



UNIVERSIDADE FEDERAL DO OESTE DO PARÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA, PÓS-GRADUAÇÃO E INOVAÇÃO
TECNOLÓGICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO DOUTORADO SOCIEDADE, NATUREZA E
DESENVOLVIMENTO

SARA FREITAS DE SOUSA

ESTUDO FITOQUÍMICO, ANTIOXIDANTE E DA ATIVIDADE BIOLÓGICA
DE CONSTITUINTES DO RESÍDUO MADEIREIRO E DA SEIVA DE *Hymenaea*
courbaril

SANTARÉM/PA
2022

SARA FREITAS DE SOUSA

**ESTUDO FITOQUÍMICO, ANTIOXIDANTE E DA ATIVIDADE BIOLÓGICA
DE CONSTITUINTES DO RESÍDUO MADEIREIRO E DA SEIVA DE *Hymenaea*
*courbaril***

Tese apresentada à Universidade Federal do Oeste do Pará – UFOPA, como parte dos requisitos para obtenção do título Doutora em Ciências Ambientais, junto ao Programa de Pós- Graduação *Stricto Sensu* Doutorado em Sociedade, Natureza e Desenvolvimento. Área de concentração: Recursos Naturais, Biodiversidade e Bioprospecção na Amazônia.

Orientador: Lauro Euclides Soares Barata

Coorientadora: Silvia Katrine Rabelo da Silva

**SANTARÉM/PA
2022**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas – SIBI/UFOPA

- S725e Sousa, Sara Freitas de
Estudo fitoquímico, antioxidante e da atividade biológica de constituintes do resíduo madeireiro e da seiva de *Hymenaea courbaril*. / Sara Freitas de Sousa. – Santarém, 2022.
136 p. : il.
Inclui bibliografias.
- Orientador: Lauro Euclides Soares Barata.
Coorientadora: Silvia Katrine Rabelo da Silva.
Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Oeste do Pará, Pró-Reitoria de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação Tecnológica, Programa de Pós-Graduação Doutorado em Sociedade, Natureza e Desenvolvimento.
1. Jatobá. 2. Flavonóides. 3. Atividade antimicrobiana. I. Barata, Lauro Euclides Soares, *orient.* II. Silva, Silvia Katrine Rabelo da, *coorient.* III. Título.

CDD: 23 ed. 634.974

Bibliotecária - Documentalista: Renata Ferreira – CRB/2 1440

FOLHA DE APROVAÇÃO DE TESE

SARA FREITAS DE SOUSA

**ESTUDO FITOQUÍMICO, ANTIOXIDANTE E DA ATIVIDADE
BIOLÓGICA DE CONSTITUINTES DO RESÍDUO MADEIREIRO E DA
SEIVA DE *Hymenaea courbaril***

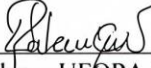
Tese apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Ciências Ambientais, ao Programa de Pós-graduação em Sociedade, Natureza e Desenvolvimento- PPGSND, da Universidade Federal do Oeste do Pará – UFOPA.

Data da defesa: 20/01/2022


Banca Examinadora:



Lauro Euclides Soares Barata – PPGSND/UFOPA (Orientador/Presidente)



Sílvia Katrine Rabelo da Silva – UFOPA (Coorientadora)



Raphael Carlos Ferrer de Santana – UNINASSAU (Membro externo)



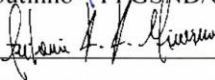
Isabella Cristhina Gonçalves Costa – IFPI (Membro externo)



Dercilio Júnior Verly Lopes - DEPARTMENT OF SUSTAINABLE
BIOPRODUCTS/ MISSISSIPPI STATE UNIVERSITY (Membro externo)



Victor Hugo Pereira Moutinho – PPGSND/UFOPA (Membro interno)



Antônio Humberto Hamad Minervino - PPGSND/UFOPA (Membro interno)

Aos meus pais Edilson Lira de Sousa e Sirley Freitas de Sousa, dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço todos os dias a Deus pelo dom da vida, por me conceder forças para nunca desistir desta caminhada e por colocar pessoas importantes ao longo desses anos de formação.

Agradeço a Universidade Federal do Oeste do Pará (UFOPA), onde iniciei minha vida acadêmica e conheci o quão importante é um cientista para a humanidade.

Ao Programa de Pós-graduação Sociedade, natureza e desenvolvimento (PPGSND) da Universidade Federal do Oeste do Pará (UFOPA), pela grande oportunidade concedida e por viabilizar o meu curso de doutorado. Agradeço imensamente a todos os professores deste programa pelos conhecimentos compartilhados.

A Fundação Amazônia de Amparo a Estudos e Pesquisa (FAPESPA) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

Ao Programa Nacional de Cooperação Acadêmica (PROCAD/CAPES) pela bolsa concedida para a realização do estágio profissional no Instituto de química da Universidade Estadual Paulista, Campus de Araraquara (IQ/UNESP).

Ao Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal do Oeste do Pará (UFOPA) e seus pesquisadores, agradeço pelo apoio e suporte durante esses anos na pesquisa, especialmente ao amigo e técnico José Jeosafá Vieira Júnior, pelo acompanhamento de inúmeros ensaios microbiológicos.

Aos laboratórios de Tecnologia da madeira, Laboratório de Pesquisa & Desenvolvimento de Produtos Naturais Bioativos da UFOPA e seus membros, pelo auxílio na coleta de material e de análises.

Aos profissionais do Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista (IQ/UNESP), professora Dra. Lourdes Campaner dos Santos que me recebeu durante dois meses na cidade de Araraquara (SP), transmitindo o máximo de conhecimento. Ao Dr. Nivaldo Boralle pelos espectros de Ressonância Magnética Nuclear (RMN). Agradeço ainda, a Dra. Ana Zanatta e Dra. Izabella Costa pela disponibilidade, auxílio nas análises químicas e acompanhamento deste trabalho. Vocês foram fundamentais!

Ao Dr. Adilson Sartoratto do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA) da Universidade de Campinas (UNICAMP), pela realização das injeções no equipamento CG-EM.

Ao Professor Dr. Lauro Euclides Soares Barata pelo apoio, conhecimento, incentivo e dedicação a este trabalho e por me mostrar o quão interessante é a área de produtos naturais.

A Professora Dra. Katrine Rabelo pela coorientação deste trabalho, pela amizade e incentivo. Serei sempre grata por me apresentar o mundo da microbiologia.

Aos professores Dr. Victor Moutinho, Dr. Bruno Silva e Dra. Debora Taketa por contribuírem de forma significativa para a realização deste trabalho.

Aos técnicos dos laboratórios Alciene e Anselmo pelo auxílio nesta pesquisa, e pela disponibilidade.

Aos membros da Banca Examinadora, pela participação e contribuições neste trabalho.

Aos meus pais, Edilson Lira e Sirley Sousa, meus irmãos Charles Freitas e Simei Freitas, meu esposo João Victor Ramos, meu cunhado Abmael Laurido, cunhada Solange Sousa, e minhas sobrinhas Cecília, Ester e Sofia. Não há palavras que descrevam o que sinto por vocês, muito obrigada pela força, investimento e por lutarem comigo para que este sonho se concretizasse.

Aos meus avôs, tios (as), primos (as) (família Freitas e família Sousa), sempre serei grata por suas vidas. Passamos por momentos difíceis que nos tornaram ainda mais fortes. Tia Cleidimar Freitas, tio Francisco Sousa e tio Jeová Sousa (*in memoria*) em 2019 nos deixaram, mas nos apegamos no que o apóstolo Paulo nos ensinou “Nós, porém, irmãos, privados da companhia de vocês por breve tempo, em pessoa, mas não no coração, esforçamo-nos ainda mais para vê-los pessoalmente, pela saudade que temos de vocês” (1 Tessalonicenses 2:17).

A todos os colegas e amigos de laboratório, pelo convívio, colaboração e aprendizado, em especial a Bárbara Moura, Amanda Lima, Aline Munchen que compartilhei momentos maravilhosos que guardarei para sempre.

Aos demais amigos Vanessa Mota, Helender Ueno, Gabrielly Bobadilha, Obila Matos, Henrique Silva, Harold Araújo, Juliana Portela e Carla Paxiúba que tornaram essa jornada mais leve, com boas conversas e momentos compartilhados. Gratidão!

As professoras e amigas Kariane Nunes e Gabriella Biachi pela amizade e conhecimento.

A todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação, muito obrigada.

“A menos que modifiquemos a nossa maneira de pensar, não seremos capazes de resolver os problemas causados pela forma como nos acostumamos a ver o mundo”.
(Albert Einstein)

RESUMO

A família Fabaceae possui distribuição cosmopolita, sendo *Hymenaea courbaril* uma das espécies mais importantes devido seu uso múltiplo, potencial etnofarmacológico e farmacológico. Dados estes que conduziram a investigação de sua constituição química e de seus compostos bioativos através da análise fitoquímica e avaliação de atividade antioxidante e antimicrobiana da seiva e do extrato etanólico de resíduos madeireiros de *H. courbaril*. Os resíduos florestais e a seiva foram obtidos da empresa Fortimber florestal, próximo à cidade de Santarém, Pará, Brasil. Para a obtenção do extrato, a serragem foi seca em estufa à 40°C por 96 horas, para posterior extração dos metabólitos secundários com o solvente etanol em aparelho de Soxhlet. Para a análise fitoquímica dos materiais foram utilizadas as técnicas de Cromatografia em Camada Delgada (CCD), Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (CG-EM), Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a um detector de arranjo de fotodiodos (CLAE-DAD), Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a um Espectrômetro de Massas (CLAE-IES-EM/EM), utilizando a abordagem de redes de interações moleculares ou *molecular networking* através da plataforma GNPS (*Global Natural Products Social Molecular Networking*). Adicionalmente foi empregada a técnicas de Ressonância Magnética Nuclear uni e bidimensionais, (1H, 13C, HMBC, HSQC) para a identificação das substâncias isoladas. A atividade antioxidante foi determinada através dos métodos de DPPH e FRAP. A quantificação de flavonóides totais e compostos fenólicos foram obtidos por meio de métodos espectrofotométrico. A atividade antimicrobiana foi avaliada frente a microrganismos de interesse clínico pela técnica de concentração inibitória mínima (CIM). Verificou-se que o extrato etanólico tem maior potencial antioxidante, assim como possui o maior teor de compostos fenólicos e flavonoides quando comparados a seiva. A classe de composto predominante tanto no extrato como na seiva são flavonóides, o que possibilitou a proposta de 16 substâncias, além de derivados taxifolínicos obtidos por meio de correspondência espectral com dados experimentais do GNPS. Através da análise dos espectros de RMN 1D e 2D foi possível identificar as substâncias fustina, taxifolina, 3-metóxi-quercetina e a quercetina. Verifica-se que o extrato etanólico destacou-se em relação a seiva, por apresentar maior atividade antimicrobiana *in vitro*. A substancia taxifolina, isolada por RMN, teve menor potencial biológico, quando comparado com os resultados obtidos do extrato etanólico. A partir destes dados, é possível contribuir para a utilização segura de *H. courbaril*, por populações tradicionais na Amazônia, com vistas à preparação de medicamentos e formulações à base de plantas.

Palavras-chave: Jatobá. Flavonóides. Atividade antimicrobiana.

ABSTRACT

The Fabaceae family is widely distributed which *Hymenaea courbaril* is one of the most important species. Because of its multiple use, ethnopharmacological and pharmacological potential, it is crucial to investigate its chemical constitution and bioactive compounds. In this study, we aimed to perform the phytochemical analysis, antioxidant and antimicrobial activity of the sap and ethanolic extract of *H. courbaril* wood residues. The forest residues and sap were obtained from the Fortimber forestry company, near the city of Santarém, Pará, Brazil. To obtain the extract, the sawdust was dried in an oven at 40°C for 96 hours, for subsequent extraction of secondary metabolites with the solvent ethanol in a Soxhlet apparatus. The following techniques were performed to complete phytochemical analysis: Thin Layer Chromatography (TLC), Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry (GC-MS), High Performance Liquid Chromatography coupled to a photo-diode array detector (HPLC-PDA), High Performance Liquid Chromatography coupled to a Mass Spectrometer (HPLC-ESI-MS/MS), using the molecular interaction networks approach or molecular networking through the GNPS (Global Natural Products Social Molecular Networking) platform. One and two dimensional Nuclear Magnetic Resonance technique, (¹H, ¹³C, HMBC, HSQC) was used for the identification of the isolated substances. The antioxidant activity (DPPH and FRAP), quantification of total flavonoids, phenolic compounds contents were done by spectrophotometric methods. The antimicrobial activity of both extract and sap of *H. courbaril* were performed against microorganisms of clinical interest by the minimum inhibitory concentration (MIC) technique. The ethanolic extract has a higher antioxidant potential and has the highest content of phenolic compounds and flavonoids when compared to the sap. The predominant compound class in both the extract and the sap are flavonoids, which enabled identification of 16 substances including taxifolin derivatives through spectral correspondence with experimental data from GNPS. Through analysis of the 1D and 2D NMR spectra it was possible to identify the substances fustin, taxifolin, 3-methoxy-quercetin and quercetin. The ethanolic extract stood out in relation to the sap by showing greater antimicrobial activity in vitro. The substance taxifolin, isolated by NMR, had less biological potential when compared to the results obtained from the ethanolic extract. From these data, it is possible to contribute to the safe use of *H. courbaril*, by traditional populations in the Amazon, for the preparation of herbal medicines and formulations.

Keywords: Jatoba. Flavonoids. Antimicrobial activity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Estruturas de terpenos encontrados no gênero <i>H. palustris</i>	26/27
Figura 2 - Estrutura da lignana Palstatina encontrada em <i>H. palustris</i>	27
Figura 3 - Flavonóides de <i>H. martiana</i>	28/29
Figura 4 - Núcleo fundamental dos flavonóides com respectiva numeração dos carbonos.....	31
Figura 5 – Esqueleto básico das principais classes de flavonóides.....	32
Figura 6 - Estruturas de flavonóides encontrados em <i>H. courbaril</i>	33
Figura 7 - Estrutura do isopreno.....	33
Figura 8 - Estruturas dos diterpenos encontrados em <i>H. courbaril</i> var. <i>stilbocarpa</i>	34
Figura 9 - Estrutura do principal constituinte (fisetina) da seiva de <i>H. courbaril</i>	35
Figura 10 - Estruturas dos flavonóides encontrados em <i>H. courbaril</i>	35
Figura 11 - Sistema de Cromatografia Líquida de Alto Eficiência (CLAE).....	39
Figura 12 - Componentes de um espectrômetro de massa.....	40
Figura 13 - Mapa de localização da região de coleta das amostras de <i>H. courbaril</i>	45
Figura 14 – Serragem obtida a partir do desdobro do resíduo madeireiro de <i>H. courbaril</i>	46
Figura 15 – Extrato etanólico seco de <i>H. courbaril</i>	47
Figura 16 – Seiva de <i>H. courbaril in natura</i> (A) e após concentração em rotaevaporador rotativo (B).....	48
Figura 17 - Fluxograma da partição líquido-líquido do extrato etanólico de <i>H. courbaril</i>	49
Figura 18 - Partição líquido-líquido do extrato etanólico do resíduo de <i>H. courbaril</i> com solventes de diferentes polaridades (hexano, diclorometano e acetato de etila).....	50
Figura 19 – Técnica de cromatografia líquida de média pressão (MPLC).....	50
Figura 20 – Cromatógrafo líquido semi-preparativo de gradiente binário, acoplado a um detector de arranjo de fotodiodos (PAD).....	51
Figura 21- Fluxograma de isolamento dos compostos no extrato etanólico de Jatobá.....	52
Figura 22 - Cromatograma do extrato etanólico bruto de <i>H. courbaril</i>	63
Figura 23 - Cromatograma da seiva de <i>H. courbaril</i>	64
Figura 24 – Representação da banda I e II dos flavonóides.....	64
Figura 25 - Substância HC-4.1 isolada do extrato etanólico de <i>H. courbaril</i>	65
Figura 26 - Principais correlações observadas no mapa de contorno HMBC da substância HC-4.1.....	67
Figura 27 - Espectro de RMN de ¹ H da substância HC-4.1 (CD ₃ OD; 600 MHz).....	68

Figura 28 - Espectro de DEPTQ da substância HC- 4.1 (CD ₃ OD; 150 MHz).....	69
Figura 29 - Mapa de contorno HSQC de HC-4.1 (CD ₃ OD; 600 e 150 MHz).....	70
Figura 30 - Mapa de contorno HMBC de HC-4.1 (CD ₃ OD; 600 e 150 MHz).....	71
Figura 31 - Substância HC-4.4 isolada do extrato etanólico de <i>H. courbaril</i>	72
Figura 32 - Principais correlações observadas no mapa de contorno HMBC da substância HC-4.4.....	74
Figura 33 - Espectro de RMN de ¹ H da substância HC-4.4 (CD ₃ OD; 600 MHz).....	75
Figura 34- Espectro de DEPTQ da substância HC-4.4 (CD ₃ OD; 150 MHz).....	76
Figura 35 - Mapa de contorno HSQC da substância HC-4.4 (CD ₃ OD; 600 e 150 MHz).....	77
Figura 36 - Mapa de contorno HMBC da substância HC-4.4 (CD ₃ OD; 600 e 150 MHz).....	78
Figura 37 - Substância HC-13.4 isolada do extrato etanólico de <i>H. courbaril</i>	79
Figura 38 - Espectro de RMN de ¹ H da substância HC-13.4 (DMSO-d ₆ ; 600 MHz).....	81
Figura 39 - Espectro de DEPTQ da substância HC-13.4 (DMSO-d ₆ ; 150 MHz).....	82
Figura 40 - Substância HC-13.5 isolada do extrato etanólico de <i>H. courbaril</i>	83
Figura 41 - Principais correlações observadas no mapa de contorno HMBC da substância HC-13.5.....	85
Figura 42 - - Espectro de RMN de ¹ H da substância HC-13.5 (CD ₃ OD; 600 MHz).....	86
Figura 43 - Mapa de contorno HSQC da substância HC-13.5 (CD ₃ OD; 600 e 150 MHz).....	87
Figura 44 - Mapa de contorno HMBC da substância HC-13.5 (CD ₃ OD; 600 e 150 MHz)....	88
Figura 45 - Perfil do extrato etanólico e da seiva de <i>H. courbaril</i> (Jatobá).....	89
Figura 46 - Cluster 1 dos flavonóides da rede de interação molecular (<i>Molecular Networking</i>) do extrato etanólico e seiva de <i>H. courbaril</i> no modo negativo.....	92
Figura 47 - Espectro de massas por CLAE-IES-EM/EM e suas respectivas fragmentações no modo de ionização negativo, observados no extrato etanólico de <i>H. courbaril</i> , correspondente ao íon molecular <i>m/z</i> 303 (taxifolina).....	92
Figura 48 - Espectro de massas por CLAE-IES-EM/EM e suas respectivas fragmentações no modo de ionização negativo, observado no extrato etanólico e seiva de <i>H. courbaril</i> , correspondente ao íon molecular <i>m/z</i> 303 (3- <i>O</i> -metil-(<i>epi</i>) catequina).....	93
Figura 49- Espectro de massas por CLAE-IES-EM/EM e suas respectivas fragmentações no modo de ionização negativo, observado no extrato etanólico e seiva de <i>H. courbaril</i> , correspondente ao íon molecular <i>m/z</i> 301 (quercetina).....	93
Figura 50 - Cluster 2 dos ácidos fenólicos da rede de interação molecular (<i>Molecular Networking</i>) do extrato etanólico e seiva de <i>H. courbaril</i> no modo negativo.....	94

Figura 51- Espectro de massas por CLAE-IES-EM/EM e suas respectivas fragmentações no modo de ionização negativo, observados no extrato etanólico e seiva de <i>H. courbaril</i> , correspondente ao íon molecular m/z 179 (Ácido cafeico).....	94
Figura 52 - Espectro de massas por CLAE-IES-EM/EM e suas respectivas fragmentações no modo de ionização negativo, observados no extrato etanólico e seiva de <i>H. courbaril</i> , correspondente ao íon molecular m/z 193 (Ácido ferúlico).....	95
Figura 53 - Cluster 3 de flavonóides glicosilados da rede de interação molecular (<i>Molecular Networking</i>) do extrato etanólico e seiva de <i>H. courbaril</i> no modo negativo.....	95
Figura 54- Espectro de massas por CLAE-IES-EM/EM e suas respectivas fragmentações no modo de ionização negativo, observado no extrato etanólico de <i>H. courbaril</i> , correspondente ao íon molecular m/z 431 (Kaempferol-7- <i>O</i> - deoxihexose).....	96
Figura 55 - Espectro de massas por CLAE-IES-EM/EM e suas respectivas fragmentações no modo de ionização negativo, observado no extrato etanólico e seiva de <i>H. courbaril</i> , correspondente ao íon molecular m/z 447 (Quercetina-3- <i>O</i> - deoxihexose (quercitrina).....	96
Figura 56 - Cluster 4 dos flavonóides da rede de interação molecular (<i>Molecular Networking</i>) do extrato etanólico e seiva de <i>H. courbaril</i> no modo negativo.....	97
Figura 57 - Espectro de massas por CLAE-IES-EM/EM e suas respectivas fragmentações no modo de ionização negativo, observados nos extratos etanólico e seiva de <i>H. courbaril</i> , correspondente ao íon molecular m/z 299 (gliricidina).....	97
Figura 58 - Espectro de massas por CLAE-IES-EM/EM e suas respectivas fragmentações no modo de ionização negativo, observado no extrato etanólico e seiva de <i>H. courbaril</i> , correspondente ao íon molecular m/z 315 (isoramnetina).....	98
Figura 59 - Cluster 5 dos flavonóis da rede de interação molecular (<i>Molecular Networking</i>) do extrato etanólico e seiva de <i>H. courbaril</i> no modo negativo.....	98
Figura 60 - Espectro de massas por CLAE-IES-EM/EM e suas respectivas fragmentações no modo de ionização negativo, observado no extrato etanólico e seiva de <i>H. courbaril</i> , correspondente ao íon molecular m/z 269 (genisteína).....	99
Figura 61 - Espectro de massas por CLAE-IES-EM/EM e suas respectivas fragmentações no modo de ionização negativo, observado no extrato etanólico de <i>H. courbaril</i> , correspondente ao íon molecular m/z 285 (kaempferol).....	99
Figura 62 - Espectro de massas por CLAE-IES-EM/EM e suas respectivas fragmentações no modo de ionização negativo, observado no extrato etanólico e seiva de <i>H. courbaril</i> , correspondente ao íon molecular m/z 289 (Catequina).....	100

Figura 63 - Nodo individual da rede de interação molecular (<i>Molecular Networking</i>) do extrato etanólico e seiva de <i>H. courbaril</i> no modo negativo.....	100
Figura 64 - Espectro de massas por CLAE-IES-EM/EM e suas respectivas fragmentações no modo de ionização negativo, observados no extrato etanólico e seiva de <i>H. courbaril</i> , correspondente ao íon molecular m/z 359 (ácido rosmarínico).....	101
Figura 65 - Cluster 6 dos flavonóides glicosilados da rede de interação molecular (<i>Molecular Networking</i>) do extratos etanólico e seiva de <i>H. courbaril</i> no modo negativo.....	102
Figura 66 - Espectro de massas por CLAE-IES-EM/EM e suas respectivas fragmentações no modo de ionização negativo, observados no extrato etanólico e seiva de <i>H. courbaril</i> , correspondente ao íon molecular m/z 433 (engeletina).....	102
Figura 67 - - Espectro de massas por CLAE-IES-EM/EM e suas respectivas fragmentações no modo de ionização negativo, observados no extrato etanólico e seiva de <i>H. courbaril</i> , correspondente ao íon molecular m/z 449 (Taxifolina 3- <i>O</i> -rhamnosideo (astilbina).....	103
Figura 68 - Cluster 7 de derivados da taxifolina da rede de interação molecular (<i>Molecular Networking</i>) do extrato etanólico e seiva de <i>H. courbaril</i> no modo negativo.....	103
Figura 69 - Substâncias encontradas no extrato etanólico bruto de <i>H. courbaril</i>	104
Figura 70 - Estrutura das substâncias encontradas na fração hexânica de <i>H. courbaril</i>	106
Figura 71- Avaliação da atividade antioxidante pelo método de DPPH (A), fenólicos totais (B) e flavonóides totais (C) do extrato etanólico de <i>H. courbaril</i>	107
Figura 72 - CIM da taxifolina frente a patógenos de interesse clínico.....	115

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Microrganismos utilizados no ensaio biológico.....	59
Tabela 2 - Rendimento médio das frações obtidas do extrato etanólico de <i>H. courbaril</i>	62
Tabela 3 - Dados de RMN de ^1H , ^{13}C , HMBC (CD_3OD , 600 e 150 MHz) de HC- 4.1 (δ em ppm e J em Hz).....	66
Tabela 4 - Dados de RMN de ^1H , ^{13}C , HMBC (CD_3OD , 600 e 150 MHz) de HC-4.4 (δ em ppm e J em Hz).....	73
Tabela 5 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C ($\text{DMSO-}d_6$, 600 e 150 MHz) de HC-13.4 (δ em ppm e J em Hz).....	80
Tabela 6 - Dados de RMN de ^1H , ^{13}C , HMBC (CD_3OD , 600 e 150 MHz) de HC-13.5	84
Tabela 7 - Compostos propostos em <i>H. courbaril</i> por dados CLAE-EM/EM.....	90
Tabela 8 - Composição química da fração hexânica de <i>H. courbaril</i> analisada por CG-EM.....	105
Tabela 9 - Atividade antioxidante do extrato etanólico de <i>H. courbaril</i> determinada pelo método de DPPH e FRAP.	107
Tabela 10 – Determinação do teor de fenólicos totais e flavonóides totais do extrato etanólico de <i>H. courbaril</i>	108
Tabela 11 – Antibiograma obtido para os microrganismos testados.....	109/110
Tabela 12 - Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) do extrato etanólico e da seiva do resíduo de <i>H. courbaril</i> contra os microrganismos testados.....	111

