlaneto<sup>3</sup>; Cleverson Luiz dos Santos Vigo; Jackson Roberto Guedes da Silva Almeida<sup>1\*</sup>**

<sup>1</sup>*Núcleo de Estudos e Pesquisas de Plantas Mediciniais, Universidade Federal do Vale do São Francisco,* <sup>2</sup>*CIFARMA Científica Farmacêutica,* <sup>3</sup>*Hebron Farmacêutica,*

\*Correspondence: J.R.G.S. Almeida. Núcleo de Estudos e Pesquisas de Plantas Mediciniais, Universidade Federal do Vale do São Francisco. Av. José de Sá Maniçoba, S/N, 56304-917, Petrolina-PE, Brazil. E-mail: jackson.guedes@univasf.edu.br.

### **ABSTRACT**

*Hymenaea martiana* belongs to the Fabaceae family and is popularly known as “jatobá”. This study aims to perform physicochemical and phytochemical analysis of barks and leaves of *Hymenaea martiana*. The drugs were dried and powdered, and submitted to physicochemical assays. Extracts were obtained and a phytochemical screening and determination of compounds was performed. The drug particles were characterized as coarse powder and the foam index for the barks was higher, and the results for the other tests were found within the expected limits. The semi-quantitative test for heavy metals was satisfactory (below 10 ppm). However, on analysis by atomic spectrometry equipment, Hg concentration on the barks was above the

acceptable limit. The extracts of the barks indicated the presence of anthracene derivatives, flavonoids, monoterpenes, diterpenes, naphthoquinones, saponins, triterpenes and steroids. The maceration of plant leaves indicated the presence of anthracene derivatives, flavonoids, saponins and naphthoquinones. The content of phenolic compounds was markedly higher in the barks of *Hymenaea martiana*, but for the quantification of total flavonoids, similar amounts were found. The standardization of herbal drugs *H. martiana* is an important step for the future development of pharmaceuticals, characterizing a plant with great therapeutic potential.

**Uniterms:** *Hymenaea martiana*, physicochemical characterization, phytochemical screening.

## RESUMO

*Hymenaea martiana* é uma espécie pertencente à família Fabaceae, popularmente conhecida como "jatobá". Este estudo tem como objetivo realizar a análise físico-química e fitoquímica das cascas e folhas de *Hymenaea martiana*. As drogas foram secas e pulverizadas, e submetidas a ensaios físico-químicos. Os extratos foram obtidos e uma prospecção fitoquímica e determinação dos compostos foi realizada. As partículas foram caracterizadas como drogas de pó grosso, o índice de espuma para as cascas foi maior, e os resultados para os outros ensaios foram encontrados dentro dos limites esperados. O teste semi-quantitativo para os metais pesados foi satisfatório (abaixo de 10 ppm). No entanto, na análise por equipamento de espectrometria atômica, a concentração de Hg nas cascas estava acima do limite aceitável. Os extratos das cascas indicaram a presença de flavonoides, derivados antracênicos, monoterpenos, diterpenos, naftoquinonas, saponinas, triterpenos e esteroides. A maceração das folhas das plantas indicou a presença de derivados antracênicos, flavonoides, saponinas e naftoquinonas. O teor de compostos fenólicos foi marcadamente maior nas cascas de *Hymenaea martiana*, mas para a quantificação de flavonoides totais, valores semelhantes foram encontrados. A

padronização de medicamentos à base de *H. martiana* é um passo importante para o futuro desenvolvimento de produtos farmacêuticos, caracterizando-se como uma planta com grande potencial terapêutico.

**Unitermos:** *Hymenaea martiana*, caracterização físico-química, prospecção fitoquímica.

## INTRODUCTION

All along human history, plants have been used for therapeutic purposes, and are characterized as a fundamental part of traditional cultures. In Brazil, indigenous communities have the practice of using plants, both as food, as ritual elements and for medicinal purposes, and then these practices being spread to the present days. Among the available drugs in the therapeutic, medicinal plants and their derivatives have shown continuous growth, mainly due to the widespread use in traditional medicine, as well as the stimulation of herbal medicine in specific programs (BRAZIL, 2012).

The use of the biodiversity for the development of new drugs had a great relevance, because it is estimated that 25% of the medicines available on the market are derived directly or indirectly from plant active ingredients (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2011). Therefore, the search for new drugs from the biodiversity in a sustainably way today features an essential action, as the use of active vegetable raw materials directly affects the production of medicines (BRAZIL, 2012).

As an example of a medicinal plant with a cultural and medicinal relevance present in the Caatinga biome, *Hymenaea martiana*, popularly known as “jatobá” is traditionally used as a food and building material source, and also is used in the folk medicine. The indications for this species for several diseases are various, such as anemia, gastritis, inflammation, rheumatism, antinociceptive and analgesic (NEVES et al., 1993; ANSELMO et al., 2012;

GAZZANELO; LUCENA; ALBUQUERQUE, 2005). Some substances that have been related to the pharmacological activities of *Hymenaea martiana* are flavonoids (CARNEIRO et al., 1993; CALIXTO; YUNES; MEDEIROS, 1992a, 1992b; NEVES et al., 1993, CLOSA et al., 1997; ALMEIDA et al., 2012).

To a medicinal plant be used as phytotherapeutic medicine safely, it is necessary to its standardization. In other words, the purity of the plant drug and its content of active compounds must be established within the quality criteria. The Brazilian Nacional Agency of Sanitary Surveillance (ANVISA), by the RDC No. 26, published in 2014, states that herbal medicines are produced with the exclusive use of plant active raw materials, effectively and safely based on clinical evidence and show constancy in its quality (BRAZIL, 2014).

In this context, this study aims to perform physical-chemical and phytochemical analysis of the barks and leaves of *Hymenaea martiana*, to establish initial specifications, which in the future can serve as parameters for the quality control of herbal drugs from this species.

