



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCIÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO TERAPÉUTICA

SARAH LUANNE SILVA

**Prospecção fitoquímica e avaliação das atividades antimicrobiana
e antioxidante de extratos e frações enriquecidas
a partir de *Hymenaea eriogyne* Benth**

RECIFE
2019

SARAH LUANNE SILVA

**Prospecção fitoquímica e avaliação das atividades antimicrobiana
e antioxidante de extratos e frações enriquecidas a partir
de *Hymenaea eriogyne* Benth**

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco, em cumprimento às exigências do programa.

Área de concentração: Desenho, Modelagem Molecular e Preparação de Produtos Bioativos.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Alberto Lira Soares

Coorientadora: Profa. Dra. Magda Rhayanny Assunção Ferreira

RECIFE

2019

Catalogação na fonte
Elaine C Barroso (CRB4/1728)

Silva, Sarah Luanne

Prospecção fitoquímica e avaliação das atividades antimicrobiana e antioxidante de extratos e frações enriquecidas a partir de *Hymenaea eriogyne* Benth / Sarah Luanne Silva- 2019.

89 folhas: il., fig., tab.

Orientador: Luiz Alberto Lira Soares

Coorientadora: Magda Rhayanny Assunção Ferreira

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco.
Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Inovação
Terapêutica. Recife, 2019.
Inclui referências e anexos

1. Fitoquímicos 2. *Hymenea eriogyne* 3. Atividade antimicrobiana I.
Soares, Luiz Alberto Lira (orient.) II. Ferreira, Magda Rhayanny
Assunção

572.2

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2019-367

SARAH LUANNE SILVA

**Prospecção fitoquímica e avaliação das atividades antimicrobiana
e antioxidante de extratos e frações enriquecidas
a partir de *Hymenaea eriogyne* Benth**

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa
de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica da
Universidade Federal de Pernambuco, em
cumprimento às exigências do programa na área de
concentração: Desenho, Modelagem Molecular e
Preparação de Produtos Bioativos.

Aprovado em: 30/08/2019

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Luiz Alberto Lira Soares
Orientador

Profa. Dra. Karina Perrelli Randau
Membro interno

Profa. Dra. Terezinha Inez Estivalet Svidzinski
Membro externo

AGRADECIMENTOS

Em nossas vidas passam muitas pessoas, as quais nos ajudam a crescer, seja nos ensinamentos ou fazendo algo por nós. Esses agradecimentos são para todos que de alguma forma me ajudaram a chegar até aqui.

Agradeço primeiramente a Deus por ter me abençoado e me guiado em todos os momentos.

A meus pais Valdécia e Lucivaldo, pelo esforço para me oferecer uma educação digna e consistente e pelo apoio e incentivo em todas as minhas decisões e escolhas.

Ao meu esposo Thiago Alexandre, por toda a ajuda, pela paciência nos momentos de estresse e ausência, e por sempre está ao meu lado me incentivando. Sei que posso contar com ele para tudo.

A meu orientador, Prof. Dr. Luiz Alberto Lira que me acolheu e proporcionou a realização deste trabalho, sempre muito paciente e atencioso. A ele minha admiração e meu respeito. A minha Coorientadora Magda Ferreira, por sempre ser tão presente e disponível, e me incentivar a busca do conhecimento, meu muito obrigada.

Agradeço também a todas as alunas do Laboratório de Farmacognosia, em especial a Rhayanne Moraes por todos os conselhos e pela parceria nessa jornada, obrigada pela amizade desenvolvida nesses dois anos de mestrado. Agradeço também a Liliane Lima por toda ajuda no desenvolvimento do trabalho, e pela amizade construída. À Camylla Tenório pela contribuição no trabalho. Enfim, a todos que contribuíram direto ou indiretamente, para a realização de um objetivo.

RESUMO

Hymenaea sp. apresenta uma grande variedade de compostos químicos com propriedades biológicas já descritas na literatura. Porém, destaca-se a ausência de estudos para a espécie *H. eriogyne*, popularmente conhecida como “Jatobá”. Dessa forma, o propósito deste trabalho foi realizar a caracterização fitoquímica e a avaliação da propriedade biológica através da determinação das atividades antimicrobiana e antioxidante. Para tanto, amostras das cascas, folhas e frutos da espécie foram coletadas em Bezerros (PE) e identificadas no Instituto Agronômico de Pernambuco. Após coleta e identificação, os farmacógenos foram secos em estufa (40 °C), triturados e submetidos a caracterização físico-química conforme preconizado pela Farmacopeia Brasileira. O processo de otimização para o doseamento de polifenois totais investigou a influência da proporção droga: solvente (5, 10, 15% p/v), dos métodos extractivos (refluxo, maceração e ultrassom) assim como a influência do solvente extrator (acetona:água em diferentes proporções: (1:1 e 7:3). Após otimização do método extractivo, foi realizada a obtenção da fração enriquecida através da partição com acetato de etila e hexano. A análise fitoquímica qualitativa foi conduzida por cromatografia em camada delgada e a análise quantitativa de marcadores por cromatografia líquida (CLAE-DAD). Por fim, as propriedades biológicas antimicrobianas (CIM, CBM,CFM e atividade modulatória de resistência) e antioxidante (DPPH e ABTS) foram avaliadas *in vitro*. As melhores condições extractivas foram observadas para 10% (p/v) de droga vegetal, utilizando acetona: água (7:3) como solvente extrator e empregando turbólise como método extractivo. A análise quantitativa por CLAE-DAD permitiu separar e identificar o flavononol astilbina (taxifolina 3-O-ramnosídeo) e, através de análise comparativa dos espectros de varredura, foi possível confirmar a presença de derivados flavonoídicos. Quanto à avaliação biológica, o extrato bruto e a fração acetato de etila apresentaram maior eficiência, com os menores valores de CIM frente a *S. aureus* (250 µg/mL). Além disso, comportamento sinérgico foi observado em quatro das oito associações testadas pela atividade modulatória. Em relação à atividade antifúngica, os resultados não foram considerados promissores. Por fim, a atividade antioxidante dos derivados de *H. eriogyne* foi observada pelo método DPPH e ABTS, que pode ser atribuída ao seu conteúdo em compostos fenólicos.

Palavras chave: Atividade antimicrobiana. CCD. CLAE. *Hymenaea eriogyne*.

ABSTRACT

Hymenaea spp. presents a wide variety of chemical compounds with biological properties already described in the literature. However, there is the absence of studies for the species *H. eriogyne*, popularly known as “Jatobá”. Therefore, the purpose of this work was to perform the phytochemical characterization and the evaluation of biological property through the determination of antimicrobial and antioxidant activities. For this, samples of bark, leaves, and fruits of the species were collected in Calves (PE) and identified at the Agronomic Institute of Pernambuco. After collection and identification, the pharmacogens were oven-dried (40 ° C), crushed and analyzed to physicochemical characterization as recommended by the Brazilian Pharmacopoeia. The optimization process for the total polyphenols assay investigated the influence of the drug: solvent ratio (5, 10, 15% w / v), the extractive methods (reflux, maceration and ultrasound) as well as the influence of extractor solvents (water, acetone: water in different proportions: (1: 1 and 7: 3). After the optimization of the extractive method, the enriched fraction was obtained by a partition with ethyl acetate and hexane. Qualitative phytochemical analysis was conducted by thin-layer chromatography and quantitative marker analysis by liquid chromatography (HPLC-DAD). Finally, the antimicrobial (MIC, MBC, MFC and resistance modulatory activity) and antioxidant (DPPH and ABTS) biological properties were experimentally evaluated *in vitro*. According to the data found, the best extractive conditions were observed for 10% (w / v) of the vegetable drug, using acetone: water (7: 3) as the extraction solvent and employing turbolysis as an extraction method. The quantitative analysis by HPLC-DAD allowed the separation and identification of flavononol astilbine (taxifoline 3-O-ramnoside) and, by a comparative analysis of the scanning spectra, it was possible to confirm the presence of other flavonoid derivatives. Regarding the biological evaluation, crude extract and ethyl acetate fraction showed higher efficiency, with lower MIC values to *S. aureus* (250 µg / mL). Besides, synergistic behavior was observed for four out of eight associations tested for modulatory activity. Regarding antifungal activity, the results were not considered promising. Certainly, the antioxidant activity of *H. eriogyne* derivatives was observed by the DPPH and ABTS method, which can be attributed to their content in phenolic compounds.

Keywords: Antimicrobial Activity. CCD. CLAE. *Hymenaea eriogyne*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura química do flavonoide astilbina.....	23
Figura 2 - Reação de oxirredução pelo método DPPH.	28
Figura 3 - Reação de formação do radical estável ABTS com persulfato de potássio com antioxidante.	29
Figura 4 - Esquema de obtenção das frações enriquecidas.	35
Figura 5 - Curvas de retenção e passagem referentes às amostras de <i>H. eriogyne</i> . 46	
Figura 6 - Histograma de distribuição granulométrica dos farmacógenos de <i>H. eriogyne</i>	47
Figura 7 - Cromatoplaca obtida por aplicação semi-automatizada para flavonoides, derivados cinâmicos e taninos hidrolisáveis visualizada em 366 nm.	54
Figura 8 - Cromatoplaca obtida por aplicação semi-automatizada para taninos condensados revelado com vanilina clorídrica e visualizado sob luz branca.	
.....	55
Figura 9 - Cromatograma obtido para o extrato bruto (A), fração aquosa (B) e fração acetato de etila (C) da casca de <i>H. eriogyne</i> , em 280 e 350 nm.....	56
Figura 10 - Espectros de varredura dos picos evidenciados no extrato e frações das cascas de <i>H. eriogyne</i>	57
Figura 11 - Cromatograma e espectro de varredura do padrão astilbina em 280 nm.	
.....	58
Figura 12 - Cromatograma e espectro de varredura do padrão catequina em 280 nm.	
.....	58
Figura 13 - Cromatograma obtido para o extrato bruto (A), fração hexano (B), fração aquosa residual (C) e fração acetato de etila (D) da folha de <i>H. eriogyne</i> ; em 280 nm e 350 nm.....	59
Figura 14 - Espectros de varredura dos picos evidenciados no extrato e frações das folhas de <i>H. eriogyne</i>	60
Figura 15 - Cromatograma obtido para o extrato bruto (A), fração aquosa residual (B) e fração acetato de etila (C) do fruto de <i>H. eriogyne</i> , em 280 nm e 350 nm.	
.....	61
Figura 16 - Espectros de varredura dos picos evidenciados no extrato e frações dos frutos de <i>H. eriogyne</i>	62

Figura 17 - Cromatogramas obtidos para os extratos brutos dos três farmacógenos em 280 nm (A) e 350 nm (B).....	63
Figura 18 - Cromatogramas obtidos para as frações aquosas dos três farmacógenos em 280 nm (A) e 350 nm (B).	64
Figura 19 - Cromatogramas obtidos para as frações acetato de etila dos três farmacógenos em 280 nm (A) e 350 nm (B).	65

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Sistemas cromatográficos empregados para obtenção do perfil fitoquímico típico da espécie <i>H. eriogyne</i>	36
Quadro 2 - Microrganismos, origem e perfis de susceptibilidade.....	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Teor de matéria estranha presentes nos farmacógenos de <i>H. eriogyne</i>	48
Tabela 2 - Teores de umidade das amostras de <i>H. eriogyne</i>	48
Tabela 3 - Teores de cinzas totais das amostras de <i>H. eriogyne</i>	49
Tabela 4 - Teor de polifenois totais (TPT) calculado em g% de pirogalol em diferentes quantidades de droga e métodos de extração para os três farmacógenos de <i>H. eriogyne</i>	50
Tabela 5 - Teor de polifenois totais (TPT) calculado em g% de pirogalol utilizando diferentes solventes na extração para os três farmacógenos de <i>H. eriogyne</i>	51
Tabela 6 - Rendimento dos Extratos Brutos e Frações de <i>H. eriogyne</i>	52
Tabela 7 - Prospecção fitoquímica dos extratos metanólicos da casca, folha e fruto de <i>H. eriogyne</i>	52
Tabela 8 - Teores calculados para o extrato bruto e frações obtidas das cascas de <i>H. eriogyne</i>	66
Tabela 9 - Teores calculados para o extrato bruto e frações obtidas das folhas de <i>H. eriogyne</i>	66
Tabela 10 - Teores calculados para o extrato bruto e frações obtidas dos frutos de <i>H. eriogyne</i>	67
Tabela 11 - Valores da concentração inibitória mínima (CIM) dos extratos e frações das cascas, folhas e frutos de <i>H. eriogyne</i> , frente as bactérias.	69
Tabela 12 - Valores da concentração bactericida mínima (CBM) dos extratos e frações das cascas, folhas e frutos de <i>H. eriogyne</i> , frente as bactérias	71
Tabela 13 - CIM de antibióticos contra isolados multirresistentes, na ausência e presença da fração acetato de etila das cascas e folhas de <i>H. eriogyne</i> em concentrações sub-inibitórias (1/8 CIM).	73
Tabela 14 - Valores de Concentração Inibitoria Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM) em µg/mL dos extratos e frações das cascas, folhas e frutos de <i>H. eriogyne</i> , frente as isolados de <i>Candida</i> sp.....	74
Tabela 15 - Atividade Antioxidante pelo método de sequestro do radical DPPH (IC ₅₀) e pelo método ABTS (IC 50) dos extratos e frações de <i>H. eriogyne</i>	76

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABTS -	2,2'-azinobis (3-etylbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)
ATB -	Antibiótico
BHA -	Butilhidroxianisol
BHT -	Butilhidroxitolueno
CCD -	Cromatografia em Camada Delgada
CCD-AE -	Cromatografia em Camada Delgada de Alta Eficiência
CLAE -	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CBM -	Concentração Bactericida Mínima
CFM -	Concentração Fungicida Mínima
CIM -	Concentração Inibitória Mínima
CLSI -	Clinical Laboratory and Standards Institute
DAD -	Detector de Diodo
DNA -	Ácido Desoxirribonucleico
DPPH -	2,2-difenil-1-picril-hidrazila
EB -	Extrato Bruto
EBC -	Extrato Bruto Casca
EBF -	Extrato Bruto Folha
EBFr -	Extrato Bruto Fruto
FAE -	Fração Acetato de Etila
FAEH -	Fração Acetato de Etila após Hexano
FAqr -	Frações Aquosa Residual
FH -	Fração Hexânica
IPA -	Instituto Agronômico de Pernambuco
NUDATEF-	Núcleo de Desenvolvimento Analítico e Tecnológico de Fitoterápicos
RNA -	Ácido Ribonucleico
SUS -	Sistema Único de Saúde
UFPE -	Universidade Federal de Pernambuco
UV-B -	Radiação ultravioleta B

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.2 OBJETIVOS.....	18
1.2.1 OBJETIVO GERAL.....	18
1.2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	20
2.1 ASPECTOS BOTÂNICOS.....	20
2.1.1 Família Fabaceae.....	20
2.1.2 Gênero <i>Hymenaea</i>	20
2.1.3 <i>Hymenaea eriogyne</i> Benth.	22
2.2 ASPECTOS FITOQUÍMICOS.....	23
2.3 POLIFENOIS.....	24
2.3.1 Técnicas para detecção de Polifenois em Espécies Vegetais	25
2.4 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	26
2.5 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	27
3 MATERIAIS E MÉTODOS	31
3.1 MATERIAL VEGETAL.....	31
3.2 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS MATERIAIS VEGETAIS	31
3.2.1 Determinação de Material Estranho	31
3.2.2 Análise Granulométrica por Tamisação	32
3.2.3 Perda por Dessecação por Balança de Infravermelho.....	32
3.2.4 Cinzas Totais	32
3.3 OBTENÇÃO DO EXTRATO BRUTO.....	33
3.3.1 Avaliação do método extractivo e quantidade de droga	33
3.3.2 Determinação do teor de polifenois totais	33
3.3.3 Avaliação da influência do solvente	34
3.4 OBTENÇÃO DAS FRAÇÕES.....	34
3.5 TRIAGEM FITOQUÍMICA.....	35
3.5.1 Análise por Cromatografia em Camada Delgada (CCD)	35
3.5.2 Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	37
3.6 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	38
3.6.1 Microrganismos.....	38

3.6.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e da Concentração Bactericida/Fungicida Mínima (CBM/CFM).....	41
3.6.3 Avaliação da Interferência de Frações Enriquecidas na Resistência a Antibióticos Sintéticos	42
3.7 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	43
3.7.1 DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil).....	43
3.7.2 ABTS (Ácido 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico).....	44
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
4.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA.....	46
4.1.1 Análise Granulométrica	46
4.1.2 Matéria Estranha	47
4.1.3 Determinação de Umidade	48
4.1.4 Cinzas Totais	49
4.2 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS BRUTOS E FRAÇÕES ENRIQUECIDAS.....	49
4.3.1 Prospecção fitoquímica	52
4.3.2 Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	55
4.4 ATIVIDADE ANTIBACTERIANA	67
4.5 ATIVIDADE ANTIFÚNGICA	73
4.6 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	75
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	78
REFERÊNCIAS.....	79
ANEXO 1.....	88
ANEXO 2.....	89

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A utilização de plantas para fins medicinais é datada desde a antiguidade, estando disseminada entre diferentes povos e culturas. As observações e relatos da população sobre o uso de plantas medicinais foi e continua sendo fundamental para o desenvolvimento de estudos a partir de drogas vegetais, permitindo o progresso na descoberta de compostos naturais farmacologicamente ativos e com potencial terapêutico para ser estudado (COLALTO, 2018).

No Brasil, a biodiversidade vegetal a qual foi proporcionada pela localização tropical, permitiu notório interesse científico no estudo de plantas medicinais. Contudo, somente uma pequena parcela tem sido pesquisada cientificamente quanto ao seu potencial de produção de fármacos. Em 2006 com a criação da Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos as pesquisas com plantas medicinais passaram a receber maiores incentivos, visando garantir o acesso seguro ao uso de plantas medicinais para fins terapêuticos e fortalecer a capacidade de inovação e do desenvolvimento tecnológico no país (BRASIL, 2006), além disso, a Organização mundial da Saúde (OMS) vem reconhecendo internacionalmente o uso da fitoterapia em políticas de saúde pública (OLIVEIRA, ARAUJO, 2007).

Dentre as plantas tropicais com potencial terapêutico, as espécies pertencentes ao gênero *Hymenaea*, constituem um reservatório de compostos químicos com diversas propriedades medicinais, compreende 17 espécies, sendo as mais descritas na literatura: *H. courbaril*, *H. stigonocarpa* Hayne, *H. martiana* Hayne, *H. parvifolia* Huber e *H. verrucosa* Gaertn. Nestas espécies foram descritos diversos compostos bioativos, dentre eles: procianidinas (SASAKI *et al.*, 2009), ácidos graxos (OMAIRA *et al.*, 2011), flavonoides (BEZERRA *et al.*, 2013; DA COSTA *et al.*, 2014), cumarinas (FERNANDES *et al.*, 2015), terpenoides e compostos fenólicos (MONTEIRO *et al.*, 2015).

Entre as propriedades relatadas em literatura para o gênero, são reportadas ação antianêmica (AGRA *et al.*, 2007), antiviral (CECILIO *et al.*, 2012), anti-inflamatória (ORSI *et al.*, 2014), antiemética (MARANHÃO *et al.*, 2013), antidiarreica (ORSI *et al.*, 2014), antimicrobiana (DIMECH *et al.*, 2013; MONTEIRO *et al.*, 2014) e antioxidante (SILVA *et al.*, 2012).

O estudo de novos agentes antimicrobianos a partir de plantas medicinais é de grande importância, pois apesar do advento de antimicrobianos de espectro

estendido, a resistência antimicrobiana faz-se cada vez mais presente, principalmente devido ao uso indiscriminado destes medicamentos. Tal realidade representa um grande desafio, pois limita as opções terapêuticas disponíveis atualmente, levando a uma necessidade de descoberta de novas classes de compostos antimicrobianos (LIMA; BENJAMIN; SANTOS, 2017). Nesse contexto, os produtos de origem natural vigoram como uma alternativa promissora para o tratamento de doenças bacterianas/fúngicas, devido a ampla aceitação de uso na medicina popular, bem como constituírem-se como fonte renováveis e biodisponíveis (BOHATCH JUNIOR *et al.*, 2016).

Outra possível aplicação terapêutica para o gênero *Hymenaea* constitui a capacidade antioxidante apresentada em seus extratos vegetais. Silva e colaboradores (2012) relatam a atividade antioxidante do extrato acetona: água do fruto de *H. stigonocarpa* sob o radical 2,2-difenil-1-pricril-hidrazila (DPPH). Há vasto interesse tecnológico implicado, devido à baixa toxicidade de antioxidantes naturais em relação aos antioxidantes sintéticos, bem como potencial para prevenção e tratamento de doenças como câncer, doenças cardiovasculares crônicas e neurodegenerativas (GIL-CHAVEZ *et al.*, 2013).

Considerando o potencial descrito para espécie do gênero *Hymenaea* observou-se a ausência de registros de estudos até o presente momento, relacionados a espécie *H. eriogyne*, planta nativa do bioma caatinga (LEE; LANGENHEIM, 1975), popularmente conhecida como jatobá, que apresenta possibilidade de descoberta de novos compostos com atividade antimicrobiana e antioxidante, e campo de estudo para elucidação química destes ativos, os quais podem estar presentes em seus diferentes farmacógenos.

OBJETIVOS

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 OBJETIVO GERAL

Realizar a prospecção fitoquímica em extratos e frações a partir de farmacógenos (cascas do caule, folhas e frutos) de *Hymenaea eriogyne* Benth, bem como avaliar as propriedades antimicrobiana e antioxidante dos mesmos.

1.2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Coletar, identificar e caracterizar os farmacógenos de *H. eriogyne*;
- Preparar extratos brutos e frações das cascas do caule, das folhas e dos frutos de *H. eriogyne*;
- Realizar triagem fitoquímica e desenvolver perfil cromatográfico dos extratos brutos e frações de *H. eriogyne* por Cromatografia em Camada Delgada (CCD);
- Desenvolver perfil cromatográfico por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE-DAD) e validar método para quantificação de marcadores em extratos brutos e frações de *H. eriogyne*;
- Avaliar a atividade antimicrobiana dos extratos brutos e frações de *H. eriogyne* frente a cepas da *American Type Culture Collection* e isolados clínicos multirresistentes;
- Avaliar atividade modulatória de frações e antibióticos frente a isolados MDR;
- Quantificar o poder antioxidante dos extratos de frações pelos métodos DPPH e ABTS.

REFERENCIAL TEÓRICO

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 ASPECTOS BOTÂNICOS

2.1.1 Família Fabaceae

Segundo Souza e Lorenzi (2005), as espécies pertencentes à família Fabaceae estão bem representadas na maioria dos ecossistemas naturais brasileiros e apresentam grande importância econômica pois são utilizadas para diversos fins, como por exemplo: forrageiras (*Medicago*, *Melilotus*), madeireiras (*Andira*, *Dalbergia*), medicinais (*Hymenaea*, *Bauhinia*, *Senna*), produtoras de resinas, tintas e bases de vernizes (*Hymenaea*, *Copaifera*), ornamentação (*Bauhinia*, *Caesalpinia*, *Cassia*), entre outros, compondo assim, um grupo numeroso de espécies de importância econômica, ecológica e medicinal (WOJCIECHOWSK; LAVIN; SANDERSON, 2004). As espécies possuem ampla distribuição geográfica sendo encontradas em ambientes bastante diversificados. Depois de Poaceae, a família Fabaceae é a segunda de maior importância econômica, medicinal, alimentícia, ornamental e madeireira (BARROSO, 1991; JOLY, 1998; JUDD *et al.*, 2009).

De acordo com a literatura, a família Fabaceae é a terceira maior família botânica existente e registra 730 gêneros que abrigam 19.325 espécies, (JUDD *et al.*, 2009), sendo no Brasil registrados 222 gêneros, que abrigam 2.845 espécies (Flora do Brasil 2020). Entre elas *Hymenaea* spp. (LEE; LANGENHEIM, 1975; SOUZA; FUNCH; QUEIROZ, 2014).

2.1.2 Gênero *Hymenaea*

O gênero *Hymenaea* é considerado neotropical com 17 espécies distribuídas do centro do México através da América Central e das Índias Ocidentais para todos os países da América do Sul, exceto Uruguai e Chile, sendo 15 dessas encontradas no Brasil (LANGENHEIM; LEE, 1975; SOUZA; FUNCH; QUEIROZ, 2014). As espécies tiveram origem nas florestas equatoriais africanas, e apresentaram excelente adaptação na América do Sul e Central (LANGENHEIM; LEE, 1975).