LISTA DE ABREVIATURAS

AlCl ₃	Cloreto de alumínio
ANOVA	Análise de variância
BD	Batata-Dextrose
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CID	Dissociação induzida por colisão
CG-EM	Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massa
CFM	Concentração Fungicida/Bactericida Mínima
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLAE-DAD	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detector por arranjo de diodos
CIM	Concentração inibitória mínima
COSY	Correlation Spectroscopy
CPQBA	Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazina
ERT	Equivalentes a Rutina
ESI	<i>Electrospray ionization</i> (Ionização por <i>electrospray</i>)
FRAP	Redução do Ferro
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
GNPS	<i>Global Natural Products Social Molecular Networking</i>
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Coherence</i>
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência)
HPLC-PAD	<i>High Performance Liquid Chromatography - Photodiode Array Detector</i> (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada com Detector de Arranjo de Fotodiodos)
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>
<i>m/z</i>	Relação massa carga.
MH	Mueller Hinton
MMA	Ministério do Meio Ambiente
MoNA	Massbank of North American
MPLC	<i>Medium Pressure Liquid Chromatography</i> (Cromatografia Líquida de Media Pressão)
MS	<i>Mass Spectrometry</i> (Espectrometria de Massas)

MS2 –	MS/MS
Na ₂ SO ₄	Sulfato de sódio
NaOH	Hidróxido de Sódio
PAD	<i>Photodiode Array Detector</i> (Detector com Arranjo de Fotodiodos)
PPGSND	Programa de Pós-Graduação em Sociedade, Natureza e Desenvolvimento
P&DBio	Laboratório de Pesquisa & Desenvolvimento de Produtos Naturais Bioativos
PPM	Partes por milhão
UFOPA	Universidade Federal do Oeste do Pará
RMN	Ressonância magnética nuclear
SEMAS	Secretaria Estadual de Meio Ambiente e Sustentabilidade do Pará
SFB	Serviço Florestal Brasileiro
SISFLORA	Sistema de Comercialização e Transporte de Produtos Florestais
SPE	<i>Solid Fase Extraction</i> (Extração em fase sólida).
TMSD	Trimetilsilil-diazometano
TOCSY	<i>Total Correlation Spectroscopy</i>
UFC	Unidade formadora de colônia
UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas
UV	Ultravioleta

LISTA DE SIGLAS

cm	Centímetros
d	Dupleto
dd	Duplo dubleto
Da	Daltons
g	Gramas
<i>J</i>	Constante de acoplamento
h	Horas
ha	Hectares
HC	<i>Hymenaea courbaril</i>
Hz	Hertz
L	Litros
L / min.	Litros por minuto
nm	Nanômetro
m	Metros
mg	Miligrama
mg.mL ⁻¹	Miligramas por mililitro
ml	Mililitro
MHz	MegaHertz
MM	Massa molecular
mm	Milímetros
m ³	Metro cúbico
ppm	Partes por milhão
R\$	Reais
Rt	Retenção
S	Simpleto
v/v	Volume/volume
V	Volts
°C	Graus Celsius
%	Porcentagem
μL	Microlitros
μg.mL ⁻¹	Microgramas por mililitro
δ	Deslocamento químico

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	24
2.1 Produção de resíduos madeireiros	24
2.2 Família fabaceae	25
2.2.1 Gênero <i>Hymenaea</i>	25
2.2.1.1 <i>Hymenaea courbaril</i>	29
2.3 Seiva do jatobá	34
2.4 Atividade antioxidante	36
2.5 Resistência microbiana	36
2.6 Análise química de produtos naturais	38
2.6.1 Cromatografia líquida de alta performance (CLAE)	38
2.6.2 Análise de dados espectrais por meio de redes moleculares - <i>Global Natural Products Social Molecular Networking</i>	41
2.6.3 Ressonância Magnética Nuclear - RMN	41
3 OBJETIVO	43
3.1 Objetivo geral	43
3.2 Objetivos específicos	43
4 MATERIAL E MÉTODOS	44
4.1 Materias, reagentes e soluções	44
4.2 Caracterização da área de estudo	44
4.3 Coleta do material vegetal, obtenção do extrato e da seiva de <i>H. courbaril</i>	45
4.3.1 Resíduo madeireiro de <i>H. courbaril</i>	45
4.3.1.1 Obtenção do extrato etanólico do resíduo madeireiro de jatobá	46
4.3.2 Seiva de <i>H. courbaril</i>	47
4.4 Partição líquido-líquido do extrato etanólico do resíduo madeireiro de <i>h. courbaril</i>	48
4.5 Fracionamento do extrato etanólico do residuo madeireiro de <i>H. courbaril</i>	50
4.6 Análise e identificação das substâncias extraídas	53
4.7 Análise do extrato etanólico e da seiva por clae-ies-em/em	53
4.8 Análise de dados por rede molecular (<i>molecular networking - gnps</i>)	54
4.9 Análise do extrato etanólico por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (cg-em)	55
4.9.1 Derivatização dos extratos.....	56
4.10 Avaliação do potencial antioxidante, fenólicos e flavonóides totais de <i>H. courbaril</i> ..	56
.....	56

4.10.1 Determinação da atividade antioxidante.....	56
4.10.2 Quantificação de fenólicos totais.....	57
4.10.3 Quantificação de flavonóides totais.....	58
4.11 Atividade antimicrobiana	58
4.11.1 Cepas utilizadas	58
4.11.2 Concentração inibitória mínima (CIM)	59
4.11.3 Antibiograma	60
4.12 Análise estatística.....	60
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	62
5.1 Rendimento do extrato etanólico e frações.....	62
5.2 Estudo químico do extrato etanólico e da seiva de <i>H. courbaril</i>.....	62
5.2.1 Cromatografia em Camada delgada (CCD).....	62
5.2.3 Identificação dos compostos isolados dos extrato etanólico do resíduos madeireiro de <i>H. courbaril</i>	65
5.2.3.1 Identificação estrutural da substância HC-4.1	65
5.2.3.2 Identificação estrutural da substância HC-4.4	72
5.2.3.3 Identificação estrutural da substância HC-13.4	79
5.2.3.4 Identificação estrutural da substância HC-13.5	83
5.2.4 Análises de Cromatografia líquida de alta eficiência por espectrometria de massas (CLAE-EM).....	89
5.2.5 Análise das redes de interações moleculares (Molecular Networking – GNPS)	90
5.2.6 Compostos orgânicos voláteis presentes no extrato etanólico de <i>H. courbaril</i>	104
5.2.6.1 Análise do extrato bruto	104
5.2.6.2 Substâncias encontradas nas frações obtidas pela partição líquido-líquido.	104
5.3 Atividade antioxidante, fenóis e flavonóides totais.....	106
5.4 Ação antimicrobiana do extrato e da seiva de <i>h. courbaril</i>.....	108
5.4.1 Antibiograma	108
5.4.2 Ação fungicida e bactericida do extrato etanólico e da seiva de <i>H. courbaril</i>	110
5.4.3 Ação bacteriostática da Taxifolina	114
6 CONCLUSÃO.....	117
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	119

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é reconhecido por sua diversidade biológica, sendo que esta biodiversidade, em sua grande maioria, concentra-se na Amazônia, abrigando espécies que só ocorrem nesta região, colocando-o na primeira posição do ranking dos países megadiversos (MITTERMEIER; ROBLES; MITTERMEIER, 1997; MENIN, 2005; GIAM et al., 2010; LEUZINGER et al., 2019).

Relatórios emitidos pelo Serviço Florestal Brasileiro (SFB) em 2019, enfatizam que neste bioma, o volume madeireiro é de 109.404 milhões de metros cúbicos, o que representa 92,8% do volume total de madeira dos biomas brasileiros. Além disso, a quantidade de biomassa e carbono estimados na região Amazônica é de 96.046 milhões de toneladas e 47.354 milhões de toneladas, respectivamente (SFB, 2019).

Aproximadamente 40-50% das operações florestais correspondem a resíduos madeireiros, o que constitui um problema ambiental e uma grande oportunidade para o uso desse material. Na Amazônia legal, o rendimento operacional é em média de 41%, que se deve principalmente à falta de investimentos em equipamentos e capacitação. Além disso, com o rendimento operacional tão baixo, a produção desses resíduos se torna um grande impedimento ao desenvolvimento sustentável das indústrias, causando assim, diversos problemas socioambientais (ANDRADE et al., 2013; RAMOS et al., 2017).

Se considerado o relatório consolidado com os dados emitidos pelo Sistema de Comercialização e Transporte de Produtos Florestais – SISFLORA (<http://monitoramento.sembraspa.gov.br/sisflora/relatorios.html>), sobre beneficiamento e comércio de produtos da madeira por espécie florestal no estado do Pará, entre os anos de 2006 a 2016, verifica-se que nove espécies são citadas como as principais comercializadas na guia florestal (GF3) utilizada para transporte de diferentes tipos de produtos florestais destinados a diferentes comércios (estadual ou de exportação), dentre elas temos o Jatobá (*H. courbaril* L.), sendo esta madeira importante para setores como moveleiro, construção civil e fabricação de laminados. Possui ainda valiosa resina, frutos comestíveis e cascas taníferas (espessura de até 3 centímetros) e tem potencial melífero, paisagístico urbano, além de ser uma excelente espécie para ser usada na recuperação de áreas degradadas (KLITZKE et al., 2008; LORENZI, 2008; COSTA et al., 2011).

Em se tratando de Jatobá, por exemplo, o rendimento médio é de aproximadamente 45-55%, e o restante é enquadrado na categoria de subprodutos como pó, serragem, aparas,

cascas e pontas, sendo de suma importância a gestão de resíduos dessa espécie (CHITECULO et al., 2018).

Com isso, sabe-se que na Amazônia há abundância de matérias primas com potencial econômico e ambiental, especialmente no que tange a sua diversidade vegetal, permitindo a descoberta de novas atividades biológicas com potencial e aplicação biotecnológica (BITTENCOURT; RIOS, 2013).

O Jatobá é reconhecido por seu potencial antifúngico, antibacteriano, inseticida, larvicida ou antitermítico de produtos e subprodutos, que incluem desde cascas, flores, sementes, frutos e súber da madeira e seus resíduos, sendo essas atividades associadas a sua composição química, constituindo assim, uma importante fonte de compostos químicos oriundos do seu metabolismo secundário, tornando-se uma alternativa e oportunidade para diversos setores da indústria farmacêutica, biotecnológica, agroindústria, dentre outras (LORENZI; MATOS, 2002; BONIFACE; FERREIRA; KAISER, 2017).

Este gênero é de grande potencial medicinal e é utilizado pela população na preparação de infusões e decocções para o tratamento de doenças como anemia, doenças renais, feridas, asma, cólicas intestinais e estomacais, cistite, tosses, gripe e bronquite (RIZZINI; MORS, 1995; GAZZANEO; LUCENA; ALBUQUERQUE, 2005; CARTAXO; ALMEIDA SOUZA; ALBUQUERQUE, 2010). Estudos farmacológicos também revelam atividades anestésica, analgésica e anti-inflamatória, antibacteriana, antifúngica, moluscocidas, miorelaxante, antiespasmódicas e antioxidante desta planta (LORENZI; MATOS, 2002; BEZERRA et al., 2013; CIPRIANO et al., 2014; COSTA et al., 2014).

As principais classes de compostos do Jatobá são os flavonóides, sendo possivelmente responsáveis pelas características referentes as atividades farmacológicas e biológicas. No extrato obtido da casca de *H. courbaril* está registrada a presença de polifenóis como flavonóides e taninos, assim como antocianinas, triterpenóides e saponinas (BEZERRA et al., 2013).

Do fuste é extraída a seiva, rica em compostos químicos como os flavonoides. Costa et al. (2014) detectaram as substâncias fisetina, fisetinidol, fustina, 3-O-metil-2,3- trans- fustina e taxifolina. Costa et al. (2019) ao investigarem o potencial de multiprodutos de *H. courbaril* L. em uma área de manejo comunitário na Floresta Nacional do Tapajós no estado do Pará, verificaram que o potencial de produção da seiva de *H. courbaril* é de aproximadamente de 373,12 litros.100 ha⁻¹, sendo que o preço médio na cidade de Santarém/PA é de aproximadamente R\$ 15,00 litro⁻¹ (5.596,80 R\$.100 ha⁻¹), sendo que estes autores enfatizam

sobre a necessidade de terem maiores investimentos para impulsionar a comercialização deste produto.

Os flavonóides são polifenólicos com diferentes atividades biológicas já descritas (FALCONE FERREYRA; RIUS; CASATI, 2012; MARANHÃO et al., 2013), porém há uma limitação quanto suas aplicações farmacêuticas devido sua baixa solubilidade, estabilidade e biodisponibilidade, isso se deve principalmente ao seu caráter hidrofóbico (THUAN et al., 2017).

Entre as principais técnicas analíticas utilizadas para detectar substâncias em uma amostra temos à espectrometria de massa (EM), onde as moléculas são ionizadas quando submetidas a um espectrômetro de massa com os íons movendo-se no campo eletromagnético, capturados pelo detector, e então os valores da relação m/z (massa/carga) de íons produzidos são determinados (PITT, 2009; CAVALCANTI, 2016).

O aumento do compartilhamento de dados experimentais de EM/EM, além da disponibilidade de bancos de dados espectrais, como o GNPS, promoveram o desenvolvimento de várias abordagens da bioinformática que auxiliam na interpretação de grandes conjuntos de dados gerados por espectrometria de massa (PILON et al., 2019).

A plataforma GNPS (*Global Natural Product Social Molecular Networking*) é uma ferramenta eficiente para processar e anotar os dados de MS2. O conceito de rede molecular (*molecular networking*), baseia-se na visualização e organização de informações de espectrometria de massa por similaridade espectral. As substâncias estruturalmente relacionadas geralmente compartilham espectros de massa similares e a partir do GNPS, os espectros semelhantes em um formato baseado em rede, permite a análise visual de moléculas idênticas e análogas (PILON et al., 2019). E utilizando esta abordagem, juntamente com a análise das substâncias presentes tanto na seiva como no extrato etanólico de *H. coubaril* torna-se o diferencial desta pesquisa.

Assim, a anotação química via GNPS resulta da correspondência espectral direta entre os espectros de EM e seus bancos de dados disponíveis, sendo observadas as diferenças de massa entre as estruturas relacionadas, destacadas por sua semelhança espectral na rede (YANG et al., 2013; FERNANDES, 2014).

Com isso, o estudo de substâncias naturais de diferentes fontes, como é o caso da seiva e dos resíduos (galhos) madeireiros de *H. courbaril* é de suma importância, pois podem ser fortes aliadas a diferentes indústrias como farmacêutica, de corantes e agrícolas, sendo estas responsáveis pela promoção de estratégias de aproveitamento dessas substâncias bioativas.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Produção de resíduos madeireiros

Na atividade de manejo florestal são gerados grandes quantidades de resíduos, que em sua maioria, são mal gerenciados e/ou utilizados. Muitos benefícios são gerados quando há a retirada de resíduos da floresta, como a diminuição dos custos de restauração, redução do risco de incêndio, melhoria da gestão florestal e a redução da poluição atmosférica de queimadas (BRAGHIROLI; PASSARINI, 2020).

A Instrução Normativa 05 de 11/12/2006, no seu artigo 2º, parágrafo XIV, inclui galhos, sapopemas, restos de troncos de árvores provenientes das espécies exploradas como resíduos da exploração florestal (BRASIL, 2006). No processo de industrialização da madeira são gerados resíduos sólidos que podem ocasionar sérios riscos socioambientais, como a contaminação da água, do solo, do ambiente, além de oferecer riscos à saúde de seres vivos. Por este motivo, é de importância o gerenciamento e reutilização/ reciclagem desse material por parte das indústrias produtoras (OLIVEIRA et al., 2017; RAMOS et al., 2017; SILVA et al., 2017).

O estudo mercadológico sobre as quantidades disponíveis de resíduos gerados a partir do processamento de madeira não são facilmente encontrados, sendo encontrados resultados de alguns países que se baseiam apenas em modelagem, e a previsão é que a oferta de resíduos madeireiros seja diretamente proporcional a demanda e ao processamento de madeira (SAAL; WEIMAR; MANTAU, 2017).

As maiores perdas na forma de resíduo ocorrem no processamento primário da madeira, no entanto, nas indústrias ainda podem ocorrer perdas no processamento secundário, e em geral, esses resíduos são na forma de serragem e de fragmentos de madeira, e seu aproveitamento, na maior parte, é voltado para a geração de energia (HILLIG; SCHNEIDER; PAVONI, 2009).

Os resíduos de madeira poderiam ter grande utilidade na produção de móveis, pequenos artefatos, agregando ainda mais valor, e conseqüentemente, maior aproveitamento deste recurso florestal. Por outro lado, esses resíduos poderiam ser importante para a área de produtos naturais, pois, novas estruturas químicas poderiam ser descobertas, favorecendo o desenvolvimento de produtos alternativos capazes de auxiliar no tratamento e prevenção de patologias (RIBEIRO et al., 2016).

2.2 Família fabaceae

A família Fabaceae possui distribuição cosmopolita, está presente tanto em regiões frias como temperadas, é encontrada em quase todas as fitofisionomias brasileiras, possuindo importância ecológica e econômica (FLORES; RODRIGUES, 2010; AMORIM et al., 2016; LUZ, 2016).

Espécies da família Fabaceae podem ser desde ervas e lianas, herbáceas, até árvores e arbustos, estando presentes em florestas tropicais úmidas, regiões temperadas, ambientes semiáridos e desertos (BFG, 2015). Esta família possui três subfamílias, a Caesalpinioideae, Faboideae ou Papilionoideae, e Mimosoideae (KHURM et al., 2020). Na literatura é frequentemente descrita sua capacidade de fixação de nitrogênio (N), ocorrendo devido as associações simbióticas que há entre os as plantas, bactérias e nódulos das raízes (AMORIM et al., 2016).

A família Fabaceae é a terceira maior família de Angiospermas, possui 751 gêneros e 19.500 espécies, ficando atrás apenas da Asteraceae e Orchidaceae (LPWG, 2018; ARAÚJO; LEMOS, 2020) sendo a família mais diversa na Amazônia e Caatinga (BFG, 2018). No Brasil são registrados aproximadamente 253 gêneros, distribuídos em 3.033 espécies, sendo 1.578 consideradas endêmicas (FLORA DO BRASIL, 2020).

A diversidade e abundância das espécies desta família permitem diferentes usos para o produtor rural, principalmente devido a suas potencialidades. Possuem importância ecológica, sendo essencial na ciclagem de nutrientes e na associação com microrganismos fixadores de nitrogênio (MARCHETTI; SANTOS; BARATTO, 2017; CALDEIRA et al., 2020).

Além da importância no setor agrônomo e florestal, espécies da família Fabaceae são descritas com diferentes propriedades químicas e biológicas, sendo descritas com altos teores de flavonóides em sua composição, principalmente isoflavonóides antimicrobianos (LIMA; SANTOS; LA PORTA, 2018). Os alcalóides é muito comum na família Fabaceae, além de serem descritas também proteínas lectinas que são utilizadas contra irritação e inflamação do tubo digestivo, no tratamento de náuseas e evacuações frequentes. Alguns glicosídeos cianogênicos e cristais de proteínas podem ser detectados nesta família (SANTOS, 2012).

2.2.1 Gênero *Hymenaea*

O gênero *Hymenaea* compreende as seguintes espécies: *Hymenaea altíssima* Ducke, *Hymenaea martiana* Hayne, *Hymenaea reticulata* Ducke, *Hymenaea splendida* Vog.,

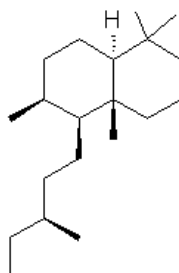
Hymenaea coreana Barb. Rodr., *Hymenaea chapadensis* Barb. Rodr. *Hymenaea rubiflora* Ducke, *Hymenaea velutina* Ducke, *Hymenaea capanema* Ducke, *Hymenaea eriogyne* Benth, *H. oblongifolia* Huber, *Hymenaea intermedia* Ducke, *Hymenaea stilbocarpa* Hayne, *Hymenaea courbaril* L., *Hymenaea oblongifolia* Huber, *Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne (RIZZINI, 1971). Dentre as espécies que ocorrem na Amazônia, *Hymenaea courbaril* é a mais comum, no entanto, outras espécies deste gênero já foram encontradas neste bioma, *Hymenaea parviflora* Huber, *Hymenaea oblongifolia* Huber, *Hymenaea intermedia* Ducke, e *H. reticulata* Ducke, *H. martiana* Hayne (LEE; LANGENHEIM, 1975; IPT, 2018; CIPRIANO et al., 2014). Em Santarém, no estado do Pará são encontradas as espécies *H. courbaril* L. e *H. parvifolia* Huber (CORRÊA, 2015).

Popularmente são conhecidas com “Jatobá”, “jataí”, “jutaí”, Jutai-açu, Jutai do igapó, Jutai-grande, Jutai mirim, quebra machado, Jataí-peba, Jataí-vermelho, Jitai, copal, courbaril, farinha, Jataíba, Jatobá-curuba, Jatobarzinho, Burandã, Imbiúva, Jatobá-miúdo, Jatobá-da-Caatinga (Bahia) (CORRÊA, 1984; IPT, 2018). No mercado internacional possui nomes como loksi, lokus (Suriname), algarrobo (Colômbia e Venezuela), courbaril (Cuba, Guiana, Guiana Francesa, Peru, Inglaterra) (IPT, 2018).

Algumas análises químicas têm sido realizadas com o gênero *Hymenaea*, sendo os diterpenos abietano, pimarano e labdano citados como constituintes, dos quais possuem variedade estrutural, além de serem reconhecidos pelas propriedades funcionais (FARIA et al., 2004; VALENTIM, 2006). O abietano, diterpeno que forma a base de uma variedade de compostos químicos naturais, possui atividade antimicrobiana, antifúngicas, antitumoral, anti-inflamatória e antioxidante; o pimarano possui atividade citotóxica e anti-inflamatória; o labdano também é descrito como um terpeno com efeito citotóxico (GONZÁLEZ, 2015; MONTEIRO et al., 2015) (Figura 1).

Figura 1 - Estruturas de terpenos encontrados no gênero *H. palustris*.





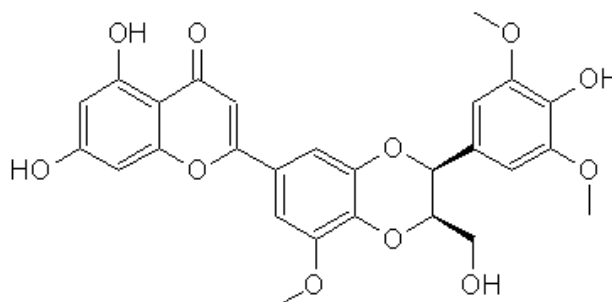
Labdano

Fonte: Elaborado pelo próprio Autor.

A maioria das espécies inclusas neste gênero são conhecidas por terem resinas, frutos, cascas com alto teor de taninos e com um amplo espectro de utilização (LORENZI; MATOS, 2002; GOMES et al., 2010; BEZERRA et al., 2013).

A lignana Palstatina (Figura 2) é um flavonóide encontrado em *Hymenaea palustris*, e já foi descrito como inibidor de crescimento de células leucêmica linfótica tipo P388 (PETTIT et al., 2003). Lignana é um polímero complexo, sendo o principal constituinte não-carboidrato de plantas vasculares, é responsável pelo reforço da parede celular. Esse polifenol é de interesse devido sua ação anti-inflamatória (PAN et al., 2009).

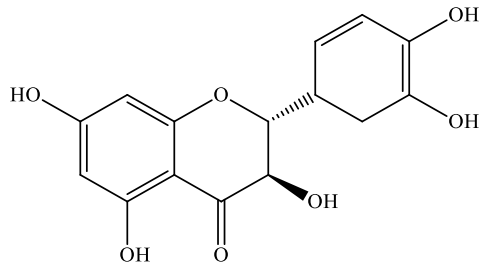
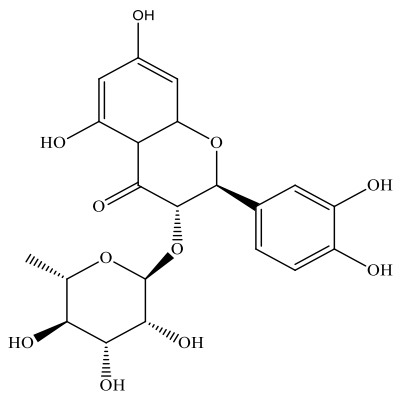
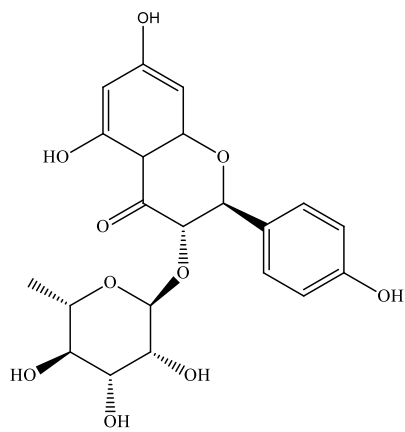
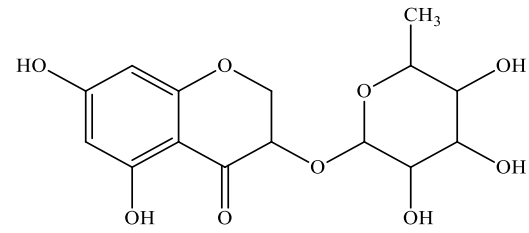
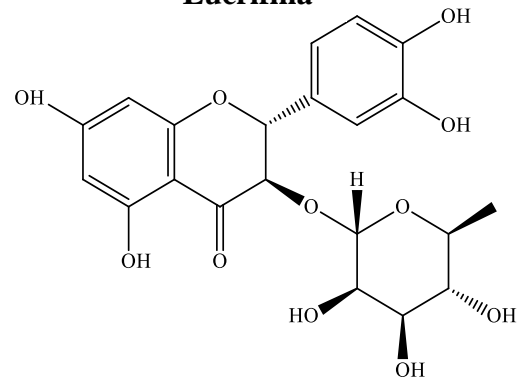
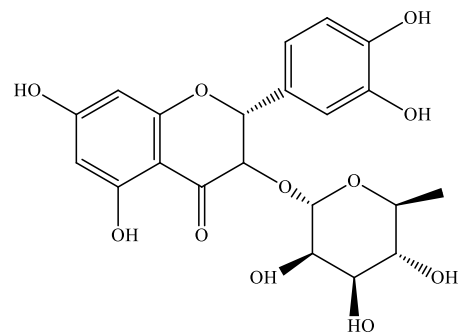
Figura 2 - Estrutura da lignana Palstatina encontrada em *H. palustris*

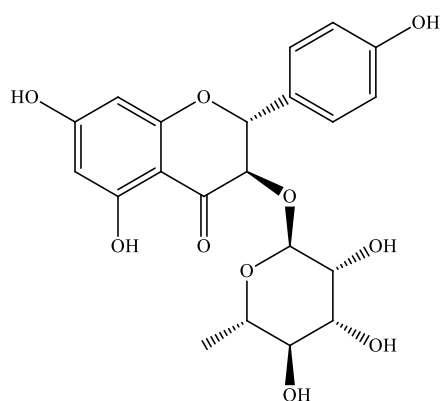
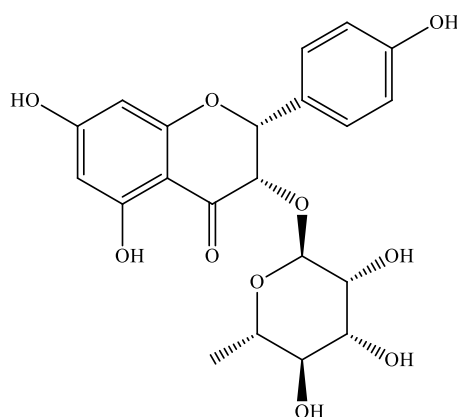


Palstatina

Fonte: Elaborado pelo próprio Autor.