## **METHODOLOGY**

### **Obtaining of plant drugs**

The leaves and barks of *Hymenaea martiana* Hayne were collected in the city of Petrolina, Pernambuco, Brazil, in the months of May and July 2013, and was identified by a botanist from Centro de Referência para Recuperação de Áreas Degradadas da Caatinga (CRAD). A voucher specimen (nº 6444, coordinates 09°11'04.30" S, 040°18'05.40" W, 357 m height) was deposited on the Herbarium Vale do São Francisco (HVASF) of the Universidade Federal do Vale do São Francisco.

The vegetal materials were dried at medium temperature of 40 °C, during 72 hours, and then the materials were powdered in a mill.

### **Physicochemical characterization of the plant drugs**

Physicochemical assays were developed: determination of particle size, determination of the foam index, determination of loss on drying, determination of water content, determination of sulfated ashes, limit assay for heavy metals, following the recommendations of the Brazilian Pharmacopoeia (BRAZIL, 2010). Additionally, assays were developed for the determination of uncompressed bulk density and determination of pH in aqueous solution, following another studies found in the literature (FONSECA, 2009).

#### **Determination of particle size**

Sieves were used with mesh size of 250, 300, 425, 500  $\mu\text{m}$  and 1.70 mm, in a siever (Bertel)<sup>®</sup>. 25.0 g of the plant drugs were weighed, and the samples were transferred for the superior sieve, distributing it uniformly. The device was triggered, with vibration 4, for 15 minutes. After this time, the retained sample was weighed, including the collector. The percent retained on each sieve was obtained using the following calculation: % Retained in the sieve =  $P1 / P2 \times 100$ , where: P1 = Weight of the sample retained in each sieve (g); P2 = Sum of weights in each sieve and collector (g); 100 = Percentage factor.

#### **Determination of the foam index**

1.0 g of the plant drugs were weighed and transferred to a flask containing 50 ml of boiling water. The solution was maintained under moderate boiling for 30 minutes. The solution was then cooled and filtered into a 100 ml volumetric flask. The volume was completed through the filter to 100 ml. The decoction obtained was distributed in 10 test tubes with stopper (16 mm diameter x 16 cm height). The tubes were capped and shaken with vertical movement for 15 seconds with two shakes per second. The tubes were left to stand for 15

minutes, the foam height was measured.

If the foam height of all tubes is less than 1.0 cm, the foam index is less than 100. The foaming index was calculated according to the equation: Foam Index = 1000/A, where: A = the volume in milliliters, of the decoction used for dilution of the preparation in the tube in which the foam was observed.

### **Determination of loss on drying**

2.0 g of plant drugs were weighed and transferred to previously flat weighting bottle dried for 30 minutes at 105 °C. After cooling in a desiccator, the weighting bottle was capped and weighed, containing the sample. The sample was distributed as uniformly as possible. The weighting bottle was inserted in a drying oven, with the cover removed, leaving it also in the oven. The sample was dried at 105 °C for 2 hours, the weighting bottle was cooled to room temperature in a desiccator, and it was weighed. The operation was repeated until constant weight. The loss on drying was obtained using the following calculation: Loss on drying (%) =  $(P_u - P_s) / P_a \times 100$ , where  $P_a$  = sample weigh;  $P_u$  = weighting bottle weigh containing the sample before drying;  $P_s$  = weighting bottle weigh containing the sample after drying.

### **Total ashes**

In a previously weighed crucible, 3.0 g of the drug added, distributed uniformly and incinerated increasing, gradually the temperature to a maximum of  $600 \pm 25$  °C until all the carbon was removed. The sample was cooled in desiccator and weight. The percentage of total ash was calculated in relation to the plant drug.

### **Sulfated ashes**

In a previously weighed crucible, 1.0 g of the drug added, which was moistened with

concentrated sulfuric acid and carbonized on Bunsen burner. The sample was moistened again with concentrated sulfuric acid, carbonized and incinerated with gradual heating to 800 °C. The sample was cooled, reweighed, and incinerated for 15 minutes more. The procedure was repeated until the difference between two successive weightings were not greater than 0.5 mg. The determination of sulfated ash was obtained using the equation: % Sulfated ashes =  $(Pr - Pv) / Pa \times 100$ , where Pr = crucible weight + sample residue; Pv = empty crucible weight; Pa = sample weight.

#### **Uncompressed bulk density**

In a 10 ml measuring cylinder, previously weighed, was added 1.0 g of the plant drugs, so that the relationship between the volume and powder mass constituted uncompact bulk density, by the equation: Bulk density (g/ml) = Mass (g) / Volume occupied (ml).

#### **Determination of pH in aqueous solution**

2.0 g of the powdered drug was weighed, and 20 ml of distilled water were added. The solution was subjected to ultrasonic bath at 25 °C for 10 minutes for homogenization and filtered through filter paper. The electrode was calibrated with buffer solution, and the pH was measured in a MS Tecno<sup>®</sup> equipment.

#### **Limit assay for heavy metals (semi-quantitative method)**

This test was conducted with the collaboration of Hebron Laboratory, located in Caruaru, Pernambuco, Brazil, and the Method I (Brazilian Pharmacopoeia) was chosen (BRAZIL, 2010), and the special reagents were prepared as described.

The sample preparation was obtained transferring the sample to a tube and it was diluted to 25 ml with water (4 mg of each plant drug). The pH of the solution was adjusted

between 3.0 and 4.0 with 1 M acetic acid and 6 M ammonium hydroxide using indicator paper.

The solution was diluted with water to approximately 40 ml and were homogenized.