Ceratia foi a primeira nomenclatura do gênero, descrita por Bauhin em 1623; após duas décadas, Piso (1642) e Marcgraf (1648), descreveram o gênero com o nome de *Jetaíba*. Apenas em 1737, Linnaeus ao se referir ao mesmo gênero, escolheu

o nome *Hymenaea*, em referência ao Deus grego do casamento, Himeneu, fazendo alusão aos dois folíolos pareados das folhas (LANGENHEIM; LEE, 1975). Linnaeus também descreveu a espécie brasileira *H. courbaril*. Muitas outras espécies desse gênero foram descritas por outros botânicos, Hayne, Bentham, Huber, Ducke, Lee e Langenheim. A última revisão sistemática do gênero foi realizada por Lee e Langenheim (1975).

Quanto aos aspectos botânicos, as espécies deste gênero apresentam árvores de troncos retos e cilíndricos, com folhas compostas, bifoliadas, de filotaxia alterna com estípulas e pecíolo livre do lado interno. A floração e a frutificação têm início após oito e doze anos, respectivamente, podendo acontecer anualmente ou não. No Brasil, o tempo de floração ocorre geralmente nos meses de dezembro a fevereiro, com amadurecimento dos frutos entre os meses de agosto e setembro. Suas flores são hermafroditas, diclamídeas e pentámeras, com cálice gamossépalo e corola dialipétala, com 10 estames e um pistilo (BARROSO, 1991). O fruto apresenta-se cilíndrico, unicarpelar com sabor adocicado, aspecto interno farináceo, com elevado teor de fibra alimentar, cálcio e magnésio, sendo por isso muito utilizado na alimentação humana e animal (CARVALHO FILHO *et al.*, 2003).

O gênero *Hymenaea* é caracterizado entre todos os gêneros de leguminosas pelo fruto indeiscente, volumoso, lenhoso, geralmente cilíndrico ou achatado (BARROSO *et al.*, 1991). No Brasil, a espécie com maior incidência e estudos é *H. stigonocarpa* Mart. ex Hayne, que apresenta maior prevalência no Cerrado e, *H. courbaril* Linn. que pode ser encontrada desde a Floresta Amazônica até a floresta estacional semidecidual no sudeste do país (CASTELENN, 2005). Há uma grande plasticidade fenotípica dentro do gênero, algumas espécies desenvolvem menos de 3 metros de altura (*H. stigonocarpa*), enquanto outras desenvolvem mais de 40 metros, como *H. courbaril* var. *altissima* Ducke (LEE; LANGENHEIM, 1975; PESTANA, 2010).

Boniface e colaboradores (2017) recentemente descreveram os aspectos fitoquímicos, uso tradicional e farmacológico do gênero e das espécies mais estudadas até o momento. Oliveira e colaboradores (2018) também realizaram uma revisão do gênero, mostrando sua importância farmacológica e suas peculiaridades, sendo novamente as espécies *H. courbaril*, *H. stigonocarpa* e *H. martiana* as que apresentam maior número de relatos na literatura. Pestana (2010) realizou o estudo taxonômico de *H. courbaril*, *H. martiana* e *H. stigonocarpa* para reavaliação da

nomenclatura das três espécies de maior ocorrência e com maior número de variedades de espécies.

H. courbaril é a espécie que apresenta maior distribuição territorial, estando presente desde o sul do México até o centro-oeste do Brasil, sendo sua maior incidência na Floresta Amazônica e no Cerrado (LEE; LANGENHEIM, 1975). Oliveira e colaboradores (2018) citam a presença da espécie na Caatinga do Nordeste brasileiro. Devido a sua ampla distribuição, é a espécie mais estudada do gênero (PESTANA, 2010), apresentando muitos relatos do uso popular e de estudos científicos sobre sua composição química, e suas diversas atividades biológicas (OLIVEIRA et al., 2018). A espécie é conhecida popularmente como jatobá ou jatobá-do-cerrado, e apresenta relatos na literatura do seu uso para tratar tosse, bronquite, gripe, anemia, gastrite (ALBUQUERQUE, 2007), febre, diarreia, problemas respiratórios (HEINRICH et al., 1992), atividade anti-inflamatória (ARAUJO et al., 2008) antimicrobiana (DIMECH et al., 2013) e antioxidante (BEZERRA et al., 2013).

H. stigonocarpa é outra espécie importante do gênero *Hymenaea*, conhecida como uma árvore indígena, que é conhecida popularmente como jatobá e jatobá-do-campo. Essa espécie é encontrada na Caatinga e Cerrado Brasileiro (LORENZI, 2000). Quanto as propriedades terapêuticas, já foram avaliadas a capacidade anti-inflamatória intestinal do extrato metanólico (ORSI et al., 2014) e atividade antimicrobiana (DIMECH et al., 2013; FERREIRA et al., 2013). Também existem relatos da obtenção da farinha a partir das sementes do fruto, que apresentam alto teor de fibras alimentares e sais minerais que são utilizados pela população carente na preparação de biscoitos e pães (BATISTA et al., 2011).

2.1.3 *Hymenaea eriogyne* Benth.

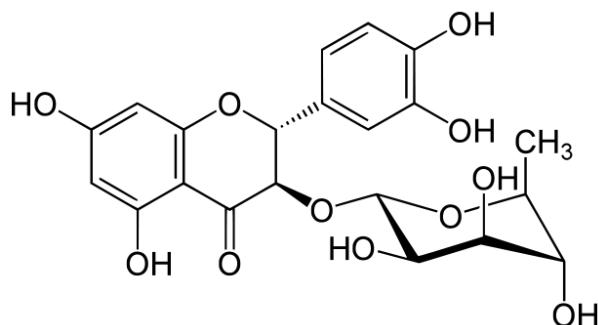
A espécie *H. eriogyne* descrita por Lee e Langenheim (1975) ainda é pouco citada na literatura. Segundo Souza e colaboradores (2016), a espécie está distribuída entre os Estados Bahia, Ceará, Goiás, Minas Gerais, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do Norte e Tocantins, representando uma espécie endêmica do cerrado e caatinga.

2.2 ASPECTOS FITOQUÍMICOS

Bessa e colaboradores (2013) verificaram a presença de flavonoides, taninos hidrolisáveis, taninos condensados, terpenos e esteroides no extrato das cascas de *H. coubaril*. Bezerra *et al.* (2013) também realizou um screening fitoquímico com as cascas de *H. courbaril* que mostrou a presença de flavonoides, saponinas e taninos; nesse mesmo estudo foi isolado o flavonoide denominado astilbina (Figura 1), que está presente na maioria das espécies do gênero, sendo descrita a presença do mesmo flavonoide na fração acetato de etila das cascas de *H. stignocarpa* Mart. (DIMECH *et al.*, 2013) e nas cascas da espécie *H. martiana* (CARNEIRO *et al.*, 1993).

Segundo a literatura, esse metabolito apresenta grande potencial antioxidante e antimicrobiano (SOUZA *et al.*, 2016) e é considerado o marcador do gênero (OLIVEIRA *et al.*, 2018). Em 2016, Vecanto e colaboradores (2016) também realizaram um screening fitoquímico do extrato aquoso das cascas de *H. coubaril* verificando a presença de rutina como o flavonoide majoritário.

Figura 1 - Estrutura química do flavonoide astilbina.



Fonte: Vecanto *et al.*, 2016.

No estudo de Carneiro e colaboradores (1993) foram isolados das cascas de *H. martiana* os flavonoides: eucrifina, engelitina e astilbina, e, a saponina β -sitosterol-3-glicosídeo. Outros trabalhos mostram nas folhas a presença de terpenoides (ABDEL-KADER *et al.*, 2002; MONTEIRO, 2014; MONTEIRO *et al.*, 2015), esteroides (MONTEIRO, 2014), flavonoides, entre eles, astilbina e epicatequina (BEZERRA *et al.*, 2013); já no fruto foi descrito a presença de terpenoides (KHOO; OEHLSCHLAGER, 1973; JAYAPRAKASAM *et al.*, 2007), diterpenos (NOGUEIRA *et al.*, 2001) e cumarinas (FERNANDES *et al.*, 2015).

Quanto ao perfil fitoquímico da espécie *Hymenaea eriogyne*, ainda não existem relatos na literatura para esta espécie. No que diz respeito à principal classe encontrada nos farmacógenos das espécies de *Hymenaea*, os compostos fenólicos ou polifenois merecem destaque, pois são substâncias biologicamente ativas, que compreendem uma classe de metabólitos secundários sintetizados por diversos vegetais e microrganismos (ALI *et al.*, 2018).

2.3 POLIFENOIS

Os polifenois constituem a maior classe de metabolitos encontrados em espécies vegetais, e apresentam grande importância fisiológica nas plantas, como por exemplo na proteção contra patógenos, herbívoros e radiação ultravioleta, além de serem responsáveis por diversas atividades biológicas descritas na literatura (BEHLING *et al.*, 2008).

Esses compostos apresentam uma grande variedade estrutural, que vai desde moléculas simples, quanto complexas, e que apresentam pelo menos um anel aromático substituído por uma hidroxila (GANESAN, XU, 2017). Os polifenois são diferenciados pelo seu esqueleto principal podendo apresentar-se como: fenóis simples, ácidos fenólicos, cumarinas, flavonoides, lignanas, ligninas e taninos (SIMOES *et al.*, 2017)

Para quantificação de polifenois em espécies vegetais é necessário levar em consideração alguns fatores que interferem diretamente na eficiência da extração, como por exemplo: método extrativo, tempo, emprego de temperatura, proporção droga-solvente, solventes (IGNAT *et al.*, 2011). A escolha do método extrativo é fundamental para a obtenção dos compostos de interesse. Sempre é necessário levar em consideração a natureza do material vegetal e a natureza dos compostos de interesse. O uso de técnicas convencionais que utilizam aquecimento para extração de polifenois possuem algumas limitações, devido ao longo período de extração que muitas vezes são requeridos, ocorrendo a degradação dos compostos ativos sensíveis a temperatura, podendo resultar dessa forma em perda de compostos e consequentemente um baixo rendimento. Como alternativa simples e de baixo custo existe o método de turbo extração, que tem sido bastante aplicado para a extração de compostos fenólicos, de maneira eficaz aumentando a área de contato da droga vegetal

com o solvente extrator, liberando os componentes ativos durante o processo de extração (OLIVEIRA *et al.*, 2016).

A escolha do solvente extrator é outra etapa fundamental para extração adequada dos componentes desejáveis da matéria prima vegetal. Ele deve ser o mais seletivo possível e possuir polaridade semelhante da substância, a qual se deseja extrair (SOARES; FARIAS, 2017). Na literatura existem relatos do uso de diversos sistemas de solventes para a extração de compostos fenólicos, dentre eles destacam-se água, acetona, etanol e metanol ou a mistura desses solventes (COELHO, 2014).

2.3.1 Técnicas para detecção de Polifenois em Espécies Vegetais

Uma das técnicas mais utilizadas na rotina para identificação de compostos em espécies vegetais é a Cromatografia em Camada Delgada (CCD). A CCD é amplamente utilizada, devido sua simplicidade, baixo custo e rapidez (AZEREDO *et al.*, 2004). Com o avanço tecnológico, a técnica de CCD foi adaptada e originou a Cromatografia em Camada Delgada de Alta Eficiência (CCD-AE), que se trata de um método automatizado, rápido e capaz de fornecer uma melhor separação e detecção de compostos, o que permite maior eficiência e reproduzibilidade das análises, devido à utilização de placas cromatográficas com sílica de menor tamanho (4-8 µm) e maior uniformidade de distribuição (NICOLLETI, 2011; AGAPOUDA *et al.*, 2017).

Dessa forma, a utilização da técnica para identificação de compostos fenólicos é bastante empregada, principalmente na obtenção de impressões digitais (*fingerprints*) e no desenvolvimento de métodos para a análise de drogas vegetais, sendo fundamental no processo de controle de qualidade (ATTIMARAD *et al.*, 2011).

No que diz respeito a identificação e quantificação de compostos, a técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), tem sido largamente utilizada. Essa ferramenta é útil por sua aplicabilidade universal e notável precisão de ensaio (SNYDER; RITCHIE, 2010). Para otimização do ensaio, acoplamento a detectores ultravioleta (UV), arranjo de fotodiodos (DAD), detectores eletroquímicos (Fluorescência, Espectrofotômetro de Massa ou Ressonância Magnética Nuclear) tem sido bastante difundido. Com isso, tem se tornado possível análise de misturas complexas, como os extratos vegetais (WYREPOKOWSKI *et al.*, 2014).

A utilização dessas ferramentas permite traçar um perfil característico da espécie vegetal a ser estudada, ou seja, verificar quais são as substâncias e/ou classe

de substâncias que pertencem à espécie. A composição qualitativa de materiais vegetais também deve ser avaliada, a partir dos perfis cromatográficos (impressões digitais) obtidos por CLAE e CCD, sendo úteis na autenticação da matéria prima vegetal e seus produtos derivados (DECONINCK *et al.*, 2013).

2.4 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

A resistência antimicrobiana constitui um grave problema de saúde pública mundial. Apesar do grande avanço no desenvolvimento de antimicrobianos de amplo espectro, o uso indiscriminado deste tipo de medicamento tem favorecido o aparecimento de populações bacterianas/fúngicas resistentes, limitando assim as opções terapêuticas (FERREIRA *et al.*, 2013).

O estudo de plantas medicinais constitui uma alternativa para a descoberta de novos antimicrobianos diante do cenário atual. Dessa forma, a avaliação da atividade antimicrobiana de plantas medicinais tem sido ampliada, devido a busca de alternativas para o tratamento de infecções, sobretudo por microrganismos multirresistentes (SOUZA *et al.*, 2017).

A resistência antifúngica é bastante presente principalmente para *Candida* sp. aos derivados azólicos como o fluconazol (CASTRO *et al.*, 2006; GOLAS *et al.*, 2014), sendo relacionada a diversos fatores, tais como: exposição contínua a antifúngicos levando a diminuição da permeabilidade da membrana; infecções por microrganismos com resistência intrínseca; seleção de isolados resistente além da ocorrência de modificações na interação droga e enzima-alvo (CHONG *et al.*, 2007). Outro fato que pode levar ao desenvolvimento de microrganismos resistentes é o uso contínuo de antifúngicos por paciente imunossuprimidos, muitas vezes intravenosos, sendo o fluconazol o de primeira escolha. Porém estudos já mostram que o uso recorrente leva ao surgimento de fungos resistentes a esse medicamento (MARTINEZ *et al.*, 2002; GOLAS *et al.*, 2014).

Além dos derivados azólicos, a Anfotericina B, um potente antifúngico utilizado no tratamento de infecções fúngicas quando os microrganismos são resistentes aos derivados azólicos; porém, apresenta uso restrito devido à sua nefotoxicidade, além de diversos efeitos colaterais, como: distúrbios gastrintestinais, febre, hepatotoxicidade, neurotoxicidade, reações alérgicas entre outras (CASTRO *et al.*, 2006). Para minimizar essa toxicidade, foi desenvolvida a Anfotericina B lipossomal

ou complexada a fosfolipídios como alternativa para as infecções fúngicas graves, porém estudos demostram que esses medicamentos também geram a curto prazo alterações renais (MAURYA *et al.*, 2013). Dessa forma, é necessário a busca por novos agentes com propriedades antifúngicas, para o desenvolvimento de novas opções terapêuticas.

Dentre os metabólitos secundários, os flavonoides estão descritos na literatura por apresentar atividade antimicrobiana frente a bactérias e fungos, devido a sua capacidade de formar ligações de hidrogênio com os ácidos nucleicos dos microrganismos, inibindo dessa forma a síntese de DNA e RNA (KURMA; PANDEY, 2013). Os taninos condensados, derivados de proantocianidinas, possuem a capacidade de inibir enzimas extracelulares e substratos essenciais, e apresentam ação sobre membranas celulares, devido à sua capacidade de complexação de proteínas (FRANÇA *et al.*, 2014).

Diante do exposto, o gênero *Hymenaea* demonstra potencial antimicrobiano a ser explorado em diversos de seus farmacógenos. Entretanto, a ausência de relatos para a espécie *H. eriogyne*, evidencia a importância desse estudo.

Já foram descritos na literatura estudos com extrato das cascas do caule de *H. stigonocarpa* frente a isolados de *Candida* sp., sendo o extrato aquoso o que apresentou melhor resposta (MIC de 125 µg/mL) frente a espécie *C. albicans*. Rahalison e colaboradores (1993) relataram atividade antifúngica sobre *C. albicans* de extratos clorofórmicos das cascas de *H. courbaril*. Também já foram realizados estudos com *H. martiana*, que apresentou atividade frente a fungos dermatófitos (SOUZA, 2008).

2.5 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Os antioxidantes naturais são estudados por apresentar-se como uma alternativa a utilização de substâncias sintéticas como o BHT (butilhidroxitolueno) ou o BHA (butilhidroxianisol), ambos usados como conservantes de alimentos e como modelos para pesquisa de novas drogas para tratamento de doenças que apresentem estresse oxidativo (DEGASPARI; WASZCZYNSKYJ; DOS SANTOS, 2004).

Essa atividade antioxidante que as plantas possuem é devido a presença dos polifenóis que apresentam capacidade de estabilizar radicais livres e espécies reativas de oxigênio, sendo dessa forma considerados agentes oxidantes naturais. Tal

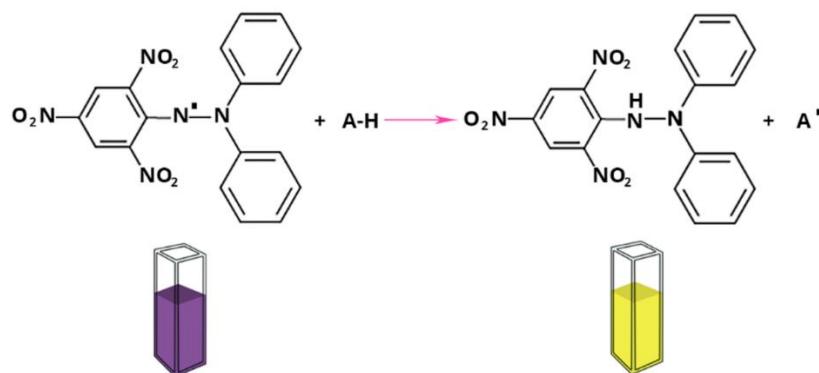
capacidade se dá devido a sua estrutura química que apresenta grupos hidroxilas ligados ao anel (PACKER *et al.*, 1999).

Os polifenois são os principais antioxidantes da dieta e podem contribuir significativamente para a saúde da população que faz uso de produtos naturais em sua rotina diária (VOLP; RENHE; STRINGUETA, 2009). Estudos mostram que a ingestão regular de polifenois contribui significativamente para a prevenção de doenças do sistema cardiovascular, artrite, Alzheimer, entre outras (KRISHNAIAH; SARBATLY; NITHYANANDAM, 2011).

São relatadas na literatura inúmeras metodologias para avaliação da capacidade antioxidant, variando quanto ao tipo de radicais gerados, ao indicador de oxidação escolhido e ao método usado para quantificar e detectar a capacidade antioxidant. Segundo a literatura, o método ideal para quantificação da capacidade antioxidant deve ser um simples, rápido, reproduzível, econômico e que não afete as propriedades físicas do composto (SHIRAHIGUE *et al.*, 2010).

Entre os métodos existentes, o radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) é o mais utilizado devido sua simplicidade e rapidez de resultados. Esse método é utilizado em 90% de estudos de antioxidantes publicados (OLIVEIRA, 2015). O DPPH (Figura 2) tem a capacidade de aceitar um elétron ou um radical hidrogênio para se tornar estável, ao se ligar ao íon hidrogênio, removendo o composto oxidante, observa-se uma diminuição da absorbância, o que permite calcular a quantidade de antioxidante necessária para reduzir o radical DPPH (BROINIZI *et al.*, 2007). O DPPH como radical apresenta coloração roxa, ao reagir com o agente antioxidant perde a coloração, e essa diferença é mensurada no espectrofotômetro.

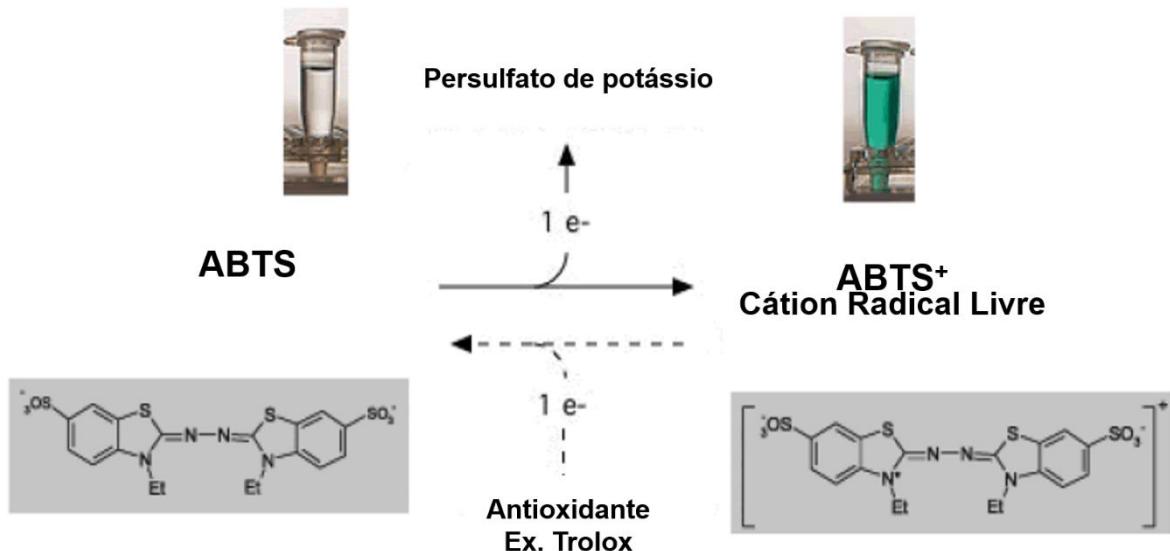
Figura 2 – Reação de oxirredução pelo método DPPH.



Fonte: MOON, SHIBAMOTO, 2009.

Outro método bastante utilizado é o sequestro de radical 2,2'-azino-bis(3-etylbenzotiazolina-6-sulfônico) (ABTS). Esse método baseia-se na inibição do cátion radical ABTS. A formação desse radical ocorre na presença da solução de persulfato de potássio (Figura 3); esse radical apresenta-se na coloração azul, quando neutralizado pelo agente antioxidante, perde a coloração, a reação também é mensurada em espectrofotômetro a 734 nm (SHIRAHIGUE *et al.*, 2010).

Figura 3 - Reação de formação do radical estável ABTS com persulfato de potássio com antioxidante.



Fonte: MOON, SHIBAMOTO, 2009.

Com relação a atividade antioxidante de espécies do gênero *Hymenaea*, já foi avaliado o poder antioxidante das folhas, cascas do caule e sementes da polpa do fruto de *H. courbaril* e observado que o extrato etanólico das sementes foi o que apresentou melhor resultado, com IC₅₀ de 149,4 mg/mL (MELLO-PEIXOTO, 2013). Orsi e colaboradores (2014) relataram que as cascas e polpa dos frutos apresentavam atividade antioxidante graças a presença de flavonoides e taninos condensados de *H. stigonocarpa*.

MATERIAIS E MÉTODOS

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MATERIAL VEGETAL

As cascas do caule, folhas e frutos de *Hymeneae eriogyne* foram coletados em Bezerros – PE (Latitude: 08°14'00"S; Longitude: 35°47'49"W), e identificados no Herbário Dárdano de Andrade Lima do Instituto Agronômico de Pernambuco (IPA) sob nº 91602. O acesso a espécie foi registrado no *Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e Conhecimento Tradicional Associado* (SisGen) com o número A36002A.

Na preparação da matéria-prima vegetal, o material foi seco em estufa (82/480, Lucadema®), onde as folhas permaneceram a 45 °C durante 2 dias e as cascas e frutos por 7 dias. Após secagem, os materiais foram triturados, as cascas e os frutos em forrageira (TRF 400 Super, Trapp®) e as folhas em moinho de facas tipo Willye (TE-680, Tecnal®).

3.2 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS MATERIAIS VEGETAIS

Para o controle de qualidade físico-químico os materiais vegetais foram caracterizados empregando os métodos gerais em Farmacognosia de acordo com a Farmacopeia Brasileira 5^a edição (BRASIL, 2010). Os ensaios realizados foram: determinação de material estranho; perda por dessecção; determinação de cinzas totais; teor de extractivos e análise granulométrica por tamisação.