Foram identificados também flavonóides no extrato etanólico bruto e na fração de acetato de etila de *H. martiana*, sendo nominalmente: taxifolina, eucrifina, neoastilbina, astilbina, neoengeletina, quercitrina, engeletina e isoengeletina (PACHECO et al., 2019) (Figura 3).

Figura 3 - Flavonóides de *H. martiana*.**Taxifolina****Neoastilbina****Neoengeletina****Eucrifina****Astilbina****Quercitrina**

**Engeletina****Isoengeletina**

Fonte: Elaborado pelo próprio Autor.

2.2.1.1 *Hymenaea courbaril*

O Jatobá (*H. courbaril*) pertence ao filo Magnoliophyta, classe Magnoliopsida, ordem Fabales, família Fabaceae, subfamília Caesalpinioideae. Acredita-se que a espécie *H. courbaril* seja a espécie com distribuição mais ampla, pois é descrita com ocorrência em quase toda a extensão de distribuição do gênero (FLORA DO BRASIL, 2020), sendo encontrada de forma dispersa em matas de terra firme e de várzeas altas, além de serem frequente em solos argilosos e pobres.

A árvore de *H. courbaril* possui comumente entre 10 a 15 metros de altura, no entanto na literatura é descrito que esta pode alcançar até 30 metros na Amazônia, sendo dotada de copas amplas e densas, casca cinza prateada, troncos retos e cilíndricos que chegam até a dois metros de diâmetro (CARVALHO FILHO et al., 2003; SHANLEY; MEDINA, 2005).

A madeira de *H. courbaril* é bastante comercializada, e em termos de avaliação de estoque de colheita em uma unidade de trabalho (UT) em Santarém/PA, estima-se aproximadamente 24,94 árvores/ 100 ha, sendo 238,58 m³/ 100 ha passíveis de serem colhidos, e se considerado o preço da madeira em tora comercializado (R\$ 395,00 por m⁻³) pela cooperativa onde foi realizado o estudo, o valor obtido para esta espécie é em média de 294.239,00 R\$/100 ha (COSTA et al., 2019).

Não somente a madeira, a espécie *H. courbaril* possui também produtos de alta qualidade como resinas, frutas, além de cascas utilizáveis na medicina popular com quantidade significativa de taninos, fato que justifica seu uso. As terapêuticas empíricas,

muitas vezes, são a base para as investigações farmacológicas tanto de extratos brutos, frações e substâncias isoladas de material de origem vegetal (BEZERRA et al., 2013; CIPRIANO et al., 2014).

A resina do jatobá é outro produto oriundo desta árvore, sendo também chamada de jutaica. É muito utilizada por comunidades tradicionais, e geralmente encontra-se no início do tronco da árvore, escorrida das “feridas” que muitas vezes os insetos ocasionam na casca. É válido mencionar que esta resina é encontrada na forma sólida e muitas vezes é utilizada como verniz, combustível e incenso (SHANLEY; MEDINA, 2005).

Os produtos naturais de uso etnobotânico, etnofarmacológico tem sido descritos por Mors, Magalhães e Gottlieb (1962) e Pio Corrêa (1974), sendo esses estudos importantes para os mais diversos setores. É constante a busca por produtos naturais, sendo sua utilização, na maioria das vezes, considerada viável, efetiva, eficiente e segura, devido à baixa/ausência toxicidade, além de ter a capacidade de biodegradar-se (MARANHÃO, 2009).

A utilização etnofarmacológica de *H. courbaril* iniciou-se com os povos indígenas da floresta tropical sul-americana onde eram utilizadas de diferentes modos as partes das plantas (BONIFACE; FERREIRA; KAISER, 2017). As cascas, frutos, resina, folhas, sementes e caules tem grande potencial medicinal e são utilizados popularmente em infusões e decocções para o tratamento de diversas doenças, sendo atribuído ao Jatobá os seguintes usos: anemia, doenças renais, feridas, asma, diarreias, cólicas intestinais e estomacais, hematúria, disenteria, dispepsia, constipação e hemoptise, tratamento de doenças cardiovasculares, problemas urológicos, cistite, tosse, gripe, tônico, cicatrizante, antisséptico, brônquico, vermífugo, antioxidante, diurético, hepatoprotetor, estimulante e energético (MORS, 2000; LORENZI; MATOS, 2002; CARTAXO; COSTA et al., 2016).

Estudos farmacológicos têm revelado as atividades anestésica, analgésica e anti-inflamatória de extratos do caule de *H. courbaril*. Outras atividades como ação antibacteriana, antifúngica, moluscocidas, miorelaxante, antiespasmódicas, antioxidante também são descritas (LORENZI; MATOS, 2002; BEZERRA et al., 2013; CIPRIANO et al., 2014).

O extrato etanólico de *H. courbaril* também foi testado em roedores, sendo descrito e comprovado seu potencial anti-inflamatório e antinociceptivos (BRITO, 2015).

Os taninos e flavonóides, componentes químicos presentes em *H. courbaril* são compostos que estão provavelmente associados à ação antifúngica (FERNANDES; SANTOS; PIMENTA, 2005; COSTA et al., 2014).

Autores relatam que os flavonoides estão frequentemente presentes em *H. courbaril*, e são os responsáveis pelas características antimicrobianas atribuídas a espécie (BEZERRA et al., 2013).

Compostos fenólicos obtidos a partir de *H. courbaril* já são descritas em literatura. Substância dessa classe foi constatada nos extratos de casca da espécie associado à presença de procianidinas diméricas (m/z 577), triméricas (m/z 865), tetrâmeras (m/z 1153), pentâmeras (m/z 1441), hexâmeras (m/z 1729), heptâmeras (m/z 1008), octâmeras (m/z 1152) e nonâmeras (m/z 1296) (VEGGI et al., 2014).

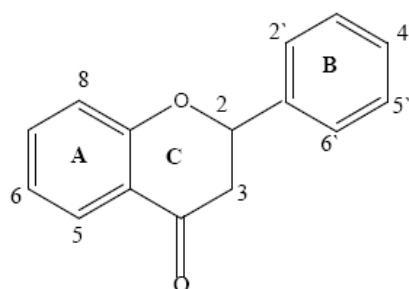
Por meio de abordagem fitoquímica da planta de *H. courbaril* verificou-se a presença de polifenóis como flavonóides e taninos, assim como antociânicos, triterpenóides e saponinas na casca desta espécie (BEZERRA et al., 2013).

Alguns metabólitos foram isolados das cascas, do tronco, dos galhos e das folhas de *H. courbaril*, sendo encontrados os flavonóides eucrifina, epicatequina, luteolina, crisoeiro; os diterpenos abietano, pimarano, lábdano (GONÇALVES; ALVES FILHO; MENEZES, 2005; COSTA, 2012; FERNANDES et al., 2015).

Os flavonóides são compostos conhecidos pelo nome generalista de metabólitos secundários (substâncias que não possuem distribuição universal e não são essenciais a todas as plantas, no entanto, são de suma importância na interação planta - ambiente). Essa classe é biossintetizada a partir de fenilpropanoides, constituindo diversas formas estruturais com a maioria dos representantes desta classe possuindo 15 átomos de carbonos no núcleo fundamental sendo caracterizados normalmente por dois grupos fenil ligados por uma cadeia de três carbonos entre si (Figura 4) (KUMAR; PANDEY, 2013).

As diferentes classes de flavonóides possuem características distintas como copigmentação e apresentam ainda, propriedades bacterianas e antifúngicas (MARANHÃO, 2009).

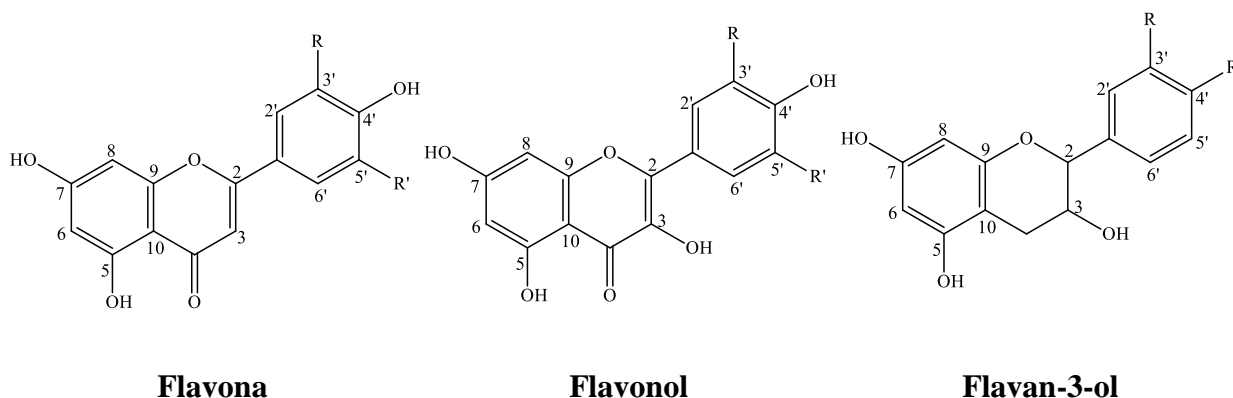
Figura 4 - Núcleo fundamental dos flavonóides com respectiva numeração dos carbonos.



Fonte: Elaborado pelo próprio Autor.

As classes de flavonóides mais distribuídos na natureza são flavonas, flavonóis e as flavan-3-ols, com o padrão de hidroxilação típico, sendo que anel A pode ser dois tipos, floroglucinol (1,3,5-triidroxibenzeno) ou resorcinol (1,3-diidroxibenzeno). As flavonas diferem dos flavonóis devido à ausência da hidroxila na posição 3 do anel C. Os flavonóis apresentam na sua estrutura várias posições para hidroxilas (posição 3,5 e 7), como pode ser visto abaixo (MACIEL et al., 2009) (Figura 5).

Figura 5 – Esqueleto básico das principais classes de flavonóides

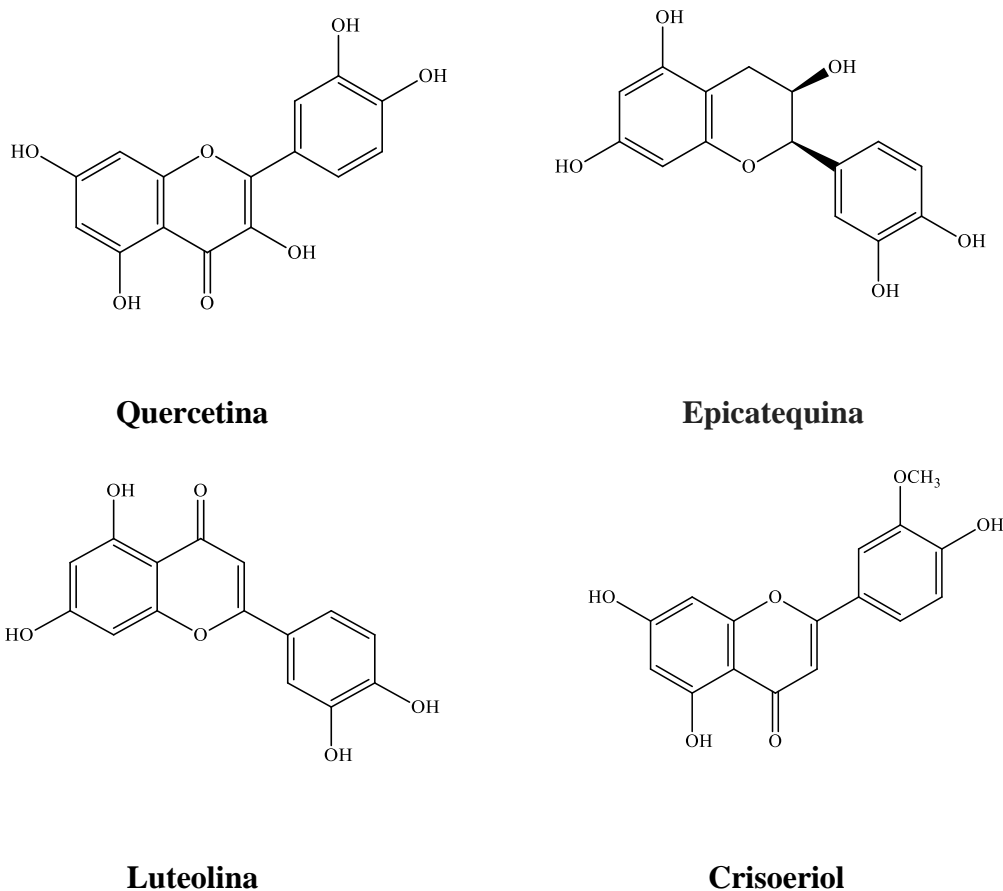


Elaborado pelo próprio autor.

Os flavonóides possuem características espectrais típicas no UV/VIS e tem absorção de em torno de 350 nm (ARAPITSAS, 2008). A banda A encontra-se no 310- 350 nm para flavona, enquanto que para flavonol está entre 350 e 385 nm. Verifica-se ainda que a banda B, encontra-se entre 250-290 nm, sendo muito semelhante nesses subgrupos de flavonóides. Os flavanóis mostram uma absorção máxima em comprimentos de onda não específicos, que encontra-se entre 270 e 290 nm (BOHM, 1998; TSIMOGLIANNIS et al., 2007).

Flavonóides como quercetina epicatequina, luteolina, crisoeriol também foram citados em espécies de *Hymenaea* (CARNEIRO et al., 1993; PETTIT et al., 2003; MARANHÃO et al., 2013; FARIAS et al., 2017; SILVA et al., 2019).

Segundo a literatura, a quercetina possui atividade antioxidante, antimicrobiana e anti-inflamatória (RUMA; SUNIL; PRAKASH, 2013; DJOUOSI et al., 2015; LESJAK et al., 2018), já a epicatequina é descrita como um flavonóide antioxidante e anti-inflamatório (BENABDERRAHMANE et al., 2021; QU et al., 2021), a luteolina como um flavonóide de ocorrência natural com atividades anti-mutagênica, anti-tumorígenicas antioxidante e anti-inflamatória (ROSS; KASUM, 2002; SEELINGER; MERFORT; SCHEMPP, 2008). O crisoeriol é descrito com atividade anticancerígena, antioxidante e anti-inflamatória (BARRECA et al., 2020) (Figura 6).

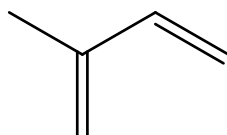
Figura 6 - Estruturas de flavonóides encontrados em *H. courbaril*.

Fonte: Elaborado pelo próprio Autor.

O grupo dos flavonóides constitui uma classe de metabólito abundante em polifenóis que se caracterizam pelo baixo peso molecular e seu significativo interesse econômico devido a produção de pigmentos, além da sua importância na indústria farmacêutica com ação antiinflamatória e antialérgica (VALENTIM, 2006; MARANHÃO, 2009). Os flavonóides de origem natural apresentam-se muitas vezes oxigenados, e ainda podem ocorrer conjugados com açúcares (SIMÕES et al., 1999).

Alguns terpenos também são descritos neste gênero, sendo classificados conforme o número de carbonos que o compõem, sua unidade básica são os cinco carbonos, denominado de isopreno (Figura 7), sendo esta classe de metabólitos derivados do ácido mevalônico (SIMÕES et al., 1999).

Figura 7 - Estrutura do isopreno.



Fonte: Elaborado pelo próprio Autor.

Os esqueletos carbonados dos terpenos são formados pela condensação variável de unidades isoprênicas, podendo ser hemiterpeno (5C) monoterpênicos (10C), sesquiterpenos (15C), diterpenos (20C), sesterpenos (25C), triterpenos (30C), tetraterpenos (40C) e politerpenos (unidades maiores). Existem alguns terpenoides, como os sesquiterpenos que são reconhecidos por atuarem como fitoalexinas, além de possuir atividade antimicrobiana (MARÓSTICA, 2006; SILVA, 2016; WANG et al., 2016).

No extrato da semente de *H. courbaril* var. *stilbocarpa* foi relatado a presença de diterpenos, sendo identificados como ácido ózico, ácido isoózico e ácido covalênico (NOGUEIRA et al., 2002) (Figura 8).

Figura 8 - Estruturas dos diterpenos encontrados em *H. courbaril* var. *stilbocarpa*.



Fonte: Elaborado pelo próprio Autor.

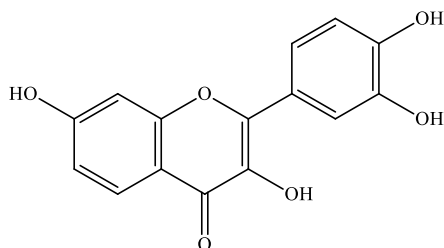
2.3 Seiva do jatobá

Do fuste de *H. courbaril* exsuda uma seiva, rica em terpenos e com grande interesse comercial devido sua coloração ou pigmentação (DIAS; LUZIA; JORGE, 2013). Algumas propriedades etnofarmacológicas da seiva de Jatobá também são encontradas na literatura. Quando misturada com mel de abelha, esta é utilizada para tratar doenças do coração (BONIFACE; FERREIRA; KAISER, 2017), a seiva *in natura* ainda pode ser utilizada como um fortalecedor imunológico (SANTANA, 2015).

É atribuído à espécie *H. courbaril* atividades antimicrobiana frente a diferentes patógenos (UEDA; MIMICA, 2011; ALEIXO et al., 2013; COSTA et al., 2014; GARCIA; SOUSA et al., 2020). A partir da determinação da atividade antifúngica e citotoxicidade da seiva de *H. courbaril* L. (Figura 9), verificou-se que esta é capaz de inibir o crescimento de dermatófitos e de *Cryptococcus neoformans*, sendo encontrado uma concentração inibitória mínima (CIM) de até 256 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, por outro lado, a fisetina, principal substância da seiva do Jatobá, apresentou CIM <128 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ para esses fungos. Com relação ao ensaio de citotoxicidade com a linha celular de fibroblastos Balb/c 3T3-A31, verificou-se que a fisetina

mostrou menor toxicidade ($IC_{50} = 158 \mu\text{g.mL}^{-1}$) do que a seiva de xilema ($IC_{50} = 109 \mu\text{g.mL}^{-1}$) (COSTA et al., 2014).

Figura 9 - Estrutura do principal constituinte (fisetina) da seiva de *H. courbaril*.

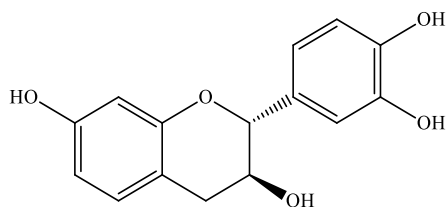


Fisetina

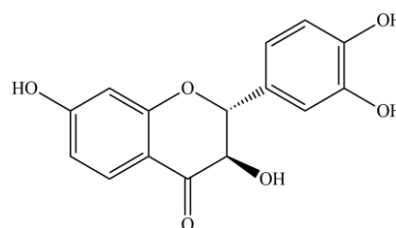
Fonte: Elaborado pelo próprio Autor.

Os autores mencionados acima, por meio da ressonância magnética nuclear uni e bidimensional identificaram na seiva de *H. courbaril* as substâncias fisetinidol, fustina, 3-*O*-metil-2,3-*trans*-fustina (Figura 10) e taxifolina (Figura 3).

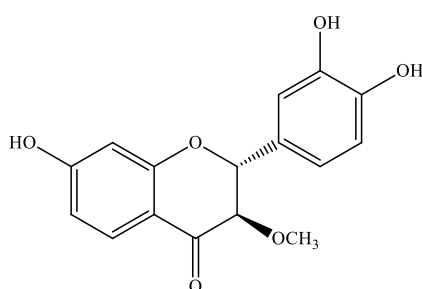
Figura 10 - Estruturas dos flavonóides encontrados em *H. courbaril*



Fisetinidol



Fustina



3-*O*-metil-2,3-*trans*-fustina

Fonte: Elaborado pelo próprio Autor.

2.4 Atividade antioxidante

Os antioxidantes são capazes de interceptar os radicais livres que são gerados a partir do metabolismo celular ou até mesmo por fontes exógenas (BIANCHI; ANTUNES, 1999). Alguns ensaios são relatados para determinar o potencial de frutas, extratos e óleos como fontes de compostos antioxidantes. Verifica-se ainda a correlação entre os compostos fenólicos e a atividade antioxidante de amostras, pois esta classe possuem estrutura excelente para o sequestro de radicais (SOARES, 2002).

São descrito vários métodos que são utilizados para a determinação da atividade antioxidante, destacando-se principalmente o de 1,1-difenil-2-picril-hidrazila (DPPH). O uso do ensaio DPPH é o mais utilizado para avaliar de maneira fácil e rápida os antioxidantes por espectrofotometria, de modo que pode ser útil na avaliação de vários produtos ao mesmo tempo (GARCIA et al. 2012). O DPPH caracteriza-se por possuir uma coloração púrpura, sendo detectado por espectrofotômetro, e quando este é reduzido pela ação de um antioxidante, transforma-se em um composto chamado de difenil-picril-hidrazina, com uma coloração amarelada, reduzindo assim a detecção por absorvância. A interpretação deste resultado se refere a quantidade de DPPH consumida pelo antioxidante e a quantidade deste agente necessário para diminuir a 50 % da concentração inicial de DPPH (BEZERRA et al., 2013).

Existem outros métodos que são bastante citados na literatura, destacando-se: o ensaio FRAP (*Ferric Reducing Ability Power*) que determina o poder de redução de antioxidantes por meio da reação com cloreto férrico; o do radical ABTS⁺ que também é um método prático, rápido e de alta sensibilidade (BOROSKI *et al.*, 2015); e do método ORAC (*Oxygen Radical Absorbance Capacity*) que se baseiam na propriedade fluorescente de proteínas como B-ficoeritrina (B-PE) e R-ficoeritrina (R-PE) (ALVES et al., 2010).

2.5 Resistência microbiana

A resistência microbiana tem sido uma ameaça ao tratamento eficaz de diversas infecções causadas por bactérias, parasitas, vírus e fungos, o que faz com que a resistência antibiótica seja inevitável (FRIEDRICHS et al., 2021). Os medicamentos utilizados para o tratamento dessas doenças, muitas vezes são de alto custo, impossibilitando e/ou inviabilizando seu uso, o que pode propiciar o prolongamento dessas infecções ou até mesmo levar à óbito o paciente (WHO, 2014). A resistência microbiana é definida como um

fenômeno natural que ocorre em microrganismos, e que é acelerado por pressão seletiva exercida pelo uso frequente e indevido de uma gama de antimicrobianos (WHO, 2014).

Se faz necessário compreender cientificamente a resistência microbiana, sendo essencial combater esta grande ameaça à saúde pública. Para que isto ocorra, este entendimento deve abranger aspectos como os mecanismos de resistência, pois só assim será possível ter abordagens sobre o diagnóstico e à terapêutica, até aos condutores de resistência antimicrobiana na sociedade e no ambiente, o que é de fundamental importância para o desenvolvimento de políticas de intervenção adequadas (HOLMES et al., 2016).

Alguns autores relatam sobre os principais mecanismos que envolvem a resistência bacteriana aos antibióticos que englobam a modificação ou a destruição enzimática do antibiótico, a prevenção da acumulação intracelular do antibiótico, as alterações nas moléculas alvo dos antibióticos, e por fim, a produção de moléculas alvo alternativas que não são inibidas pelo antibiótico (HAWKEY, 1998; FORBES; SAHM; WEISSFELD, 2007; LOUREIRO et al., 2016).

A sensibilidade dos microrganismos aos antibióticos é complexa, pois há variação no local e no tempo, com isso, é importante enfatizar sobre a importância do monitoramento regular da sensibilidade bacteriana aos antibióticos (ROY; DHAR, 2017).

Como mencionado acima, a resistência antimicrobiana é um problema global e que está afetando a saúde humana. Com base nesta problemática, no início do ano de 2017 foi publicado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) a primeira lista de microrganismos resistentes a antibióticos, sendo incluso nesta lista, patógenos conhecidos como *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp., *Neisseria gonorrhoeae* e *Streptococcus pneumoniae* (WHO, 2017; KUMAR; CURTIS; HOSKINS, 2018).

A Diretriz Nacional para Elaboração de Programa de Gerenciamento do Uso de Antimicrobianos em Serviços de Saúde conceitua resistência antimicrobiana como a capacidade de um patógeno de resistir à ação de um agente antimicrobiano, eliminando a eficácia deste para curar ou prevenir a infecção causada pelo microrganismo (ANVISA, 2017)

A terapia com antimicrobianos por um longo período de tempo, ou ainda, de forma inadequada, permite que os microrganismos sofram mutações, favorecendo ainda mais sua sobrevivência, tornando-se cepas resistentes. Por isso, a compreensão dos patógenos mais comuns, assim como suas variantes, são o norte para a escolha do antibiótico apropriado no tratamento de pacientes (ROY; DHAR, 2017).

Verifica-se que a resistência microbiana tem se tornado um fator de preocupação e uma problemática global da saúde pública, pois muitos são os antimicrobianos utilizados que já se tornaram ineficazes, acarretando assim um rol de consequências direta e indireta como o prolongamento da patologia, o aumento da taxa de mortalidade, resistência e permanência em hospitais, afetando no tratamento das doenças (ANVISA, 2017; ZIMERMAN, 2010).

Com base nisso, verifica-se a necessidade de combate e intervenção à propagação de microrganismos resistentes aos antimicrobianos, além do desenvolvimento de estudos com ênfase em novos antimicrobianos, o que exige uma abordagem mais ampla, simultânea e articulada de segmentos governamentais, pesquisadores, profissionais de saúde e a sociedade em geral (ANVISA, 2017).

Estudos tem sido realizado com a finalidade de descobrir os componentes e princípios químicos de plantas, sendo que esses metabólitos secundários exibem excelente atividade antimicrobiana, demonstrando que diversas espécies vegetais podem ser usadas no tratamento de diferentes enfermidades (UEDA; MIMICA, 2011; BEZERRA et al., 2013).