The standard solution was obtained transferring to a tube 2 ml of plumb standard solution (10 ppm Pb), and diluted to 25 ml with water. The pH of the solution was adjusted between 3.0 and 4.0 with 1 M acetic acid and 6 M ammonium hydroxide using indicator paper. The solution was diluted with water to approximately 40 ml and was homogenized.

The control solution was prepared transferring 2 ml of the sample solution to a third tube, and 2 ml of plumb standard solution (10 ppm Pb) was added. The pH of the solution was adjusted between 3.0 and 4.0 with 1 M acetic acid and 6 M ammonium hydroxide using indicator paper. The solution was diluted with water to approximately 40 ml and was homogenized.

To each solution, it was added 2 ml of the acetate buffer pH 3.5 and 1.2 ml of thioacetamide. The solution was diluted with water to 50 ml, homogenized and allowed to stand for 2 minutes. After this time, a color was developed that ranges from yellow to black. The preparations were observed from above, along the vertical axis of the tube on white background.

Any color developed in the sample preparation is not more intense than in the standard preparation. The test is valid only if the intensity of the color developed in the preparation control is equal to that of the standard preparation.

### **Limit assay for heavy metals (Atomic spectrometry)**

This assay was developed in the equipment ICP-OES Perkin Elmer®, OPTIMA 2100DV model, with the collaboration of Cifarma Laboratory, located in Goiânia, Goiás, Brazil, following the atomic spectrometry method, with the sample decomposition, as

described in the Brazilian Pharmacopoeia (BRAZIL, 2010).

### **Obtaining plant extracts**

Both of the barks and leaves of *Hymenaea martiana* were submitted to an exhaustive extraction process through maceration method, with ethanol 95%, in a stainless steel flask. Three extractions were developed, replacing the solvent every 72 hours until complete exhaustion of the drug. The extraction solution obtained was submitted to a distillation process of the solvent, in a rotary evaporator at reduced pressure at an average temperature of 50 °C.

### **Phytochemical screening**

An aliquot of the extracts of each plant drug was solubilized in chloroform, and was submitted to thin layer chromatographic analysis, with silica gel 60 F254, with aluminum support, applied with a micropipette and eluted with different systems of solvents, as described by Wagner and Bladt (1996), seeking to highlight the major groups of secondary metabolites (Table I).

**Table I** - Elution systems and revelators used in the phytochemical screening of *Hymenaea martiana* by thin layer chromatography.

---

| <b>Secondary metabolites</b> | <b>Elution Systems</b> | <b>Revelators</b> |
|------------------------------|------------------------|-------------------|
|------------------------------|------------------------|-------------------|

---

|                          |  |                            |
|--------------------------|--|----------------------------|
| Alkaloids                | Toluene: ethyl acetate: diethyl amine<br>(70:20:10, v/v)                   | Dragendorff reagent        |
| Anthracene derivatives   | Ethyl acetate: methanol: water (100:13.5:10, v/v)                          | KOH 10% ethanolic reagent  |
| Coumarins                | Toluene: ethyl ether (1:1 saturated acetic acid 10%, v/v)                  | KOH 10% ethanolic reagent  |
| Flavonoids and tannins   | Ethyl acetate: formic acid: acetic acid glacial: water (100:11:11:26, v/v) | NP + PEG reagent           |
| Lignans                  | Chloroform: methanol: water (70:30:4, v/v)                                 | Vanilin phosphoric reagent |
| Mono and diterpenes      | Toluene: ethyl acetate (93:7, v/v)   | Vanilin sulfuric reagent   |
| Naphthoquinones          | Toluene: formic acid (99:1, v/v)   | KOH 10% ethanolic reagent  |
| Triterpenes and steroids | Toluene: chloroform : ethanol (40:40:10, v/v)                              | Lieberman-Burchard reagent |

### Determination of total phenolic compounds

The content of total phenolic compounds was measured by the colorimetric method, using the Folin-Ciocalteu reagent (SIGMA), and gallic acid as the standard, based on the method described by Slinkard and Singleton (1977), only the volumes were adjusted (ALMEIDA et al., 2011). For this, an aliquot (40 µl) of the diluted extract was added to 3.16 mL of distilled water and 200 µl of Folin-Ciocalteu reagent, being immediately mixed. The mixture was allowed to stand for 6 minutes, and after that were added 600 µl of a stock solution of Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> and well mixed. The final solutions were allowed to stand for 2 hours at 25 °C. At

the end of the process, the absorbance of each solution was measured in using a spectrophotometer (QUIMIS) at 765 nm against the blank. Total phenolic contents of the extracts were expressed as mg gallic acid equivalents per gram of the sample (mg GAE/g), through the calibration curve with gallic acid. The calibration curve range was 50–1000 mg/l ( $R^2 = 0.9975$ ). All samples were performed in triplicates.

### **Determination of total flavonoids**

The content of total flavonoids was determined using the colorimetric method by metallic complexation described (MARQUES et al., 2012a), using quercetin as the standard. A sample solution of 5 mg/ml was prepared with absolute ethanol, and was added 0.2 ml of  $AlCl_3$  2.5% alcoholic solution and 3.80 mL of absolute ethanol. The solutions were allowed to stand for 30 minutes at room temperature. At the end of the process, the absorbance of each solution was measured in using a spectrophotometer (QUIMIS) at 408 nm against the blank. Total flavonoid content of the extracts were expressed as mg quercetin equivalents per gram of the sample (mg QE/g), through the calibration curve with quercetin. The calibration curve range was 2.5–20  $\mu$ g/ml ( $R^2 = 0.9930$ ). All samples were performed in triplicates.

### **Statistical Analysis**

Statistical analysis was performed using the software GraphPad Prism 5.0 and Microsoft Excel 2010, with 95% confidence.