3.2.1 Determinação de Material Estranho

Para este ensaio, foram pesados cerca de 10 g de cada amostra e espalhada sobre uma superfície plana e realizada a técnica de quarteamento. Os materiais estranhos às amostras foram separados manualmente, com o auxílio de uma lente de aumento. O material separado foi pesado e com base no peso da amostra foi calculada a percentagem de matéria estranha em porcentagem de massa.

3.2.2 Análise Granulométrica por Tamisação

Para este ensaio, foram pesados cerca de 25 g de cada amostra e foram submetidas à passagem através de tamises, previamente tarados, com abertura de malha de 850, 710, 600, 425, 250, 125 μm e a base sem abertura. A tamisação foi realizada a 60 vibrações por segundo durante 15 min em tamisador (Bertel®). Logo após este processo, as frações retidas nos tamises e coletor foram pesadas. Os dados foram analisados através de métodos gráficos, construindo-se um histograma de distribuição e curvas de retenção e passagem para determinação do diâmetro médio das partículas.

3.2.3 Perda por Dessecação por Balança de Infravermelho

Foram pesados aproximadamente 2 g de cada amostra em prato de alumínio na própria balança de infravermelho (Série ID V.18, Marte®). As amostras foram submetidas a uma temperatura de 130 °C até apresentar uma variação menor que 0,02% por 30 segundos.

3.2.4 Cinzas Totais

Foram pesados cerca de 3 g de cada amostra em cadiinhos, previamente incinerados e tarados. Em seguida os cadiinhos foram submetidos ao seguinte gradiente de temperatura: 200 °C ± 25 °C durante 30 minutos, seguido de 400 °C ± 25 °C durante 60 minutos e 600 °C ± 25 °C durante 90 minutos. Após esse período, os cadiinhos contendo a amostra foram retirados da mufla, resfriado em dessecador por 30 min à temperatura ambiente e pesados. Depois, os cadiinhos foram recolocados na mufla à temperatura de 600 °C ± 25 °C por 1h e foram novamente resfriados e pesados. O procedimento foi repetido até atingir peso constante. Os teores de cinzas foram calculados segundo a fórmula abaixo:

$$CT = \frac{C2 - C1}{Ca} \times 100$$

Onde: CT = Teor de Cinzas; C2 = Peso do cadiño com a amostra após incineração; C1= Peso do cadiño vazio; Ca = Peso da amostra antes da incineração.

3.3 OBTENÇÃO DO EXTRATO BRUTO

3.3.1 Avaliação do método extrativo e quantidade de droga

As soluções extractivas foram obtidas utilizando diferentes proporções droga: solvente (5, 10 e 15%; p/v) e três diferentes métodos extractivos (refluxo, turbólise e ultrassom), utilizando para cada extração 100 mL do solvente extrator acetona: água (7:3, v/v).

Para o método Decocção sob Refluxo a extração foi realizada utilizando as quantidades de droga citadas anteriormente, em balão de fundo redondo em contato com o solvente extrator. A solução foi mantida a temperatura de 85 °C, durante 30 minutos em banho-maria (modelo LUCA-150, Lucadema®), em seguida, resfriada até temperatura ambiente. Todo o conteúdo foi transferido para balão volumétrico com capacidade para 100 mL e o volume ajustado com o solvente. A mistura foi mantida em repouso para decantar, em seguida foi filtrada através de papel de filtro.

No método Turbo-extração, a obtenção da solução extractiva foi realizada conforme Ramos et al. (2017) com modificações, onde a droga vegetal e o solvente extrator foram submetidos à extração em liquidificador industrial (LAR2, Metvisa®) por 20 minutos, com intervalos de 5 minutos a cada ciclo extractivo de 1 minuto. Após o término dos ciclos a solução foi filtrada através de papel filtro.

Na extração por Sonda Ultrassônica (Ultronique®), a droga vegetal foi colocada em contato com o 100 mL do solvente extrator por 5 min na potência de 90 W. Após isso, a solução foi filtrada através de papel filtro.

Ao final todas as soluções foram armazenadas em frasco âmbar e acondicionadas sob refrigeração até o momento das análises, que ocorrem no dia seguinte.

3.3.2 Determinação do teor de polifenois totais

A partir das soluções extractivas obtidas, alíquotas foram transferidas para balão volumétrico de 25 mL e diluídas em água destilada (solução estoque – SE). Para reação de quantificação de polifenois por espectrofotometria no UV-Vis, foram transferidos 500 µL da SE para balão volumétrico de 10 mL, adicionados 400 µL de Folin-Ciocalteau, 4 mL de água destilada e, por fim o volume foi ajustado com solução

de carbonato de sódio (NaCO_3) a 10,75% (p/v). As leituras foram realizadas após 20 minutos no modo de varredura para determinar o comprimento de onda de maior absorção. O teor de polifenois totais, expresso em gramas de pirogalol por 1 g de extrato, foi calculado segundo a equação abaixo:

$$TPT = \frac{A1 \cdot m2 \cdot FD}{A3 \cdot (m - p)}$$

Onde: TPT – teor de polifenois totais em g% de pirogalol; A1 – absorbância da amostra; m2 – massa de droga seca (g); FD – fator de diluição; A3 – absorbância específica do padrão; (m – p) – massa da droga considerando a perda por dessecção.

3.3.3 Avaliação da influência do solvente

Após escolha da quantidade de droga e do método extrativo, foi então realizada uma nova etapa para verificar a influência do líquido extrator na extração de polifenois, e, sendo utilizados água, e as misturas acetona: água 1:1 e 7:3 (v/v). As soluções para quantificação do TPT foram preparadas e conforme descrito no item 4.3.2.

Após otimização das soluções extractivas, os extratos otimizados foram filtrados e a evaporação do solvente orgânico foi realizada em evaporador rotatório (RV10 Basic, IKA®) sob pressão reduzida e a temperatura 40 °C. Por fim, os extratos foram congelados (em freezer -80 °C) e liofilizados (Liotorp 101, Liobras®), obtendo-se assim os extratos brutos (EB).

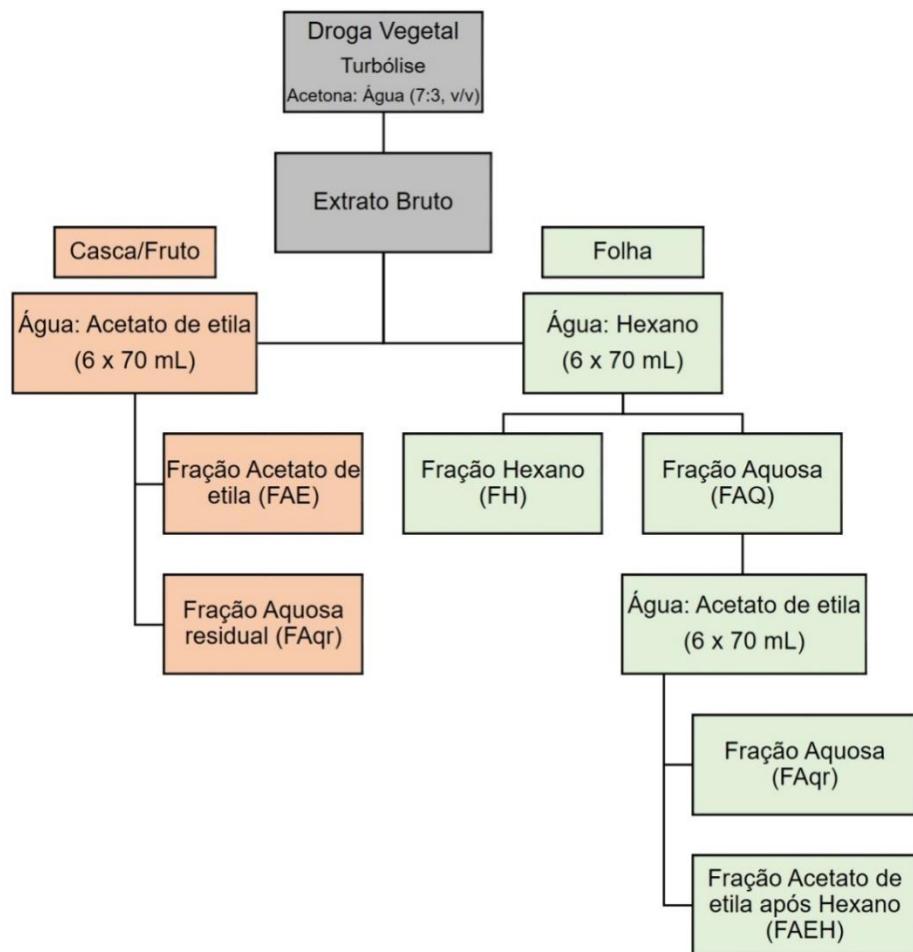
3.4 OBTENÇÃO DAS FRAÇÕES

As frações foram obtidas segundo metodologia de Ramos *et al.* (2017) com modificações. Os extratos brutos liofilizados das cascas (EBC) e fruto (EBFr) foram dispersos em água destilada e particionados 6 vezes com acetato de etila. Após a partição, foram obtidas as frações aquosa residual (FAqr) e acetato de etila (FAE), as quais foram concentradas em evaporador rotatório, congeladas e liofilizadas.

O extrato bruto liofilizado da folha (EBF) foi disperso em água destilada e particionado 6 vezes com hexano para retirada de compostos apolares. Após a

partição, foram obtidas as frações aquosa residual (FAqr) e hexânica (FH), as quais foram concentradas em evaporador rotatório, congeladas e liofilizadas. A FAq foi então particionada com acetato de etila (6 vezes), sendo obtidas as frações aquosa residual (FAqr) e acetato de etila após hexano (FAEH), as quais foram concentradas em evaporador rotatório, congeladas e liofilizadas (Figura 4).

Figura 4 - Esquema de obtenção das frações enriquecidas.



Fonte: Autoria própria.

3.5 TRIAGEM FITOQUÍMICA

3.5.1 Análise por Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

Para a triagem inicial foram preparados extrativos metanólicos das cascas, folhas e frutos por decocção na proporção 1:10 (p/v). Em seguida, foram resfriados e filtrados com auxílio de algodão. Do filtrado, alíquotas de 15 µL foram retiradas e

aplicadas manualmente em placas de sílica gel 60 F₂₅₄ (Macherey-Nage[®]). Os sistemas de eluição, reveladores e padrões utilizados para cada classe de metabólito estão descritos no quadro 1, de acordo com metodologiaa de Wagner e Bladt (1996) com modificações.

Quadro 1 - Sistemas cromatográficos empregados para obtenção do perfil fitoquímico típico da espécie *H. eriogyne*.

Metabólitos	Sistemas de eluição	Reveladores	Padrões
Taninos condensados	AcOEt: HCOOH: H ₂ O (90:5:5)	Vanilina Clorídrica	Catequina
Taninos hidrolisáveis		Cloreto de Alumínio	Ácido gálico
Flavonoides		UV/366 nm	Astilbina/Rutina
Derivados cinâmicos			Ácido cafeico/ Ácido clorogênico
Cumarinas	EtOEt: Tolueno: AcOH10% (50:50:50)	KOH+UV	Cumarina
Saponinas	AcOEt: HCOOH: AcOH: H ₂ O (100:11:11:26)	Lieberman	Escina
Terpenos e esteroides	Tolueno: AcOEt (70:30)	Buchard +Δ	β-sitosterol
Alcaloides	AcOEt: MeOH: H ₂ O (50:6,75:5)	Dragendorff	Nitrato de pilocarpina
Antraquinonas		HNO ₃ + KOH	Senosídeo A

AcOEt = Acetato de etila; HCOOH = Ácido fórmico; H₂O = Água; AcOH = Ácido acético; MeOH = metanol; EtOEt = Éter etílico; UV = ultravioleta; HNO₃ :Ácido nitrico; KOH: Hidroxido de Potássio; Δ: Aquecimento. Fonte: Wagner; Bladt (1996) com modificações.

Considerando os resultados evidenciados na triagem dos extrativos metanólicos por CCD, foram preparadas soluções na concentração de 3 mg/mL em metanol a partir das amostras liofilizadas dos extratos brutos e frações. Destas soluções, foram aplicados 15 µL das amostras e 10 µL dos padrões com o auxílio de um equipamento semi-automático modelo Linomat V (Camag[®]).

Os cromatogramas foram desenvolvidos em placas de sílica gel 60 F₂₅₄ com 0,2 mm de espessura adsorvida em suporte de alumínio (Macherey-Nagel[®]) com dimensões de 20 x 10 cm. A largura das bandas e a distância entre elas foram

padronizadas. Antes de cada processo de separação a cuba cromatográfica Camag® (20 x 10 cm) foi saturada com a respectiva fase móvel. Por fim, os cromatogramas obtidos foram derivatizados e observados nos comprimentos de onda de 254 nm e 366 nm. Os cromatogramas foram digitalizados após a revelação com auxílio de Fotodocumentador (UVP®) com câmera (EOS1100D, Canon®).

3.5.2 Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

As análises cromatográficas dos extratos brutos e frações enriquecidas das cascas, folhas e frutos foram realizadas em cromatógrafo líquido (Ultimate 3000, ThermoScientific®) equipado com detector de arranjo de fotodiodos (DAD-3000 (RS) com bomba binária (HPG3x00RS, Thermo Fisher Scientific®), degaseificador e autoamostrador com loop de 20 µL (ACC 3000, Thermo Fisher Scientific®) e sistema de injeção automático. As análises foram conduzidas pelo programa computacional Chromeleon® 6.0, que também gerencia a aquisição e tratamento dos dados. Foi empregado uma coluna C₁₈ (250 mm x 4,6 mm, 5 µm; Dionex®) equipada com pré-coluna (3,9 µm; Phenomenex®), sob temperatura ambiente ($25 \pm 1^{\circ}\text{C}$), controlada por ar condicionado.

Os padrões e as amostras foram eluídos utilizando fase móvel composta por água e ácido trifluoracético a 0,05% (A) e metanol e ácido trifluoracético a 0,05% (B) sob fluxo de 0,7 mL/min, conforme gradiente: 0-15 min, 30-50% B; 15-21 min, 50-54% B; 21-22 min, 54-58% B; 22-23 min, 58-62% B; 23-25 min 62-68% B; 25-27 min 68-80% B; 27-30 min, 80-30% B, sendo ambas as fases degaseificadas em banho de ultrassom (Ultracleaner 1600A, Unique®). As amostras e padrões foram filtrados em membranas com porosidade de 0,45 µm (Chromafil®) e injetados 20 µL em triplicata. Os comprimentos de onda de 254 nm, 290 nm and 350 nm foram usados para detecção, de acordo com o máximo de absorção mensurado pelo detector.

3.6 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

3.6.1 Microrganismos

Para avaliação da atividade antibacteriana foram utilizadas cepa padrão da *American Type Culture Collection* (ATCC) e isolados clínicos disponibilizados pelo Hospital Militar do Recife (HMR), que posteriormente foram depositados na coleção do Laboratório de Farmacognosia da UFPE. Para atividade antifúngica, foram utilizadas leveduras da Coleção de Culturas do Departamento de Micologia da UFPE. A pesquisa foi aprovada no comitê de ética da Universidade Federal de Pernambuco (CAAE:99918018.6.0000.5208). Os microrganismos utilizadas estão descritas no quadro 2, sua identificação bioquímica e o fenótipo de resistência foram concedidos pelos fornecedores, através de identificação bioquímica automatizada para as bactérias (Phoenix 100, Becton Dickinson®).

Foram utilizados os seguintes antimicrobianos: ampicilina, gentamicina, azitromicina, ciprofloxacino para as bactérias; e, fluconazol, para as leveduras. O critério de resistência para os antibióticos foi definido conforme o *Clinical Laboratory and Standards Institute* (CLSI, 2008; CLSI, 2012). Foram preparadas soluções estoque dos fármacos com concentrações iguais a 2 mg/mL. Para as amostras dos EBs e frações, foram preparadas soluções de igual concentração, porém utilizando-se dimetilsulfóxido (DMSO) a 10% como agente solubilizante, esterilizando-as por filtração em membrana Millipore® com porosidade de 0,22 µm.

Quadro 2 – Microrganismos, origem e perfis de susceptibilidade.

Espécies	Identificação	Origem	Sensibilidade	Resistência
<i>Staphylococcus aureus</i>	25293	ATCC	Controle	Controle
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	SE073HC	Sangue	DAP; LIN; OXA; TET; VAN	AMP; CLIN; ERI; PTZ
<i>Streptococcus agalactiae</i>	SA059CV	Secreção vaginal	OXA; VAN	--
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	PA173SN	Cavidade nasal	AMI; CEFT; CIP; GEN; IMI; MER; PTZ	--
<i>P. aeruginosa</i> MDR	PA169AT	Secreção Traqueal	IMI; MER	AMI; CEFT; CIP; GEN; PTZ
<i>P. aeruginosa</i> MDR	PA001UC	Urina	IMI; GEN; MER	AMI; CEFT; CIP; PTZ
<i>Klebsiella pneumoniae</i> KPC	KP180PC	Ponta de Cateter	AMI; MER	AMP; CEFT; CFT; CIP; ERT; GEN; PTZ
<i>K. pneumoniae</i> KPC	KP098UC	Urina	AMI; MER; TIG	AMP; CEFT; CFT; CIP; ERT; GEN; PTZ
<i>K. pneumoniae</i> KPC	KP180UC	Urina	AMI; IMI; MER; TIG	AMP; CEFT; CFT; CIP; ERT; GEN; PTZ
<i>Serratia marcescens</i>	SM172AT	Secreção Traqueal	GEN; IMI; MER	AMI; AMP; CFT; CIP; PTZ
<i>Escherichia coli</i>	EC001UC	Urina	AMI; CFT; ERT; GEN; IMI; MER; PTZ	CIP; SZT
<i>E. coli</i> ESBL	EC044UC	Urina	AMI; CFT; ERT; GEN; IMI; MER; PTZ	AMP; CIP; SZT

<i>Enterobacter aerogenes</i>	EA062UC	Urina	AMI; CFT; GEN; IMI; MER; PTZA	AMP; CIP; STZ
<i>Candida albicans</i>	URM 5901	Escamas Ungueais	FLU; ANF	--
<i>C. krusei</i>	URM 6391	Sangue	FLU; ANF	--
<i>C. tropicalis</i>	URM 6551	Cavidade Oral	FLU; ANF	--
<i>C. parapsilosis</i>	URM 6951	--	FLU; ANF	--
<i>C. glabrata</i>	URM 4246	Sangue	ANF	FLU

AMI: Amicacina; AMP: Ampicilina; ANF: Anfotericina B; CFT: Ceftazidima; CFT: Ceftriaxona; CIPRO: Ciprofloxacino; CLIN: Clindamicina; DAP: Daptomicina; ERI: Eritromicina; ERT: Ertapenem; FLU: Fluconazol; GEN: Gentamicina; IMI: Imipenem; LIN: Linezolida; MER: Meropenem; OXA: Oxacilina; PTZ: Piperaciclina/Tazobactam; TET: Tetraciclina; TIG: Tigeciclina; SZT: Sulfametoxazol/Trimetoprina; VAN: Vancomicina. MDR: multidroga resistente; ESBL: produtor de espectro extendido de β-lactamase (ESBL); KPC: produtor de carbapenemase (KPC); ATCC: American Type Culture Collection.

Fonte: Autoria própria.

3.6.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e da Concentração Bactericida/Fungicida Mínima (CBM/CFM)

As bactérias foram manipuladas sob condições experimentais estéreis e cultivadas em ágar Mueller Hinton (MH) (Merck®, Darmstadt, Alemanha) por 24h a 37 °C. Os inóculos foram calibrados por suspensão de colônias em solução salina (0,9% (v/v)) estéril, ajustando-se turbidimetricamente a 0,5 na escala de McFarland em espectrofotômetro (AJX-1900 Micronal®) a 600 nm. Desta suspensão, novas diluições foram realizadas: a primeira de 1:50 em solução salina estéril e a segunda de 1:20 no meio de cultura líquido, a fim de calibrar o inóculo em 10^5 UFC/ mL.

As leveduras foram manipuladas sob condições experimentais estéreis e cultivadas em ágar Sabouraud por 48 h a 35 °C. Os inóculos foram calibrados por suspensão de colônias em solução salina a 0,9% (v/v), ajustando-se turbidimetricamente a 0,5 na escala de McFarland em espectrofotômetro (AJX-1900 Micronal®) a 530 nm. Desta suspensão, novas diluições foram realizadas a fim de calibrar o inóculo em 10^3 UFC/ mL (FERREIRA *et al.*, 2013).

Os ensaios foram realizados em microplaca de 96 poços, onde foi adicionado 100 µL do inóculo diluído em todos os poços da linha A. Posteriormente foram adicionados 100 µL das soluções testes (Extratos Brutos e Frações) na concentração de 2 mg/mL. Foram realizadas diluições seriadas da linha A à linha H, a fim de se obter extratos brutos e frações com concentrações variando de 1000 a 7,8 µg/mL. O meio de cultura contendo inóculo diluído em DMSO (10%) e soluções aquosas (2 mg/mL) de azitromicina, ampicilina, ciprofloxacino, gentamicina (bactérias) e fluconazol (leveduras), foram utilizados como controle de esterilidade, controle negativo e padrões respectivamente. As placas foram incubadas durante 24h a 37 °C (bactérias)/48h a 35 °C (leveduras), e posteriormente observadas quanto a presença ou ausência de crescimento.

A CIM foi considerada a menor concentração dos extratos e frações capazes de reduzir visivelmente o crescimento bacteriano em 100%, comparando com o controle positivo. Para avaliar a atividade dos extratos e frações foi considerado a classificação de Alijannis e colaboradores (2001) que atribui uma atividade forte para valores de CIM até 500 µg/mL; atividade moderada para valores de CIM entre 600 e 1500 µg/mL; e, atividade fraca para valores de CIM acima de 1500 µg/mL.

Para a determinação da CBM/CFM, alíquotas de 5 µL de cada poço da CIM foram transferidas para placas de Petri contendo ágar MH para Bactérias e ágar Sabouraud para fungos. As placas foram incubadas a 37 °C durante 24 h (bactérias) e 35 °C durante 48 h (Fungos). A CBM correspondeu à menor concentração dos extratos brutos e frações capazes de inibir o crescimento visível do inóculo (FERREIRA *et al.*, 2013).

3.6.3 Avaliação da Interferência de Frações Enriquecidas na Resistência a Antibióticos Sintéticos

A avaliação da atividade modulatória foi realizada conforme metodologia adaptada de Coutinho e colaboradores (2010). Foram utilizadas as frações acetato de etila das cascas e folhas em concentrações sub-inibitórias. As bactérias são consideradas resistentes aos antibióticos testados e suscetíveis as frações acetato de etila foram selecionadas. Foram utilizadas microplacas de 96 poços, e as soluções das frações acetato de etila (2 mg/mL) preparadas em DMSO (10%) e soluções aquosas (2 mg/mL) dos antibióticos: azitromicina, ampicilina, ciprofloxacino e gentamicina.

Os valores de CIM utilizados neste experimento foram estabelecidos pelos resultados obtidos no protocolo anterior. Para a análise, o inóculo calibrado (0,5 McFarland) foi diluído em caldo Muller-Hinton (Merck®, Darmstadt, Alemanha) até a concentração final de 10^5 UFC/mL por poço. Em eppendorf foi adicionado 1,5 mL do inóculo diluído e um volume correspondente a 1/4 da CIM de cada fração foram adicionados, a fim de atingir 1/8 da CIM das frações acetato de etila por poço. Um volume de 100 µL desta mistura foi adicionado horizontalmente aos poços. No poço 1 foram adicionados 100 µL da solução do antibiótico a ser testada, e posteriormente foram realizadas diluições seriadas até o 12º poço, a fim de se obter concentrações variando de 1000 a 0,5 µg/mL. Utilizou-se o meio de cultura e o inóculo em DMSO (10%) como controle de esterilidade e controle negativo, respectivamente. As placas foram incubadas a 37 °C por 24h e solução aquosa de resazurina a 0,02% (20 µL) foi adicionada a cada poço, incubando por 3 horas a 35 °C para verificar a presença ou ausência de crescimento. O efeito modulador foi interpretado como antagônico, sinérgico ou inerte.

3.7 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

3.7.1 DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil)

O estudo foi realização para verificar a capacidade antioxidante dos extratos brutos e frações enriquecidas frente ao radical livre DPPH conforme metodologia descrita por Mensor *et al.* (2001) com adaptações. As soluções foram preparadas em etanol e armazenadas em frascos âmbar; como padrão foi utilizado foi o BHT (hidroxitolueno butilado) para confecção da curva de calibração.

O radical DPPH e as soluções estoques dos extratos brutos e frações foram preparadas a uma concentração de 0,03 mM e 1 mg/mL, respectivamente, sendo agitadas em vórtex por 60 segundos e preparadas no dia da análise conforme metodologia. Para o teste foram utilizadas concentrações na faixa de 10 a 250 µg/mL. Para cada concentração avaliada, foi utilizado o controle negativo apresentando apenas o DPPH, o controle positivo (BHT) e um branco (amostra sem DPPH).