A partir da análise na literatura de que o Jatobá possui diferentes atividades biológicas (UEDA; MIMICA, 2011; ALEIXO et al., 2013; COSTA et al., 2014; GARCIA; SOUSA et al., 2020), torna-se de suma importância estudar *H. courbaril* para o controle microbiano, principalmente para aqueles microrganismos multirresistentes.

2.6 Análise química de produtos naturais

2.6.1 Cromatografia líquida de alta performance (CLAE)

A cromatografia líquida é uma técnica analítica descoberta no século XX, sendo utilizada inicialmente como um método de separação de compostos coloridos. Conforme o aprimoramento da técnica percebeu-se que além de separar, a cromatografia líquida de alta eficiência podia identificar e quantificar cada componente de uma mistura, sendo seu sucesso atribuído a características como reprodutibilidade, facilidade de manipulação e a excelente resolução, tornando esta técnica uma das mais avançadas e utilizadas atualmente nos laboratórios de pesquisas assim como pelas indústrias farmacêuticas (RAVISANKAR et al., 2019; GHANJAOU et al., 2020).

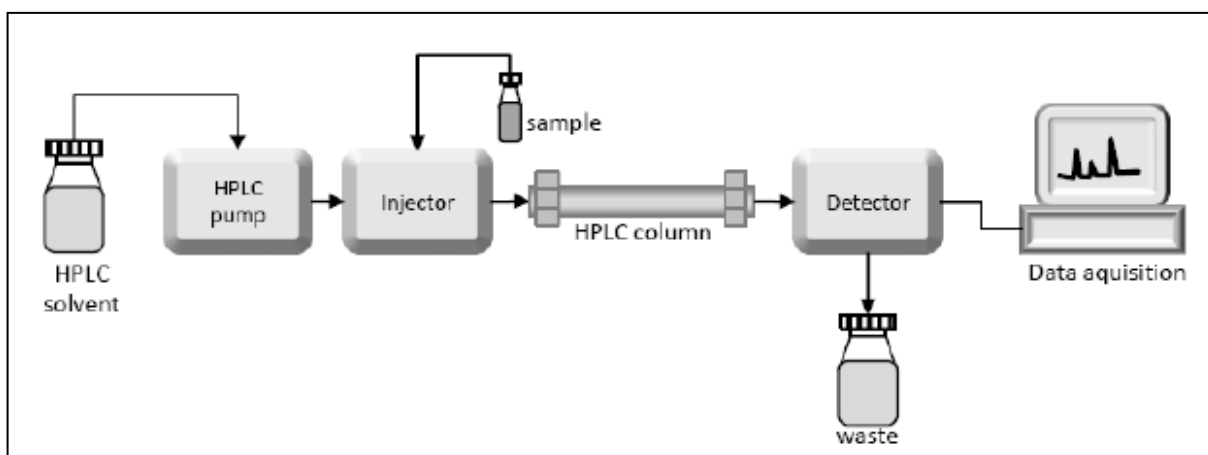
O princípio da CLAE baseia-se na injeção de uma solução da amostra na coluna (que contém a fase estacionária) e um líquido (fase móvel) que é bombeado a alta pressão. As

substâncias constatadas na amostra que possuem maior afinidade com a camada estacionária passará mais lentamente, se compararmos aos compostos com menor afinidade (GHANJAOUUI et al., 2020).

A técnica da cromatografia líquida de alta eficiência pode ser realizada em dois modos, o normal e o reverso, sendo que o primeiro caracteriza-se por ter uma fase estacionária de caráter polar e uma fase móvel menos polar, já no segundo tem uma fase estacionária de menor polaridade e a uma fase móvel de maior polaridade (TONHI; COLLINS; JARDIM, 2002; MOITA, 2019).

De forma simplificada, em um aparelho de CLAE inicialmente são utilizados sistemas de solventes, considerada a fase móvel, que podem ser tanto puros como em misturas. Outras partes deste equipamento são: bomba (*pump*), em que caracteriza-se por ter uma vazão contínua sem pulsos; o injetor (*injector*) em que é inserida a amostra (*sample*) com auxílio de uma seringa; a coluna (*column*), pode ser de diferentes materiais (aço inox ou vidro), comprimento, diâmetros, fases (normal ou reversa), enchimentos e tamanhos; o detector (*detector*) que é encontrado de diferentes formas, além de que o tempo de resposta é relativamente curto e independe da vazão; e por fim é possível obter os dados (*data acquisition*) a partir de cromatogramas (CZAPLICKI, 2013; RAMOS, 2014) (Figura 11).

Figura 11 - sistema de Cromatografia Líquida de Alto Eficiência (CLAE).



Fonte: Czaplicki (2013)

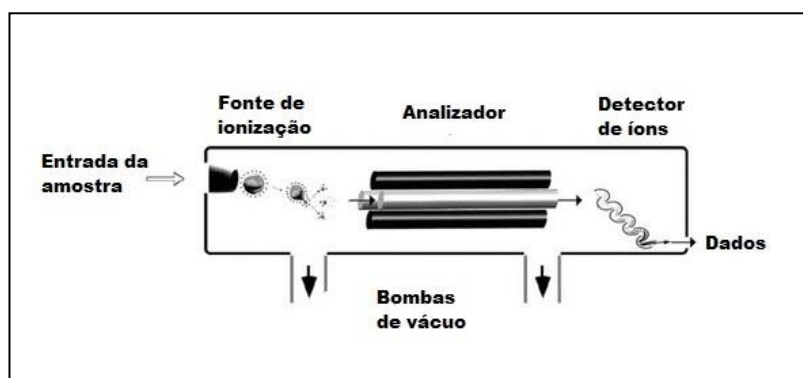
Alguns dos detectores utilizados em cromatografia Líquida de alta eficiência, são ultravioleta-Visível (UV-VIS / DAD) em que e seu funcionamento baseia-se na absorção da luz por parte da amostra analisada, além de que há diferença na absorvância do UV dependendo do comprimento de onda que foi utilizado, sendo comum o de 254 nm; a de fluorescência (FL) em que os átomos do analito são excitados, emitindo assim um sinal de luz

(fluorescência); a de índice de Refração (RI) que mede a mudança no índice de reflexo; e o de espectrometria de Massas (EM) em que é possível quantificar limites de detecção relativamente baixo de componentes elementares e moleculares. Esses detectores são altamente sensíveis e foram desenvolvidos com a finalidade de permitir o monitoramento contínuo da coluna. Possuem um tempo de resposta rápido e devido a sua estabilidade permite sua repetibilidade (SKOOG et al., 1996; SUNIL et al., 2018).

A espectrometria de massa possui importância e mede a relação massa/carga (m/z) de partículas carregadas, sendo que a EM é capaz fornecer informações relevantes sobre os analitos de uma amostra, incluindo a sua estrutura, pureza e composição (EL-ANEED; COHEN; JOSEPH, 2009). A técnica analítica de espectrometria de massa é utilizada devido sua alta precisão, seletividade e sensibilidade, auxiliando assim na identificação de estruturas orgânicas (CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008).

Um espectrômetro de massa possui três partes principais com funções diferenciadas: o ionizador, o analisador e o detector (Figura 12). As moléculas são introduzidas no equipamento, e então são convertidas em íons na fonte de ionização, posteriormente, ocorre a separação dentro do analisador de massa, conforme sua razão massa/carga (m/z), e a conversão da energia iônica em sinais elétricos no detector, e assim esses dados são transmitidos a um computador (Figura 12) (SIUZDAK, 2005; SENGUPTA et al., 2019).

Figura 12 – Componentes de um espectrômetro de massa



Fonte: Siuzdak (2005)

Um tipo de ionização recorrente é a *electrospray* - ESI, em que as amostras são normalmente dissolvidas em tampão ou solvente e esta é introduzida no espectrômetro de massa sob a forma de um *spray*. Nos espectros de ESI muitas vezes é possível observar apenas os íons moleculares protonados e desprotonados, e estes não são suficientes para propor e identificar os compostos, sendo necessário diferentes abordagens como a de espectrometria de massa sequencial (EM/EM), conhecida como *tandem mass spectrometry* (inglês), em que

se utiliza de analisadores aprisionadores de íons (*ion traps*), possibilitando a fragmentação desses íons aprisionados, obtendo-se espectros com íons produtos (EL-ANEED; COHEN; JOSEPH, 2009).

2.6.2 Análise de dados espectrais por meio de redes moleculares - *Global Natural Products Social Molecular Networking*

A análise a partir de redes moleculares (*Molecular networking*) vem, muito recentemente sendo utilizada na química de produtos naturais, sendo uma ferramenta valiosa para organização e visualização de um grande número de dados. Esta técnica utiliza-se de dados espectrais, facilitando a identificação de padrões, seja este por similaridade ou por diferença entre eles (ARON et al., 2020; PILON et al., 2019, 2021). Uma plataforma relativamente recente (possui aproximadamente 711 trabalhos publicados até 2021) é a *Global Natural Products Social Networking* (GNPS), que se utiliza de cálculos de redes moleculares a partir de dados de espectrometria de massas (WANG et al., 2016; PILON et al., 2021). Esta plataforma possui importância para a indústria, campos da investigação biomédica, ciência ambiental, ecologia, forense, microbiologia, química, dentre outros (ARON et al., 2020).

Quando se utiliza o GNPS, faz-se necessário a inserção dos padrões de análise, considerando sempre o tipo de espectrômetro de massas utilizado (alta ou baixa resolução), e então a plataforma faz a comparação dos espectros de massa relativos a amostra a ser analisada, e uma vez encontrado semelhanças, esses são anotados e exibidos (WANG et al., 2016).

A técnica de rede de interação molecular fundamenta-se na realização de anotações e desrepliação de derivados químicos. Uma vez gerada a rede molecular, esta pode ser visualizada em software específico (*Cytoscape*) e a partir do mapa molecular é possível observar os nós (*node*) que são unidos por arestas (*edge*), originando grupos (*clusters*), com padrões de fragmentações semelhantes (WANG et al., 2016).

2.6.3 Ressonância Magnética Nuclear - RMN

A ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono-13 (RMN ^1H e ^{13}C) é uma técnica exata, quantitativa, abrangente, reprodutível, flexível em relação à natureza do analito e imparcial, e possui a capacidade de fornecer informações cruciais para determinação e elucidação estrutural de uma molécula (DAYRIT; DIOS, 2017; IGOLI, 2017).

A técnica de RMN é menos sensível do que a espectrometria de massa, que é capaz de fazer a detecção de compostos até ao nível de partes por milhão (ppm) (DAYRIT; DIOS, 2017). Porém, a RMN se destaca pela riqueza de informação, resolução em espectros e capacidade de interpretação da informação e relação com a estrutura molecular (RINALDI, 2004).

A utilização adequada dos dados obtidos por meio da técnica de RMN revela a estrutura da molécula, confirmando a identidade de um composto conhecido ou uma substância ainda não relatada na literatura (RIBEIRO; SOUZA, 2007; IGOLI, 2017). Sendo que alguns experimentos podem ser realizados a partir desta técnica, como exemplo temos o de ^1H em que é possível obter informações quali-quantitativas a partir de diferentes pulsos, o de ^{13}C em que os espectros podem ser exibidos de forma acoplado e/ou desacoplado ao ^1H ; o de HMBC (*Heteronuclear Multiple Bond Correlation*) em que é possível confirmar as correlações entre os núcleos de longo alcance, ou seja, fornece informações sobre carbonos e prótons que são separados por duas, três e até quatro ligações; o de COSY (*Correlation Spectroscopy*) que é possível identificar os prótons acoplados; o de HMQC/HSQC (*Heteronuclear Multiple/Single Quantum Correlation*) em que confirma-se o acoplamento entre heteronúcleos; o de TOCSY (*Total Correlation Spectroscopy*) em que identifica-se os sistemas de *spin*; e o de DEPTQ (*Distortionless enhancement by polarization transfer including the detection of quaternary nuclei*) em que obtém-se múltiplas informações para todos os carbonos, incluindo os carbonos quaternários (SAKA; GENÇTEN ; GÜMÜŞ, 2011; IGOLI, 2017).

O hidrogênio é frequente nas moléculas orgânicas, e seu isótopo principal, ^1H , possui abundância de 98,98%. Já o isótopo ^{13}C ocorre apenas a 1,108% e é de difícil visualização, sendo necessário uma biblioteca de espectros de ^{13}C RMN, software específico de previsão espectral, e um algoritmo eficiente que possa fazer a procura correspondente ao espectro observado (DAYRIT; DIOS, 2017).

3 OBJETIVO

3.1 Objetivo geral

Promover estratégias de aproveitamento de substâncias bioativas, visando contribuir para o conhecimento da composição química e da atividade biológica da seiva e do extrato etanólico oriundo do resíduo madeireiro de *Hymenaea courbaril*.

3.2 Objetivos específicos

- ✓ Obter o extrato etanólico do resíduo madeireiro de *H. courbaril* e suas frações por meio da partição líquido-líquido.
- ✓ Identificar os compostos voláteis presentes no extrato etanólico de *H. courbaril* e das frações obtidas por partição líquido-líquido.
- ✓ Analisar por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada com detector de arranjo de fotodiodos o extrato e a seiva de *H. courbaril*.
- ✓ Analisar os perfis fitoquímicos do extrato etanólico e da seiva de *H. courbaril*, utilizando a abordagem de redes de interações moleculares ou *molecular networking* através da plataforma GNPS (*Global Natural Products Social Molecular Networking*);
- ✓ Identificar os compostos fenólicos utilizando técnicas de Ressonância Magnética Nuclear uni e bidimensionais (^1H , ^{13}C , HMBC, HSQC).
- ✓ Determinar a atividade antioxidante dos extratos do resíduo madeireiro e da seiva de *H. courbaril*, quantificando flavonóides totais e os teores de fenólicos a partir de método espectrofotométrico;
- ✓ Avaliar a atividade antimicrobiana do extrato etanólico e do extrato da seiva de *H. courbaril* frente a microrganismos de interesse clínico.
- ✓ Testar a atividade antimicrobiana de uma substância isolada do extrato etanólico de *H. courbaril*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Materias, reagentes e soluções

Os solventes grau PA utilizados para as análises foram: hexano, diclorometano, acetato de etila, metanol e etanol. Os solventes grau HPLC foi o etanol absoluto 99,9% e água purificada pelo sistema Milli-Q (Millipore®, EUA).

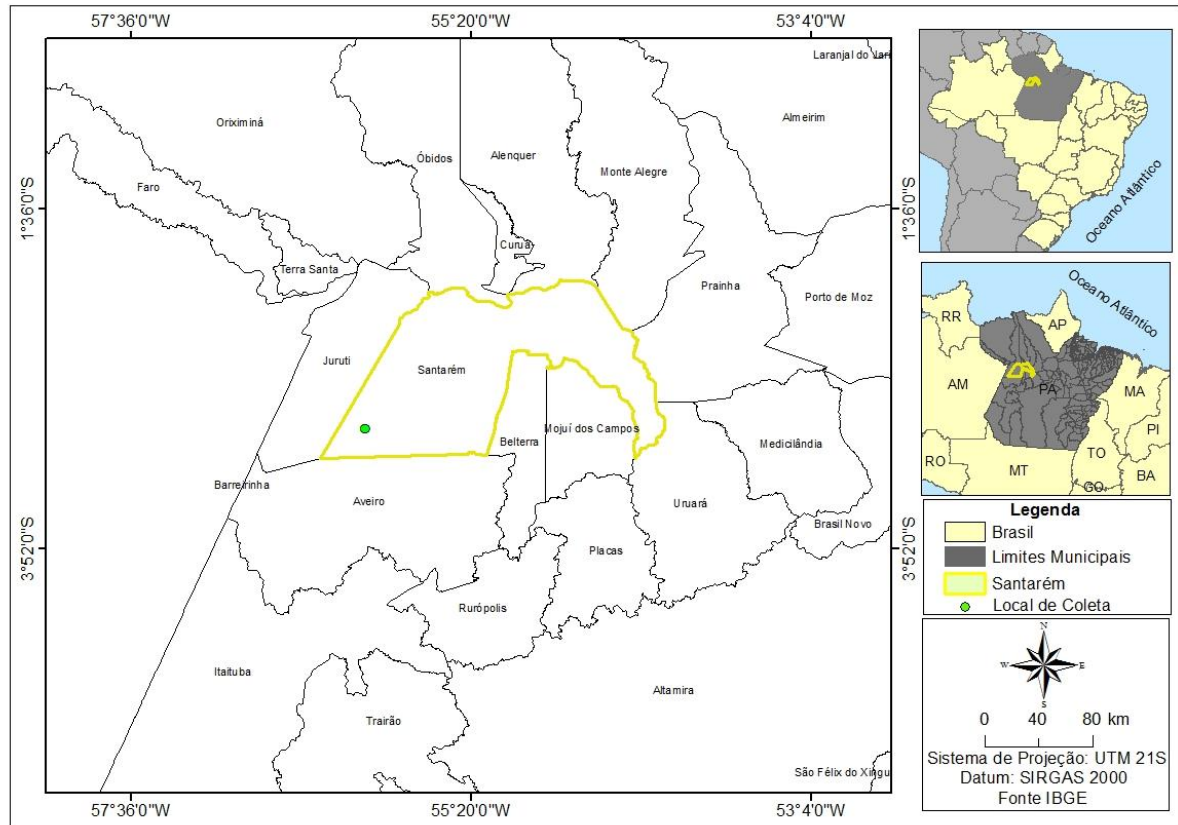
Para as análises de espectrometria de massas foram utilizados os solventes: etanol (grau HPLC; Tedia®, EUA), água ultrapurificada (Millipore®, EUA) e ácido fórmico (J.T. Baker®, UK)). Para a análise em RMN das compostos isolados nos procedimentos cromatográficos foram utilizados solventes deuterados: Dimetilsulfóxido deuterado - DMSO-d₆ (Aldrich) e metanol deuterado - CD₃OD (Aldrich). Para a derivatização do extrato etanólico de Jatobá em CG-MS utilizou-se o reagente trimetilsilil-diazometano -TMSD (Aldrich).

Na triagem fitoquímica do extrato etanólico e das frações de Jatobá foram utilizadas placas de alumínio (10 x 10 cm) e sílica 60 *mesh*, espessura da camada de 0,20 mm, marca Merck. As placas foram eluídas em cuba saturada utilizando-se dos seguintes sistemas: diclorometano:metanol:água (43:37:20, v/v/v, fase orgânica); hexano: acetato de etila (60:40, v/v), tolueno: éter (1:10, v/v). A revelação das placas foi feita com luz UV (254 nm e 365 nm), anisaldeído/ácido sulfúrico, nesta ordem; outros reveladores como vanilina sulfúrica e iodo foram utilizados.

4.2 Caracterização da área de estudo

Para esta pesquisa foram utilizados resíduos madeireiros (galhos) e a seiva de *H. courbaril* (Jatobá), proveniente de uma área de manejo da Empresa Fortimber Florestal, próximo à comunidade de Cachoeira do Aruã, localizado no município de Santarém, Pará, Brasil, com temperaturas médias anuais entre 26 e 28°C, umidade relativa anual entre 80-85%, pluviosidade média anual entre 2.000 e 2.800 mm, e tipologia vegetal predominante de Floresta Ombrófila Densa (Figura 13).

Figura 13 - Mapa de localização da região de coleta das amostras de *H. courbaril*.



Fonte: Elaborado pelo próprio Autor.

4.3 Coleta do material vegetal, obtenção do extrato e da seiva de *H. courbaril*

4.3.1 Resíduo madeireiro de *H. courbaril*

Nesta área, coletou-se amostra de cerne de *H. courbaril* retirada a dois metros da segunda bifurcação do galho (resíduo florestal) deixado *in loco*, sendo que todos os galhos amostrados possuíam mais de 50 cm de diâmetro. Posteriormente o material foi identificado cientificamente, por especialistas, no laboratório de Tecnologia da Madeira (LTM) da Universidade Federal do Oeste do Pará – UFOPA e na Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) Amazônia Oriental.

No laboratório, os resíduos madeireiros (galhos) coletados foram desdobrados em plaina elétrica devidamente higienizada afim de evitar contaminação, posteriormente realizou-se a coleta da serragem (Figura 14).

Figura 14 – Serragem obtida a partir do desdobro do resíduo madeireiro de *H. courbaril*.



Fonte: Elaborado pelo próprio Autor.

Após a obtenção da serragem, as amostras foram secas em estufa de circulação forçada e renovação de ar SL-102 (40°C por 96 horas), Após esses procedimentos, a serragem foi triturada em um moinho de facas seguido pela classificação em peneiras (40-60 mesh).

4.3.1.1 Obtenção do extrato etanólico do resíduo madeireiro de jatobá

Utilizou-se 50g de serragem seca para a extração em 1 L de etanol 92,8° INPM, sendo o solvente antes tratado com Hidróxido de Sódio (NaOH a 2%) e destilado usando destilação simples. A extração foi realizada em triplicata em aparelho de Soxhlet por 8h.

O extrato etanólico foi concentrado a pressão reduzida a 50°C em evaporador rotativo Fisatom, modelo 801 com sistema de refrigeração acoplado. Após a evaporação do solvente, a amostra foi pesada, armazenada em frasco âmbar hermeticamente fechado e mantidos sob refrigeração a 10°C.

Para a pesagem do extrato foi utilizado balança analítica de precisão Shimadzu®, modelo AY-220 (capacidade para 220 g e precisão de 0,0001 mg). Após a remoção total do solvente (Figura 15), foram obtidos os rendimentos dos extratos pela seguinte equação 1:

$$\text{Rendimento (\%)} = \frac{\text{Massa do extrato}}{\text{Massa do material vegetal}} * 100 \quad (1)$$

Figura 15 – Extrato etanólico seco de *H. courbaril*.



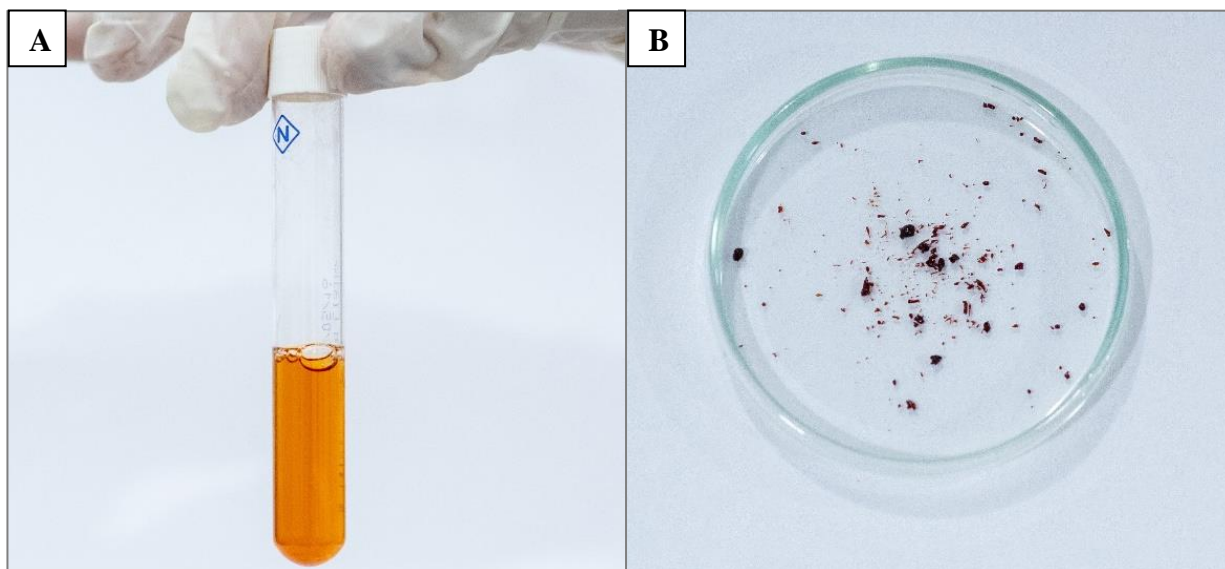
Fonte: Elaborado pelo próprio Autor.

4.3.2 Seiva de *H. courbaril*

Coletou-se a seiva de *H. courbaril*, a partir de um orifício no fuste da árvore utilizando um trado de ferro, a fim de se obter a seiva *in natura* (aproximadamente 5,0 litros), e para isto, utilizou-se uma conexão de uma mangueira encaixada entre o orifício e o recipiente coletor. Após o procedimento da coleta, o orifício foi vedado, a fim de impedir vazamento de seiva e/ou ataque de organismos xilófagos na planta.

Após a obtenção da seiva de *H. courbaril* (Figura 16A), esta foi levada ao laboratório e evaporada em rotaevaporador rotativo sob pressão reduzida equipado com uma bomba a vácuo e após concentrada (Figura 16B), as amostras foram pesadas, armazenadas em frascos âmbar hermeticamente fechados e mantidos sob refrigeração (8°C).

Figura 16 – Seiva de *H. courbaril* in natura (A) e após concentração em rotaevaporador (B).