## **RESULTS AND DISCUSSION**

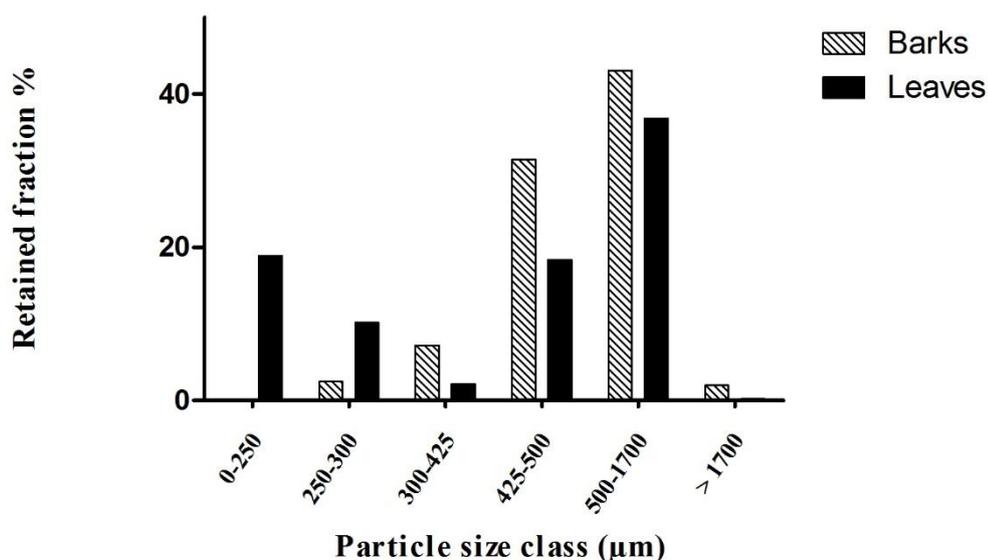
The use of medicinal plants has been present throughout the history of humanity, not just for food use, but also to ritualistic and therapeutic use. For a long time, medicinal plants constituted the main therapeutic resource available, but the technological advances have

brought synthetic drugs for the treatment of diseases. Currently, the society is highlighting the use of natural products with therapeutic properties, probably due to the search for healthy habits, and problems with the efficient treatment of certain diseases such as bacterial resistance and side effects of allopathic medicines (SOUZA-MOREIRA; SALGADO; PIETRO, 2010).

For registration of medicines, testing intended to ensure the purity and integrity of the plant drug is required, in addition to evaluation of solvents and excipients used in the extraction of the derivative, approximate ratio vegetable drug : vegetal derivative and purity and integrity tests of the vegetal derivative (BRAZIL, 2014).

The results obtained by determining the particle size of the drug (Figure 1) demonstrate that the drugs from *Hymenaea martiana* did not have homogeneous distribution, and the barks and leaves dried and powdered particles were predominantly distributed around the 500  $\mu\text{m}$  sieve, representing respectively 43.12 and 36.84% of the whole material.

The average particle size of the barks was 500  $\mu\text{m}$  and for the leaves of *H. martiana* were 600  $\mu\text{m}$  (Figure 2 and Figure 3).



**Figure 1** – Particle size distribution histogram of the barks and leaves of *Hymenaea martiana*.

According to the Brazilian Pharmacopoeia, the powders of barks and leaves of *Hymenaea martiana* can be characterized as coarse powder. Due to the fact that the plant drug particles size can influence directly in the efficiency of the extraction, this classification would be appropriate for the extraction process, because very fine particles could adhere to larger particles, increasing the viscosity of the medium and blocking the penetration of solvent (MARQUES et al., 2012b).

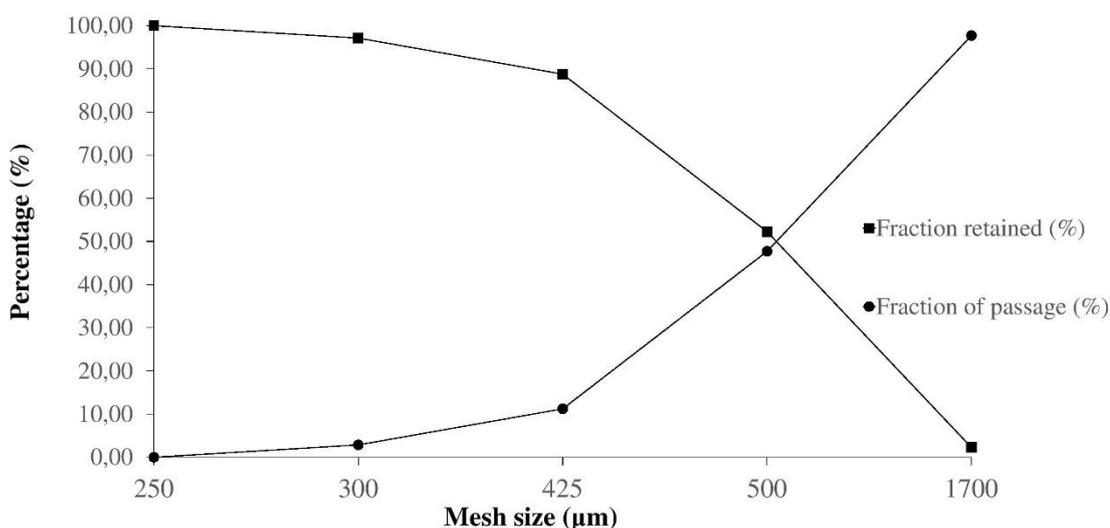


Figure 2 - Retention and passage curve of the barks from *Hymenaea martiana*.