Em tubo âmbar foram adicionados 500 µL de solução de teste e 200 µL de DPPH 0,03 mM nas amostras com os extratos e no controle positivo. Após 30 minutos, as amostras foram lidas em espectrofotômetro no comprimento de onda de 517 nm em espectrofotômetro (AJX-1900, Micronal®). A capacidade de remoção do radical DPPH foi calculada pela seguinte equação:

$$\text{AA (\%)} = 100 - (\text{AH} \times 100)/\text{CA}$$

Onde: AA: Atividade antioxidante; AH: Absorbância para extratos/frações; CA: Absorbância do Controle (BHT).

A atividade sequestradora dos extratos foi determinada pelo IC₅₀ valor. Onde o valor de IC₅₀ é a concentração de extratos nos quais o DPPH os radicais são eliminados em 50%. O menor valor de IC₅₀ indica maior capacidade de eliminação de radicais. Para o cálculo da IC 50%, foi utilizada a equação da reta, onde foi substituído o valor de y por 50.

3.7.2 ABTS (Ácido 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)

Os testes foram realizados conforme metodologia descrita por Van Den Berg e colaboradores (1999). Inicialmente todas as soluções foram preparadas em etanol e acondicionadas em frascos âmbar. Para a solução contendo o radical ABTS^{•+} foi necessário ausência de luz devido ao poder redutor do radical. Foram adicionados 5 mL de ABTS[•] na concentração 7 mM com 88 µL de persulfato de potássio 140 mM. A solução foi armazenada no escuro e à temperatura ambiente por 16 horas. Posteriormente, a solução foi diluída até absorbância de 0,70 ± 0,05 a 734 nm (espectrofotômetro AJX-1900, Micronal®).

Foi construída uma curva padrão de Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico (Acros Organics®, EUA) em concentrações variando de 0,1 a 2 mM, e para os extratos brutos e frações foram utilizadas as soluções nas concentrações de 100; 250; 500 e 1000 µg/mL. Para a reação foram pipetados 30 µL de cada solução e 3 mL da solução de ABTS^{•+}, a homogeneização foi realizada em vórtex por 30 segundos. Após 6 minutos de reação as absorbâncias foram mensuradas em espectrofotômetro a 734 nm (AJX-1900, Micronal®). Os resultados foram expressos como a Capacidade Antioxidante em Equivalentes Trolox, que equivale a µmol de Trolox por grama de extrato.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

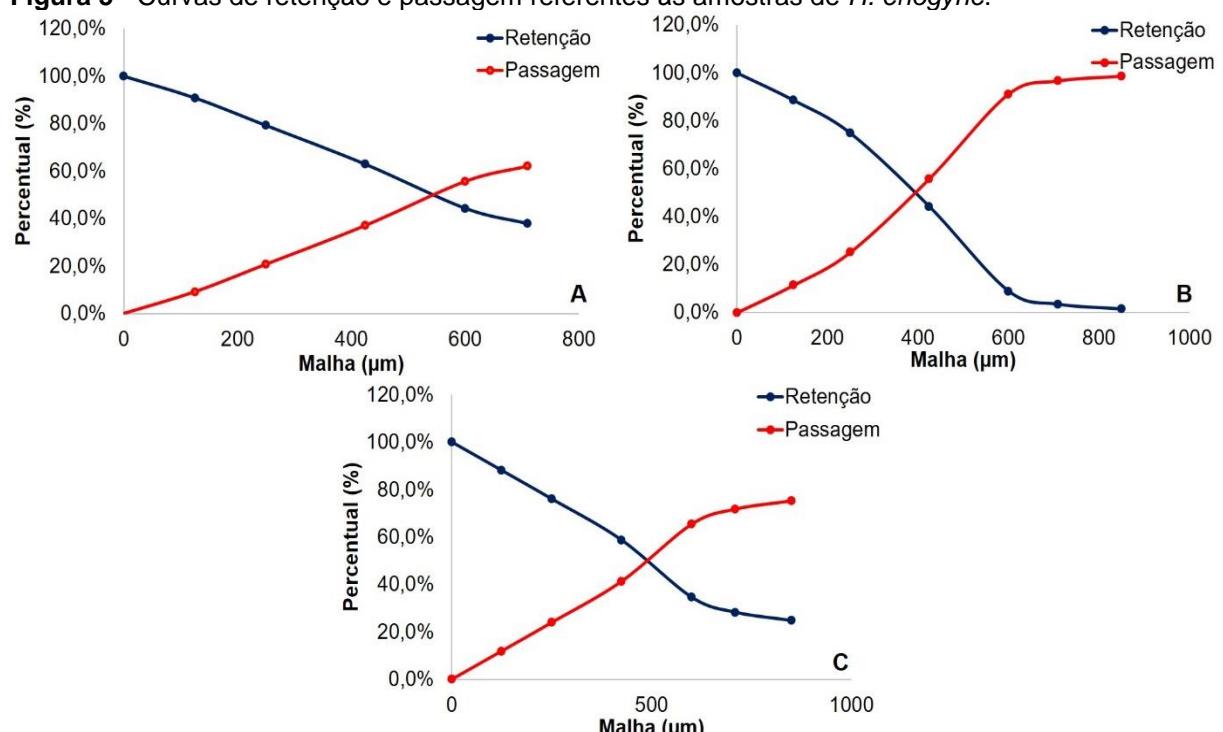
4.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA

4.1.1 Análise Granulométrica

A Trituração consiste em uma operação que visa reduzir e uniformizar mecanicamente o tamanho das partículas, facilitando dessa forma o armazenamento e contribuindo para o aumento da eficiência da extração dos componentes presentes na matéria prima vegetal, decorrente da maior superfície de contato entre o material vegetal e o líquido extrator, além de contribuir para a reproduzibilidade da operação de extração (MIGLIATO *et al.*, 2007).

Os resultados obtidos pela análise dos histogramas de distribuição granulométrica da casca do caule, folha e fruto de *H. eriogyne* demonstram que as partículas referentes a casca se distribuíram predominantemente no tamis de 710 µm, representando $37,79\% \pm 2,15$ de todo o material; e, para as folhas e frutos, as partículas predominam no tamis de 425 µm representando $35,31\% \pm 1,5$ e $24,04\% \pm 2,3$, respectivamente, de todo material (Figura 5).

Figura 5 - Curvas de retenção e passagem referentes às amostras de *H. eriogyne*.

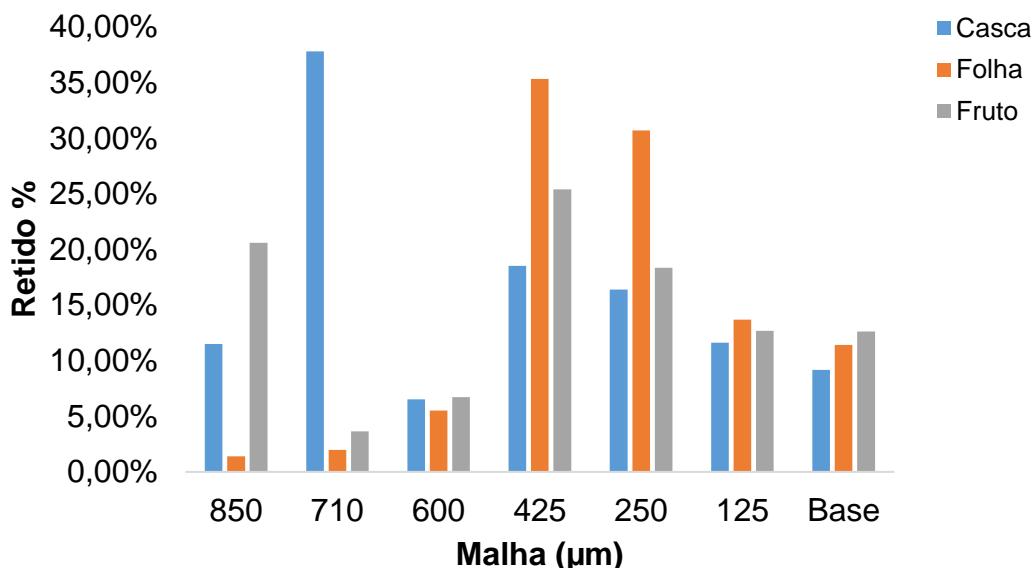


A: Casca; B: Folha; C: Fruto.

Fonte: Autoria própria.

Após moagem, o pó da casca foi considerado grosso; e, os pós da folha e fruto como moderadamente grosso, segundo a classificação da Farmacopeia Brasileira (2010). Essa diferença de tamanho de partículas observada para cada farmacógeno se dá devido as peculiaridades da matéria-prima e consequentemente do equipamento utilizado para realizar a trituração. A granulometria pode ser observada no histograma de distribuição da Figura 6.

Figura 6 - Histograma de distribuição granulométrica dos farmacógenos de *H. eriogyne*.



Fonte: Autoria própria.

4.1.2 Matéria Estranha

A análise de matéria estranha tem como objetivo verificar que as amostras utilizadas estão isentas de materiais estranho (fungos, mofo, inseto, ou partes, impurezas de origem mineral, outras partes do vegetal e outros materiais contaminantes). Além disso, também é observado aspecto ou odor anormal, descoramento ou qualquer indício de deterioração. O limite de material estranho é de 10% em regra geral, a menos que esteja especificado em monografia (BRASIL, 2010). Como podemos ver na tabela 1, as drogas vegetais utilizadas apresentam baixo teor de matéria estranha, mostrando que a matéria-prima vegetal foi obtida, manipulada e armazenada de forma correta, e dessa forma, adequando-se aos parâmetros estabelecidos para garantir a qualidade do material vegetal (BRASIL, 2014).

Tabela 1 - Teor de matéria estranha presentes nos farmacógenos de *H. eriogyne*.

Farmacógeno	Média ± DP (DPR%)
Cascas	0,0020 ± 0,0006 (2,8%)
Folhas	0,0040 ± 0,0001 (2,4%)
Frutos	0,0112 ± 0,0001 (1,5%)

DP: Desvio Padrão; DPR: Desvio Padrão Relativo

Fonte: Autoria própria.

4.1.3 Determinação de Umidade

A determinação do percentual de umidade da planta foi realizada utilizando balança de infravermelho. Essa metodologia foi escolhida por se tratar de uma técnica simples, e capaz de determinar os teores de umidade das amostras com rapidez, precisão e reproduzibilidade (GONÇALVES *et al.*, 2014).

A determinação deste parâmetro associada ao controle da operação de secagem previamente realizado, é essencial na padronização da matéria prima vegetal, uma vez que o excesso de água nesta matriz favorece a proliferação de microrganismos, reações de hidrólise e atividade enzimática, alterando desse modo os seus constituintes químicos (SOARES; FARIAS, 2017).

A Farmacopeia Brasileira (2010) preconiza um limite de umidade residual em drogas vegetais de 8 a 14%. Todas as amostras analisadas não ultrapassam esse limite, apresentando estabilidade microbiológica (Tabela 2). Além disso, todos os desvios padrões relativos se mostraram inferiores a 5%, demonstrando assim que o ensaio foi realizado com precisão. Dos três farmacógenos estudados as folhas foram as que apresentaram um maior teor de umidade, esse resultado pode ser devido ao método utilizado quantificar não apenas a perda de água, mas também dos demais constituintes volatilizados juntamente com a água (BORGES *et al.*, 2005).

Tabela 2 - Teores de umidade das amostras de *H. eriogyne*.

Farmacógeno	Média ± DP (DPR%)
Cascas	6,6 ± 0,0793 (1,20%)
Folhas	8,4 ± 0,0404 (0,50%)
Frutos	7,8 ± 0,1078 (1,60%)

DP: Desvio Padrão; DPR: Desvio Padrão Relativo

Fonte: Autoria própria.

4.1.4 Cinzas Totais

A determinação de cinzas totais permite verificar impurezas inorgânicas não voláteis obtidas por incineração, as quais podem estar presentes na própria espécie vegetal (cinzas fisiológicas) ou serem de origem terrosa (cinzas não fisiológicas) (BRASIL, 2010; SOARES; FARIAS, 2017). Em diversas monografias, a Farmacopeia Brasileira preconiza um limite de 14% de cinzas totais. E caso o limite exceda a 8% é necessário realizar a determinação de cinzas insolúveis em ácido, a fim de quantificar os materiais silicosos presentes na droga vegetal.

Neste ensaio, todas as amostras apresentaram teores de cinzas inferiores a 14%, o que representa quantidade adequada de material inorgânico nas matérias primas analisadas, indicando que elas não possuem excesso de terra e/ou areia. De acordo com os valores de cinzas totais obtidos, não houve a necessidade de realizar a determinação de cinzas insolúveis em ácido, uma vez que os teores não ultrapassaram o limite preconizado de 8% (Tabela 3).

Tabela 3 - Teores de cinzas totais das amostras de *H. eriogyne*.

Farmacógeno	Média ± DP (DPR%)
Cascas	2,17 ± 0,0435 (1,54%)
Folhas	3,70 ± 0,8008 (2,56%)
Frutos	2,89 ± 0,0817 (2,48%)

DP: Desvio Padrão; DPR: Desvio Padrão Relativo

Fonte: Autoria própria.

4.2 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS BRUTOS E FRAÇÕES ENRIQUECIDAS

A escolha do método extrativo é uma etapa importante que deve levar em consideração vários fatores, como por exemplo a natureza do material vegetal, as substâncias de interesse, a aplicabilidade na indústria e o baixo consumo de energia. O uso de técnicas convencionais que utilizam o aquecimento para extração de polifenóis possuem algumas limitações, devido ao longo período de análise que muitas vezes são requeridos, levando à degradação de compostos ativos termossensíveis, podendo resultar em baixo rendimento da extração (PEREZ-JIMENEZ *et al.*, 2008).

Estudos preliminares foram realizados para verificar a influência da quantidade de droga e método na extração de polifenois das cascas, folhas e frutos de *H. eriogyne*. Foram avaliados 5, 10 e 15 g de droga vegetal; e, a extração foi realizada por turboextração, refluxo e sonda ultrassônica. Todos os extratos foram obtidos utilizando a mistura acetona: água (7:3) como solvente para maior extração de flavonoides e compostos fenólicos (COELHO, 2014).

De acordo com os resultados obtidos, foi possível evidenciar que melhores respostas no teor de polifenois foram obtidas com 10 g de droga vegetal e com o método de turboextração para os três farmacógenos. Os teores calculados encontram-se dispostos na tabela 4.

Tabela 4 – Teor de polifenois totais (TPT) calculado em g% de pirogalol em diferentes quantidades de droga e métodos de extração para os três farmacógenos de *H. eriogyne*.

Farmacógeno	Quantidade de droga (g)	Método		
		Refluxo	Ultrassom	Turbólise
Casca	5	8,63 (0,69)	8,15 (0,44)	10,89 (0,55)
	10	9,67 (0,53)	9,25 (2,74)	11,15 (0,12)
	15	8,43 (1,14)	8,77 (1,87)	11,33 (2,77)
Folha	5	9,00 (0,61)	7,39 (0,85)	9,02 (3,16)
	10	9,64 (1,86)	7,80 (0,50)	10,57 (3,76)
	15	9,30 (0,53)	8,03 (2,52)	9,42 (1,13)
Fruto	5	1,12 (0,89)	1,09 (1,78)	1,97 (0,89)
	10	1,86 (0,25)	1,75 (0,99)	2,91 (1,76)
	15	1,87 (1,23)	1,77 (1,12)	2,89 (0,55)

Os dados foram expressos como média (desvio padrão relativo), em g por 100 g de droga.

Fonte: Autoria própria.

Com a quantidade de droga e métodos determinados, foi então realizada uma nova etapa para verificar a influência do líquido extrator na obtenção dos polifenois, e, os solventes utilizados foram água, e as misturas acetona: água 1:1 e 7:3 (v/v) (Tabela 5).

Tabela 5 – Teor de polifenois totais (TPT) calculado em g% de pirogalol utilizando diferentes solventes na extração para os três farmacógenos de *H. eriogyne*.

Solvente	Casca	Folha	Fruto
Água	6,56 (3,80)	3,18 (4,30)	0,63 (7,82)
Acetona: água (1:1)	10,19 (1,78)	7,95 (1,41)	1,87 (5,52)
Acetona: água (7:3)	11,38 (0,22)	10,41 (1,13)	2,93 (0,81)

Os dados foram expressos como média (desvio padrão relativo), em g por 100 g de droga.

Fonte: Autoria própria.

O método de turboextração (turbólise) foi o que apresentou melhor eficiência na extração dos polifenois, somado a simplicidade de execução, baixo custo, leva ao quase esgotamento total da droga e não tem emprego de temperatura (OLIVEIRA et al., 2016). Já o método ultrassom pode gerar a degradação e modificação de compostos, devido a pressão exercida pelo equipamento (CHAVES et al., 2012); e, a extração sob refluxo utiliza calor, o que pode ter contribuído para degradação de composto termolábeis, dessa forma, esses métodos foram menos eficientes quando comparados à turbólise.

A escolha dos solventes é outra etapa fundamental, pois a polaridade vai influenciar diretamente na extração da classe de compostos de interesse (TIWARI et al., 2011). Dessa forma, a utilização da mistura acetona: água como solvente extrator foi baseada na grande interação que o líquido apresenta com os compostos fenólicos, e dessa forma, acarretando maior capacidade extrativa, quando associada à turbólise (OLIVEIRA et al., 2016).

Após determinação das melhores condições de obtenção do extrato bruto que foram: 10 g de droga vegetal, método turbólise e solvente extrator acetona: água (7:3); estes foram submetidos a partições utilizando solventes de diferentes propriedades para melhor separação dos metabólitos secundários e obtenção de frações enriquecidas (RAMOS et al., 2017). Com o rendimento dos extratos e frações calculados, foi possível observar que o rendimento dos produtos obtidos a partir da folha foi maior, quando comparado aos farmacógenos de casca e fruto. Quanto às frações, foi observado um bom rendimento da fração acetato de etila da casca (Tabela 6).

Tabela 6 - Rendimento dos Extratos Brutos e Frações de *H. eriogyne*.

Farmacógeno	EB (7:3)	FAE/FAEH	FAqr	FH
Casca	17,56%	22,37%	56,55%	--
Folha	24,89%	8,28%	68,28%	29,80%
Fruto	9,06%	2,10%	39,54%	--

EB: Extrato bruto; FAE/FAEH: Fração acetato de etila/Fração acetato de etila após hexano; FAqr: Fração aquosa residual; FH: Fração hexano. Fonte: Autoria própria.

4.3 CARACTERIZAÇÃO DOS EXTRATIVOS METANÓLICOS, EXTRATOS BRUTOS E FRAÇÕES

4.3.1 Prospecção fitoquímica

A cromatografia em camada delgada foi utilizada nessa etapa devido as suas vantagens, tais como: técnica simples, rápida e que proporciona uma visão geral dos constituintes de uma amostra vegetal. Dessa forma, foi possível observar pela análise de CCD a presença de diversos grupos de metabólitos secundários presentes nos extrativos metanólicos dos três farmacógenos da espécie estudada.

Na prospecção fitoquímica dos extrativos metanólicos (1:10, p/v) da casca, folhas e frutos, foi possível observar a presença de polifenois, com destaque para os flavonoides presentes nos três farmacógenos; e, taninos condensados presentes na casca e folha. Também foi observado, porém em menor quantidade, bandas referentes a terpenos, esteroides e saponinas em todas as amostras (Tabela 7).

Tabela 7 - Prospecção fitoquímica dos extratos metanólicos da casca, folha e fruto de *H. eriogyne*.

Classe de metabólito	Casca	Folha	Fruto
Alcaloides	-	-	-
Antraquinonas	-	-	-
Cumarinas	-	+	-
Derivados cinâmicos	+	-	+
Flavonoides	+++	+++	+
Taninos Hidrolisáveis	-	-	-
Taninos Condensados	+++	++	-
Terpenos e Esteroides	+	++	+
Saponinas	+	+	+

(+/++/+++): intensidade relativa da classe de metabólitos; (-): ausência. Fonte: Autoria própria.

Estudos referentes a outras espécies do gênero *Hymenaea* descrevem a presença de várias classes de metabólitos. Bezerra e colaboradores (2013) descreveram em seu estudo a presença de polifenois no extrato etanólico da casca de *H. coubaril*, destacando a presença dos flavonoides como compostos majoritários. Também foram descritos para a espécie *H. stigonocarpa* a presença de polifenois, terpenos e esteroides no extrato etanólico das folhas (MONTEIRO *et al.*, 2015) e no fruto foi descrito a presença de polifenois, entre eles cumarinas (FERNANDES *et al.*, 2015). Para *H. eriogyne* ainda não se tem descrito na literatura um perfil fitoquímico para comparação, sendo esse trabalho o primeiro a descrever as classes de metabólitos encontradas para a espécie.

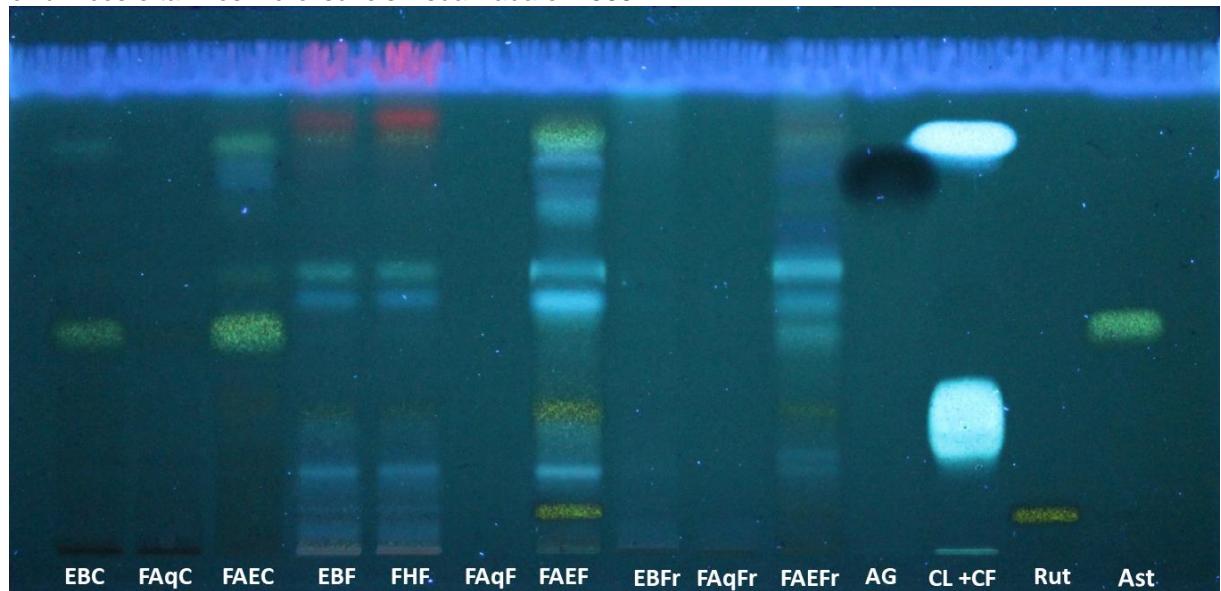
Tendo o presente trabalho como foco os polifenois (flavonoides) pelas suas atividades antimicrobiana e antioxidante descritas na literatura (OLIVEIRA, 2015), foram realizadas as análises dos polifenois dos extratos acetona: água (7:3) e frações das cascas, folhas e frutos.

Na figura 7 está apresentada a cromatoplaca desenvolvida e revelada para observação de flavonoides, derivados cinâmicos e taninos hidrolisáveis. De acordo com a coloração, foi possível detectar bandas características da presença de flavonoides, cujas fluorescências de colorações amarela e amarelo-esverdeado, são típicos para estes compostos derivatizados com cloreto de alumínio (AlCl_3). Esse fenômeno acontece devido a complexação das hidroxilas vicinais com o cátion Al^{3+} , que produz fluorescência quando observado na luz UV (MARQUES *et al.*, 2013).

Merece destaque o extrato bruto da casca e sua fração acetato de etila, em que foi possível evidenciar a presença de bandas de mesma coloração (amarelada) e R_f (0,45) semelhante a astilbina, um flavonoide característico do gênero *Hymenaea*, descrito por Bezerra *et al.* (2013) no extrato etanólico das cascas de *H. coubaril*.

Também é possível observar que nenhum dos extratos/frações de *H. eriogyne* apresentaram bandas características de taninos hidrolisáveis, quando comparamos com a banda do padrão ácido gálico, que apresenta coloração escura.