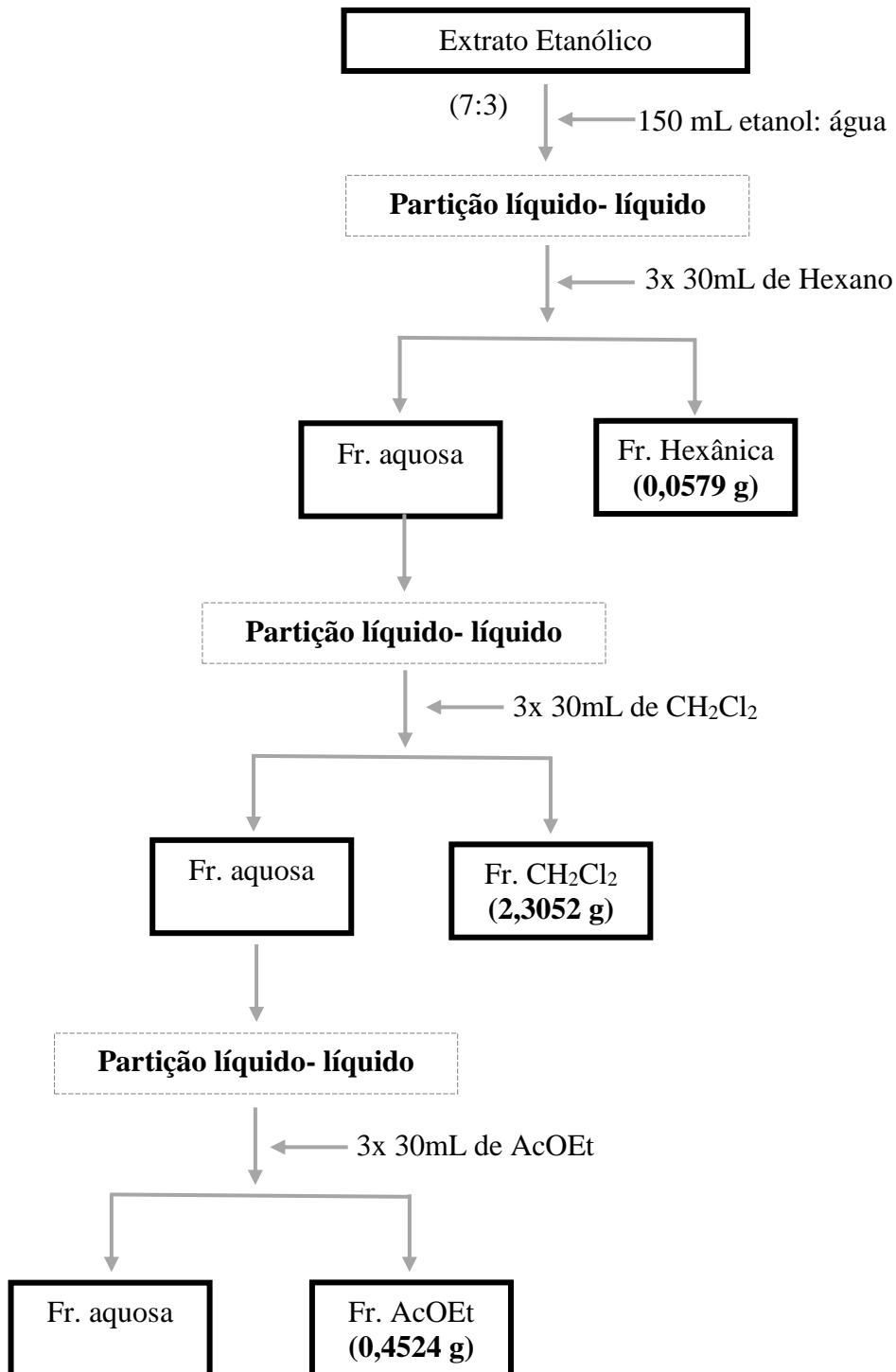
Fonte: Elaborado pelo próprio Autor.

4.4 Partição líquido-líquido do extrato etanólico do resíduo madeireiro de *H. courbaril*

A partição líquido-líquido tem por objetivo fracionar o extrato bruto de acordo com a polaridade das substâncias presentes, usando-se para isto solventes de diferentes polaridades. Para o processo são necessárias duas fases: a aquosa e a orgânica. Para criar a fase aquosa, a amostra foi diluída no sistema etanol/água.

Para o fracionamento por polaridade foram utilizados 3 g de extrato etanólico obtido via Soxhlet e solubilizado em 150 mL de solução etanol/água 70:30. Transferiu-se a solução para um funil de separação, posteriormente iniciou-se o processo de partição líquido-líquido pela ordem dos solventes conforme a sua polaridade: hexano, diclorometano e acetato de etila (3 x 30 mL cada) (Figura 17 e 18).

Ao final, as soluções foram secas com sulfato de sódio (Na_2SO_4), filtradas e concentradas em evaporador rotativo a pressão reduzida. Após esses processos, as frações foram analisadas por Cromatografia em Camada Delgada (CCD), posteriormente por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massa (CG-EM).

Figura 17 - Fluxograma da partição líquido-líquido do extrato etanólico de *H. courbaril*.

Fonte: Elaborado pelo próprio Autor.

Figura 18 - Partição líquido-líquido do extrato etanólico do resíduo de *H. courbaril* com solventes de diferentes polaridades (hexano, diclorometano e acetato de etila).



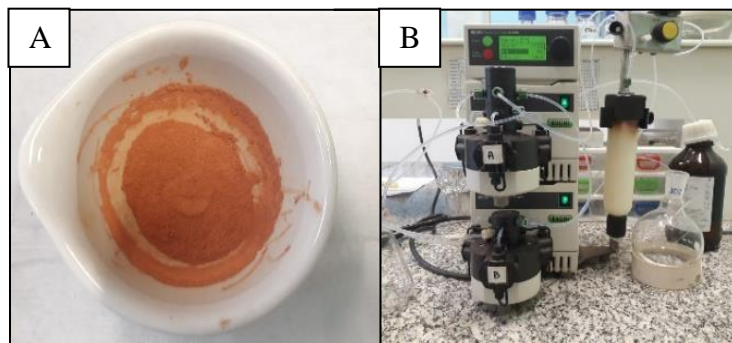
Fonte: Elaborado pelo próprio Autor.

4.5 Fracionamento do extrato etanólico do resíduo madeireiro de *H. courbaril*

Utilizou-se a técnica de cromatografia líquida de média pressão (MPLC), objetivando a separação e purificação de moléculas do extrato etanólico de Jatobá, para aplicações a nível analítico e preparatório. Inicialmente foram misturados 2 g de extrato etanólico com 6 g de areia (proporção 1:3) em um gral de porcelana com pistilo (Figura 19 A), para então serem inseridos no equipamento (Figura 19 B).

Para esta análise utilizou-se um sistema Buchi, equipado com uma bomba gerente C-615 que comporta outras duas bombas (módulos C-601), permitindo a formação do gradiente binário de solventes de 10%, 20%, 30%, 40% e 60% (etanol: água) e uma vazão de 7,5 mL min⁻¹ e pressão de 2,8 Bar.

Figura 19 – Técnica de cromatografia líquida de média pressão (MPLC).



Fonte: Elaborado pelo próprio Autor.

Posteriormente coletou-se 19 frações, denominadas: HC-1, HC-2, HC-3, HC-4, HC-5, HC-6, HC-7, HC-8, HC-9, HC-10, HC-11, HC-12, HC-13, HC-14, HC-15, HC-16, HC-17, HC-18 e HC-19. Abaixo, encontra-se o fluxograma das frações isoladas (Figura 24).

Foi realizado uma triagem fitoquímica das frações coletadas para verificar a similaridade entre elas, para isto foram utilizadas placas de alumínio (10 x 10 cm) e sílica 60 *mesh* com indicador fluorescente 254 nm e espessura da camada de 0,20 mm, em que estas foram eluídas com clorofórmio: metanol: água na proporção 43: 37: 20. As placas foram reveladas em luz UV (254 nm e 365 nm) e anisaldeído sulfúrico.

Realizou-se a purificação das frações do extrato etanólico de *H. courbaril* em um cromatógrafo líquido semi-preparativo de gradiente binário, acoplado a um detector de arranjo de fotodiodos (PAD) (Figura 20), em que inicialmente foram injetados 50 μ L das frações no cromatógrafo e então eram coletados as amostras conforme os picos se formavam, sendo obtido frações mais puras e até mesmo, substâncias isoladas. A separação dos compostos ocorreu por meio de uma coluna empacotada com fase reversa C18 imobilizadas com octadecilsilano. A condição inicial da fase móvel utilizada consistiu de água 70% (eluente A) e metanol 30% (eluente B) e a vazão utilizada de 4,0 mL.min⁻¹.

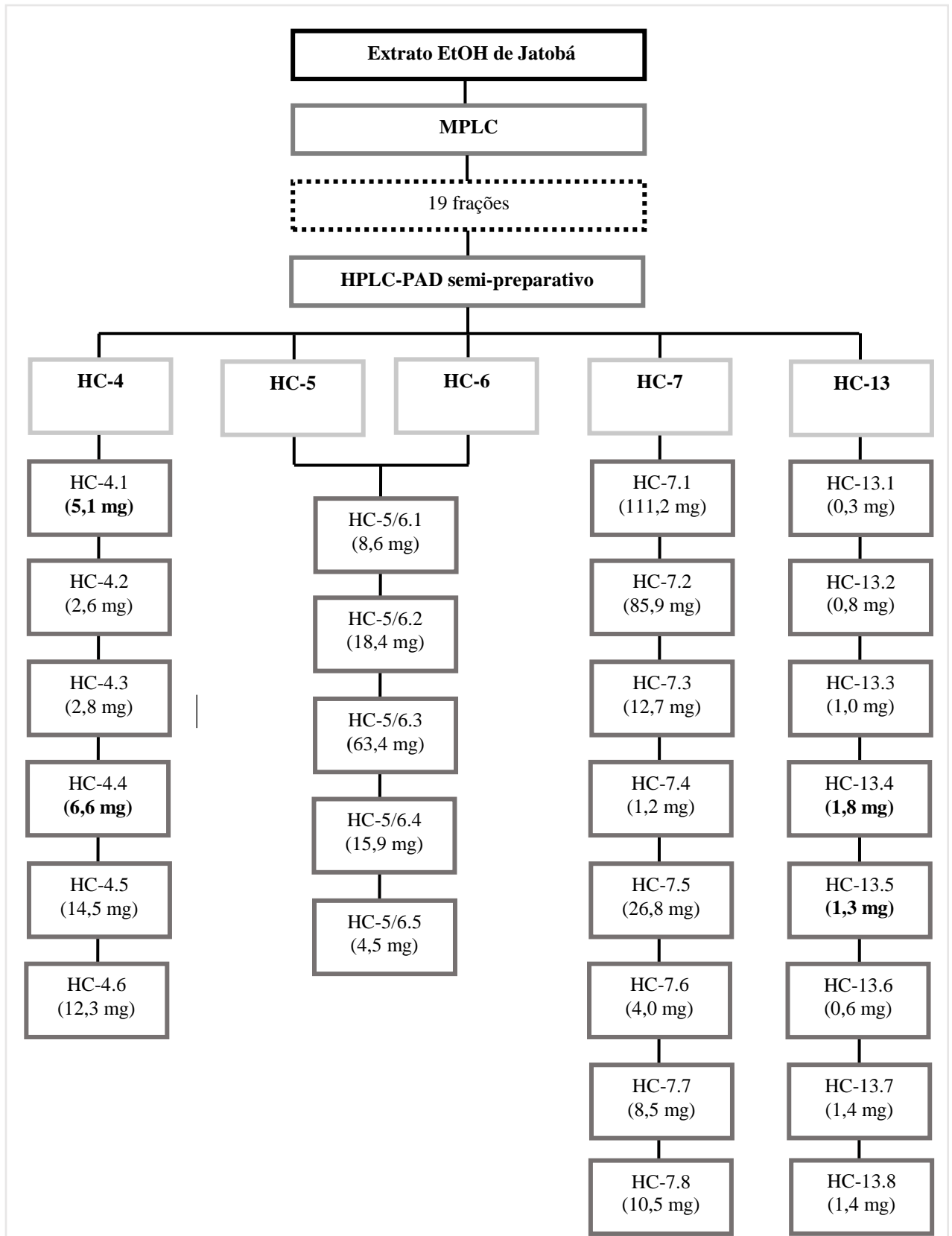
Figura 20 – Cromatógrafo líquido semi-preparativo de gradiente binário, acoplado a um detector de arranjo de fotodiodos (PAD)



Fonte: Elaborado pelo próprio Autor.

Por meio da e cromatografia líquida de alta eficiência semi-preparativa foram analisadas e purificadas cinco frações (HC-4, HC-5, HC-6 e HC-7 e HC-13), originando assim, as demais frações (Figura 21). As frações HC-5 e HC-6 foram unificadas devido à similaridade apresentada, após a análise por Cromatografia em Camada Delgada (CCD).

Figura 21 - Fluxograma de isolamento dos compostos no extrato etanólico de Jatobá.



Fonte: Elaborado pelo próprio Autor.

Após a obtenção das frações, essas foram concentradas em um rotaevaporador rotativo sob pressão reduzida (Heidolph®, Laborota 4001 – efficient) equipado com uma bomba a vácuo (Heidolph®, Rotavac valve control).

4.6 Análise e identificação das substâncias extraídas

Posterior ao procedimento de purificação, foi realizado a identificação de substâncias fenólicas utilizando técnicas de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) uni e bidimensionais. A RMN consiste em uma técnica espectroscópica para o estudo de aspectos estruturais e dinâmicos de moléculas orgânicas em solução. As análises de RMN unidimensional ^1H e ^{13}C e a bidimensional HSQC, HMBC e TOCSY foram realizadas em espectrômetros de RMN Bruker® Avance III HD 600 (14,1 Tesla) e Bruker® Fourier 300 (7,1 Tesla), sendo as amostras dissolvidos em Dimetilsulfóxido deuterado (DMSO-d₆ e CD₃OD). Para a aquisição dos deslocamentos químicos dos espectros utilizou-se o *software MestReNova* versão 6.0.2.

4.7 Análise do extrato etanólico e da seiva por CLAE-IES-EM/EM

As amostras de *H. courbaril* (extrato e seiva) foram pré-tratadas Extração por Fase Sólida (*Solid Phase Extraction* - SPE) (Chromabond®, 45 μm , 500 mg, 6 mL). Os cartuchos foram pré-ativados com EtOH (3,0 mL) e equilibradas com EtOH/H₂O (9:1, v/v) (3,0 mL). Foram solubilizados 20 mg de cada amostra em 1,5 mL de EtOH/H₂O 9:1 (v/v), carregados em um cartucho C-18 e eluídos com 1,5 mL da mesma fase móvel. O eluato seco foi suspenso em EtOH a uma concentração de 2,0 mg.mL⁻¹ e filtrado com filtro Millex® PTFE (0,22 μm , 25 mm).

A análise cromatográfica do perfil químico do extrato etanólico e da seiva foi realizada por espectrometria de massas utilizando o sistema Shimadzu UFLC (Kyoto, Japão) acoplado a um detector de arranjo de fotodiodos (PDA) com faixa de varredura no ultra violeta de 200-450 nm, modelo SPD -M20A (Shimadzu®) e um espectrômetro de massas Íon Trap amazon - SL (Bruker Daltonics®), com fonte de ionização por eletrospray (ESI) em modo negativo. As separações cromatografia líquida foram conduzidas usando coluna C18 (Luna C18 250 x 4,6 mm). O volume de injeção e a vazão aplicados foram de 1 μL e 0,7 mL.min⁻¹, respectivamente. Para eluição da amostra, um gradiente linear com fase móvel composta por água acidificada com ácido fórmico 0,1% (solvente A) e etanol (solvente B), de 20 a 75% (B) foi empregado por 40 minutos.

Os parâmetros de EM foram: HV *offset* da placa terminal -500 V, nebulizador 50 psi, gás seco com fluxo de 10 L.min⁻¹, temperatura seca de 300 °C e tensão capilar de - 4500 V. Foram registrados os espectros na faixa de *m/z* 50-1800 a cada 0,2 s. Os experimentos de fragmentação foram realizados por dissociação induzida por colisão (*Collision induced dissociation* - CID) em funcionamento em EMⁿ automático (fragmentação inteligente) utilizando o modo UltraScan para aquisição de EM/EM e aumento da energia de colisão com a amplitude máxima de fragmentação de 75%.

Os espectros de massas foram obtidos no modo negativo, por ser mais sensível na análise de flavonóides, sendo que o comportamento da fragmentação foi capaz de fornecer informações adicionais e complementares para a identificação dos compostos (CUYCKENS; CLAEYS, 2004). Os espectros de massas adquiridos no modo negativo foram processados no *software* DataAnalysis (versão 4.3, Bruker®).

É comum a utilização de solventes tóxicos como metanol e acetonitrila em CLAE-IES-EM, e as análises do resíduo madeireiro e da seiva *H. courbaril* com o uso do biosolvente etanol como alternativo não tóxico foi um diferencial neste trabalho (ORDOÑEZ et al., 2015; PACHECO et al., 2019).

Embora os solventes alternativos não seja tão usuais quando comparado com os convencionais, esses podem proporcionar análises eficientes quando combinados com temperaturas elevadas (BORGES; BOTTOLI; COLLINS, 2010). Além dos benefícios abordados acima, o uso do etanol em análises é uma alternativa interessante, já que o Brasil é um grande produtor, e este é um solvente orgânico não tóxico, produzido a partir de fontes renováveis, sendo mais barato, não gera resíduos e ainda é de grande disponibilidade no país (LANÇAS, 2012).

4.8 Análise de dados por rede molecular (*Molecular networking* - GNPS)

O extrato etanólico e a seiva de *H. courbaril* foi analisado a partir da abordagem de redes de interações moleculares ou *molecular networking* por meio da plataforma GNPS (*Global Natural Products Social Molecular Networking*) (WANG et al., 2016).

Para a análise, os dados CLAE-IES-EM/EM foram convertidos para o formato mzML no software MSConvert (ProteoWizard) usando o filtro Peak Picking. Os arquivos mzML foram processados em MZmine2 v.2.53 (<http://mzmine.sourceforge.net/>) (PLUSKAL et al., 2010) usando os seguintes parâmetros: nível de ruído MS1, 1x10³; Nível de ruído MS2, 1x10². Para a construção do cromatograma, foi empregado o método ADAP (NI et al., 2016)

com as seguintes condições de parametrização: limiar de intensidade de 1×10^3 ; intensidade máxima de 3×10^3 e tolerância m/z de 50 ppm; para a deconvolução, a opção Wavelets (ADAP) foi escolhida usando: coeficiente/limiar de área de 10; intervalo de duração de pico de 0,01-10,00 min; e intervalo de *wavelet* de tempo de retenção de 0,01-0,10 minutos. Os picos foram ordenados, filtrados e alinhados.

Os dados foram exportados e enviados diretamente para a plataforma GNPS (<https://gnps.ucsd.edu>) (WANG et al., 2016) e analisados pelo fluxo de trabalho *Feature-Based Molecular Networking* (NOTHIAS et al., 2020). Os dados foram filtrados pela remoção de todos os íons de fragmentos de EM/EM dentro de ± 17 Da do íon precursor m/z . Os espectros de EM/EM foram filtrados pela escolha apenas dos 6 principais íons produto na faixa de ± 50 Da em todo o espectro. A tolerância de massa para o íon precursor foi ajustada para 2,0 Da e a tolerância para o íon produto EM/EM para 0,5 Da. A rede molecular foi então criada, onde os arcos foram filtrados para ter um escore de cosseno acima de 0,70 e mais de 6 picos combinados. Além disso, os arcos entre dois nodos foram mantidos na rede se e somente se cada um dos nodos aparecesse em cada um dos outros, os 10 nodos mais semelhantes. Finalmente, o tamanho máximo de uma família molecular foi fixado em 100, e os arcos com menor escore foram removidos das famílias moleculares até que o tamanho da família molecular ficasse abaixo desse limite. Os espectros na rede foram então pesquisados contra as bibliotecas espectrais GNPS (WANG et al. 2016; HORAI et al., 2010). As redes moleculares foram visualizadas usando o software *Cytoscape* (SHANNON et al., 2003).

As informações sobre a rede molecular podem ser acessadas publicamente em gnps.ucsd.edu/ProteoSAFe/status.jsp?task=0e7a19c7fad446c386af52987b6f2654.

Para a anotação das substâncias foram consideradas as sugestões da biblioteca GNPS, e para aquelas que não foram anotadas por esta biblioteca, foi utilizado o Dicionário de Produtos Naturais (DNP) (<http://dnp.chemnetbase.com>), bem como estudos baseados na estrutura química, padrão de fragmentação e por comparação com os relatados na literatura para o gênero *Hymenaea*.

4.9 Análise do extrato etanólico por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG-EM)

Os extratos brutos e frações foram caracterizados no Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). O equipamento utilizado para Cromatografia Gasosa foi o Cromatógrafo a Gás

acoplado a Espectrômetro de Massas Agilent, modelo: HP-6890 acoplado a detector seletivo de massas.

Para análise dos compostos voláteis do extrato etanólico do resíduo madeireiro de jatobá foram utilizados as seguintes parâmetros: coluna capilar HP-5MS (30m x 0,25 mm x 0,25 mm), temperatura do injetor de 250°C, temperatura do detector de 300 °C, temperatura da coluna de 80 °C, gás de arraste He 1,0 mL.min⁻¹. Os espectros de massa gerados foram comparados com os disponibilizados pela biblioteca NIST05 e bibliografia Adams (2007).

4.9.1 Derivatização dos extratos

Com objetivo de melhorar a volatilidade dos compostos presentes na amostra e permitir a sua identificação, utilizou-se a técnica de derivatização do extrato etanólico e das frações hexânica, diclorometânica, acetato de etila realizado no Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Para esta etapa, solubilizou-se 10 mg de cada um dos extratos do resíduo de Jatobá em 2 mL de solução CH₂Cl₂:MeOH (90:10) e em seguida adicionou-se o reagente trimetilsilil-diazometano (TMSD) (BOAVENTURA JR., 2015).

4.10 Avaliação do potencial antioxidante, fenólicos e flavonóides totais de *H. courbaril*

Para a realização dos ensaios antioxidante e da determinação do teor de fenólicos e flavonóides totais foram utilizados três repetições de cada amostra (seiva e extrato etanólico), sendo a leitura da absorvância realizada em espectrofotômetro BEL® modelo SP 1102.

4.10.1 Determinação da atividade antioxidante

Dois métodos *in vitro* foram utilizados para avaliar a atividade antioxidante do extrato etanólico e da seiva de *H. courbaril*, sendo os ensaios de captura de radicais livres DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazina) e de Redução do Ferro (FRAP) em que se utilizam espécies radicalares estáveis e a detecção do ponto final que se realiza por absorvância.

Para o ensaio de captura de radicais livres DPPH utilizou-se as concentrações de 50-800 µg.mL⁻¹ para a seiva e de 5- 150 µg.mL⁻¹ para o extrato. Em ambiente escuro, foram transferidos uma alíquota de 0,1 mL de cada diluição do extrato para tubos de ensaio com 3,9 mL do radical DPPH e homogeneizados em agitador de tubos. Foram utilizados 0,1 mL da

solução controle (solução de álcool etílico 50% e 40 mL da solução de acetona 70%), completando o volume para 100 mL com água destilada com 3,9 mL do radical DPPH, e então estes foram homogeneizados.

Foi utilizado o álcool etílico, como branco, para fim de calibração do espectrofotômetro. As leituras (à 515 nm) foram monitoradas a cada minuto para observação da redução da absorbância até sua estabilização. A atividade foi determinada por meio da capacidade dos antioxidantes presentes nas amostras em sequestrar o radical estável DPPH (RUFINO et al., 2007).

As absorbâncias das amostras (AbsA) foram correlacionadas à absorbância do branco (AbsB), que consiste apenas em solução etanólica de DPPH. A capacidade antioxidante é expressa em EC 50 % $\mu\text{g.mL}^{-1}$, calculada por regressão linear.

O método de Redução do Ferro (FRAP) foi realizado de acordo com Rufino et al. (2006), em que inicialmente preparou-se em tubos de ensaio, cinco diluições diferentes (50-800 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para a seiva e de 50-400 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para o extrato), em triplicata, e em ambiente escuro, foram transferidos uma alíquota de 90 μL de cada diluição do extrato e da seiva para tubos de ensaio, acrescentando 270 μL de água destilada, misturando com 2,7 mL do reagente FRAP, posteriormente foram homogeneizados em agitador de tubos e mantido em banho-maria a 37 °C (RUFINO et al., 2006).

Foram realizados a leitura em espectrofotômetro a 595 nm após 30 minutos da mistura preparada. Foi utilizado o reagente FRAP como branco, com a finalidade de calibrar o espectrofotômetro. A partir das absorbâncias obtidas das diferentes diluições dos extratos, foram plotados a absorbância no eixo Y e a diluição ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) no eixo X. Em seguida, determinar a equação da reta.

Tanto para o método de DPPH como para FRAP, os resultados foram obtidos utilizando uma curva padrão de Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8- tetrametilcromano-2-carboxílico / Sigma Aldrich), sendo a curva do trolox de 50 a 1000 $\mu\text{mol.mL}^{-1}$.

4.10.2 Quantificação de fenólicos totais

O compostos fenólicos totais em *H. courbaril* foram determinados pelo método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu (SINGLETON; ROSSI, 1965; KÄHKÖNEN et al., 1999). Partiu-se de uma solução com 10mg de extrato e 25 mL de álcool etílico (40 $\mu\text{g. mL}^{-1}$). Alíquotas de 500 μL dessa solução contendo a amostra foram transferidas para cada tubo de ensaio. Adicionou-se 2000 μL de carbonato de sódio a 25% e 2500 μL do reagente Folin-

Ciocalteau. Após adicionar os reagentes, aguardou-se o tempo para reação de 30 minutos e realizou-se a medida das absorvâncias a 740 nm.

O cálculo dos resultados foi baseado em regressão linear a partir de curva analítica de seis pontos ($10 - 1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ da seiva e de $10-200 \mu\text{g.mL}^{-1}$ do ext. etanólico) do padrão ácido gálico ($y = 83,532x - 0,5777$ e $R^2 = 0,99$) e o resultado expresso em μg de extrato equivalentes ao ácido gálico (EAG) por miligrama de matéria seca.

4.10.3 Quantificação de flavonóides totais

Determinou-se o teor de flavonóides totais por método espectrofotométrico (LAMAISON; CARNET, 1990) com adequações. Foram determinadas as concentrações de flavonóides por meio da reação com cloreto de alumínio (AlCl_3).

Inicialmente preparou-se a solução com 10 mg de extrato e 25 mL de etanol, posteriormente foi posto em cada tubo de ensaio $600\mu\text{L}$ da amostra, $2400\mu\text{L}$ de cloreto de alumínio (AlCl_3) 5%, e após 40 minutos realizada a leitura em espectrofotômetro. O cálculo dos resultados foi baseado em regressão linear a partir de curva analítica de sete pontos ($2500-5000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ da seiva e de $100-350 \mu\text{g.mL}^{-1}$ do ext. etanólico do Jatobá) do padrão Rutina ($y = 218,15x - 1,7073$ e $R^2 = 0,99$) a 420 nm e o resultado expresso em μg equivalentes a Rutina (ERT) por gramas de matéria seca.

4.11 Atividade antimicrobiana

4.11.1 Cepas utilizadas

Para os ensaios antimicrobianos foram utilizados microrganismos de referência pertencentes à micoteca e bacterioteca do Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal do Oeste do Pará (UFOPA), do Laboratório de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) e da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) (Tabela 1).

Tabela 1 - Microrganismos utilizados no ensaio biológico.