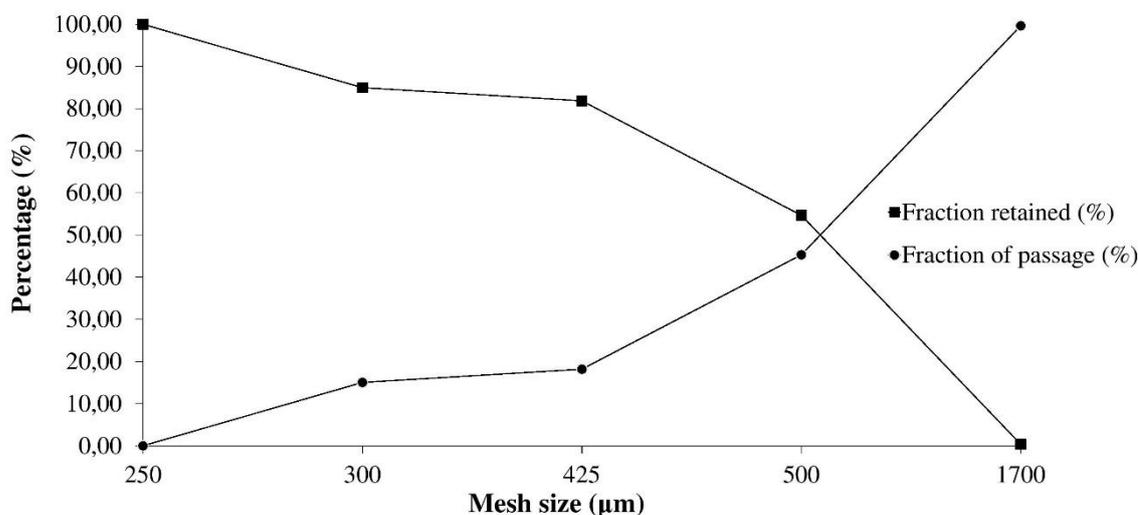


Figure 3 - Retention and passage curve of the leaves from *Hymenaea martiana*.

In order to estimate the presence of saponins in plant drugs, it was evaluated the foam index, which verifies the highest dilution in water that is able to form foam of 1 cm. The foam index for the barks was higher, with IE = 333.33, while the result for the leaves was IE = 250. These values were considered low when compared with literature data for other plants which are used as a positive control (OLIVEIRA et al., 2011). Despite being an important pharmacopeial assay for the determination of saponins, this parameter had not yet been described previously for *Hymenaea martiana*, which can add relevance to the study.

The results for water content, loss on drying, sulfated ashes, uncompressed bulk density and pH in aqueous solution are presented in Table II.

**Table II** – Results from the physicochemical assays, developed with the barks and leaves of *Hymenaea martiana*.

| Sample | L.D. (%)    | S.A. (%)    | B.D.(mg/ml)  | pH          | T.A. (%)    |
|--------|-------------|-------------|--------------|-------------|-------------|
| Barks  | 8.50 ± 1.16 | 9.16 ± 0.05 | 0.45 ± 0.005 | 5.66 ± 0.33 | 6.58 ± 0.03 |
| Leaves | 7.53 ± 1.24 | 4.82 ± 0.03 | 0.34 ± 0.01  | 5.65 ± 0.04 | 2.56 ± 0.05 |

L.D.: Loss on Drying; S.A.: Sulfated Ashes; B.D.: Bulk Density; T.A.: Total Ashes.

The determination of loss on drying and water content are important steps to evaluate the quality of vegetal raw materials, as moisture content above the specified enable the development of microorganisms, as well as hydrolysis and enzymatic activities, with the

possibility of deterioration the chemical constituents (BARNI; CECHINEL-FILHO; COUTO, 2009). The values found for the plant drug *Hymenaea martiana* are within the specified limits in the Brazilian Pharmacopoeia (BRAZIL, 2010), as well as the water content.

According to this compendium, the content of total and sulfated ashes comprises the non-volatile residue by incineration, in the presence and absence of sulfuric acid. This evaluation aims to determine the content of inorganic impurities and constituents contained in organic substances. The previous treatment of the sample with sulfuric acid is recommended to improve the reproducibility of the method (HARTKE, 1986). Barks and leaves from *Hymenaea martiana* presented a content of total and sulfated ash content below the specified in the compendium (8 - 14%).

Bulk density consists in an important parameter to the extraction process control of vegetable raw materials, which can be used as a basis for predictions of filling and compacting properties, as well as important informations about the drying process of vegetal extracts (FONSECA, 2009). According to Prista, Alves and Morgado (1996), bulk density values of tinctures vary between 0.87 and 0.98 mg/ml. While there are no reference parameters for this species, the values found might be considered normal, as these may vary according to the species to study.

The pH values constitutes a relevant information to determine the nature of the molecules present in a solution, as well as informations related to the stability of the chemical constituents. In this study, this parameter is in conformity with expectations, due to the values obtained with the plant drugs from *Hymenaea martiana* characterize its aqueous solutions as acidic, and its compounds with therapeutic values already related to their pharmacological activities are mainly flavonoids. This class of secondary metabolites has weakly acidic properties, which would result in acidic pH in aqueous solution (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).

The determination of heavy metals in plant drug constitutes a health requirement laid down in Brazilian legislation (BRAZIL, 2014). The values for heavy metals are disclosed in Table III. The semi-quantitative method consists of the formation of solid particles of sulfides of heavy metals, in suspension, and subsequent visual comparison of the color intensity in the sample and standard preparations, representing the sum of the concentration of contaminants in the sample. For the powders from *Hymenaea martiana*, the semi-quantitative test was satisfactory, being approved on the test (result below 10 ppm). On analysis by atomic spectrometry equipment, however, the mercury concentration on the barks of the studied species is above the acceptable limit described in the Brazilian Pharmacopoeia. The contamination of plants with metals can come from various sources, such as accidental, purposeful, soil contamination from material of natural or mineral origin and during manufacture (VEIGA-JÚNIOR; PINTO; MACIEL, 2005). The proximity of highways as well as water quality by pollutants that are subsequently conducted by rainwater, can affect plant (FREIRE, 2005). The Brazilian compendium recommends limits for oral use and parenteral use. The limits recommended for mercury for topical products is reported on the United States Pharmacopoeia (15 ppm) (UNITED STATES OF AMERICA, 2013). Thus, the barks of *Hymenaea martiana* could be used for topical purposes, as creams, ointments and topic cosmetics.