Figura 7 - Cromatoplaca obtida por aplicação semi-automatizada para flavonoides, derivados cinâmicos e taninos hidrolisáveis visualizada em 366 nm.

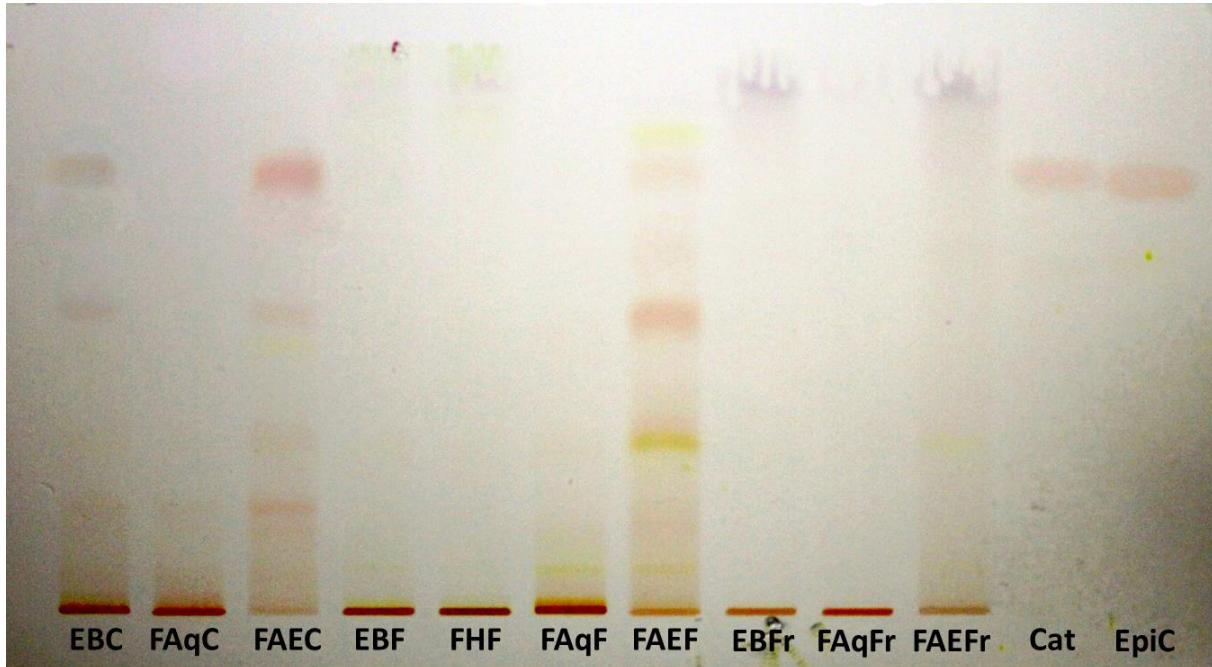


EBC: Extrato Bruto da Casca do caule; FAqC: Fração Aquosa da Casca do caule; FAEC: Fração Acetato de etila da Casca do caule; EBF: Extrato Bruto da Folha; FAqF: Fração Aquosa da Folha; FAEF: Fração Acetato de etila da Folha; FHF: Fração Hexano da Folha; EBFr: Extrato Bruto do Fruto, FAqFr: Fração Aquosa do Fruto; FAEFr: Fração Acetato de etila do Fruto; AG: Ácido Gálico; CL + CF: Ácido Clorogênico + Ácido cafeico; Rut: Rutina; Ast: Astilbina.

Fonte: Autoria própria.

Em relação aos taninos condensados, os dados permitiram observar bandas de mesma coloração (rósea-avermelhada) e Rf de (0,66) que o padrão de catequina para casca e folha, sendo na fração enriquecida acetato de etila a que se apresenta mais intensa, corroborando com o objetivo de enriquecimento da fração (Figura 8). Também foi possível verificar a presença de outras bandas de mesma coloração sugerindo a presença de outros taninos condensados, derivados da catequina. Tais resultados corroboram com os dados da literatura disponível para o gênero, onde foram descritos para a casca a presença de grande quantidade de procianidinas compostas por uma variedade de flavan-3-ols, como a catequina (SASAKI *et al.*, 2009).

Figura 8 - Cromatoplaca obtida por aplicação semi-automatizada para taninos condensados revelado com vanilina clorídrica e visualizado sob luz branca.



EBC: Extrato Bruto da Casca do caule; FAqC: Fração Aquosa da Casca do caule; FAEC: Fração Acetato de etila da Casca do caule; EBF: Extrato Bruto da Folha; FAqF: Fração Aquosa da Folha; FAEF: Fração Acetato de etila da Folha; FHF: Fração Hexano da Folha; EBFr: Extrato Bruto do Fruto, FAqFr: Fração Aquosa do Fruto; FAEFr: Fração Acetato de etila do Fruto; Cat: Catequina; EpiC: Epicatequina.
Fonte: Autoria própria.

Conforme evidenciado nas figuras 7 e 8, observa-se um incremento na intensidade de coloração de algumas bandas, quando compara-se o extrato bruto e a fração acetato de etila, indicando o enriquecimento da fração conforme esperado.

4.3.2 Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

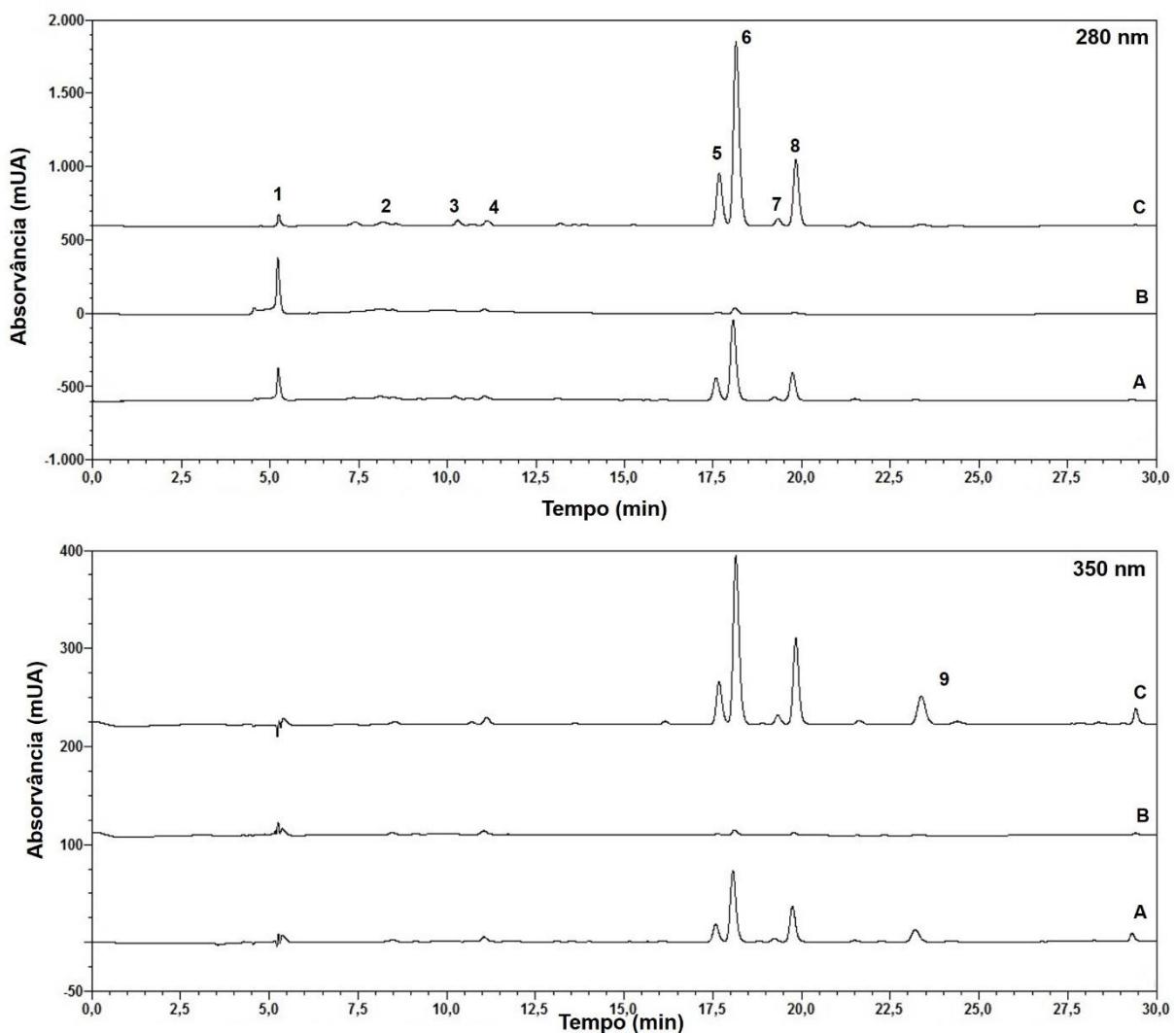
Os extratos e frações foram analisados por cromatografia líquida de alta eficiência, a fim de observar os perfis químicos referentes aos três farmacógenos, bem como, realizar a quantificação dos marcadores da espécie.

Os perfis obtidos para o extrato bruto, a fração aquosa e a fração acetato de etila da casca estão apresentados na Figura 9 (A-C, respectivamente). Após o processo de partição, para a obtenção das frações, foi possível evidenciar o enriquecimento da fração acetato de etila (Figura 9C), verificado incialmente pelo aumento das áreas dos picos.

Após obtenção dos cromatogramas foi possível evidenciar 9 picos, considerando os comprimentos de onda 280 e 350 nm (Figura 10). Merece destaque a presença do flavonoide astilbina (flavanonol), no tempo de retenção (t_R) de 18,07

min (pico 6), confirmado após co-eluição das amostras (extrato bruto e frações) e do padrão de astilbina, sendo considerado o componente majoritário da casca de *H. eriogyne*.

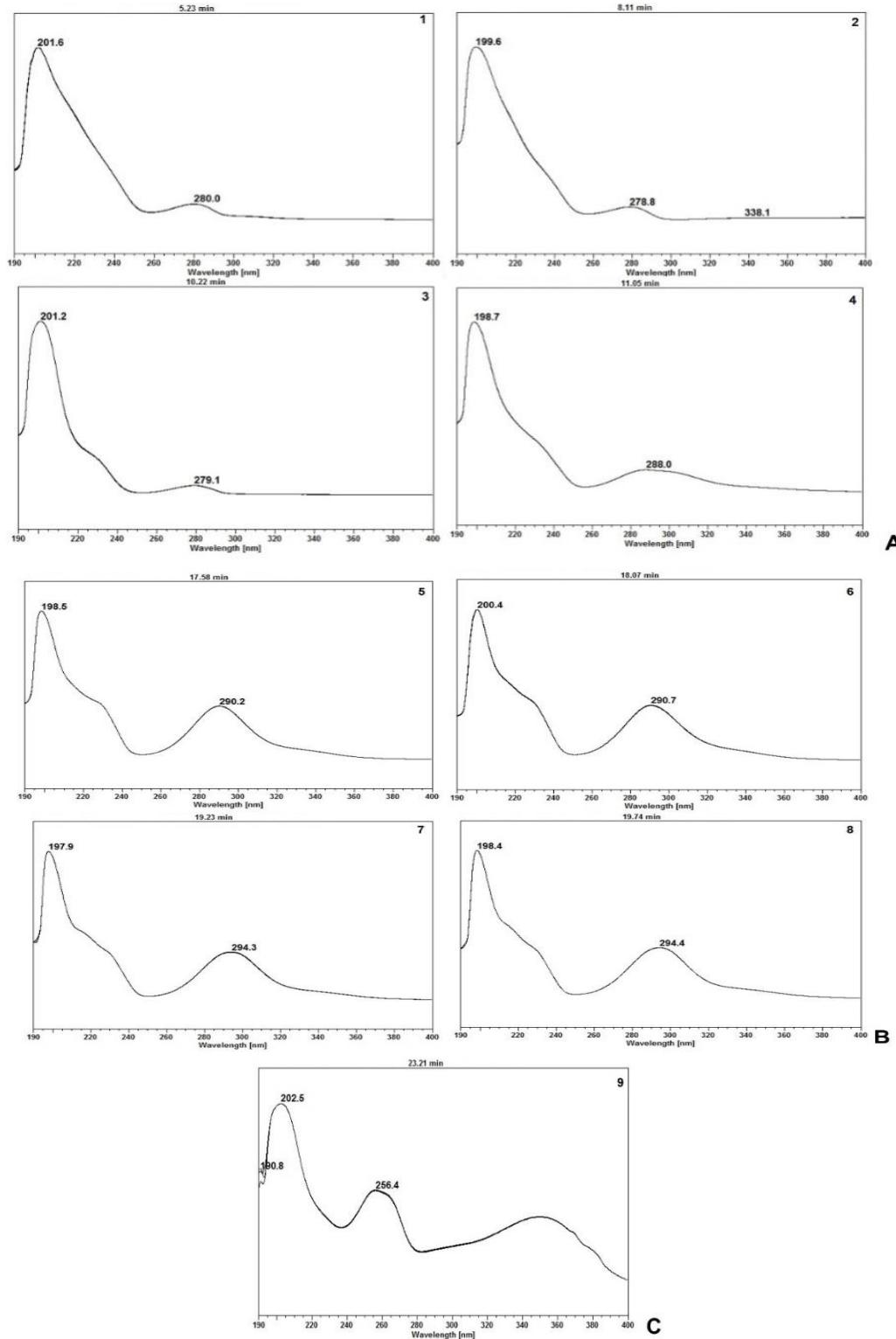
Figura 9 - Cromatograma obtido para o extrato bruto (A), fração aquosa (B) e fração acetato de etila (C) da casca de *H. eriogyne*, em 280 e 350 nm.



Fonte: Autoria própria.

Na figura 10 é possível evidenciar os espectros de varredura dos picos observados nos cromatogramas. Ademais, os dados sugerem a presença de taxifolina (aglicona correspondente a astilbina - picos 5, 7 e 8; $\lambda_{\text{máx}} = 290$ nm, aproximadamente), bem como compostos semelhantes de catequina (picos 1 a 4; $\lambda_{\text{máx}} = 280$ nm, aproximadamente) e rutina (pico 9; $\lambda_{\text{máx}} = 256$ e 350 nm, aproximadamente). Esse fato foi observado após injeção dos padrões de astilbina ($t_R = 18,07$ min) (Figura 11), catequina ($t_R = 7,86$ min) (Figura 12) e rutina ($t_R = 23,25$ min).

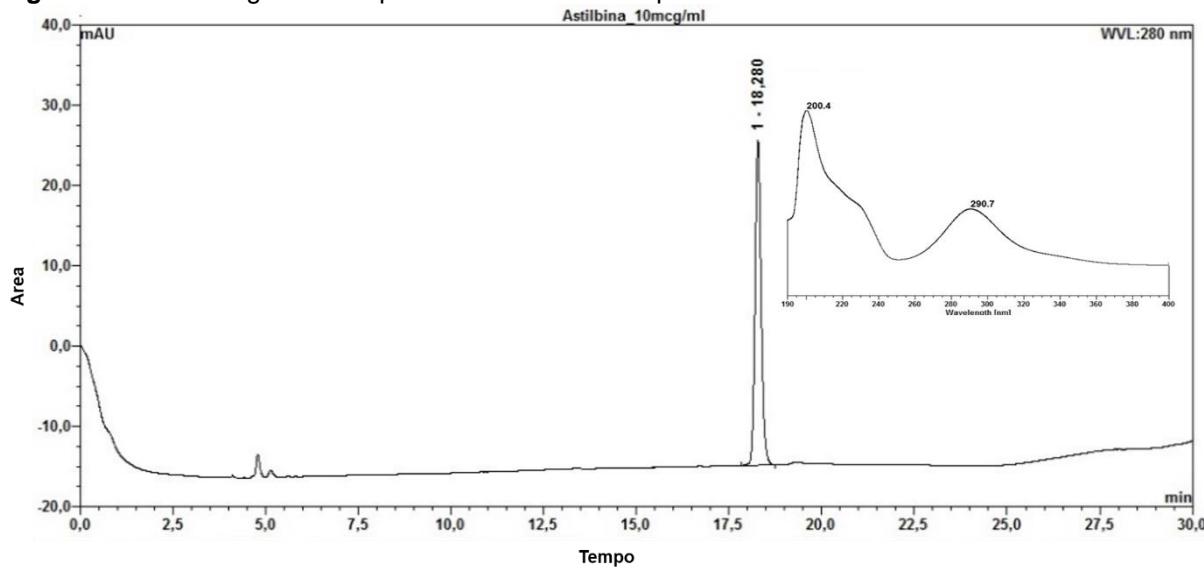
Figura 10 - Espectros de varredura dos picos evidenciados no extrato e frações das cascas de *H. eriogyne*.



A – Derivados de catequina (picos 1-4); B – Derivados de taxifolina (picos 5,7,8); Astilbina (pico 6); C – Derivado de flavonóide (pico 9).

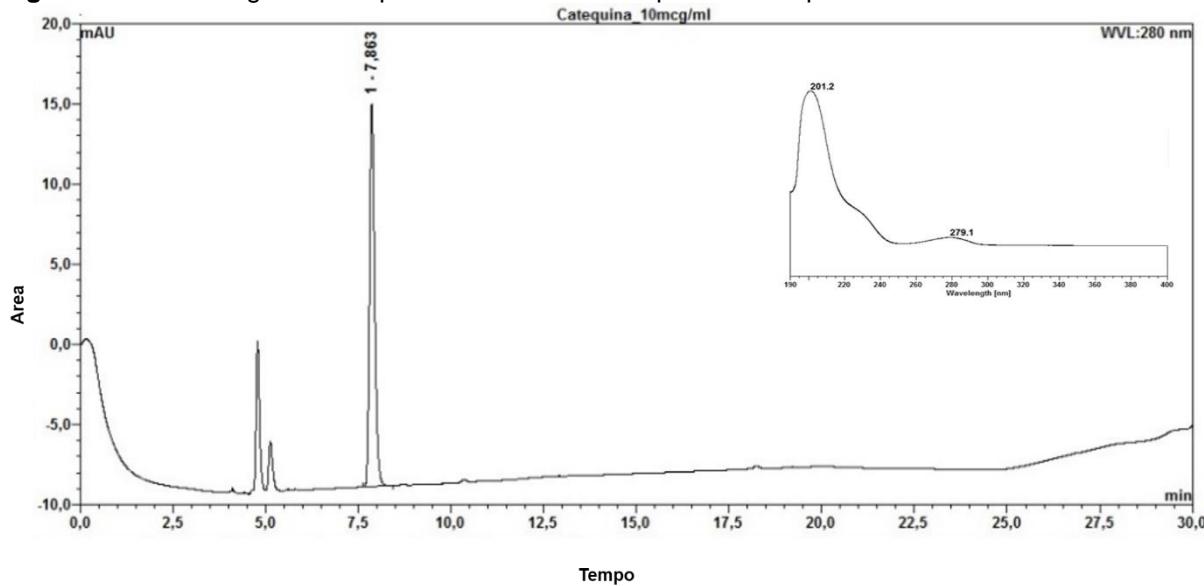
Fonte: Autoria própria.

Figura 11 - Cromatograma e espectro de varredura do padrão astilbina em 280 nm.



Fonte: Autoria própria.

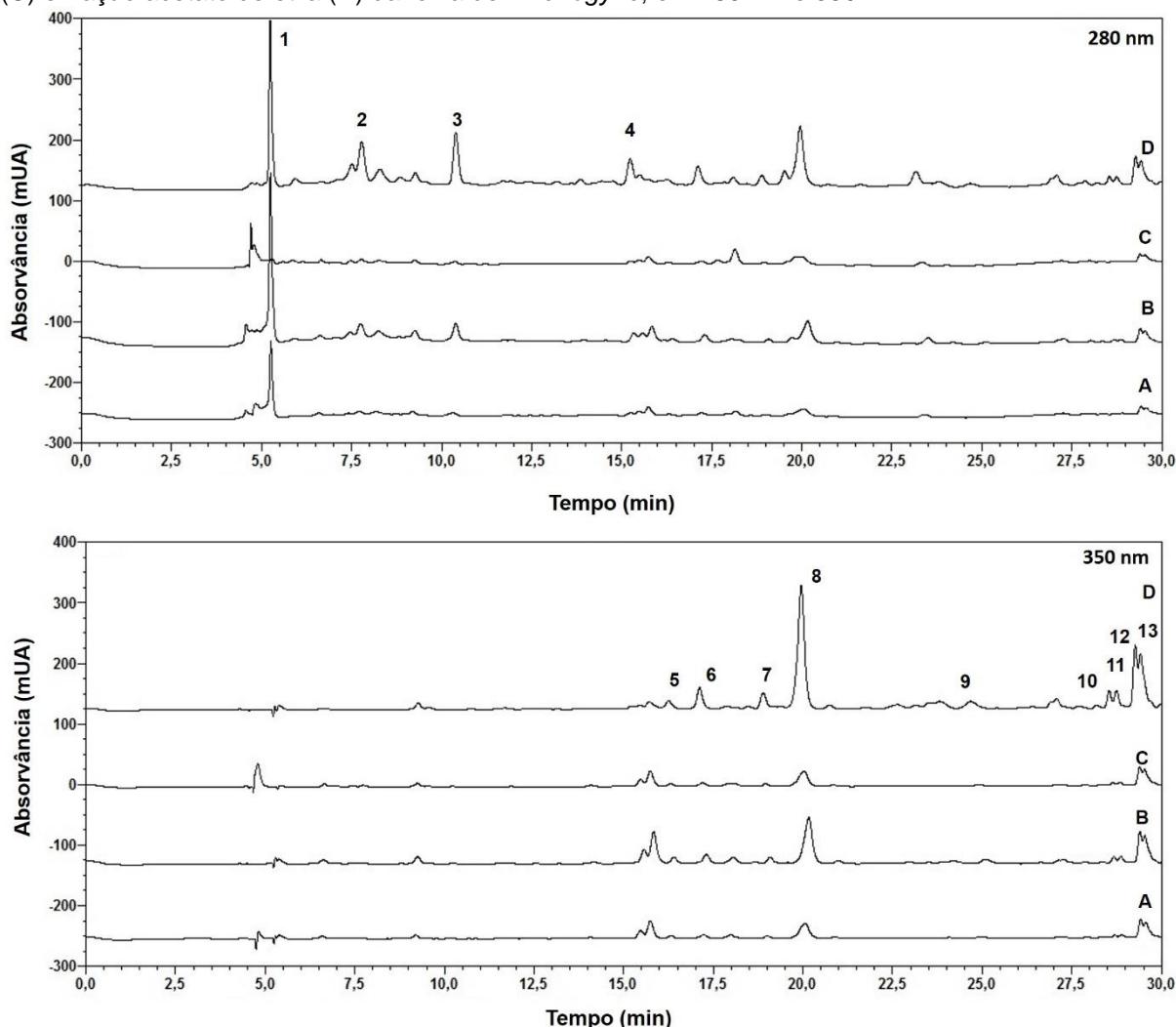
Figura 12 - Cromatograma e espectro de varredura do padrão catequina em 280 nm.



Fonte: Autoria própria.

Para a análise cromatográfica do extrato bruto e frações da folha foram observados 13 picos, sendo um deles com $t_R = 15,23$ min (pico 4; $\lambda_{\text{máx}} = 290$ nm, aproximadamente), podendo ser caracterizado como um derivado da taxifolina (aglicona correspondente a astilbina) devido as suas características de absorção como observado no chromatograma da Figura 13.