MICROORGANISMOS	REFERÊNCIA	CLASSIFICAÇÃO
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC23235	Bactéria Gram- positiva
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	ATCC12228	Bactéria Gram- positiva
<i>Micrococcus luteus</i>	ATCC 7468D	Bactéria Gram- positiva
<i>Clostridium tetani</i>	PINCQS 00067	Bactéria Gram- positiva
<i>Enterococcus faecalis</i>	NEWP 0033	Bactéria Gram- positiva
<i>Aeromonas hydrophila</i>	CP007518-2	Bactéria Gram- negativa
<i>Gardinerella vaginalis</i>	ATCC 49154	Bactéria Gram- negativa
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	ATCC 9826	Bactéria Gram- negativa
<i>Serratia marcescens</i>	ATCC 14756	Bactéria Gram- negativa
<i>Salmonella enterica subsp. enterica</i>	BM/NIHT 00236	Bactéria Gram- negativa
<i>Escherichia coli</i>	ATCC25922	Bactéria Gram- negativa
<i>Candida albicans</i>	UFPEDA 1007	Fungo leveduriforme
<i>Candida kruzei</i>	ATCC34135	Fungo leveduriforme

Fonte: Elaborado pelo próprio Autor.

4.11.2 Concentração inibitória mínima (CIM)

Foi determinada a ação biológica do extrato etanólico e da seiva extraída de *H. courbaril* por meio do método de microdiluição para avaliação da concentração inibitória mínima (CIM), expressa em microgramas por mililitros ($\mu\text{g.mL}^{-1}$), que representa a mais baixa concentração necessária para detectar a total inibição do crescimento microbiano (SILVA; BASTOS, 2007; JÚNIOR SOUZA; SALES; MARTINS, 2009).

A determinação da CIM foi realizada em triplicata, utilizando microplacas estéreis de 96 cavidades com fundo em forma de “U”, contendo 12 colunas e 8 linhas estas identificadas de A até H, sendo realizada a microdiluição em meio líquido Sabouraud (SD) para os fungos leveduriformes e meio líquido Mueller Hinton (MH) para as bactérias.

Foram preparadas suspensões microbianas padronizando o inóculo na escala de 0,5 MacFarland equivalente a $1,5 \times 10^4$ esporos.mL⁻¹ para fungos e de $1,5 \times 10^8$ UFC.mL⁻¹ para bactérias, sendo esse ajuste realizado em espectrofotômetro BEL® modelo SP 1102. Posteriormente, foram preparados e testadas as concentrações do extrato de 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 125 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 62,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 31,25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 15,625 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ frente a esses microrganismos. O ensaio foi realizado durante 48h para os fungos e 24h para bactérias.

Também foi testada a atividade antimicrobiana da substância Taxifolina, identificada por meio da técnica de Ressonância Magnética Nuclear uni e bidimensionais, (¹H, ¹³C, HMBC, HSQC), sendo testada as concentrações entre 250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ – 7,81 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Para a realização deste ensaio, foram selecionados os microrganismos viáveis, além daqueles em que

o extrato foi efetivo em CIM < 15,62 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, sendo estes: *Micrococcus luteus* ATCC 7468D, *Salmonella enterica subsp. enterica* BM/NIHT 00236, *Serratia marcescens* ATCC 14756 e *Neisseria gonorrhoeae* ATCC 9826. O ensaio com a substância isolada (taxifolina) foi realizado em triplicata.

Após 24h e 48h, adicionou-se em cada poço da placa teste 10 μL de resazurina a 0,01% (o que confere coloração azulada) como um indicador colorimétrico de viabilidade celular. As placas de Elisa foram postas em incubadora Thermo Shaker, modelo MB100-4A durante 2 horas. Caso a célula apresente atividade respiratória após a revelação, esta mostra coloração rosada, isso se deve inicialmente a uma reação de oxirredução, na qual a resazurina é convertida a resorufina (KASPER et al., 2020).

A concentração fungicida/bactericida foi determinada pela subcultura de uma alíquota de 10 μL do conteúdo dos poços correspondente a CIM, sendo realizado em triplicata nos respectivos meios de cultura. Após o tempo de incubação foi verificado a inibição do crescimento microbiano, indicando sua ação.

4.11.3 Antibiograma

Para o antibiograma foram utilizados discos de antibióticos (Laborclin[®]), com a finalidade de avaliar o perfil de sensibilidade ou resistência dos microrganismos patogênicos utilizados no ensaio antimicrobiano, através do método de difusão em ágar. Foram adotados os parâmetros de referência de resistência e sensibilidade recomendados pelo CLSI (*Clinical Laboratory Standard Institute*) que se baseia no método originalmente descrito por Bauer et al. (1966), sendo este o método mais exato para os quais foram desenvolvidos tabelas de sensibilidade e resistência e possuem o suporte por anos de estudos clínico laboratoriais extensivos (CLSI, 2005).

4.12 Análise estatística

Os valores experimentais da atividade antioxidante são plotados em relação à concentração do extrato. A partir das curvas de dose-resposta é capaz de obter a melhor correlação para os respectivos dados. Com base nas equações resultantes é calculada a concentração ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) de extratos correspondentes. Deste modo, os dados obtidos da atividade antioxidante tanto do extrato etanólico como para a seiva de *H. courbaril* foram avaliados através de análise de variância (ANOVA) ao nível de 5 % de significância ($p <$

0,05), com o auxílio do *software Sisvar* (versão 5.6). Em caso de diferença significativa ao nível de 5%, aplicou-se o teste de Tukey o qual avalia as diferenças entre os tratamentos, sendo que este teste foi aplicado para os dois métodos de análise da atividade antioxidante (DPPH e FRAP) para verificar quais tratamentos diferem entre si.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Rendimento do extrato etanólico e frações

O rendimento médio obtido para o extrato etanólico de *H. courbaril* foi de 16,09%. O rendimento é relacionado ao solvente utilizado, sendo o etanol uma molécula anfifílica, este capaz de extrair tanto substâncias com caráter apolar quanto polar (OLIVEIRA et al., 2016). Além disso, o rendimento da extração dos constituintes da planta também é influenciado pelas condições em que o processo é executado, o tempo, a temperatura e o método utilizado (WONGKITTIPONG et al., 2004; OLIVEIRA et al., 2016).

Por meio da partição líquido-líquido do extrato etanólico foram obtidos os seguintes rendimentos para as frações abaixo (Tabela 2):

Tabela 2 - Rendimento médio das frações obtidas do extrato etanólico de *H. courbaril*.

Fração	Rendimento médio %
Hexânica	1,93
Diclorometânica	76,84
Acetato de etila	15,08

Fonte: Elaborado pelo próprio Autor.

Para a fração diclorometânica foi obtido um rendimento de 76,84%, sendo este superior ao rendimento das demais frações, sugerindo que os compostos constatados no extrato etanólico bruto possuem maior afinidade com o solvente diclorometano, sendo possível também estimar que a partição líquido-líquido concentrou os metabólitos de média polaridade nesse extrato.

5.2 Estudo químico do extrato etanólico e da seiva DE *H. courbaril*

5.2.1 Cromatografia em Camada delgada (CCD)

A partir da CCD constatou-se que o extrato etanólico do resíduo madeireiro de *H. courbaril* possui em sua composição classes de compostos como terpenos, flavonóides e taninos. Autores afirmam a predominância dessas classes de compostos no Jatobá e correlacionam as substâncias com a atividade antifúngica do gênero (FERNANDES; SANTOS; PIMENTA, 2005). Polifenóis, flavonóides e taninos, juntamente com terpenoides já foram registrados no extrato etanólico da casca de *H. courbaril* (BEZERRA et al., 2013).

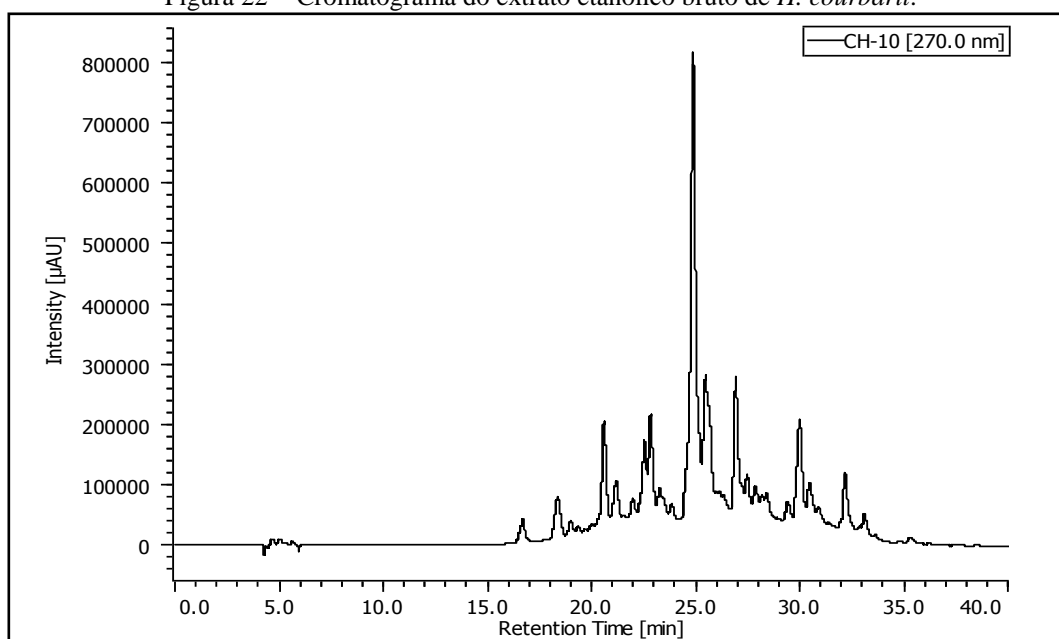
As demais classes avaliadas (alcalóides, cumarinas e derivados antracênicos) nesse extrato apresentaram resultados negativos após a revelação química.

5.2.2 Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detector por arranjo de diodos (CLAE-DAD).

O perfil cromatográfico do extrato etanólico e seiva de *H. courbaril* obtidos por CLAE-DAD, indicou a presença de bandas com diferentes intensidades, ao longo de quase todo o gradiente exploratório, evidenciando, que existem substâncias com ampla faixa de polaridade. A separação dos compostos foi realizada sob a melhor condição obtida por cromatografia líquida de alta eficiência.

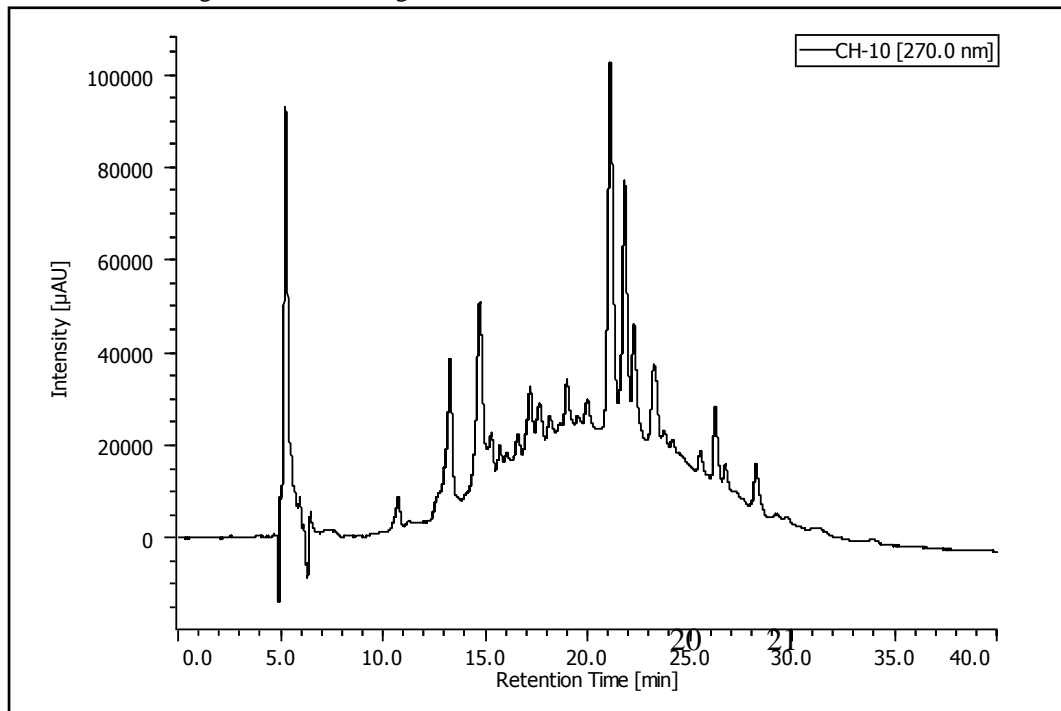
Ao comparar os cromatogramas CLAE-DAD obtidos do extrato etanólico (Figura 22) e seiva (Figura 23) de *H. courbaril* foi possível observar algumas similaridades entre as amostras. A partir da análise dos cromatogramas, foi possível sugerir que os principais picos presentes nas amostras do extrato etanólico e da seiva de *H. courbaril* podem ser indicados como fenólicos do tipo flavonóides, já que apresentavam comprimentos de onda em torno de 270nm. Por meio de levantamentos bibliográficos, constatou-se que os compostos fenólicos são frequentemente citados na literatura, inclusive nesta espécie (COSTA, 2012; COSTA et al., 2014). Verifica-se ainda que os flavonóides catequina, quercetina, miricetina e epicatequina são os fenólicos mais conhecidos e citados (SANTANA, 2014).

Figura 22 - Cromatograma do extrato etanólico bruto de *H. courbaril*.



Fonte: Elaborado pelo próprio Autor.

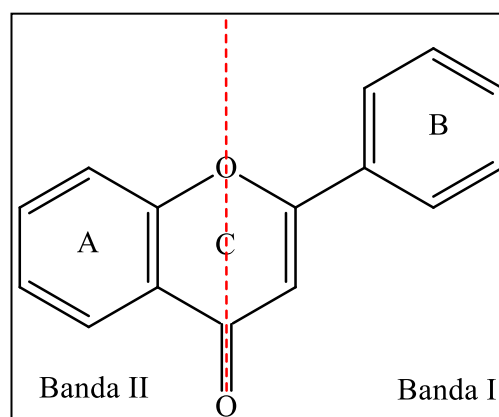
Figura 23 - Cromatograma da seiva de *H. coubaril*, em coluna C18.



Fonte: Elaborado pelo próprio Autor.

A maioria dos estudos de flavonóides englobam duas grandes faixas de absorção desta classe de composto quando registrados no UV-VIS (Faixas do UV: Ultravioleta; VIS: visível) e que são conhecidas como banda I que está entre 300-550 nm, representando a absorção do anel B, e a banda II, entre 240-285 nm, representando à absorção do anel A (KUMAR; PANDEY, 2013) (Figura 24).

Figura 24 – Representação da banda I e II dos flavonóides.



Fonte: Kumar & Pandey (2013).

Foi possível constatar na seiva de *H. courbaril* a presença de derivados da quercetina. Esta substância apresenta duas bandas de absorção, a banda I, que absorve entre 320-385 nm,

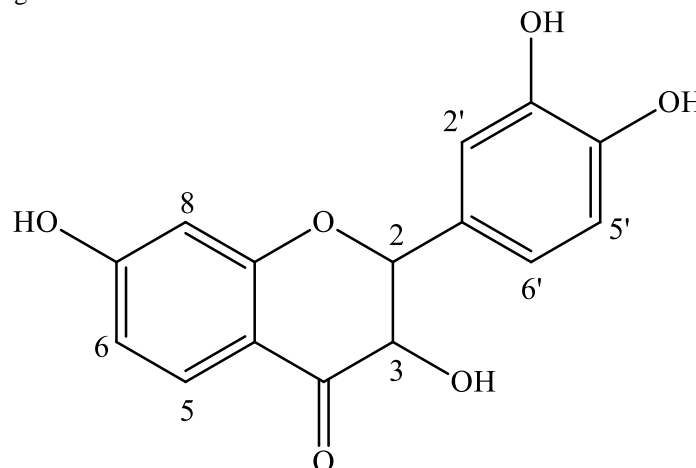
correspondente a porção B do anel, e a banda II, com absorção na faixa de 240- 280 nm, respectivo à porção do anel A (SOUZA; GIOVANI, 2005)

Sobre os flavanonóis, autores citam as faixas em que as bandas desses flavonóides podem ser observadas. O flavanonol taxifolina foi constatado com espectros de UV em 288 nm (ALMEIDA et al., 2016), sendo que esta substância foi um dos flavonóides encontrado neste trabalho.

5.2.3 Identificação dos compostos isolados dos extrato etanólico do resíduos madeireiro de *H. courbaril*

5.2.3.1 Identificação estrutural da substância **HC-4.1**.

Figura 25 - Substância **HC-4.1** isolada do extrato etanólico de *H. courbaril*.



Fonte: Elaborado pelo próprio Autor.

O espectro de RMN de ^1H (Figura 27) da substância **HC- 4.1**, apresentou dois sistemas distintos de anéis aromáticos fenólicos, sendo um com dois dupletos em δ_{H} 7,72 (1H; $J=8,7$ Hz; H-5) e δ_{H} 6,33 (1H; $J=2,2$ Hz; H-8) e um duplo duplete em δ_{H} 6,53 (1H; $J=8,7$ e 2,2 Hz; H-6), evidenciando um sistema trissubstituído. O outro apresentou dois dupletos em δ_{H} 6,99 (1H; $J=2,0$ Hz; H-2') e δ_{H} 6,81 (1H; $J=8,1$ Hz; H-5') e um duplo duplete em δ_{H} 6,86 (1H; $J=8,2$ e 2,0 Hz; H-6') que, em consonância com as multiplicidades e integração, sugeriram um anel trissubstituído. Adicionalmente, foram observados dois sinais em δ_{H} 4,94 (d; 1H; $J=11,8$ Hz; H-2) e em δ_{H} 4,49 (d; 1H; $J=11,8$ Hz; H-3) característicos de hidrogênios ligados a carbono sp^3 oxigenados.

A análise do espectro de DEPTQ (Figura 28) permitiu identificar oito carbonos metínicos e sete carbonos quaternários, sendo seis sinais característicos de carbono ligado a oxigênio (δ_c 167,3; 165,1; 85,3; 74,2; 146,3; 147,1) e uma carbonila em δ_c 194,5, confirmados por HMBC (Figuras 26 e 30).

As correlações observadas no mapa de contorno HMBC (Figuras 26 e 30) entre H-3 \leftrightarrow C-1' e H-2' \leftrightarrow C-2 permitiram estabelecer a conexão do anel C com o anel B. Foram observados também correlações entre H-5 \leftrightarrow C-4/C-9, H-6 \leftrightarrow C-8/C-10 e H-8 \leftrightarrow C6/C9 que associados às demais correlações visualizadas em HMBC (Figura 30, Tabela 3) e comparação com dados da literatura (LIU et al., 2019) permitiram identificar a substância **HC- 4.1** como sendo a dihidrofisetina, também conhecida como fustina (Figura 25).

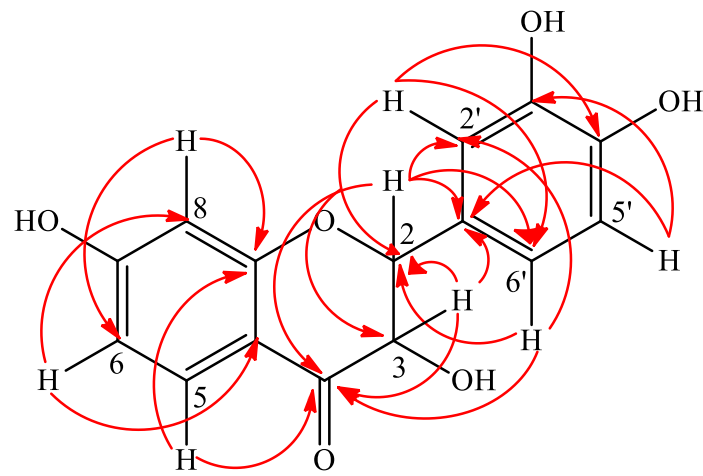
A fustina é descrito na literatura com ação antimicrobiana, antioxidante, antiproliferativa e antiinflamatória (COSTA et al., 2014; KUMBOONMA et al., 2018; LI et al., 2018). Esta substância já foi identificada na seiva de *H. courbaril* (COSTA et al., 2014), no entanto está sendo relatada pela primeira vez no extrato etanólico de *H. courbaril*.

Tabela 3 - Dados de RMN de ^1H , ^{13}C , HMBC (CD_3OD , 600 e 150 MHz) de **HC- 4.1** (δ em ppm e J em Hz).

Posição	δ_{H}	δ_c	HMBC
2	4,94 (d, $J=11,8$)	85,3	C3; C2'; C6'; C1'; C4
3	4,49 (d, $J=11,8$)	74,2	C2; C4; C1'
4	-	194,5	
5	7,72 (d, $J=8,7$)	130,1	C4; C9
6	6,53 (dd, $J=8,7; 2,2$)	111,9	C8; C10
7	-	167,3	
8	6,33 (d, $J=2,2$)	103,4	C6; C9
9	-	165,1	
10	-	113,3	
1'	-	130,0	
2'	6,99 (d, $J=2,0$)	115,6	C2; C4'; C6'
3'	-	146,3	
4'	-	147,1	
5'	6,81 (d, $J=8,1$)	115,7	C1'; C3'
6'	6,86 (dd, $J=8,2; 2,0$)	120,6	C2; C2'; C4'

Fonte: Elaborado pelo próprio Autor.

Figura 26 - Principais correlações observadas no mapa de contorno HMBC da substância **HC-4.1**.



Fonte: Elaborado pelo próprio Autor.

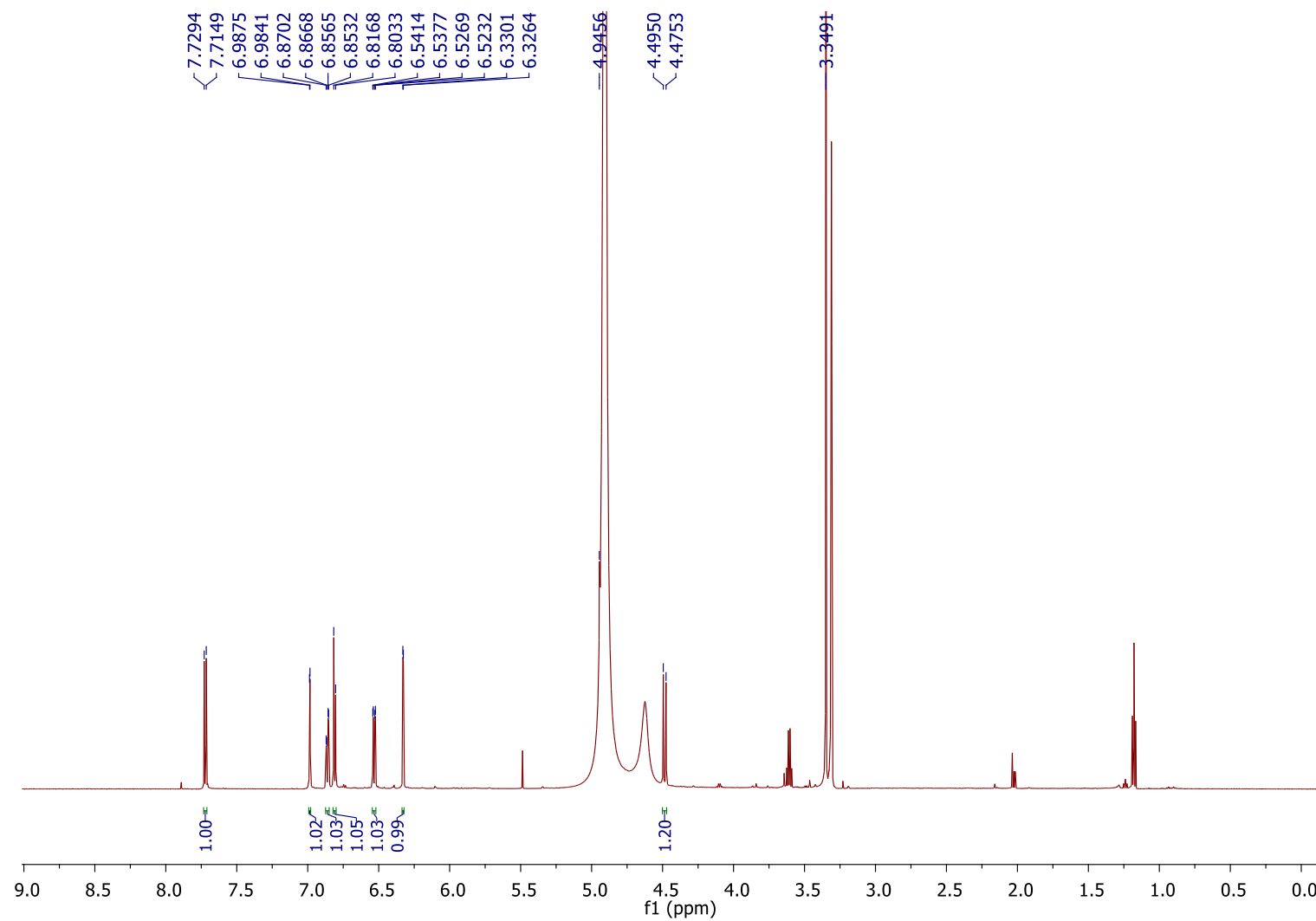
Figura 27 - Espectro de RMN de ^1H da substância **HC-4.1** (CD_3OD ; 600 MHz).