The assay developed by atomic spectrometry equipment also showed the concentration of iron contained on the samples. For the leaves, the iron content was  $0.690 \pm 0.003$  ppm, and for the barks, the content of iron was  $32.280 \pm 0.402$  ppm. This data can also justify the pharmacological uses for the barks of this and other species of the genus, cited for the treatment of anemia. The barks from *Hymenaea* genus are also used in the folk medicine as tonic, fortifier, energizer, acting to restore organic strength, and increase the blood production, counteracts

weakness in children and weakness in general (MENDES; CARLINI, 2007; BARRET, 1994; ANSELMO et al., 2012; ALBUQUERQUE et al., 2007).

**Table III** – Results of the limit test for heavy metals.

| Element | Maximum limit for                |                |                |
|---------|----------------------------------|----------------|----------------|
|         | oral use (ppm)<br>(BRAZIL, 2010) | Barks          | Leaves         |
| As      | 1.5                              | 0.600 ± 0.0255 | 0.009 ± 0.00   |
| Cd      | 0.5                              | N.D.           | N.D.           |
| Cu      | 250                              | 1.649 ± 0.0197 | 0.038 ± 0.0005 |
| Hg      | 1.5                              | 7.654 ± 0.3389 | 0.055 ± 0.001  |
| Mg      | 250                              | 45.610 ± 0.535 | 0.961 ± 0.007  |
| Mo      | 25                               | N.D.           | N.D.           |
| Pb      | 1.0                              | 0.470 ± 0.0399 | 0.009 ± 0.0005 |

N.E.: Non established; N.D.: Non detected.

The phytochemical screening with the extracts was performed, and the chromatographic thin layer plates were analyzed (Table IV). The analysis of the extracts obtained by maceration with *H. martiana* barks indicated the presence of anthracene derivatives, flavonoids, monoterpenes, diterpenes, naphthoquinones, saponins, triterpenes and steroids. These data are in accordance to the literature, since secondary metabolites have been isolated and identified in the barks of *Hymenaea martiana*, such as the flavonoids astilbin, eucryphin, engelitin and taxifolin (CARNEIRO et al., 1993; CECHINEL-FILHO et al., 2000), and the steroid daucosterol (CARNEIRO et al., 1993). The maceration of plant leaves indicated the presence of anthracene derivatives, flavonoids, saponins and naphthoquinones. Although there is no

phytochemical studies with leaves of *Hymenaea martiana*, other species of the genus presented terpenoids, flavonoids (KADER et al., 2002; LOPEZ; SCHIFF, 1976; MARTIN; LANGENHEIM; ZAVARIN, 1972; PETTIT et al., 2003), sesquiterpenes (LANGENHEIM et al., 1978) and xyloglucans (BUSATO et al., 2001).

More specific and selective studies for metabolic classes were developed, with the determination of the content of phenolic compounds and flavonoids, by spectrophotometric methods (Table V).

**Table IV** – Qualitative phytochemical screening with the barks and leaves extracts of *Hymenaea martiana*.

| Secondary Metabolites       | Bark Extract | Leaves extract |
|-----------------------------|--------------|----------------|
| Alkaloids                   | -            | -              |
| Anthracene derivatives      | +++          | ++             |
| Coumarins                   | -            | -              |
| Flavonoids                  | +++          | +++            |
| Lignans                     | -            | -              |
| Monoterpenes and Diterpenes | +            | -              |

|                          |     |   |
|--------------------------|-----|---|
| Naphthoquinones          | +++ | + |
| Saponins                 | +   | + |
| Triterpenes and steroids | +   | - |

(-): Non detected; (+): weakly positive; (++): moderately positive; (+++) strongly positive.

**Table V** – Content of total phenolic compounds and total flavonoids in extracts of the bark and leaves of *Hymenaea martiana*.

| Extract | T.P. (mg GAE/g) ± S.D. | T.F. (mg QE/g) ± S.D. |
|---------|------------------------|-----------------------|
| Barks   | 586.50 ± 9.61          | 106.20 ± 0.37         |
| Leaves  | 180.25 ± 7.74          | 100.02 ± 1.95         |

T.P.: total phenolics; T.F.: total flavonoids; GAE: gallic acid equivalents; QE: quercetin equivalents; S.D.: standard deviation.

The content of phenolic compounds was markedly higher in the barks of *Hymenaea martiana*, but for the quantification of total flavonoids, similar amounts were found, showing this plant drugs are recommended for phenolic compounds and flavonoid extraction. The values obtained shows the relevance of the compounds found in *Hymenaea martiana*. Phenolic compounds and flavonoids can justify much of the reported activities for the plant, as the anti-inflammatory and analgesic (NEVES et al., 1993), antinociceptive, anti-edematogenic (CECHINEL-FILHO et al., 2000), antispasmodic (CALIXTO; YUNES; MEDEIROS, 1992a, 1992b; CARNEIRO et al., 1993), hepatoprotective (CLOSA et al., 1997) e antimicrobial activities (SOUZA et al., 2009; SILVA-JÚNIOR, 2014).

## CONCLUSIONS

The results obtained in this study were relevant for the standardization process of quality parameters for barks and leaves of *Hymenaea martiana*, especially by the absence of limits for physicochemical tests and content determination in the literature for this species. The standardization of herbal drugs *H. martiana* is an important step for the future development of pharmaceuticals, characterizing a plant with great therapeutic potential.