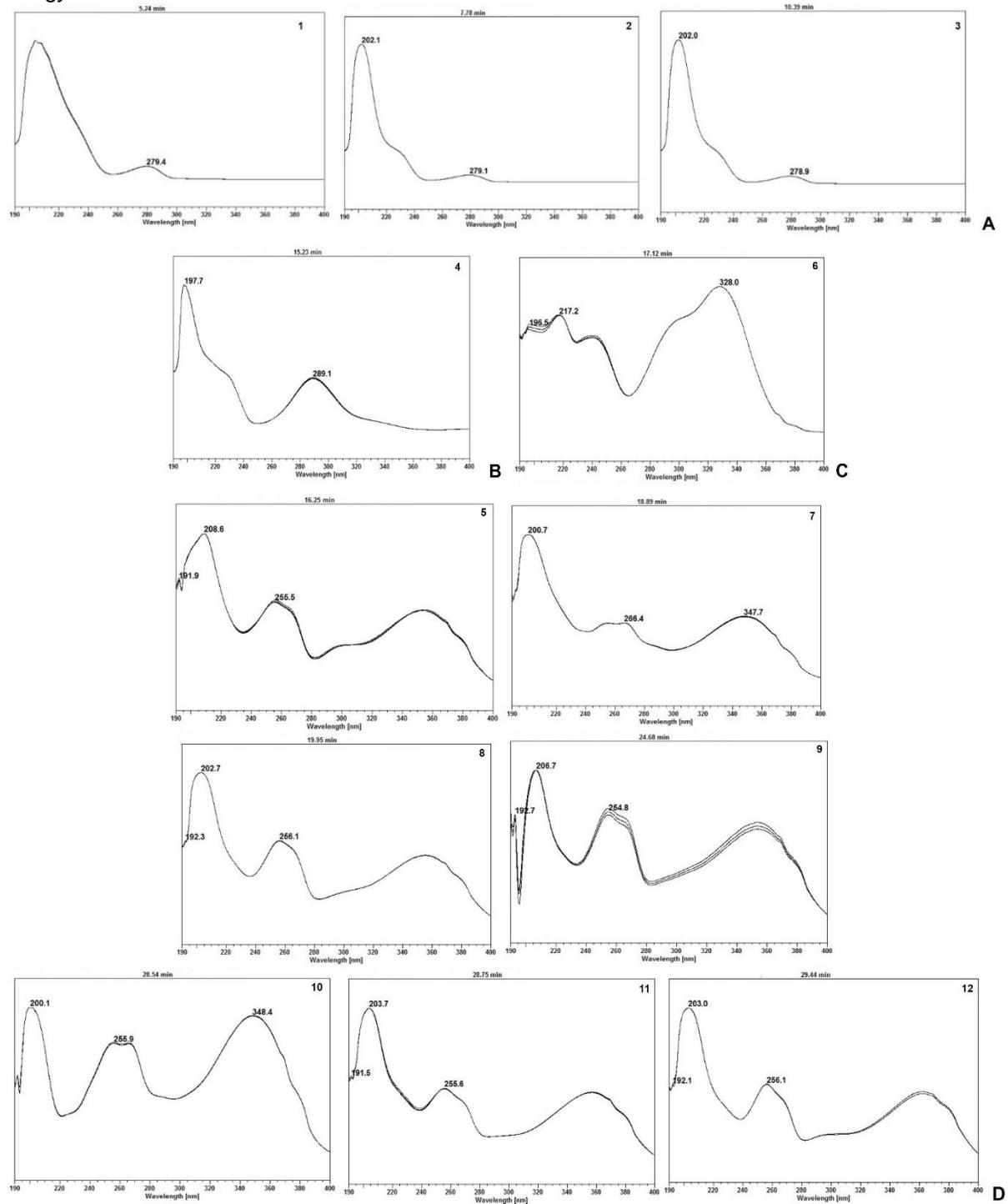
Figura 13 - Cromatograma obtido para o extrato bruto (A), fração hexano (B), fração aquosa residual (C) e fração acetato de etila (D) da folha de *H. eriogyne*; em 280 nm e 350 nm.



Fonte: Autoria própria.

Os espectros de varredura dos picos de 1 a 13 (Figura 14), evidenciaram a presença de compostos semelhantes a catequina (picos 1, 2 e 3); flavonoídicos (picos 5, 7-13) e um pico característico de derivado cinâmico – ácido fenólico (pico 6; $\lambda_{\text{máx}} = 217$ e 328 nm, aproximadamente). Os flavonoides apresentam um espectro de absorção típico no ultravioleta, com dois máximos de absorção: um ocorrendo entre 240-285 nm (Banda II) e um segundo no intervalo 300-550 nm (Banda I). Podendo considerar a banda II referente ao anel A e a banda I o anel B (SAIT *et al.*, 2015)

Figura 14 - Espectros de varredura dos picos evidenciados no extrato e frações das folhas de *H. eriogyne*.

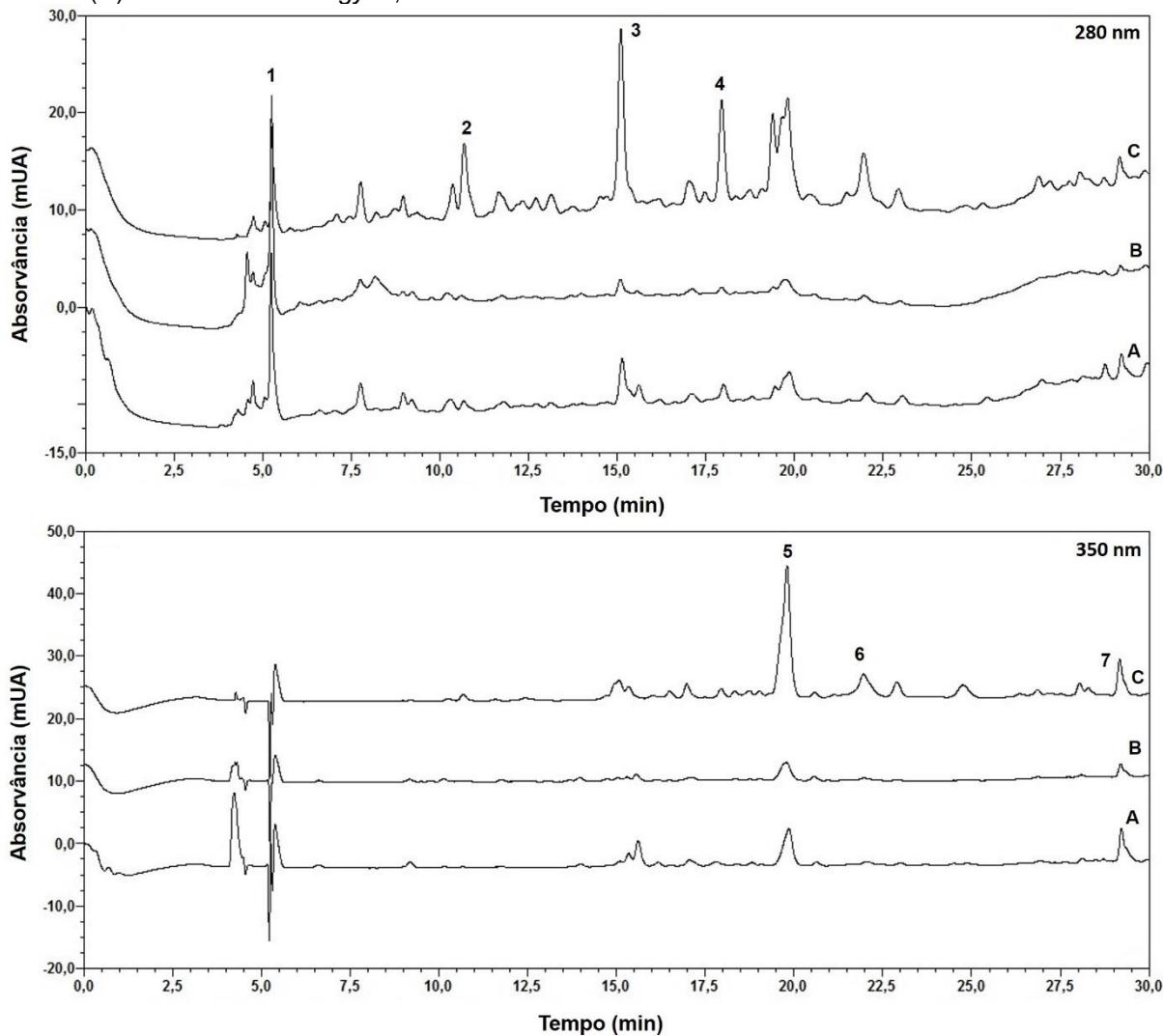


A – Derivados de catequina (picos 1-3); B – Derivados de taxifolina (pico 4); C – Derivado de ácido fenólico (pico 6); D – Derivado de flavonóide (picos 5-12).

Fonte: Autoria própria.

Por fim, os perfis obtidos para o extrato bruto e frações dos frutos estão evidenciados na figura 15, onde foram observados 7 picos.

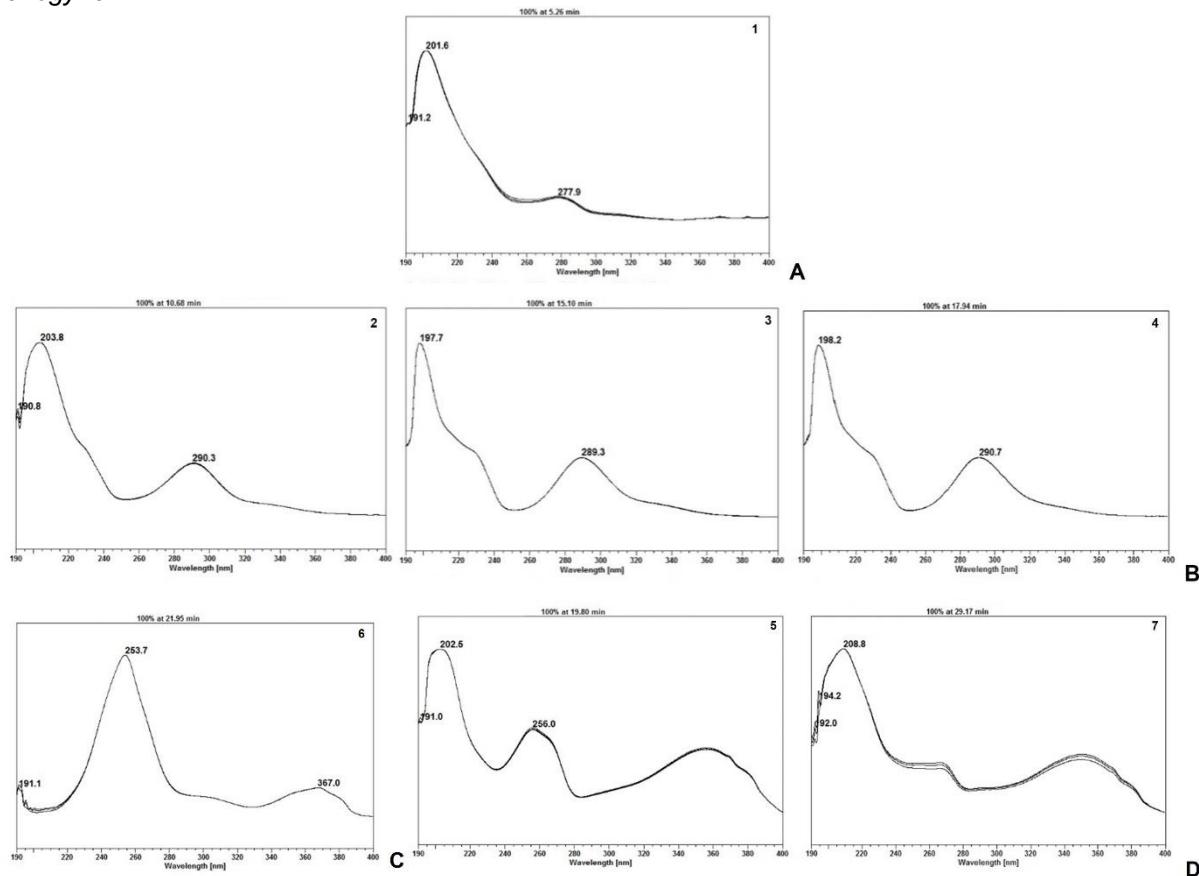
Figura 15 - Cromatograma obtido para o extrato bruto (A), fração aquosa residual (B) e fração acetato de etila (C) do fruto de *H. eriogyne*, em 280 nm e 350 nm.



Fonte: Autoria própria.

Os espectros de varredura demonstraram características semelhantes a catequina (pico 1); e semelhantes a astilbina (picos 2 e 3) e astilbina (pico 4, $t_R = 17,94$ min); derivados flavonoídicos (picos 5 e 7) e ácido elágico (pico 6; $\lambda_{\text{máx}} = 253$ e 367 nm, aproximadamente) (Figura 16).

Figura 16 - Espectros de varredura dos picos evidenciados no extrato e frações dos frutos de *H. eriogyne*.



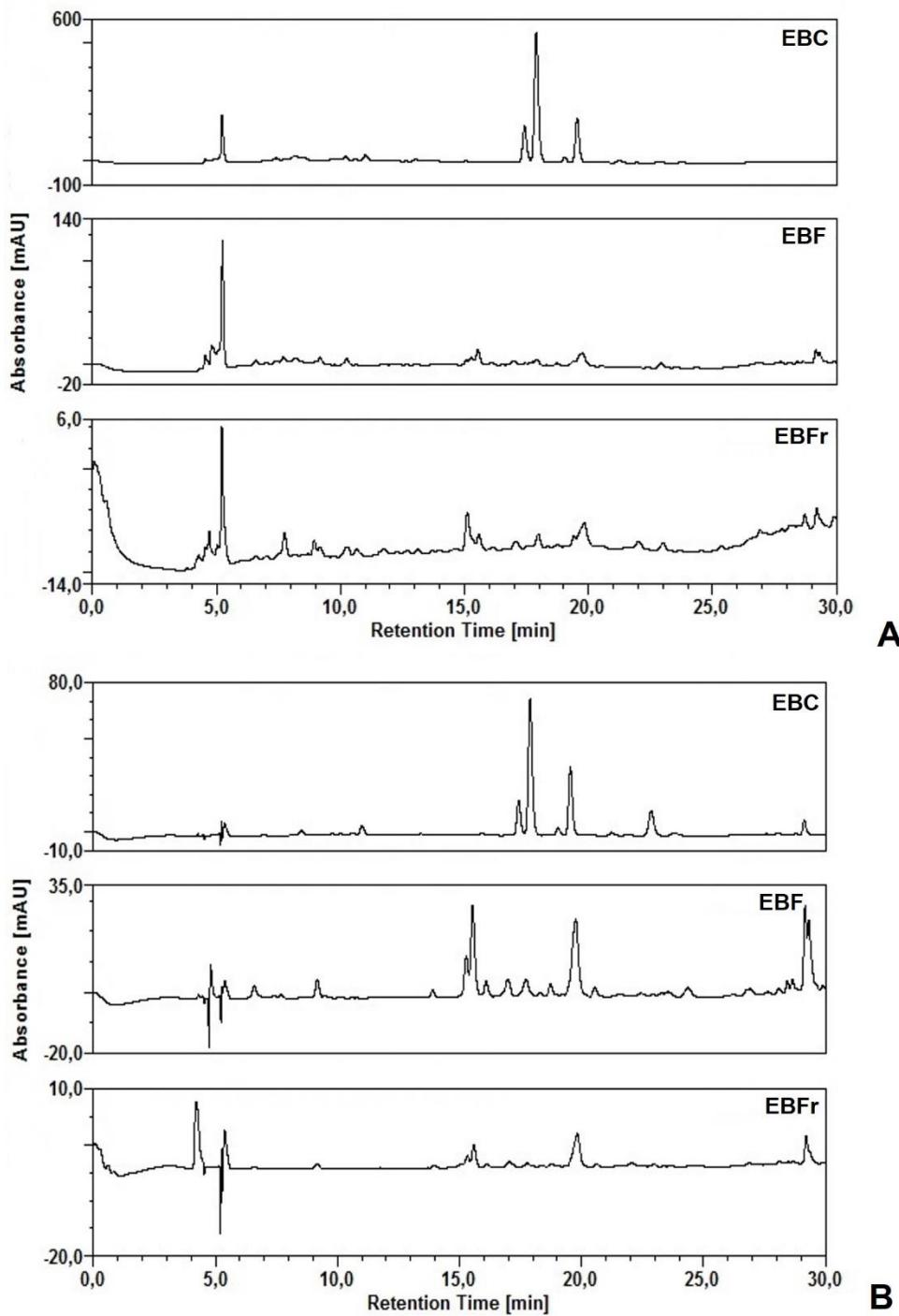
A – Derivado de catequina (pico 1); B – Derivados de Taxifolina (picos 2 e 3); Astilbina (pico 4); C – Derivado de ácido elágico; D – Derivados de flavonoíde (picos 5-7).

Fonte: Autoria própria.

De acordo com os perfis cromatográficos obtidos por CCD e CLAE, é possível evidenciar que os três farmacógenos apresentam astilbina e derivados de taxifolina na composição, bem como a presença de derivados flavonoídicos e de taninos condensados (Figuras 17 a 19).

Na figura 17 estão evidenciados os cromatogramas dos extratos brutos dos três farmacógenos. Em 280 nm (Figura 17A) é possível observar que não existem regiões comuns aos três farmacógenos, entretanto em 350 nm (Figura 17B) há uma região semelhante entre 17 e 21 min, aproximadamente, que corresponde aos derivados flavonoídicos.

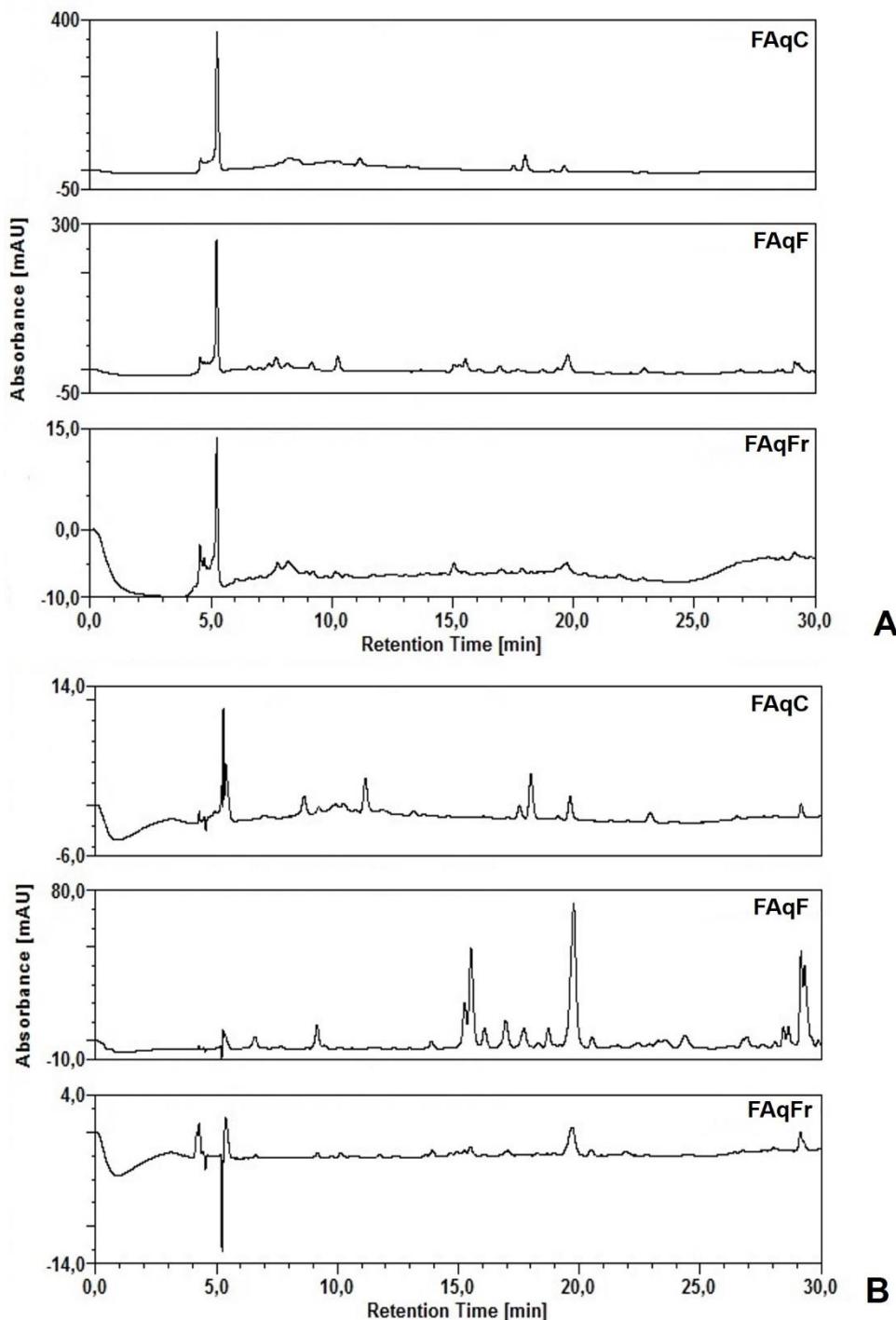
Figura 17 - Cromatogramas obtidos para os extratos brutos dos três farmacógenos em 280 nm (A) e 350 nm (B).



EBC: Extrato Bruto da Casca; EBF: Extrato Bruto da Folha; EBFr: Extrato Bruto do Fruto.
Fonte: Autoria própria.

Considerando os perfis cromatográficos das frações aquosas da casca, da folha e do fruto, observa-se tanto nos chromatogramas de CCD quanto nos chromatogramas de CLAE que existem regiões semelhantes e que apresentaram baixa intensidade de cor, bem como em valores de área (Figura 18).

Figura 18 - Cromatogramas obtidos para as frações aquosas dos três farmacógenos em 280 nm (A) e 350 nm (B).

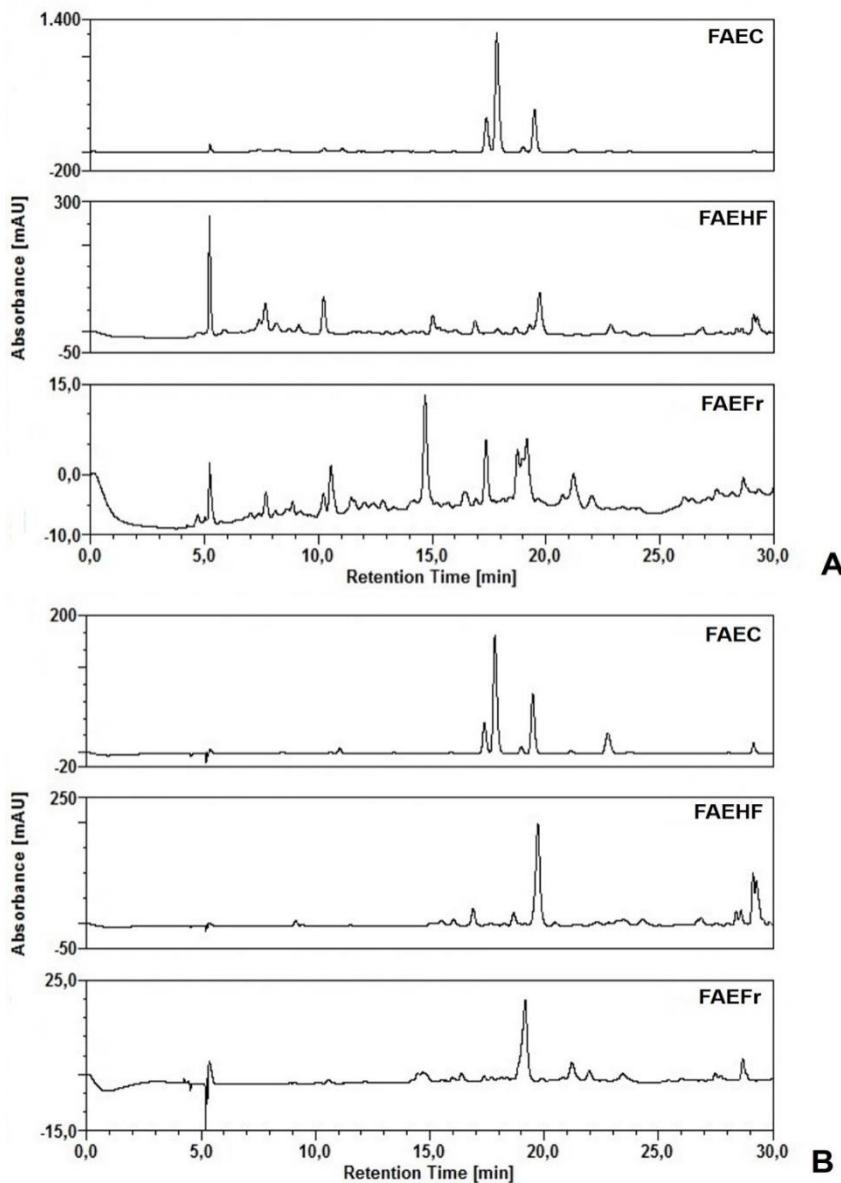


FAQC: Fração Aquosa da Casca; FAQF: Fração Aquosa da Folha; FAQFr: Fração Aquosa do Fruto.
Fonte: Autoria própria.

Por fim, as frações acetato de etila confirmam o enriquecimento obtido a partir do processo de partição realizado. Mais uma vez, os perfis cromatográficos de CCD e CLAE corroboram, evidenciando regiões semelhantes. Na figura 19 observa-se que

a região compreendida entre 17 e 21 min é semelhante para o extrato bruto e frações devido a presença da astilbina e derivados flavonoidicos.

Figura 19 - Cromatogramas obtidos para as frações acetato de etila dos três farmacógenos em 280 nm (A) e 350 nm (B).