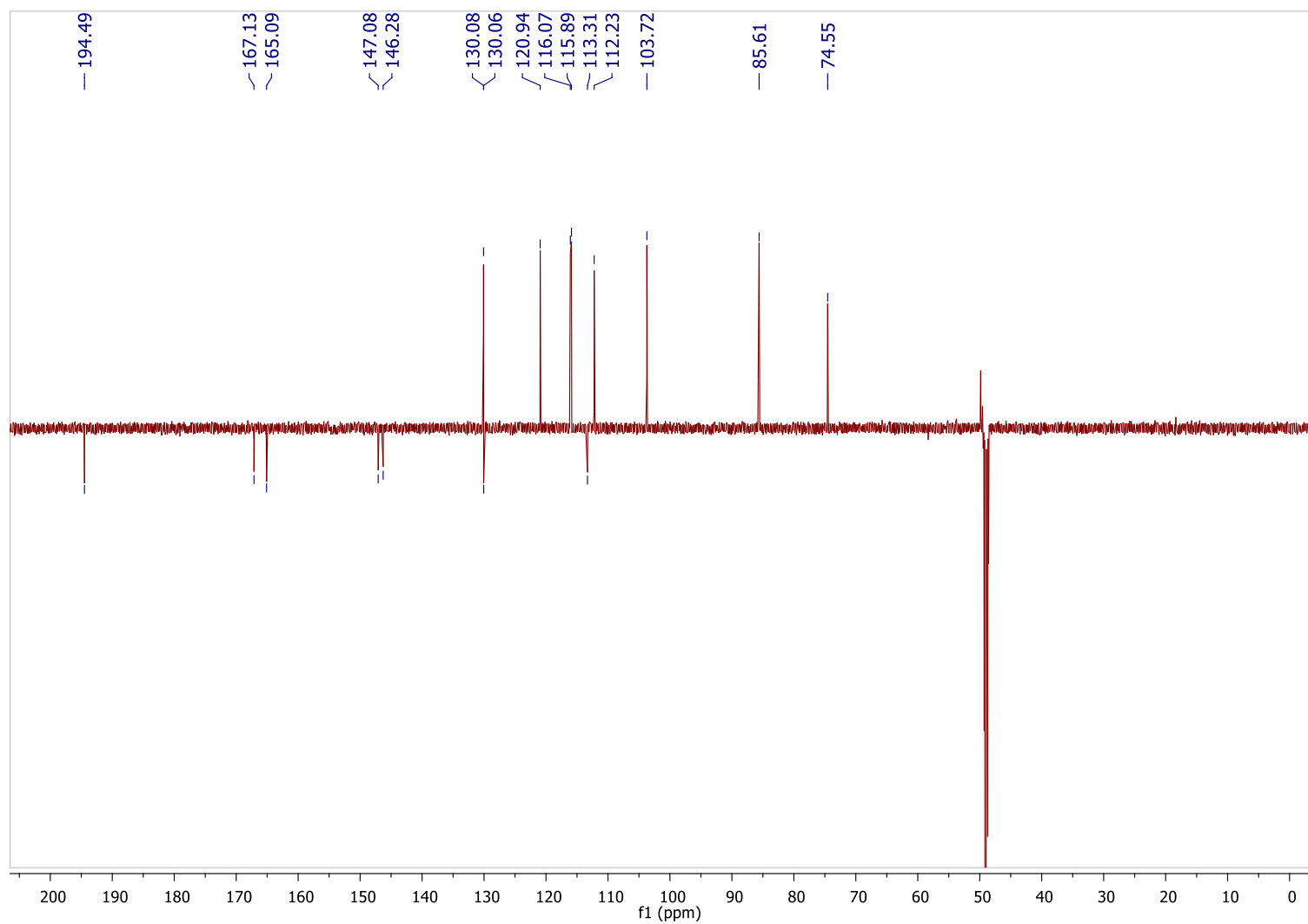
Figura 28 - Espectro de DEPTQ da substância **HC- 4.1** (CD₃OD; 150 MHz).

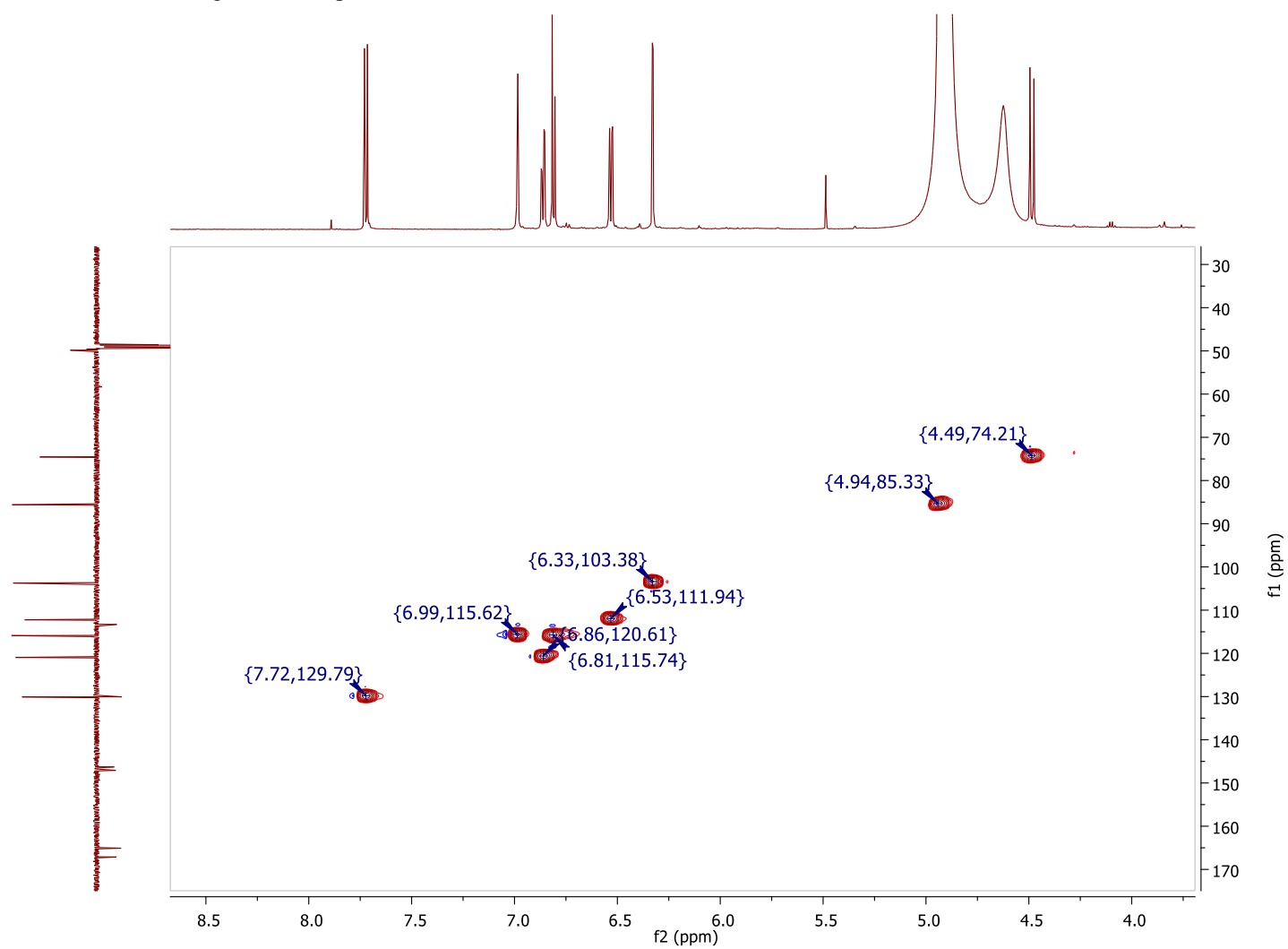
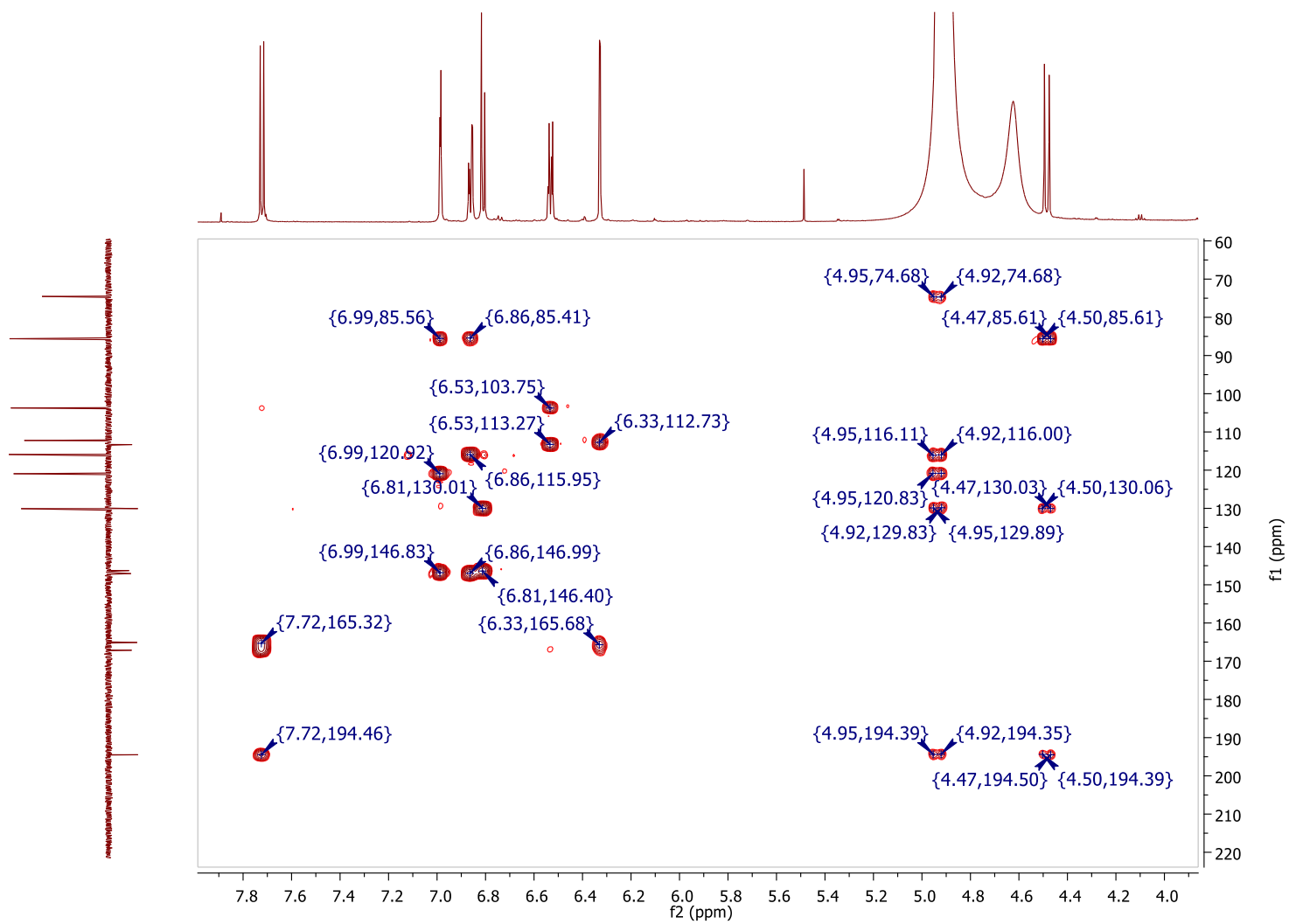
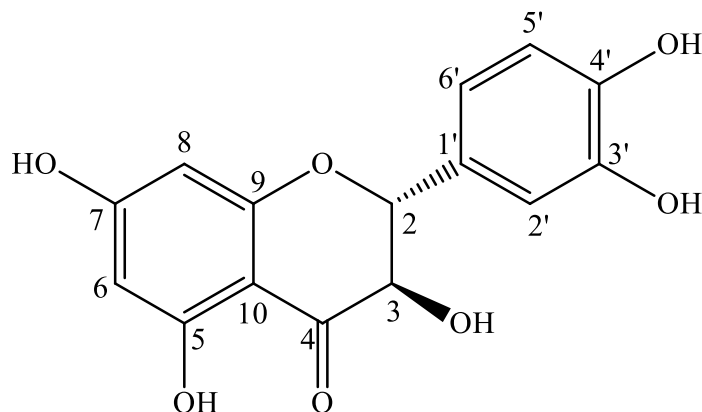
Figura 29 - Mapa de contorno HSQC da substância **HC-4.1** (CD₃OD; 600 e 150 MHz).

Figura 30 - Mapa de contorno HMBC da substância **HC-4.1** (CD₃OD; 600 e 150 MHz).

5.2.3.2 Identificação estrutural da substância **HC-4.4**.

Figura 31 - Substância **HC-4.4** isolada do extrato etanólico de *H. courbaril*.



Fonte: Elaborado pelo próprio Autor.

A partir da análise dos dados de RMN de ^1H e HSQC (Figuras 33 e 35) da substância **HC-4.4**, foi possível observar também a presença de dois sistemas de anéis aromáticos fenólicos, como constatado para a substância **HC-4.4**, sendo um com um par de dupletos em δ_{H} 5,92 (1H; $J=2,1$ Hz; H-6) e δ_{H} 5,88 (1H; $J=2,1$ Hz; H-8), evidenciando um acoplamento meta, compatível com um sistema tretrassubstituído. O outro apresentou dois dupletos em δ_{H} 6,96 (1H; $J=2,0$ Hz; H-2') e δ_{H} 6,81 (1H; $J=8,1$ Hz; H-5') e um duplo duplete em δ_{H} 6,84 (1H; $J=8,2$ e $2,0$ Hz; H-6') que, em consonância com as multiplicidades e integração, sugeriram um anel trissubstituído, compatível com um anel B flavonoídico. Foram observados ainda dois sinais em 4,92 (1H, H-2) e em 4,50 (d; 1H; $J=11,5$ Hz; H-3) característicos de hidrogênios ligados a carbono sp^3 oxigenados, sendo que sinal em δ_{H} 4,92 apareceu embaixo do sinal esperado para a água, no espectro de RMN de ^1H , o qual só foi possível de ser observado no mapa de contorno HSQC (Figura 35).

A análise do espectro de DEPTQ (Figura 34) permitiu identificar sete carbonos metínicos e oito carbonos quaternários, sendo sete sinais característicos de carbono ligado a oxigênio (δ_{C} 85,1; 73,6; 165,3; 168,8; 164,5; 146,3; 147,1) e uma carbonila em δ_{C} 198,4. A análise do mapa de contorno HSQC (Figura 35) permitiu associar os sinais de todos os hidrogênios a seus respectivos carbonos, conforme apresentados na tabela 4.

As correlações observadas no mapa de contorno HMBC (Figuras 32 e 36) entre H-6 \leftrightarrow C-8/C-10, H-8 \leftrightarrow C-9/C-10/C-7, H-5' \leftrightarrow C-1'/C-3' e H-2' \leftrightarrow C-4'/C-6'/C-2, permitiram estabelecer a conectividade entre os anéis A, B e C para a substância **HC-4.4**.

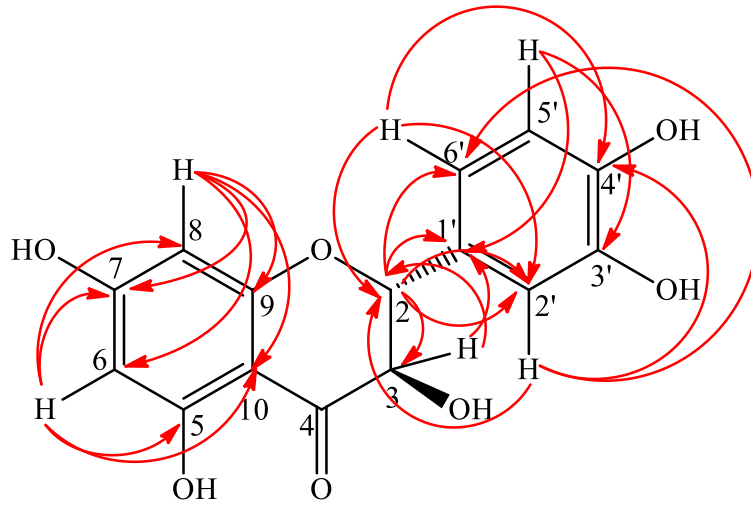
A comparação dos dados obtidos (Tabela 4) com os descritos na literatura (BAHIA et al., 2010) permitiram identificar esta substância como a Taxifolina (Figura 31). Esta

substância, conhecida como a aglicona da astilbina, já foi isolada a partir da seiva de *H. courbaril* (COSTA et al., 2014), no extrato AcOEt do cerne de *H. stigonocarpa* (MARANHÃO et al., 2013), e identificada na fração AcOEt da casca de *H. martiana* (PACHECO et al., 2019). É relatado ainda que a taxifolina possui atividade antioxidante, anticâncer, anti-edematogênicos, antiestrogênio, antimicrobiana e ação antinociceptiva (YOUNG; SEOK; HWAN, 2007; WANG et al., 2009; WUNGSINTAWEEKUL et al., 2011; HAQUE et al., 2019; CECHINEL-FILHO et al., 2000).

Tabela 4 - Dados de RMN de ^1H , ^{13}C , HMBC (CD_3OD , 600 e 150 MHz) de **HC-4.4** (δ em ppm e J em Hz).

Posição	δ_{H}	δ_{C}	HMBC
2	4,92	85,1	C3; C1'; C2'; C6'
3	4,50 (d, $J=11,5$)	73,6	C2; C1'
4	-	198,4	
5	-	165,3	
6	5,92 (d, $J=2,1$)	97,3	C5; C7; C8; C10
7	-	168,8	
8	5,88 (d, $J=2,1$)	96,3	C6; C7; C9; C10
9	-	164,5	
10	-	101,8	
1'	-	129,8	
2'	6,96 (d, $J=2,0$)	115,9	C2; C4'; C6'
3'	-	146,3	
4'	-	147,1	
5'	6,81 (d, $J=8,1$)	116,1	C1'; C3'
6'	6,84 (dd, $J=8,2; 2,0$)	120,9	C2; C2'; C4'

Fonte: Elaborado pelo próprio Autor.

Figura 32 - Principais correlações observadas no mapa de contorno HMBC da substância **HC-4.4**.

Fonte: Elaborado pelo próprio Autor.

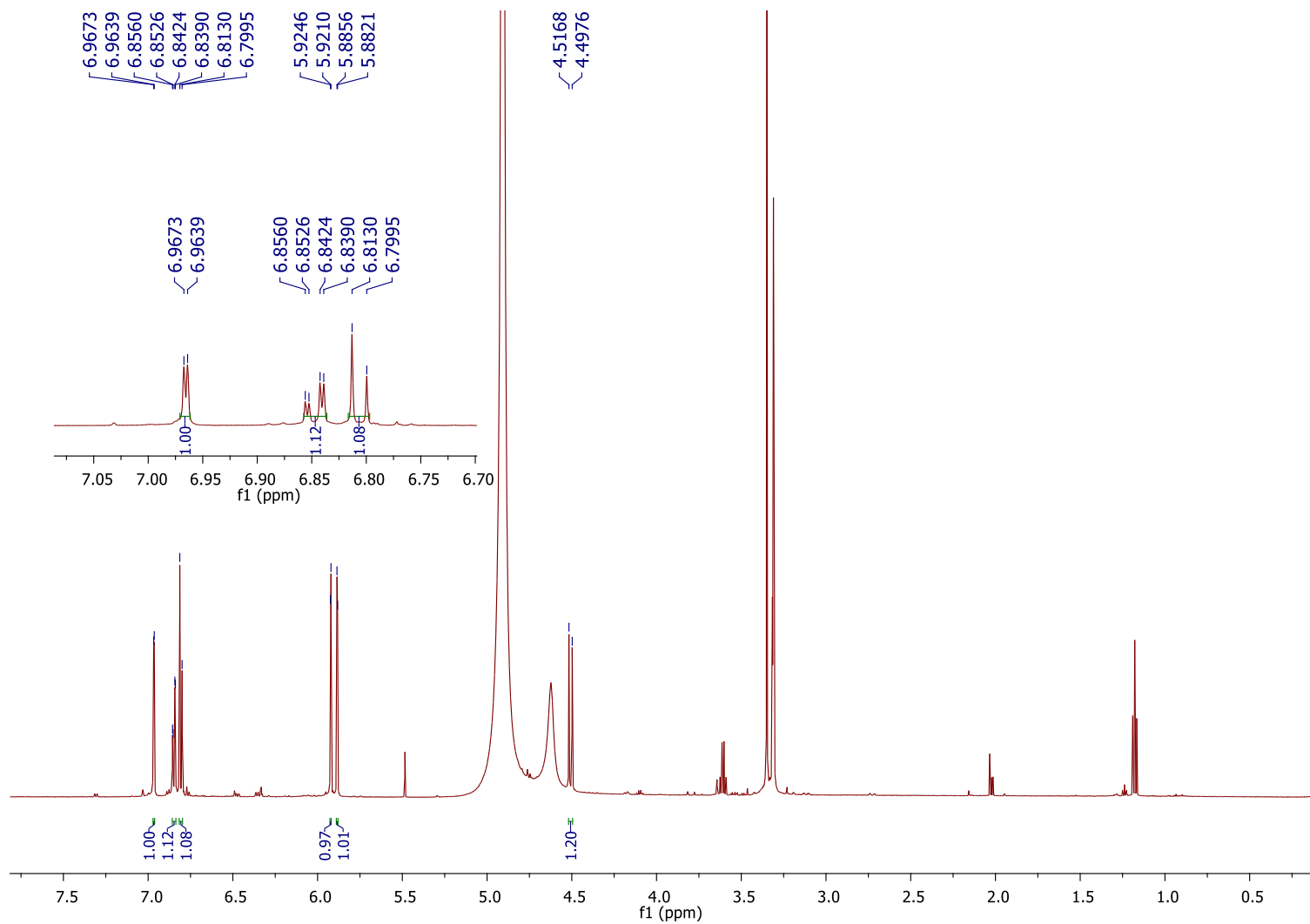
Figura 33 - Espectro de RMN de ^1H da substância **HC-4.4** (CD_3OD ; 600 MHz).

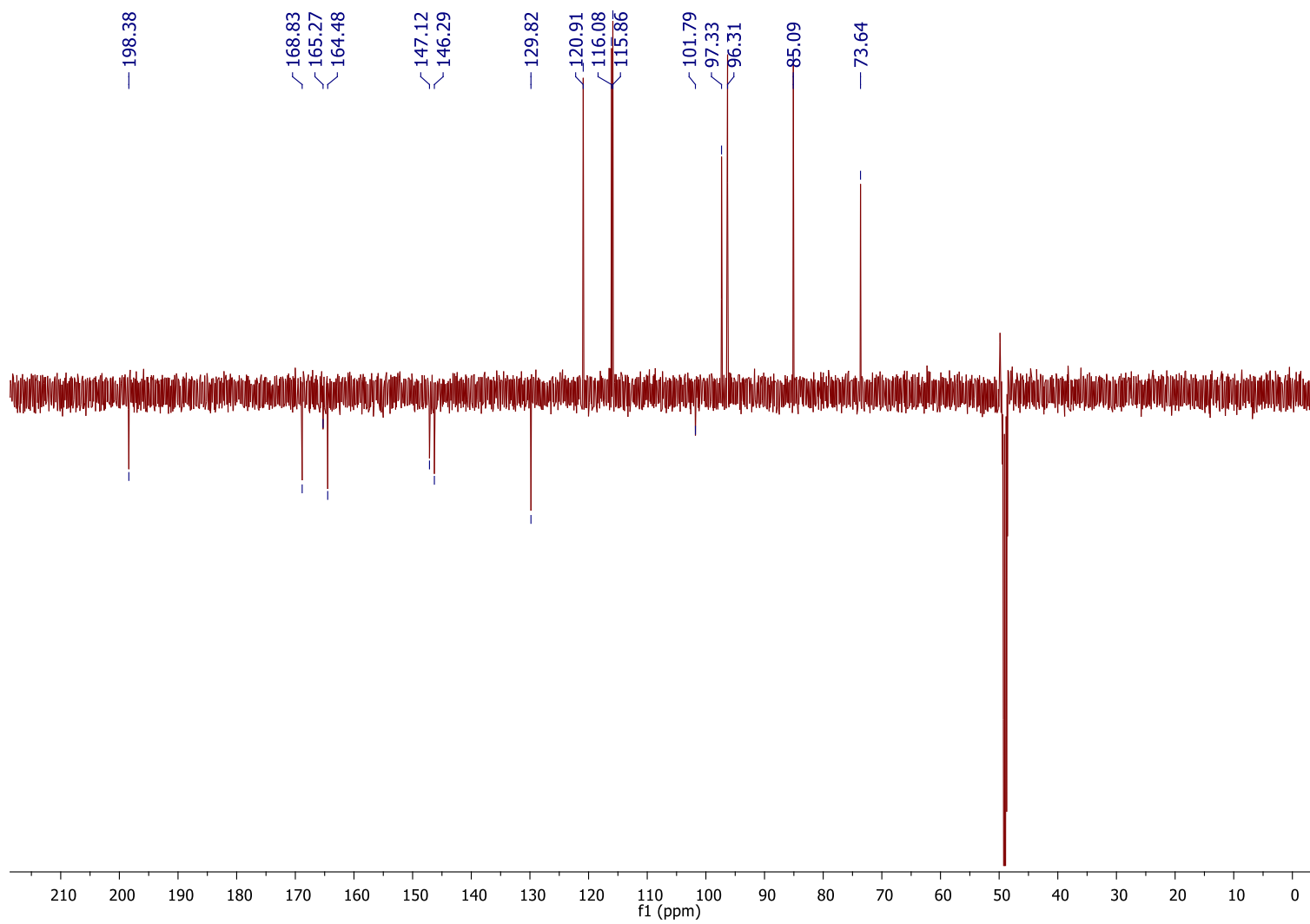
Figura 34 - Espectro de DEPTQ da substância **HC-4.4** (CD₃OD; 150 MHz).