#### ACKNOWLEDGMENT

The authors thank the collaboration of all the laboratories involved on the development of this study as well as the Brazilian agencies CAPES and FACEPE for financial support.

#### REFERENCES

ALBUQUERQUE, U.P.; MEDEIROS, P.M.; ALMEIDA, A.L.S.; MONTEIRO, J.M.; LINS-NETO, E.M.F.; MELO, J.G.; SANTOS, J.P. Medicinal plants of the caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: a quantitative approach. **J Ethnopharmacol**, v. 114, p. 325-354, 2007.

ALMEIDA, J.R.G.S.; OLIVEIRA, M.R.; GUIMARÃES, A.L.; OLIVEIRA, A.P.; RIBEIRO, L.A.A.; LÚCIO, A.S.S.C.; QUINTANS-JÚNIOR, L.J. Phenolic quantification and antioxidant activity of *Anaxagorea dolichocarpa* and *Duguetia chrysocarpa* (Annonaceae). **Int J Pharm Biol Sci**, vol. 2, n. 4, p. 367-374, 2011.

ALMEIDA, J.R.G.S.; SILVA, M.E.G.C.; GUIMARÃES, A.L.; OLIVEIRA, A.P.; ARAÚJO, C.S.; SIQUEIRA-FILHO, J.A.; FONTANA, A.P.; DAMASCENO, P.K.F.; BRANCO, C.R.C.; BRANCO, A. HPLC-DAD analysis and antioxidant activity of *Hymenaea martiana* Hayne (Fabaceae). **J Chem Pharm Res**, v. 4, n. 2, p. 1160-1166, 2012.

ANSELMO, A.F.; SILVA, C.G.; MARINHO, M.G.V.; ZANELLA, F.C.V.; XAVIER, D.A. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais comercializadas por raizeiros em uma feira livre no município de Patos – PB. **Rev Biol Farm**, vol. Especial, p. 39-48, 2012.

BARNI, S.T.; CECHINEL-FILHO, V.; COUTO, A.G. Caracterização química e tecnológica das folhas, caules e planta inteira de *Ipomoea pescaprae* (L.) R. Br., Convolvulaceae, como matéria prima farmacêutica. **Rev Bras Farmacogn**, vol. 19, n. 4, p. 865-870, 2009.

BARREIROS, A.L.B.S.; DAVID, J.M.; DAVID, J.P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Quím Nova**, vol. 29, n. 1, p. 113-123, 2006.

BARRETT, B. Medicinal plants of Nicaragua's Atlantic coast. **Econ Bot**, v. 48, n. 1, p. 8-20, 1994.

BRASIL. **Farmacopeia Brasileira**. 5ª ed. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2010. 546 p.

BRASIL. **Práticas integrativas e complementares**: plantas medicinais e fitoterapia na atenção básica. Brasília: Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica, 2012. 156 p.

BRASIL. Resolução RDC nº 26 de 13 de maio de 2014. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Brasília, DF, 14 maio, 2014. Seção 1, p. 52.

BUSATO, A.P.; REICHER, F.; DOMINGUES, R.; SILVEIRA, J.L.M. Rheological properties of thermally xyloglucan gel from the seeds of *Hymenaea courbaril*. **Mater Sci Eng**, vol. 29, p. 410-414, 2009.

CALIXTO, J.B.; YUNES, R.A.; MEDEIROS, Y.S. Differential antagonistic effect of hydroalcoholic extract from *Hymenaea martiana* Hayne arzeik on kinin and other agonist-induced contractions of the isolated rat uterus and guinea-pig ileum. **Phytother Res**, v. 6, n. 6, p. 322-326, 1992a.

CALIXTO, J.B.; YUNES, R.A.; MEDEIROS, Y.S. Vascular action of the crude hydroalcoholic extract from *Hymenaea martiana* on the isolated rat and rabbit aorta. **Phytother Res**, v. 6, n. 6, p. 327-331, 1992b.

CARNEIRO, E.; CALIXTO, J.B.; DELLE MONACHE, F.; YUNES, R.A. Isolation chemical identification and pharmacological evaluation of eucryphin, astilbin and engelitin obtained from the bark of *Hymenaea martiana*. **Int J Pharmacogn**, v. 31, n. 1, p. 38-46, 1993.

CECHINEL-FILHO, V.; VAZ, Z.R.; ZUNINO, L.; CALIXTO, J.B.; YUNES, R.A. Antinociceptive and anti-oedematogenic properties of astilbin, taxifolin and some related compounds. **Drug Res**, v. 50, n. 3, p. E281-E285, 2000.

CLOSA, D.; TORRES, M.; HOTTER, G.; BIOQUE, G.; LEON, S.; GELPI, E.; ROSELLÓ-CATAFAU, J. Prostanoids and free radicals in CI4C-induced hepatotoxicity in rats: effect of astilbin. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids**, v. 56, n. 4, p. 331-334, 1997.

FONSECA, F.N. **Desenvolvimento tecnológico de fitoproduto a partir de *Justicia pectoralis* – Chambá**: obtenção de extrato seco padronizado (CLAE-DAD) e avaliação farmacológica. Dissertação - Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, 2009.

FREIRE, M.F.I. Metais pesados e plantas medicinais. **Rev Ciênc Agron**, v. IV, n. 08, 2005.

GAZZANEO, L.R.S.; LUCENA, R.F.P.; ALBUQUERQUE, U.P. Knowledge and use of medicinal plants by local specialists in a region of Atlantic Forest in the state of Pernambuco (Northeastern Brazil). **J Ethnobiol Ethnomed**, v. 1, n. 9, p. 1-9, 2005.