FAEC: Fração Acetato de etila da Casca; FAEHF: Fração Acetato de etila após Hexano da Folha; FAEFr: Fração Acetato de etila do Fruto.

Fonte: Autoria própria.

Após obtenção dos cromatogramas, foram construídas curvas de calibração para os padrões de astilbina ($y = 1,5478x + 1,9374$; $R^2 = 0,9998$), catequina ($y = 0,5254x - 4,4547$; $R^2 = 0,9916$), rutina ($y = 0,7015x - 0,2726$; $R^2 = 0,9953$), ácido elágico ($y = 4,559x - 7,882$; $R^2 = 0,9997$) e ácido cafeico ($y = 0,2511x - 8,132$; $R^2 = 0,9911$), a fim de obter os teores nos extratos e frações de *H. eriogyne*. Os picos que

apresentaram semelhança de espectro com a catequina, astilbina, rutina e ácido cafeico, tiveram seus teores calculados como os respectivos padrões utilizados.

Assim, o enriquecimento por fracionamento, previamente sugerido pela análise por CCD, pôde ser confirmado por quantificação do extrato bruto e fração acetato de etila. Na comparação com o extrato bruto das cascas do caule, o teor de astilbina na fração acetato de etila aumentou significativamente em cerca de 2 vezes para a casca (Tabela 8).

Tabela 8 – Teores calculados para o extrato bruto e frações obtidas das cascas de *H. eriogyne*.

Casca	Astilbina	D-Taxifolina	Catequina	D-Ca	Rutina
EB	6,44 (0,29)	3,80 (0,78)	5,15 (2,45)	4,51 (0,52)	0,52 (0,45)
Faqr	0,35 (2,45)	0,06 (9,92)	9,13 (1,72)	4,18 (1,46)	0,08 (0,36)
FAE	15,11 (1,57)	9,52 (1,55)	2,28 (0,90)	5,74 (1,00)	1,15 (0,83)

O teor foi expresso em g% (gramas por 100 gramas de amostra) como média (Desvio Padrão Relativo%).

EB: Extrato Bruto; FAqr: Fração Aquosa residual; FAE: Fração Acetato de Etila.

D-Taxifolina: Derivados de Taxifolina; D-Ca: Derivados de Catequina.

Fonte: Autoria própria.

Na tabela 9 observa-se que a obtenção de frações enriquecidas proporcionou o aumento do teor de polifenóis, chegando a aumentar o teor dos Derivados flavonoídicos 4 vezes mais. Na tabela 10 podemos observar que o fruto não apresentou aumentos significativos dos teores após realização das partições.

Tabela 9 - Teores calculados para o extrato bruto e frações obtidas das folhas de *H. eriogyne*.

Casca	D-Taxifolina	Catequina	D-Ca	Rutina	Ác. Cafeico
EB	-	-	5,08 (0,17)	2,26 (1,67)	-
FH	-	-	-	-	-
FAqr	-	-	9,31 (1,06)	4,99 (1,47)	-
FAE	0,25 (3,77)	-	11,93 (1,36)	10,98 (1,34)	-

O teor foi expresso em g% (gramas por 100 gramas de amostra) como média (Desvio Padrão Relativo%).

EB: Extrato Bruto; FAqr: Fração Aquosa residual; FAE: Fração Acetato de Etila.

D-Taxifolina: Derivados de Taxifolina; D-Ca: Derivados de Catequina. -: Não foi possível quantificar.

Fonte: Autoria própria.

Tabela 10 - Teores calculados para o extrato bruto e frações obtidas dos frutos de *H. eriogyne*.

Casca	Astilbina	D-Taxifolina	Catequina	Rutina	Ác. Elágico
EB	-	-	1,17 (0,11)	1,34 (1,91)	-
FAqr	-	-	1,33 (3,64)	0,18 (1,00)	-
FAE	-	0,01 (0,21)	1,07 (0,46)	1,09 (1,34)	-

O teor foi expresso em g% (gramas por 100 gramas de amostra) como média (Desvio Padrão Relativo%).

EB: Extrato Bruto; FAqr: Fração Aquosa residual; FAE: Fração Acetato de Etila.

D-Taxifolina: Derivados de Taxifolina. -: Não foi possível quantificar.

Fonte: Autoria própria.

Os dados confirmam que o processo de partição é imprescindível para obtenção de produto enriquecido com derivados flavonoídos e catéquicos de produtos de *H. eriogyne*, principalmente para as cascas e folhas, o que pode incrementar as propriedades biológicas da espécie.

4.4 ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

Já existem descritos na literatura estudos mostrando que espécies pertencentes ao gênero *Hymenaea* apresentam potencial antimicrobiano (FERREIRA et al., 2013; DIMECH et al., 2013; MORAES et al., 2015; OLIVEIRA et al., 2018), porém nenhum estudo foi realizado com a espécie *H. eriogyne*. Dessa forma, extratos brutos e frações foram testados para avaliar a atividade antibacteriana.

Na tabela 11 estão os valores das Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) dos extratos e frações das cascas, folhas e frutos frente a cepa padrão de *S. aureus* e aos 12 isolados clínicos bacterianos, dos quais oito apresentam perfil fenotípico multidroga-resistente descritos anteriormente no quadro 2.

Os extratos brutos das cascas e das folhas e suas frações acetato de etila apresentaram atividade forte a moderada frente as bactérias testadas, com valores CIM entre 250 - 1000 µg/mL e 62,5 – 1000 µg/mL, respectivamente. Além disso, podemos observar que as frações enriquecidas apresentou maior resposta frente aos microrganismos testados, possivelmente pelo seu maior teor de polifenóis (CUSSHNIE et al., 2005).

No estudo foi possível evidenciar que os extratos brutos e frações das cascas e folhas apresentaram pronunciada atividade frente as microrganismos Gram-positivas: *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Streptococcus agalactiae*, com valores de CIM entre 250 - 1000 µg/mL. Essa melhor resposta pode ser explicada pela ausência da camada externa de lipossacarídeos, o que proporciona maior susceptibilidade do microrganismo ao extrato (IKIGAI *et al.*, 1993).

Também foi observado atividade frente a bactérias Gram-negativas, com baixos valores de CIM. A fração acetato de etila da casca apresentou notória atividade (CIM igual a 62,5 µg/mL) frente a cepa *Serratia marcescens*, uma bactéria Gram-negativa encontrada em ambiente nosocomial, geralmente isolada em pacientes imunossuprimidos. Esses isolados apresentam fenótipo de resistência a ampicilina; ciprofloxacino, ceftazidima e piperaciclina/tazobactam, e tal resultado demonstra que frações enriquecidas são capazes apresentar melhores resultados frente aos extratos brutos, devido a seletiva concentração de metabólitos secundários. Também foi observado atividade dos extratos brutos e frações testadas frente a *P. aeruginosa* com valores de CIM entre 125 - 1000 µg/mL, sendo a FaqF a que apresentou menor CIM, sendo dessa forma um potencial a ser explorado. Já foram descritas atividade antibacteriana do extrato etanólico das cascas do caule e dos frutos de *H. courbaril*, onde ambas amostram apresentaram CIM de 350 µg/mL para isolado clínico de *P. aeruginosa*.

Tabela 11 - Valores da concentração inibitória mínima (CIM) dos extratos e frações das cascas, folhas e frutos de *H. eriogyne*, frente as bactérias.

Microrganismos	CIM ($\mu\text{g/mL}$)									
	EBC	FAEC	FAqC	EBF	FHF	FAEF	FAqF	EBFr	FAEFr	FAqFr
<i>S. aureus</i> ATCC 25293	250	250	500	250	500	250	500	250	250	500
<i>S. epidermidis</i>	500	500	500	500	>1000	500	1000	>1000	>1000	>1000
<i>S. agalactiae</i>	500	500	500	1000	>1000	250	500	>1000	>1000	>1000
<i>P. aeruginosa</i>	250	250	250	500	1000	250	125	1000	1000	1000
<i>P. aeruginosa</i> MDR	500	>1000	1000	>1000	>1000	500	>1000	>1000	>1000	>1000
<i>P. aeruginosa</i> MDR	1000	250	1000	>1000	>1000	250	500	>1000	>1000	>1000
<i>K. pneumoniae</i> KPC	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
<i>K. pneumoniae</i> KPC	1000	1000	>1000	>1000	>1000	1000	>1000	>1000	>1000	>1000
<i>K. pneumoniae</i> KPC	250	250	250	1000	>1000	500	250	1000	>1000	>1000
<i>S. marcescens</i> MDR	250	62,5	125	>1000	125	62,5	62,5	500	500	500
<i>E. coli</i> MDR	1000	500	1000	>1000	>1000	250	500	>1000	>1000	>1000
<i>E. coli</i> ESBL	1000	250	1000	>1000	>1000	500	>1000	>1000	>1000	>1000
<i>Enterobacter aerogenes</i>	250	125	250	1000	>1000	500	250	>1000	1000	>1000

EBC: Extrato Bruto da Casca do caule; FAEC: Fração Acetato de etila da Casca do caule; FAqC: Fração Aquosa da Casca do caule; EBF: Extrato Bruto da Folha; FHF: Fração Hexano da Folha; FAEF: Fração Acetato de etila da Folha; FAqF: Fração Aquosa da Folha; EBFr: Extrato Bruto do Fruto; FAEFr: Fração Acetato de etila do Fruto; FAqFr: Fração Aquosa do Fruto; MDR: multidroga resistente; ESBL: produtor de espectro extendido de β -lactamase (ESBL); KPC: produtor de carbapenemase (KPC); ATCC: American Type Culture Collection.

Fonte: Autoria própria.

Segundo dados da literatura, os polifenois podem atuar na parede celular dos microrganismos, combinando-se com as adesinas e comprometendo fisiologicamente a sua vitalidade (CASTRO *et al.*, 2012). Além disso, taninos podem afetar a síntese da parede celular, por formarem complexos irreversíveis com proteínas (CHUSRI; VORAVUTHIKUNCHAI, 2009); e, os flavonoides são descritos como inibidores de topoisomerase tipo-II bacteriana, necessária para a transcrição e replicação celular (CUSHNIE; LAMB, 2011). Entretanto, o extrato bruto, e frações do fruto e a fração hexano da folha não apresentaram potencial antibacteriano, provavelmente devido ao baixo conteúdo de polifenois quando comparado com os extratos e frações da casca e da folha.

A tabela 12 apresenta os valores de concentração bactericida mínina (CBM) obtidos para *H. eriogyne*. O extrato bruto das cascas e a sua fração acetato de etila foram os que apresentaram melhor resposta, com CBM entre 250 – 1000 µg/mL para as bactérias testadas. Foi observado que o extrato bruto das cascas e suas frações apresentaram uma CMB de 1000 µg/mL, para *Streptococcus agalactiae*, uma bactéria Gram-positiva bastante presente em sepses neonatal, aborto séptico, endometrite, pielonefrite, sepse puerperal e ruptura prematura de membrana, com poucas opções terapêuticas disponíveis para tratamento (PAIVA *et al.*, 2017).

Entre as bactérias Gram-negativas testadas, a fração acetato de etila da casca foi a que apresentou melhor resposta frente a *Pseudomonas aeruginosa*, com CBM de 250 µg/mL. Esse resultado mostra como a fração acetato de etila da casca é promissora para a descoberta de novos compostos.

Tabela 12 - Valores da concentração bactericida mínima (CBM) dos extratos e frações das cascas, folhas e frutos de *H. eriogyne*, frente as bactérias

Microrganismos	CBM ($\mu\text{g/mL}$)									
	EBC	FAEC	FAqrC	EBF	FHF	FAEHF	FAqF	EBFr	FAEFr	FAqrFr
<i>S. aureus</i> ATCC 25293	250	250	500	>1000	>1000	1000	>1000	>1000	>1000	>1000
<i>S. epidermidis</i>	>1000	1000	>1000	>1000	>1000	1000	>1000	>1000	>1000	>1000
<i>S. agalactiae</i>	1000	1000	1000	>1000	>1000	500	500	>1000	>1000	>1000
<i>P. aeruginosa</i>	500	250	500	1000	1000	500	500	>1000	>1000	>1000
<i>P. aeruginosa</i> MDR	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
<i>P. aeruginosa</i> MDR	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
<i>K. pneumoniae</i> KPC	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
<i>K. pneumoniae</i> KPC	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
<i>K. pneumoniae</i> KPC	500	500	500	>1000	>1000	1000	500	>1000	>1000	>1000
<i>S. marcescens</i> MDR	1000	500	1000	>1000	1000	500	500	>1000	>1000	>1000
<i>E. coli</i> MDR	1000	>1000	1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
<i>E. coli</i> ESBL	>1000	500	1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
<i>Enterobacter aerogenes</i>	500	250	500	>1000	>1000	1000	500	>1000	1000	>1000

EBC: Extrato Bruto da Casca do caule; FAqC: Fração Aquosa da Casca do caule; FAEC: Fração Acetato de etila da Casca do caule; EBF: Extrato Bruto da Folha; FAqF: Fração Aquosa da Folha; FAEHF: Fração Acetato de etila após Hexano da Folha; FHF: Fração Hexano da Folha; EBFr: Extrato Bruto do Fruto, FAqFr: Fração Aquosa do Fruto; FAEFr: Fração Acetato de etila do Fruto; MDR: multidroga resistente; ESBL: produtor de espectro extendido de β -lactamase (ESBL); KPC: produtor de carbapenemase (KPC); ATCC: American Type Culture Collection.

Fonte: Autoria própria.

A partir do perfil de susceptibilidade obtido no ensaio anterior, as amostras que apresentaram melhores resultados frente as bactérias testadas foram submetidas a novo estudo para verificar a ação dessas frações enriquecidas na resistência aos antibióticos.

A seleção de droga levou em conta os espectros diferentes e o mecanismo da ação das classes de antibióticos mais utilizados na clínica médica (β -lactama, um macrolideo, um fluoroquinolona e um aminoglicosideo). De acordo com o perfil de suscetibilidade os isolados de *S. epidermidis* (SE073HC), *E. coli* (EC044UC), *K. pneumoniae* (KP180UC), *P. aeruginosa* (PA169AT), foram selecionadas para o ensaio de modulação, utilizando concentrações de FAE equivalentes a 1/8 de cada valor de CIM. A seleção das estirpes foi baseada na sua susceptibilidade aos FAE e resistente a estes antibióticos. Os resultados estão descritos na tabela 13.

Foi possível observar que após a utilização de concentrações sub-inibitórias para as frações acetato de etila das cascas e folhas combinadas com os antibióticos, ocorreu sinergismo em quatro das oito associações testadas. Entre as drogas testadas, o ciprofloxacino foi a que obteve melhores resultados, seguida pela gentamicina e ampicilina. A azitromicina não apresentou atividade modulatória.

Para *P. aeruginosa* PA169AT, apenas a fração acetato de etila da folha apresentou atividade antibacteriana, no entanto, quando as frações acetato de etila foram incorporadas ao meio de crescimento, observou-se uma redução na CIM para ciprofloxacino de cem por cento, e gentamicina de cinquenta por cento para *K. pneumoniae* carbapenemase (KPC) não foi observado atividade sinérgica da fração acetato de etila com a gentamicina pelo fato de a bactéria apresentar resistência ao aminoglicosídeo (Quadro 1).

Para *S. epidermidis* foi possível observar sinergismo da fração acetato de etila das cascas e folhas apresentaram sinergismo com a ampicilina, obtendo uma redução da CIM de 87,7 e 75,6% respectivamente. *E. coli* EC044UC ESBL permaneceu resistente as combinações utilizadas. Esses resultados são inéditos, pois até o momento não foram descritos estudos de atividade modulatória para casca e folha do gênero *Hymenaea*.

Tabela 13 - CIM de antibióticos contra isolados multirresistentes, na ausência e presença da fração acetato de etila das cascas e folhas de *H. eriogyne* em concentrações sub-inibitórias (1/8 CIM).

Bactérias	CIM Individual ($\mu\text{g/mL}$)		MIC Associada ($\mu\text{g/mL}$)		Redução da CIM (%)		Resultado
	ATB	CIM	CASCA	FOLHA	CASCA	FOLHA	
<i>S. epidermidis</i> (SE073HC)	AMP AZI	512 128	62,5 *	125 *	87,7 -	75,6 -	Sinergismo Antagonismo
<i>E. coli</i> (EC044UC)	CIP GEN	256 128	250 *	250 *	0 -	0 -	Inerte Antagonismo
<i>K. pneumoniae</i> (KP180UC)	CIP GEN	256 256	62,5 250	62,5 500	75,6 0	75,6 0	Sinergismo Inerte
<i>P. aeruginosa</i> (PA169AT)	CIP GEN	>1024 >1024	125 1000	31,2 1000	100 51,2	100 51,2	Sinergismo Sinergismo

CIM: Concentração Inibitória Mínima; ATB: Antibiotico; AMP: ampicilina; AZI: azitromicina; CIP: ciprofloxacino; GEN: gentamicina; * sem inibição; - não calculado.

4.5 ATIVIDADE ANTIFÚNGICA

Já foram descritos na literatura potencial antifúngico para espécies do gênero *Hymanaea*, porém, não há qualquer estudo com a espécie *H. eriogyne*. Dessa forma, os extratos e frações derivados de *H. eriogyne* foram submetidos à avaliação das suas propriedades fungicida/fungistática, empregando 5 leveduras. Na tabela 14 é possível observar os resultados de CIM e da concentração fungicida mínima (CFM) dos extratos e frações frente a isolados de *Candida albicans* e *Candida* não-*Candida albicans*.

Os extratos brutos e frações das cascas e folhas apresentaram CIM entre 500 – 1000 $\mu\text{g/mL}$ frente a espécie *C. albicans*, apresentando dessa forma, uma atividade moderada. Já o extrato bruto e a fração acetato de etila das cascas também apresentaram atividade moderada contra *C. glabrata* (CIM/CFM - 1000/1000 $\mu\text{g/mL}$).

No estudo de Ferreira e colaboradores (2013) foi visto que as cascas da espécie *H. stignocarpa* também apresentaram atividade antifúngica frente *C. albicans* com CIM de 125 $\mu\text{g/mL}$ e CFM >1000 para o extrato aquoso e também apresentou atividade frente *C. glabrata* com CIM de 125 $\mu\text{g/mL}$ e CFM >1000 para o extrato etanólico mostrando ser mais eficiente do que os extratos e frações obtidos de *H. eriogyne* (FERREIRA, et. al., 2013)

Tabela 14 – Valores de Concentração Inibitoria Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM) em µg/mL dos extratos e frações das cascas, folhas e frutos de *H. eriogyne*, frente as isolados de *Candida* sp.

Amostra	CIM/CFM (µg/mL)				
	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. krusei</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. parapsilosis</i>
EBC	1000/>1000	1000/>1000	>1000/>1000	1000/1000	500/>1000
FAEC	1000/1000	1000/>1000	>1000/>1000	1000/1000	>1000/>1000
FAQC	500/500	>1000/>1000	>1000/>1000	>1000/>1000	>1000/>1000
EBF	500/>1000	>1000/>1000	>1000/>1000	1000/>1000	>1000/>1000
FHF	1000/1000	>1000/>1000	>1000/>1000	>1000/>1000	>1000/>1000
FAEHF	500/1000	>1000/>1000	>1000/>1000	>1000/>1000	>1000/>1000
FAqrF	1000/>1000	>1000/>1000	>1000/>1000	>1000/>1000	>1000/>1000
EBFr	500/1000	>1000/>1000	>1000/>1000	>1000/>1000	>1000/>1000
FAEFr	>1000/>1000	>1000/>1000	>1000/>1000	>1000/>1000	>1000/>1000
FAqrFr	>1000/>1000	>1000/>1000	>1000/>1000	>1000/>1000	>1000/>1000

EBC: Extrato Bruto da Casca; FAqC: Fração Aquosa da Casca; FAEC: Fração Acetato de etila da Casca; EBF: Extrato Bruto da Folha; FAqF: Fração Aquosa da Folha; FAEHF: Fração Acetato de etila após Hexano da Folha; FHF: Fração Hexano da Folha; EBFr: Extrato Bruto do Fruto, FAqFr: Fração Aquosa do Fruto; FAEFr: Fração Acetato de etila do Fruto.

Fonte: Autoria própria.

4.6 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Na tabela 15 é possível observar IC₅₀ dos extratos brutos e frações de *H. eriogyne* obtido pelo metodo DPPH. Foi evidenciado que a fração acetato de etila da folha apresentou menor IC₅₀ (34,96 µg/mL). De acordo com Sousa *et al.* (2011), os extratos vegetais que apresentam menores valores de IC₅₀ são os que demonstram uma maior atividade atioxidante, pois é necessário uma menor concentração da amostra para redução 50% do radical DPPH, no entanto esse foi superior ao observado para o controle BHT (15,01 µg/mL). Bezerra *et al.* (2013) relata atividade antioxidante para o extrato etanólico de *H. courbaril* IC₅₀ (3,07 µg/mL) e fração acetato de etila IC₅₀ (5,05 µg/mL), mostrando dessa forma, maior eficiência se comparado aos valores encontrados para *H. eriogyne*.

O teste ABTS é também bastante utilizado para quantificar a capacidade antioxidantes de plantas medicinais, que são compostas por altos teores de compostos fenólicos. Foi observado que a fração aquosa do Fruto apresentou menor IC₅₀ (40,37 µg/mL), sendo ainda maior que o controle utilizado Trolox (30,01 µg/mL). Essa maior capacidade antioxidante se dar pela presença de compostos fenólicos encontrados (BERLOWSKI *et al.*, 2013).

Contreras-Calderon e colaboradores (2011) quantificaram o poder antioxidante dos frutos de *H. courbaril*, que apresentou IC₅₀ de 26,7 µg/mL, semelhante ao encontrado nesse estudo para o fruto de *H. eriogyne*. O estudo das propriedades antioxidantes de plantas medicinais é fundamental como base para desenvolver estudos mais aprofundados de outras propriedades biológicas, como por exemplo: atividade antimicrobiana, fotoproteção, combate de radicais livres e tantas outras propriedades (VELASCO *et al.*, 2008).

Tabela 15 - Atividade Antioxidante pelo método de sequestro do radical DPPH (IC_{50}) e pelo método ABTS ($IC\ 50$) dos extratos e frações de *H. eriogyne*.

Amostra	DPPH	ABTS
	IC_{50} (µg/mL)	
EBC	44,93	65,71
FAqC	45,25	63,73
FAEC	43,84	64,54
EBF	45,57	61,63
FHF	44,02	74,29
FAqF	49,39	48,24
FAEH	34,46	63,72
EBFr	44,09	40,88
FAqFr	43,91	40,37
FAEFr	43,96	63,60
BHT	15,01	-
TROLOX	-	30,05

EBC: Extrato Bruto da Casca; EBF: Extrato Bruto da Folha; EBFr: Extrato Bruto do Fruto; FHF: Fração Hexano da Folha; FAEC: Fração Acetato de etila da Casca; FAEF: Fração Acetato de etila da Folha; FAEFr: Fração Acetato de etila do Fruto; FAqC: Fração Aquosa da Casca; FAqF: Fração Aquosa da Folha; FAqFr: Fração Aquosa do Fruto; BHT: Butilhidroxitolueno.
Fonte: Autoria própria.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos na caracterização físico-química das matérias primas: casca, folhas e frutos de *H. eriogyne* mostraram que os farmavogenos atendem as exigências estabelecidas pela Farmacopeia Brasileira, garantindo os requisitos mínimos de qualidade e estabilidade para que possam ser utilizadas em estudos posteriores.

A análise por CCD sugeriu a presença de diversos metabolitos secundários, com ênfase para os polifenois do tipo flavonoides. Os dados também permitiram observar que as frações enriquecidas apresentam bandas mais intensas, mostrando que a operação de fracionamento levou ao aumento na concentração dos polifenois. A análise cromatográfica por CLAE-DAD permitiu a identificação do marcador químico do gênero, além de sugerir a presença de diversos outros derivados flavonoídicos derivados da aglicona taxifolina. Ademais, o método permitiu a quantificação do marcador nos extratos e frações derivados de *H. eriogyne*.

A avaliação da atividade antimicrobiana de *H. eriogyne*, demonstrou que o extrato bruto das cascas do caule e as frações acetato de etila das cascas e folhas foram as mais promissoras, apresentando as menores CIM para bactérias Gram-positivas *S. aureus* e *Streptococcus agalactiae*. Em relação às bactérias Gram-negativas, os mesmos derivados foram eficazes frente a espécie *Serratia marcescens* e a *Pseudomonas aeruginosa*. Esse resultado ocorreu provavelmente devido ao maior teor de polifenois totais observado para as cascas e folhas, quando comparado ao fruto. Quanto à atividade modulatória foi observado que após a utilização de concentrações sub-inibitórias para as frações acetato de etila das cascas e folhas combinadas com os antibióticos, o sinergismo ocorreu em quatro das oito associações testadas, sendo a associação com ciprofloxacino a que se obteve melhor resultado.

Em relação a atividade antifúngica, não foi observado efeito importante dos extratos e frações sobre os microrganismos estudados, indicado baixo potencial antifúngico nas condições empregadas neste trabalho.

Para a atividade antioxidante foi observado pelo método DPPH que a FAEF apresenta potencial antioxidante de IC₅₀ de 34,46 µg/mL, esse destaque da FAEF mostra a importância do enriquecimento de frações, e contribui para a continuidade de estudos referentes a composição química e biológica da espécie.

REFERÊNCIAS

- ABDEL-KADER, M. et al. 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.
- AGAPOUDA, A. et al. Quality control of *Hypericum perforatum* L. analytical challenges and recent progress. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, 2017.
- AGRA, M. F.; FREITAS, P. F. de; 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.
- ALBUQUERQUE, U. P. et al. Plantas medicinais da vegetação da caatinga (semi-árida) do nordeste do Brasil: uma abordagem quantitativa. **Jornal de etnofarmacologia**, v. 114, n. 3, p. 325-354, 2007
- ALI, H. et al. Effect of Maturation Stages on Flavor Profile and Antioxidant Activity of Date Palm Fruits (*Phoenix dactylifera*) Grown in Saudi Arabia. **International Journal of Pharmacology**, v. 14, n. 3, p. 407-414, 2018.
- ALIGIANNIS, N. et al. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 49, n. 9, p. 4168-4170, 2001.
- ARAÚJO, T. A. S. et al. A new approach to study medicinal plants with tannins and flavonoids contents from the local knowledge. **Journal of ethnopharmacology**, v. 120, n. 1, p. 72-80, 2008.
- ATTIMARAD, M. et al. High-performance thin layer chromatography: A powerful analytical technique in pharmaceutical drug discovery. **Pharmaceutical methods**, v. 2, n. 2, p. 71, 2011.
- AZEREDO, F. S. Validação de técnica analítica em cromatografia em camada delgada comparativa para identificação de fármacos anorexígenos sintéticos em produtos fitoterápicos. **Revista eletrônica de Farmácia**, v. 1, n. 2, 2004.
- BARROSO, G.M.; PEIXOTO, A.L.; COSTA, C.G.; ICHASSO, C.L.F.; GUIMARÃES, E.F. & LIMA, H.C. 1991. **Sistemática das Angiospermas do Brasil**. v.2. Viçosa, Imprensa Universitária, In: CIPRIANO, J. et al. O gênero *Hymenaea* e suas espécies mais importantes. Caderno de Pesquisa, V. 26, n. 2, p. 42-52, 2014.
- BATISTA, A. G. et al. Chemical composition of jatobá-do-cerrado (*Hymenaea stigonocarpa* Mart.) flour and its effect on growth of rats. **Alimentos e Nutrição**, v. 22, n. 2, 2011.
- BEHLING, E. V. et al. Flavonóide quercetina: aspectos gerais e ações biológicas. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v. 15, n. 3, p. 285-292, 2008.

BERŁOWSKI, A. et al. Antioxidant properties of medicinal plants from Peru. **Food and Nutrition Sciences**, v. 4, n. 08, p. 71, 2013.

BESSA, N. G. F. et al. Prospecção fitoquímica preliminar de plantas nativas do cerrado de uso popular medicinal pela comunidade rural do assentamento vale verde–Tocantins. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 15, n. 4, p. 692-707, 2013.

BEZERRA, G. P. et al. Phytochemical study guided by the myorelaxant activity of the crude extract, fractions and constituent from stem bark of *Hymenaea courbaril* L. **Journal of ethnopharmacology**, v. 149, n. 1, p. 62-69, 2013.

BOHATCH JUNIOR, M. S. et al. Efeitos da atividade antimicrobiana do extrato bruto etanólico da *piper solmsianum* e *Equisetum arvense*. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 13, n. 2, p. 100-106, 2016

BONIFACE, P.K.; BAPTISTA, S.F.; ROLAND, C. K.; Current state of knowledge on the traditional uses, phytochemistry, and pharmacology of the genus *Hymenaea*, **Journal of Ethnopharmacology**, V. 206, p.193-223, 2017.

BORGES, D. B. et al. Comparação das metodologias da Farmacopéia Brasileira para determinação de água em matérias-primas vegetais, e validação da determinação de água em analisador de umidade para. **Calendula officinalis**, p. 229-236, 2005.

BRASIL, Ministério da Saúde - POLÍTICA NACIONAL DE PLANTAS MEDICINAIS E FITOTERÁPICOS. Brasília – DF, 2006

BRASIL, Ministério da Saúde, ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 26, de 13 de maio de 2014. **Disposições sobre registro de medicamentos fitoterápicos**, Brasília: ANVISA, 2014.

BROINIZI, P. R. B. et al. Avaliação da atividade antioxidante dos compostos fenólicos naturalmente presentes em subprodutos do pseudofruto de caju (*Anacardium occidentale* L.). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 4, p. 902-908, 2007.

CONTRERAS-CALDERÓN, J. et al. Antioxidant capacity, phenolic content and vitamin C in pulp, peel and seed from 24 exotic fruits from Colombia. **Food research international**, v. 44, n. 7, p. 2047-2053, 2011

CARNEIRO, E. et al. 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.

CARVALHO FILHO, S. A. et al. Produção de mudas de Jatobá (*Hymenaea courbaril* L.) em diferentes ambientes, recipientes e composição de substratos. **Cerne**, 9, p. 109-118, 2003.

CASTELLEN, M. S. **Avaliação do estado de conservação de populações naturais de jatobá (*Hymenaea courbaril* L.) por meio de análises de estrutura**

genética e autocorrelação espacial. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. 2005.

CASTRO, T. L. et al. Mecanismos de resistência da *Candida* Sp. Wwa antifúngicos. **Infarma**, v. 18, n. 9, p. 10, 2006.

CASTRO, L. C. et al. Avaliação da atividade antimicrobiana de extrato aquoso e etanólico de *Acanthospermum australe*. **Revista Caderno Pedagógico**, v. 9, n. 2, 2012.

CECÍLIO, A. B. et al. Screening of Brazilian medicinal plants for antiviral activity against rotavirus. **Journal of ethnopharmacology**, v. 141, n. 3, p. 975-981, 2012.

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

CHUSRI, S.; VORAVUTHIKUNCHAI, S. P. Detailed studies on *Quercus infectoria* Olivier (nutgalls) as an alternative treatment for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections. **Journal of applied microbiology**, v. 106, n. 1, p. 89-96, 2009.

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute. **Method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts**: approved standard-third edition M27-A3. CLSI, Wayne, PA, USA, 2008

CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute. **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically**; Approved Standard—Tenth Edition. CLSI document M7-A09. Wayne, PA, USA, 2012

COELHO, M. S. Otimização de múltiplas respostas na extração de metabólitos especiais de folhas secas de *Eucalyptus badjensis* Beuzev. & Welch, Myrtaceae, através do planejamento de misturas do tipo Simplex-Centroid e análise de superfície de resposta. Dissertação de Mestrado - **Universidade Federal do Paraná** - Curitiba, 2014.

COUTINHO, H. D. et al. Effect of *Momordica charantia* L. in the resistance to aminoglycosides in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Comparative immunology, microbiology and infectious diseases**, v. 33, n. 6, p. 467-471, 2010.

CHONG, P. P. et al. Genotyping and drug resistance profile of *Candida* spp. in recurrent and one-off vaginitis, and high association of no-albicans species with non-pregnant status. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 7, n. 4, p. 449-456, 2007.

COLALTO, C. What phytotherapy needs: Evidence-based guidelines for better clinical practice. **Phytotherapy Research**, v. 32, n. 3, p. 413-425, 2018.

CUSHNIE, T. P.; LAMB, A.J. Antimicrobial activity of flavonoids. **International journal of antimicrobial agents**, v. 26, n. 5, p. 343-356, 2005.

DA COSTA, M. P. et al. Antifungal and cytotoxicity activities of the fresh xylem sap of *Hymenaea courbaril* L. and its major constituent fisetin. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 14, n. 1, p. 245, 2014.

DECONINCK, E. et al. Evaluation of the residual solvent content of counterfeit tablets and capsules. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 81, p. 80-88, 2013.

DEGÁSPARI, C. H.; WASZCZYNSKYJ, N.; DOS SANTOS, R. J. Atividade antioxidante de extrato de fruto de Aroeira (*Schinus terebenthifolius* Raddi). **Visão acadêmica**, v. 5, n. 2, 2004.

DIMECH, G. S. et al. Phytochemical and antibacterial investigations of the extracts and fractions from the stem bark of *Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne and effect on ultrastructure of *Staphylococcus aureus* induced by hydroalcoholic extract. **The Scientific World Journal**, v. 2013, 2013.

FARMACOPEIA BRASILEIRA. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**, 5. ed. Brasília, 2010.

FERNANDES, H. P. et al. New glycosylated biscoumarins from *Hymenaea coubaril* L. seeds. **Phytochemistry Letters**, v. 13, p. 413-416, 2015.

FERREIRA, M. R. A.; et al. Antifungal activity of medicinal plants from Northeastern Brazil. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 7, n. 40, p. 3008-3013, 2013.

Flora do Brasil 2020 em construção. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: < <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/> >. Acesso em: 14 Ago. 2019

FRANÇA, A. C. Y. R; COUTINHO, V. G.; PEXOTO, M. C.; Consumption of Cranberry in the Treatment of Inflammatory Diseases, **Ensaio Cienc. Cienc. Biol. Agrar. Saúde**, v.18, n.1, p. 47-53, 2014.

GANESAN, K.; XU, B.; A critical review on polyphenols and health benefits of black soybeans. **Nutrients**, v. 9, n. 5, p. 455, 2017.

GIL-CHÁVEZ, J. G. et al. Technologies for extraction and production of bioactive compounds to be used as nutraceuticals and food ingredients: an overview. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 12, n. 1, p. 5-23, 2013.

GOŁAŚ, M. et al. Trends in antifungal susceptibility of *Candida* species-one year observation. **Pol J Microbiol**, v. 63, p. 217-222, 2014.

GONÇALVES, J. R. et al. Método Gravimétrico de Determinação de Umidade Comparativo à Determinação por Infravermelho. **Revista Processos Químicos**, v. 8, n. 16, p. 61-64, 2014.

IGNAT, I; VOLF, I; POPA, V. I. Revisão crítica de métodos para caracterização de compostos polifenólicos em frutas e hortaliças. **Química dos Alimentos** , v. 126, n. 4, p. 1821-1835, 2011.

HEINRICH, M., RIMPLER, H., BARRERA, N. A. Fitoterapia indígena de distúrbios gastrointestinais em uma comunidade de Mixe de terras baixas (Oaxaca, México): Avaliação etnofarmacológica. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 36, n. 1, p. 63-80, 1992.

IKIGAI H. A. C.; TAIJI NAKAE, T. A. HARA, Y. B. SHIMAMURA, T. Bactericidal catechins damage the lipid bilayer. **Biochimica et Biophysica Acta**, n.1147,p.132-136, 1993.

JAYAPRAKASAM, B. et al. Terpenoids from Stinking toe (*Hymenaea courbaril*) fruits with cyclooxygenase and lipid peroxidation inhibitory activities. **Food chemistry**, v. 105, n. 2, p. 485-490, 2007.

JOLY, A. B. **Botânica. Introdução à Taxonomia Vegetal.** São Paulo: Companhia Editora Nacional. 1998. 336p. In: CIPRIANO, J. et al. O gênero *Hymenaea* e suas espécies mais importantes. Caderno de Pesquisa, V. 26, n. 2, p. 42-52, 2014.

JUDD, W. S.; CAMPBELL, C. S.; KELLOGG, E. A.; STEVENS, P. F.; DONOGHUE, M. J. **Sistemática Vegetal. Um Enfoque Filogenético.** Porto Alegre: Artmed. 2009. 632p. In: CIPRIANO, J. et al. O gênero *Hymenaea* e suas espécies mais importantes. Caderno de Pesquisa, V. 26, n. 2, p. 42-52, 2014.

KHOO, S. F.; OEHLSCHLAGER, A. C.; OURISSON, G. Structure and stereochemistry of the diterpenes of *Hymenaea courbaril* (Caesalpinoideae) seed pod resin. **Tetrahedron**, v. 29, n. 21, p. 3379-3388, 1973.

KRISHNAIAH, D.; SARBATLY, R.; NITHYANANDAM, R. Uma revisão do potencial antioxidante de espécies de plantas medicinais. **Processamento de alimentos e bioprodutos**, v. 89, n. 3, p. 217-233, 2011.

KUMAR, S.; PANDEY, A. K. Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. **The Scientific World Journal**, v. 2013, 2013

LEE, Y.; LANGENHEIM, J.H. **Systematics of the genus *Hymenaea* L. (Leguminosae Caesalpinoideae, Detarieae).** Los Angeles: University of California Press, Berkeley, v.69, 190p, 1975.

LIMA, C. C.; BENJAMIM, S.C. C.; SANTOS, R. F. S.; Mecanismo de resistência bacteriana frente aos fármacos: uma revisão. **CuidArte, Enferm**, v. 11, n. 1, p. 105-113, 2017.

LORENZI, H.; SOUZA, V.C. **Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de angiospermas da flora brasileira, baseado em APG.** São Paulo: Plantarum. 2005. 639p. In: CIPRIANO, J. et al. O gênero *Hymenaea* e suas espécies mais importantes. Caderno de Pesquisa, V. 26, n. 2, p. 42-52, 2014.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil.** São Paulo: Plantarum. 2000. 352p. In: CIPRIANO, J. et al. O gênero *Hymenaea* e suas espécies mais importantes. Caderno de Pesquisa, V. 26, n. 2, p. 42-52, 2014.

MARANHÃO, C. A. et al. Antitermitic and antioxidant activities of heartwood extracts and main flavonoids of *Hymenaea stigonocarpa* Mart. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 79, p. 9-13, 2013.

MARQUES, G. S. et al. Comparative evaluation of UV/VIS and HPLC analytical methodologies applied for quantification of flavonoids from leaves of *Bauhinia forficata*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 23, n. 1, p. 51-57, 2013.

MAURYA, I. K. et al. Rationally designed transmembrane peptide mimics of the multidrug transporter protein Cdr1 act as antagonists to selectively block drug efflux and chemosensitize azole-resistant clinical isolates of *Candida albicans*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 23, p. 16775-16787, 2013.

MARTINEZ,M. et al. Mecanismos heterogêneos de resistência a azóis em isolados clínicos de *Candida albicans* de um paciente infectado pelo HIV em terapia contínua com fluconazol para candidíase orofaríngea. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy** , v. 49, n. 3, p. 515-524, 2002.

MELLO-PEIXOTO, E.C.; et al. Antioxidant activity and phenol content and flavonoids total of the *Hymenaea stignocarpa* Mart and *Hymenaea courbaril* L. **Planta Medica**, v. 79, p. PF7, 2013.

MENSOR, L.L.; et al. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method, **Phytotherapy Research** 15, 127–130, 2001.

MIGLIATO, K. F. et al. Quality control of *Syzygium cumini* (L.) Skeels fruits. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 1, p. 94-101, 2007.

MOON, J. K.; SHIBAMOTO T.; Ensaios antioxidantes para componentes vegetais e alimentares. **Jornal de química agrícola e alimentar** , v. 57, n. 5, p. 1655-1666, 2009. In: LEÃO, Daniela Pereira. Avaliação comparativa do potencial de farelo de trigo comercial e pericarpo de queijo como substratos na produção de fibras com capacidade antioxidante. 2013.

MONTEIRO, A. F.; et al. Estudo químico e avaliação do potencial efeito biológico das folhas e flores de *Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne (Fabaceae). **Dissertação de Mestrado – Universidade Federal de Goiás – Catalão**, 2014.

MONTEIRO, A. F.; et al. Structure and absolute configuration of diterpenoids from *Hymenaea stigonocarpa*. **Journal of natural products**, v. 78, n. 6, p. 1451-1455, 2015.

MORAES P. R.; et al. Treatment of goat mastitis experimentally induced by *Staphylococcus aureus* using a formulation containing *Hymenaea martiana* extract. **Small Ruminant Research**, v. 130, p. 229-235, 2015.

NICOLETTI, M. HPTLC fingerprint: a modern approach for the analytical determination of botanicals. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 21, n. 5, p. 818-823, 2011.

NOGUEIRA, R. T. et al. Clerodane-type diterpenes from the seed pods of *Hymenaea courbaril* var. *stigonocarpa*. **Phytochemistry**, v. 58, n. 8, p. 1153-1157, 2001.

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.

OLIVEIRA, F. G. S. et al. Chapter 12 - The Genus *Hymenaea* (Fabaceae): A Chemical and Pharmacological Review, In **Studies in Natural Products Chemistry**, Elsevier. V. 58, 2018.

OLIVEIRA, G. L. S. Determinação da capacidade antioxidante de produtos naturais in vitro pelo método do DPPH•: estudo de revisão. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 17, n. 1, p. 36-44, 2015.

OLIVEIRA, V. B. et al. Efeito de diferentes técnicas extrativas no rendimento, atividade antioxidante, doseamentos totais e no perfil por CLAE-DAD de *Dicksonia sellowiana* (presl.). Hook, dicksoniaceae. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 18, n. 1, p. 230-239, 2016.

OMAIRA et al. Perfil lipídico de las gomas de semilla de *Leucaena leucocephala* e *Hymenaea courbaril*. **Ciencia**, v. 19, n. 4, 2011.

ORSI, P. R.; SEITO, L. N.; DI STASI, L. C. *Hymenaea stigonocarpa* 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, n. 1, p. 380-385, 2014.

PACKER, L.; HIRAMATSU, M.; YOSHIKAW, T. **Suplementos alimentares antioxidantes na saúde humana** . Elsevier, 1999.

PAIVA, J. A. et al. *Streptococcus agalactiae* em gestantes da cidade de Campinas-SP. **CuidArte, Enferm**, v. 11, n. 2, p. 198-202, 2017.

PÉREZ-JIMÉNEZ, J. et al. Updated methodology to determine antioxidant capacity in plant foods, oils and beverages: Extraction, measurement and expression of results. **Food Research International**, v. 41, n. 3, p. 274-285, 2008.

PESTANA, L.T.C. **Estudo taxonômico de *Hymenea* L.: complexo *H. courbaril*, *H. martiana* e *H. stigonocarpa* (Fabaceae: Caesalpinoidea: Detarieae)**. 2010, Dissertação (Programa de Pós-graduação em Biologia Vegetal – Mestrado) Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, UFMS, 2010.

RAHALISON, L. et al. Triagem para atividade antifúngica de plantas panamenhas. **Revista Internacional de Farmacognosia** , v. 31, n. 1, p. 68-76, 1993.

RAMOS, R. T. M., BEZERRA, I. C. F.; FERREIRA, M. R. A., SOARES, L. A. L. Spectrophotometric Quantification of Flavonoids in Herbal Material, Crude Extract, and Fractions from Leaves of *Eugenia uniflora* Linn. **Pharmacog Res.** 9 (3): 253-260, 2017.

SAIT, S, et al. HPLC-UV/DAD and ESI-MSⁿ analysis of flavonoids and antioxidant activity of an Algerian medicinal plant: *Paronychia argentea* Lam..**Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 111, p. 231-240, 2015

- SASAKI, K. et al. High-performance liquid chromatographic purification of oligomeric procyanidins, trimers up to nonamers, derived from the bark of Jatoba (*Hymenaea courbaril*). **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 73, n. 6, p. 1274-1279, 2009.
- SHIRAHIGUE, L. D.; et al. Wine industry residue as antioxidant in cooked chicken meat. **International journal of food science & technology**, v. 45, n. 5, p. 863-870, 2010.
- SILVA, M. E. G. C. et al. 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.
- SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia:** Do produto natural ao medicamento. Porto Alegre. Artmed, 2017.
- SNYDER, M. L.; RITCHIE, J. C. Quantification of busulfan in plasma using liquid chromatography electrospray tandem mass spectrometry (HPLC-ESI-MS/MS). In: **Clinical Applications of Mass Spectrometry**. Humana Press, 2010.
- SOARES, L.A.L.; FARIAS, M. R. Qualidade de insumos farmacêuticos ativos de origem natural. Em: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia:** Do produto natural ao medicamento. Porto Alegre. Artmed, 2017. p. 83-106.
- SOUZA, de, A. C. M. **Potencial antifúngico de extratos de *Hymenaea martiana*.** Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Goiás, 2008.
- SOUZA, C. N. et al. Antimicrobial activity of medicinal plants of the brazilian cerrado front of isolated bacteria of sheep with mastites. **Unimontes Científica**. Monte Claros, V. 19, n.2 2017.
- SOUZA, I. M.; FUNCH, L. S.; DE QUEIROZ, L. P.; Morphological analyses suggest a new taxonomic circumscription for *Hymenaea courbaril* L. (Leguminosae, Caesalpinoideae), **PhytoKeys**, n. 38, p.101–118, 2014.
- SOUZA, M. P. et al. Caracterização química e avaliação do potencial antioxidante dos frutos mari-mari (*Cassia leiandra*), pajurá (*Couepia bracteosa*) e pitomba (*Talisia esculenta*). 2016.
- SOUZA, V.C.; LORENZI, H. Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II. Nova Odessa, **Instituto Plantarum**. 2005
- TIWARI, P. et al. Phytochemical screening and extraction: a review. **Internationale pharmaceutica sciencia**, v. 1, n. 1, p. 98-106, 2011.
- VAN DEN BERG, R. et al. Applicability of an improved Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay for evaluation of antioxidant capacity measurements of mixtures. **Food Chemistry**, v. 66, n. 4, p. 511-517, 1999.

- VELASCO, M. V. R. et al. Associação da rutina com p-metoxicinamato de octila e benzofenona-3: avaliação in vitro da eficácia fotoprotetora por espectrofotometria de refletância. **Lat. Am. J. Pharm.**, v. 27, n. 1, p. 23-27, 2008.
- VENCATO, S. B. et al. avaliação do perfil fitoquímico e potencial antioxidante do extrato aquoso de *Hymenaea courbaril*. **Revista de Iniciação Científica da ULBRA**, n. 14, 2016.
- VOLP, A. C. P.; RENHE, I. R. P.; STRINGUETA, P. C. Pigmentos naturais bioativos. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v. 20, n. 1, p. 157-166, 2009.
- WAGNER, H.; BLADT, S. **Plant Drug Analysis**. A Thin Layer Chromatography. 2. ed. Berlim:Springer, 1996.
- WOJCIECHOWSKI, M.F.; LAVIN, M. SANDERSON, M. J. A phylogeny of legumes (Leguminosae) based on analysis of the plastid matk gene resolves many well-supported subclades within the family. **American Journal of Botany**, v. 91, n. 11, p. 1846-1862, 2004.
- WYREPKOWSKI, C. C. et al. C.Characterization and quantification of the compounds of the ethanolic extract from *Caesalpinia ferrea* stem bark and evaluation of their mutagenic activity. **Molecules**, v. 19, n. 10, p. 16039-16057, 2014.

ANEXO 1



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Prospecção fitoquímica, antimicrobiana e antioxidante dos extratos e frações enriquecidas das cascas, folhas e frutos de *Hymenaea eriogyne* Benth.

Pesquisador: Sarah Luanne Silva

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 99918018.6.0000.5208

Instituição Proponente: CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.043.508

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RECIFE, 28 de Novembro de 2018

Assinado por:

Gisele Cristina Sena da Silva Pinho
(Coordenador(a))

ANEXO 2

Artigo aceito para publicação na Revista **Natural Product Research (JCR 1.99)**

Phytochemical analysis and evaluation of the antimicrobial and antioxidant activities of extracts and fractions of *Hymenaea eriogyne* Benth

Sarah Luanne Silva^{1,2}; Camylla Janiele Lucas Tenório¹; Liliane Bezerra de Lima^{1,3}; Thamara Figueiredo Procópio⁴; Maiara Celine de Moura⁴; Thiago Henrique Napoleão⁴; Magda Rhayanny Assunção Ferreira^{1,3}; Luiz Alberto Lira Soares^{1,2,3}

¹ Laboratory of Pharmacognosy, Department of Pharmaceutical Sciences, Federal University of Pernambuco, Brazil

² Postgraduate Program in Therapeutic Innovation, Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil

³ Postgraduate Program in Pharmaceutical Sciences, Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil

⁴ Biochemical Department, Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.

*Corresponding author:

Prof. Dr. Luiz A. L. Soares