HARTKE, K. *Deutschers Arzneibuch 9-Kommentar*. Stuttgart: Wissenschaftliche, Frankfurt: Govi, 1989. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P. **Farmacognosia**: da planta ao medicamento. 6.ed. Porto Alegre: UFRGS; Florianópolis: UFSC, 2007. p. 277.

KADER, M.A.; BERGER, J.M.; SLEBODNICK C.; HOCH, J.; MALONE, S.; WISSE, J.H.; WERKHOVEN, M.C.M.; MAMBER, S.; KINGSTON, D.G.I. Isolation and absolute configuration of ent-halimane diterpenoids from *Hymenaea courbaril* from the Suriname rain forest. **J Nat.Prod**, v. 65, n. 1, p. 11-15, 2002.

LANGENHEIM, J.H.; STUBBLEBINE, W.H.; LINCOLN, D.E.; FOSTER, C.E. Implications of variation in resin composition among organs, tissues and populations in the tropical legume *Hymenaea*. **Biochem Sys Ecol**, v. 6, p. 299-313, 1978.

LOPEZ, J.A.; SCHIFF, P.L.J.R. Isolation of astilbin and sitosterol from *Hymenaea courbaril*. **Phytochemistry**, v. 15, p. 2025-2028, 1976.

MARQUES, G.S.; MONTEIRO, R.P.M.; LEÃO, W.F.; LYRA, M.A.M.; PEIXOTO, M.S.; ROLIM-NETO, P.J.; XAVIER, H.S.; SOARES, L.A.L. Avaliação de procedimentos para quantificação espectrofotométrica de flavonoides totais em folhas de *Bauhinia forficata* Link. **Quim Nova**, vol.35, n. 3, 2012a.

MARQUES, G.S.; LYRA, M.A.M.; PEIXOTO, M.S.; MONTEIRO, R.P.M.; LEÃO, W.F.; XAVIER, H.S.; SOARES, L.A.L.; ROLIM-NETO, P.J. Caracterização fitoquímica e físico-

química das folhas de *Bauhinia forficata* Link coletada em duas regiões brasileiras. **Rev Ciênc Farm Básica Apl**, v. 33, n. 1, p. 57-62, 2012b.

MARTIN, S.S.; LANGENHEIM, J.H.; ZAVARIN, E. Sesquiterpenes in leaf pocket resin of *Hymenaea courbaril*. **Phytochemistry**, v. 11, p. 3049-3051, 1972.

MENDES, R.F.; CARLINI, E.A. Brazilian plants as possible adaptogens: An ethnopharmacological survey of books edited in Brazil. **J Ethnopharmacol**, v. 109, p. 493-500, 2007.

NEVES, M.C.A.; NEVES, P.C.A.; ZANINI, J.C.; MEDEIROS, Y.S.; YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. Analgesic and anti-inflammatory activities of the crude hydroalcoholic extract obtained from the bark of *Hymenaea martiana*. **Phytother Res**, v. 7, n. 5, p. 356-362, 1993.

OLIVEIRA, D.R.; COSTA, A.L.M.A.; LEITÃO, G.G.; CASTRO, N.G.; SANTOS, J.P.; LEITÃO, S.G. Estudo etnofarmacognóstico da saracuramirá (*Ampelozizyphus amazonicus* Ducke), uma planta medicinal usada por comunidades quilombolas do Município de Oriximiná-PA, Brasil. **Acta Amaz**, v. 41, n. 3, p. 383-392, 2011.

PETTIT, G.R.; MENG, Y.; STEVENSON, C.A.; DOUBEK, D.L.; KNIGHT, J.C.; CICHACZ, Z.; PETTIT, R.K.; CHAPUIS, J.C.; SCHIMIDT, J.M. Isolation and structure of palstatin from the amazon tree *Hymenaea palustris*. **J Nat Prod**, v. 66, n. 2, p. 259-262, 2003.

PRISTA, L.N.; ALVES, A.C.; MORGADO, R. **Tecnologia Farmacêutica**. 6 ed., v. 1. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2002. 784 p.

SILVA-JÚNIOR, E. B. **Atividade in vitro das frações do extrato vegetal de *Hymenaea martiana* Hayne e do antimicrobiano doxicilina contra bactérias da microbiota cérvico-vaginal de ovinos**. Dissertação. Programa de Pós-graduação em Recursos Naturais do Semiárido. Universidade Federal do Vale do São Francisco. Petrolina, 2014.

SLINKARD, K.; SINGLETON, V. L. Total phenol analyses: automation and comparison with manual methods. **Am J Enol Vitic**, v. 28, p. 49-55, 1977.

SOUZA, A.C.M.; KATO, L.; SILVA, C.C.; CIDADE, A.F.; OLIVEIRA, C.M.A.; SILVA, M.R.R. Antimicrobial activity of *Hymenaea martiana* towards dermatophytes and *Cryptococcus neoformans*. **Mycoses**, v. 53, p. 500-503, 2009.

SOUZA-MOREIRA, T. M.; SALGADO, H.R.N.; PIETRO, R.C.L.R. O Brasil no contexto de controle de qualidade de plantas medicinais. **Rev Bras Farmacogn**, v. 20, n. 3, p. 435-440, 2010.

UNITED STATES OF AMERICA. **The United States Pharmacopoeia**. 37.ed. Rockville, 2013.

VEIGA-JÚNIOR, V.F.; PINTO, A.C.; MACIEL, M.A.M. Plantas medicinais: cura segura? **Quím Nova**, v. 28, n. 3, p. 519-528, 2005.

WAGNER H.; BLADT, S. **Plant Drug Analysis – A thin layer chromatography atlas**. 2. ed. Berlim: Spinger-Verlag, 1996. 384 p.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **The world medicines situation 2011**: Traditional medicines: global situation, issues and challenges. Geneva: WHO Press, 2011. 30 p.