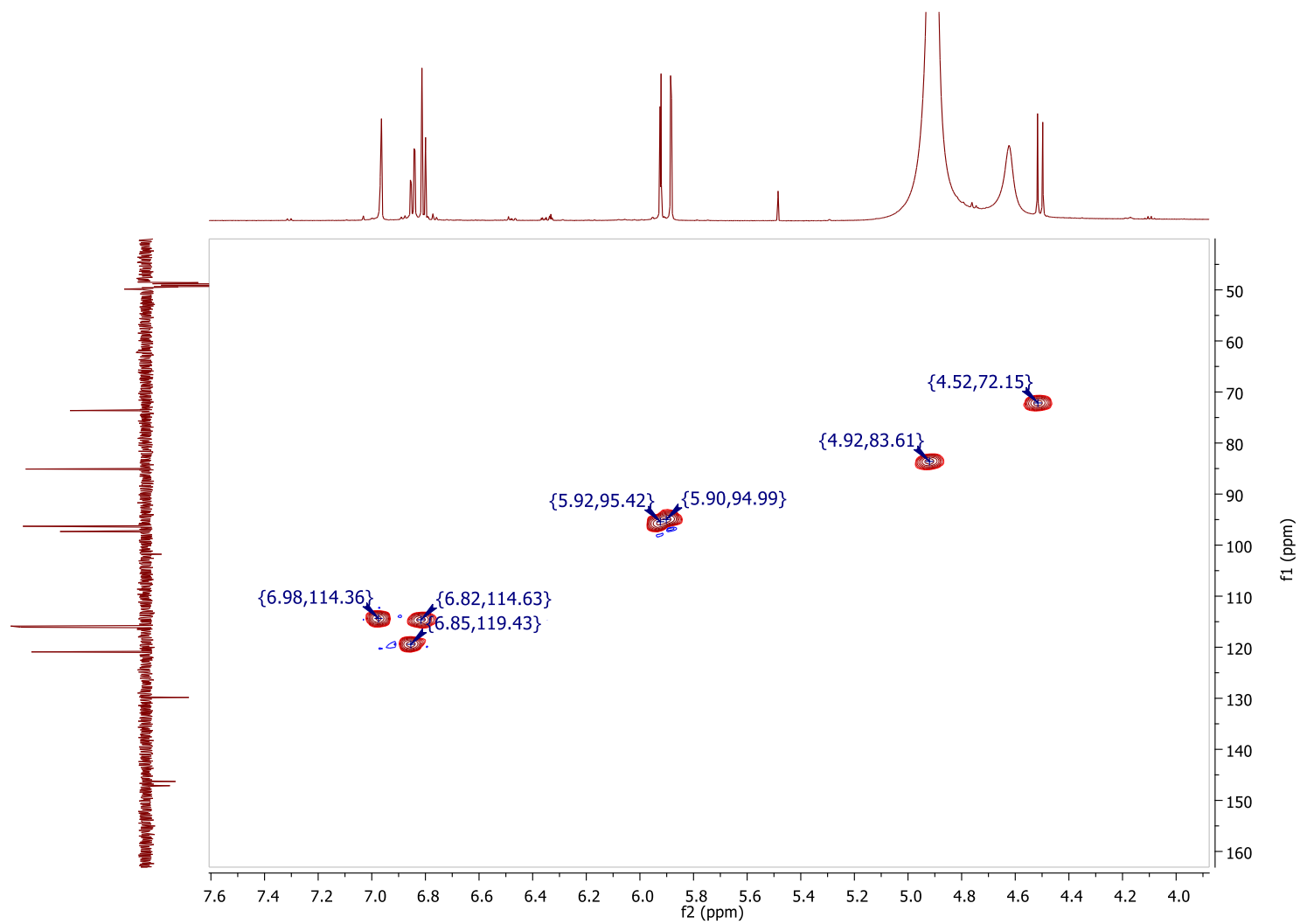
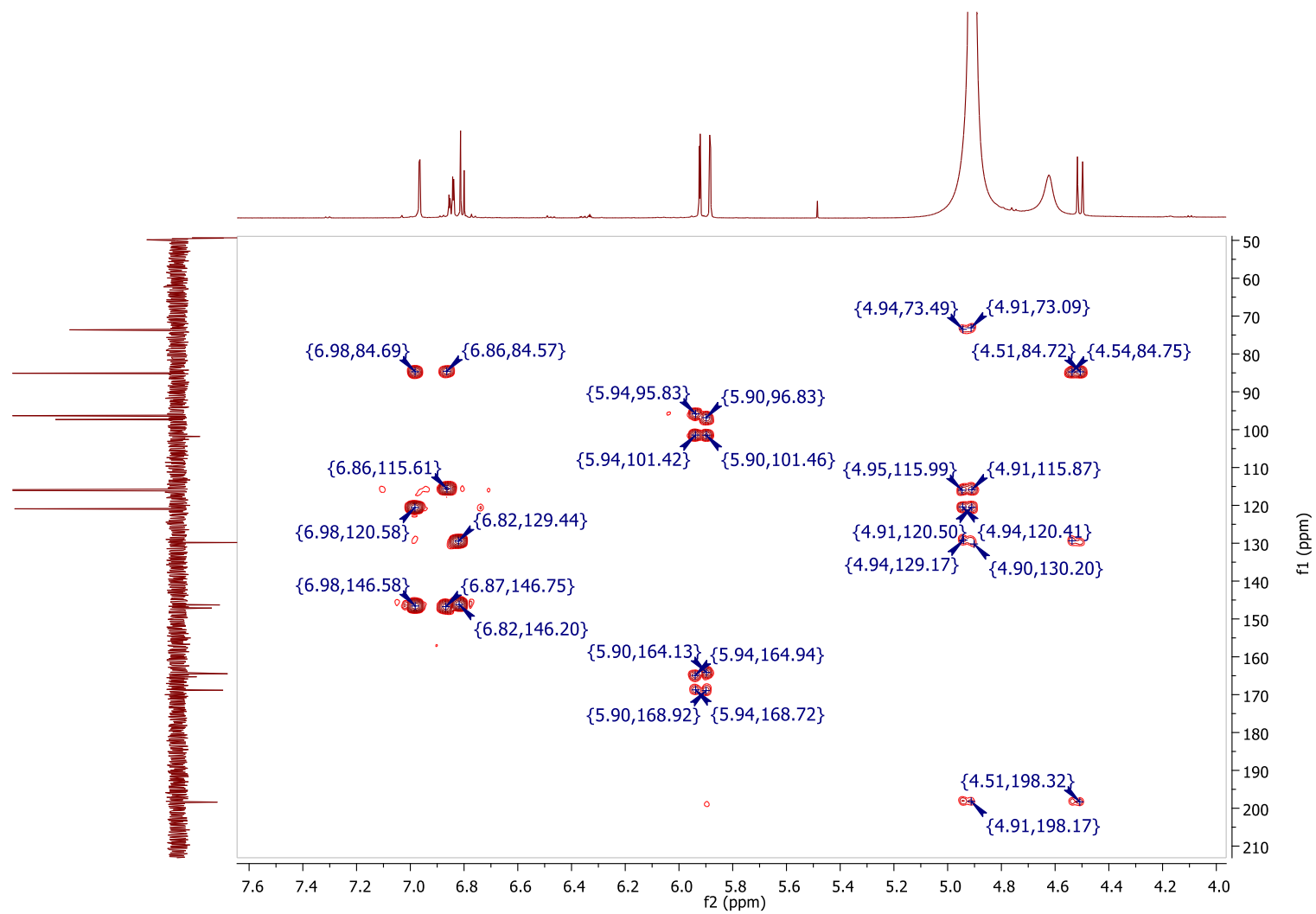
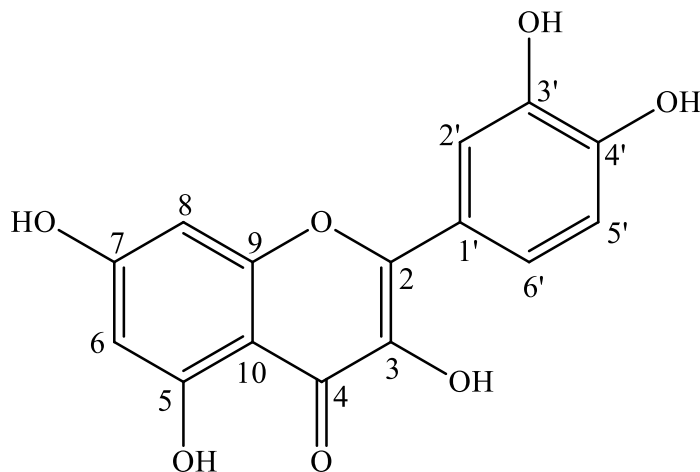
Figura 35 - Mapa de contorno HSQC da substância **HC-4.4** (CD₃OD; 600 e 150 MHz).

Figura 36 - Mapa de contorno HMBC da substância **HC-4.4** (CD₃OD; 600 e 150 MHz).

5.2.3.3 Identificação estrutural da substância **HC-13.4**.

Figura 37 - Substância **HC-13.4** isolada do extrato etanólico de *H. courbaril*.



Fonte: Elaborado pelo próprio Autor.

A análise conjunta dos dados de RMN de ^1H e DEPTQ (Figuras 38 e 39) da substância **HC-13.4**, permitiu observar uma grande semelhança dos deslocamentos químicos e das multiplicidades dos sinais quando comparado com os da substância **HC-13.5**, sendo que a única diferença observada foi a presença de uma hidroxila, ao invés da metoxila no C-3. Esta suposição foi confirmada pela presença dos sinais em 6,18 (d; 1H; $J = 2,0$ Hz; H-6), 6,40 (d; 1H; $J = 2,0$ Hz; H-8), 7,67 (d; 1H; $J = 2,2$ Hz; H-2'), 6,87 (d; 1H; $J = 8,5$ Hz; H-5') e 7,53 (dd; 1H; $J = 8,5$ e 2,2 Hz; H-6'), referentes aos hidrogênios aromáticos dos dois sistemas distintos de anel A e B de flavonóides. Foi observado também um sinal em 12,48 (s; 1H) atribuído a hidroxila quelada (Tabela 5).

A análise do espectro de DEPTQ (Figura 39) permitiu identificar cinco carbonos metínicos e dez carbonos quaternários, sendo sete sinais característicos de carbono ligado a oxigênio (δ_c 163,9; 160,7; 156,2; 146,8; 135,7; 145,1; 147,7) e uma carbonila em δ_c 175,9.

A comparação dos dados espectrais obtidos (Tabela 5) com os descritos na literatura (CARVALHO et al., 2007; MARTINS et al., 2006), permitiu identificar a substância **HC-13.4** como sendo a quercetina (Figura 37) (MARTINS et al., 2006; CARVALHO et al., 2007)

Para as atividades atribuídas à quercetina são frequentemente citadas seu efeito antioxidante (KUKONGVIRIYAPAN et al., 2012; LESJAK et al., 2018). Também são descritas para a quercetina atividades antimicrobiana (DJOUSSI et al., 2015), anti-inflamatória (RUBIÓ; MOTILVA; ROMERO, 2013; RUMA; SUNIL; PRAKASH, 2013), citotóxica (HASSAN et al., 2020) e anticâncer (GIBELLINI et al., 2011; DAJAS, 2012).

Esta substância já foi relatada no gênero *Hymenaea*, tendo destaque no extrato AcOEt *H. courbaril* var. *stilbocarpa* (TORRES et al., 2012), extrato AcOEt do cerne de *H. stigonocarpa* (MARANHÃO et al., 2013) e na seiva *H. martiana* (FARIAS et al., 2017). Por outro lado, na literatura não há relato de isolamento da quercetina a partir do resíduo madeireiro de *H. courbaril*, sendo este o primeiro estudo.

Tabela 5 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (DMSO- d_6 , 600 e 150 MHz) de **HC-13.4** (δ em ppm e J em Hz).

Posição	δ_{H}	δ_{C}
2	-	146,8
3	-	135,7
4	-	175,9
5	12,48 (1H, s, 5-OH)	160,7
6	6,18 (d, $J = 2,0$)	98,2
7	-	163,9
8	6,40 (d, $J = 2,0$)	93,4
9	-	156,2
10	-	103,0
1'	-	122,0
2'	7,67 (d, $J = 2,2$)	115,1
3'	-	145,1
4'	-	147,7
5'	6,87 (d, $J = 8,5$)	115,6
6'	7,53 (dd, $J = 8,5; 2,2$)	120,0

Fonte: Elaborado pelo próprio Autor.

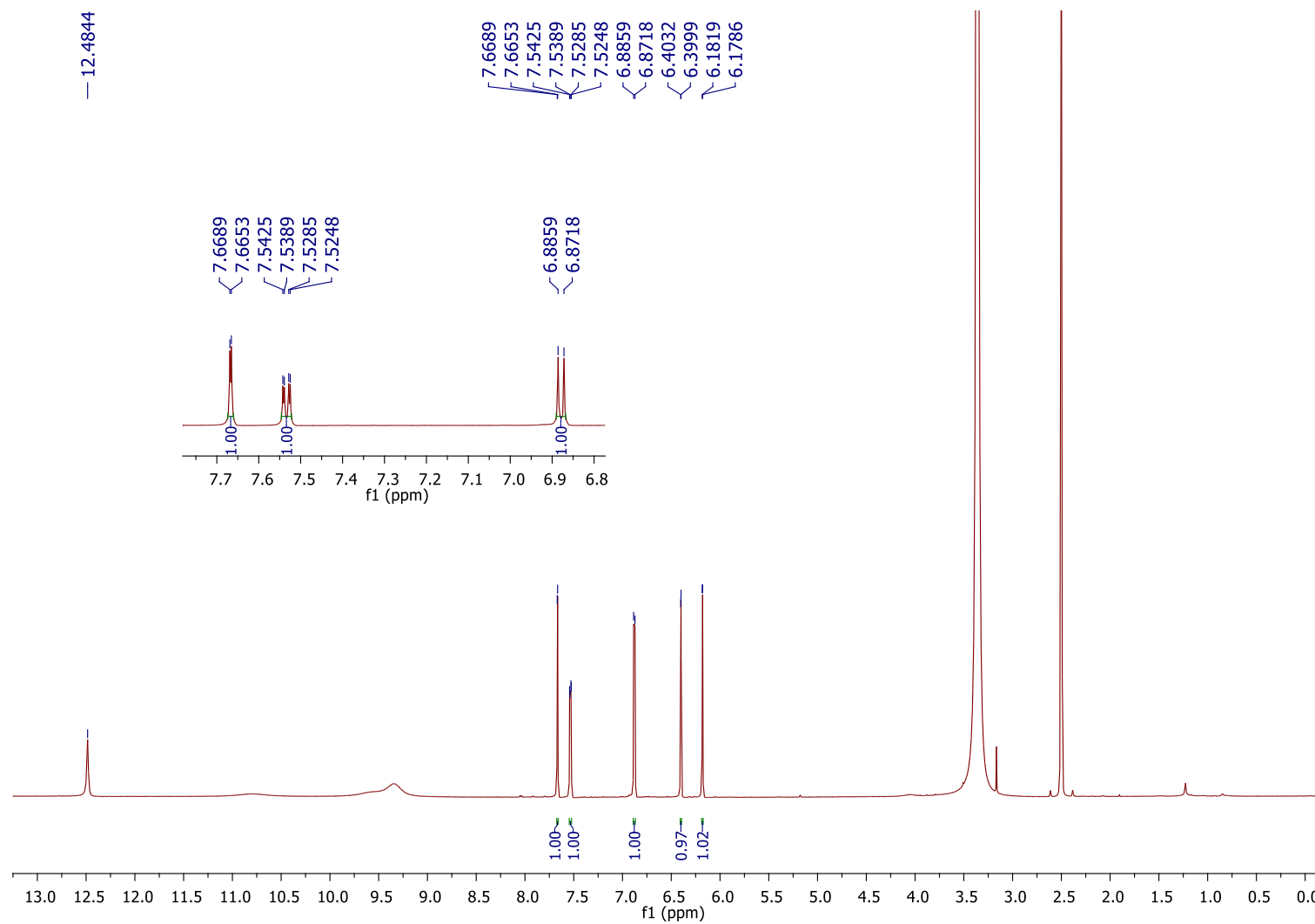
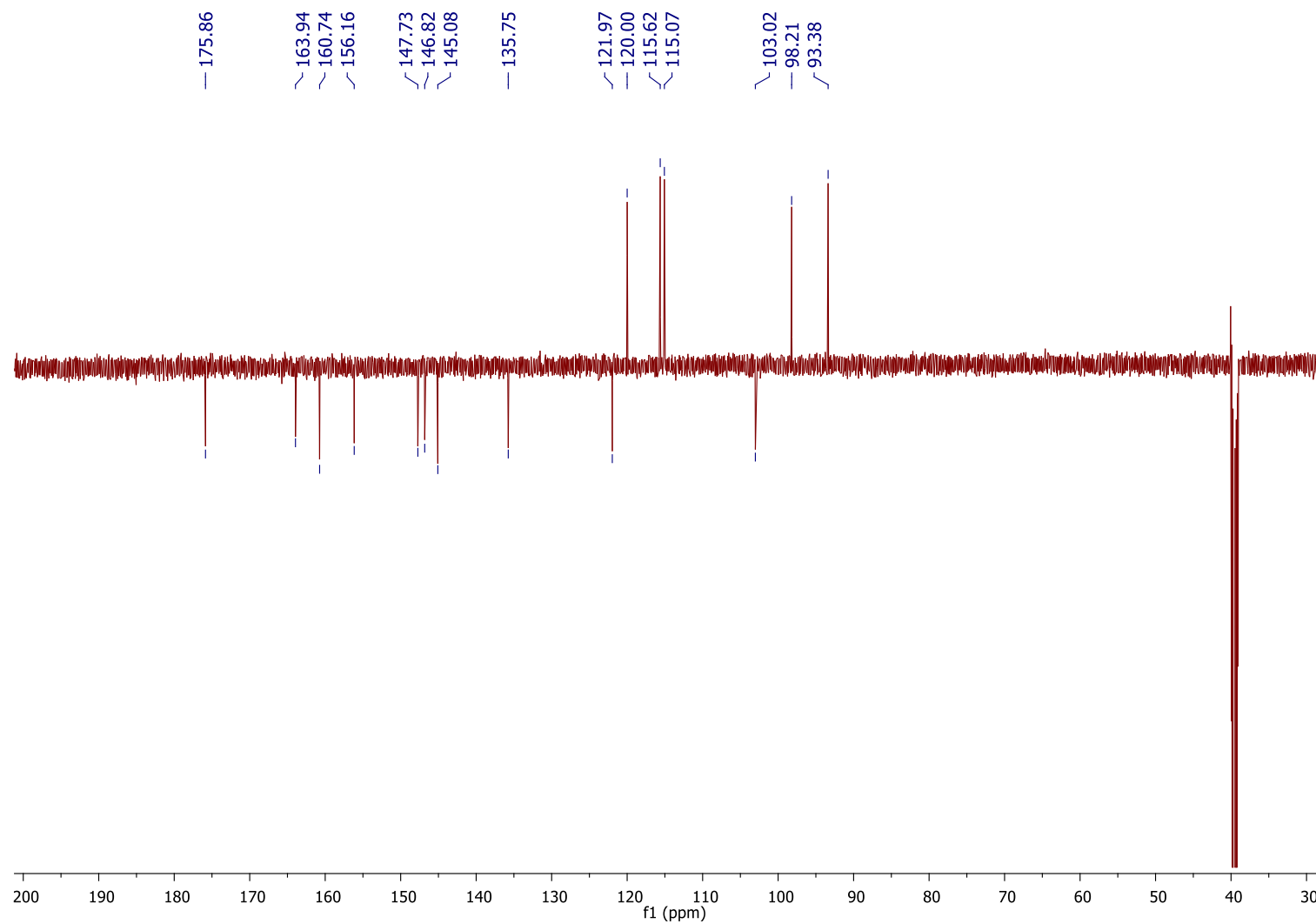
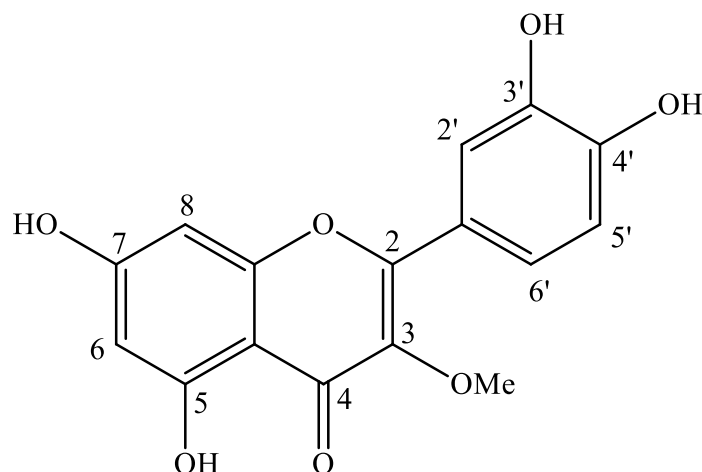
Figura 38 - Espectro de RMN de ^1H da substância **HC-13.4** ($\text{DMSO-}d_6$; 600 MHz).

Figura 39 - Espectro de DEPTQ da substância **HC-13.4** (DMSO-*d*₆; 150 MHz).

5.2.3.4 Identificação estrutural da substância **HC-13.5**.

Figura 40 - Substância **HC-13.5** isolada do extrato etanólico de *H. courbaril*.



Fonte: Elaborado pelo próprio Autor.

O espectro de RMN de ^1H (Figura 42) da substância **HC-13.5**, apresentou também um perfil característico de substância da classe dos flavonóides, evidenciado pela presença de dois dupletos em δ_{H} 6,20 (1H; $J = 1,9$ Hz; H-6) e δ_{H} 6,40 (1H; $J = 1,9$ Hz; H-8), sugerindo um anel com sistema tetrassubstituído, e dos sinais em 7,62 (d; 1H; $J = 2,0$ Hz; H-2'), 6,90 (d; 1H; $J = 8,5$ Hz; H-5') e 7,53 (dd; 1H; $J = 8,5$ e 2,0 Hz; H-6'), que evidenciam um anel trissubstituído, confirmando assim a presença de dois sistemas distintos de anéis aromáticos fenólicos. Foi observado ainda um simpleto em δ_{H} 3,78 (3H; δ_{C}), atribuído a um grupo metoxílico, o qual mostrou correlação por HMBC (Figuras 41 e 44) com C-3 (δ_{C}), confirmando assim a metoxilação no C-3, correspondente ao anel C dos flavonóides.

A análise dos mapas de contorno HSQC (Figura 43) e HMBC (Figura 44) permitiu identificar cinco carbonos metínicos, um metílico e dez carbonos quaternários, sendo um destes, uma carbonila em δ_{C} 178,5. Esta informação, associada as correlações observadas em HMBC, indicou a presença de uma cetona α,β -insaturada.

A análise dos dados de RMN de ^1H , associados às correlações visualizadas em HMBC (Tabela 6) e comparando com a literatura (SOUZA et al., 2013), permitiram identificar a substância **HC-13.5** como 3-metoxi-quercetina (Figura 40).

A 3-metoxi-quercetina é um flavonóide encontrado em plantas como *Achyrocline satureioides* (MOTA, 2008), *Lippia* sp. (OLIVEIRA, 2012), *Garcinia kola* (OMEJE et al., 2017), e principalmente em espécies de *Alternanthera* sp. (TOMEI, 2008). Para esta substância são relatadas atividades biológicas como antioxidante e anti-inflamatória

(MARINHO, 2016; OMEJE et al., 2017). Na literatura não é relatada a presença desta substância no resíduo madeireiro de Jatobá, sendo assim original o registro da presença desta molécula na espécie *H. courbaril*.

Tabela 6 - Dados de RMN de ^1H , ^{13}C , HMBC (CD_3OD , 600 e 150 MHz) de **HC-13.5** (δ em ppm e J em Hz).

Posição	δ_{H}	δ_{C}	HMBC
2	-	156,8	
3	-	138,0	
4	-	178,5	
5	-	161,5	
6	6,20 (d, $J = 1,9$)	98,4	C5; C7; C8; C10
7	-	164,7	
8	6,40 (d, $J = 1,9$)	93,4	C4; C6; C7; C9; C10
9	-	157,0	
10	-	104,2	
1'	-	121,4	
2'	7,62 (d, $J = 2,0$)	115,1	C2; C3'; C4'; C6'
3'	-	144,6	
4'	-	148,6	
5'	6,90 (d, $J = 8,5$)	115,1	C1'; C3'; C4'
6'	7,53 (dd, $J = 8,5; 2,0$)	120,9	C2; C2'; C4'
OCH₃	3,78 (s)	59,1	C3

Fonte: Elaborado pelo próprio Autor.

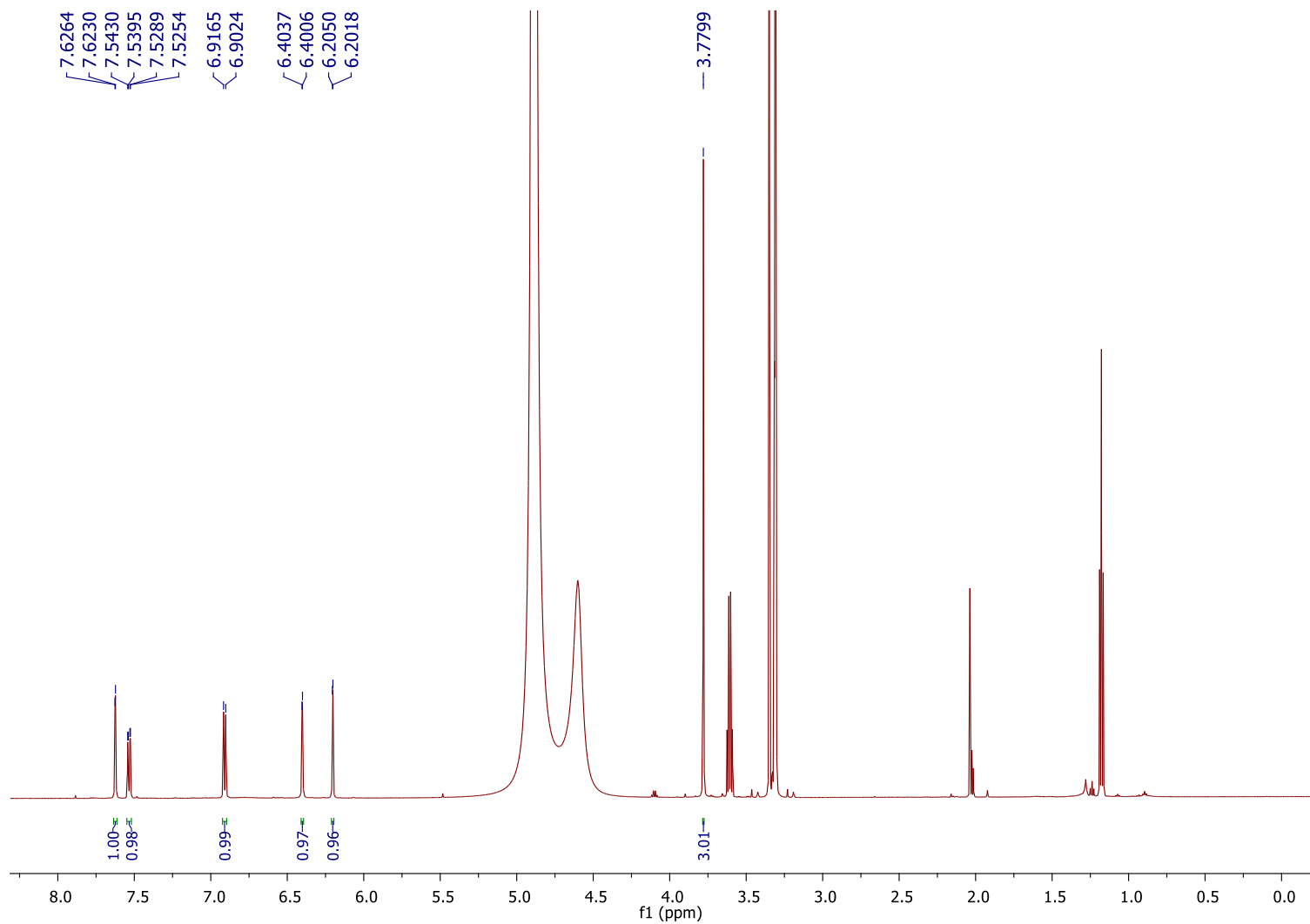
Figura 42 - Espectro de RMN de ^1H da substância **HC-13.5** (CD_3OD ; 600 MHz).

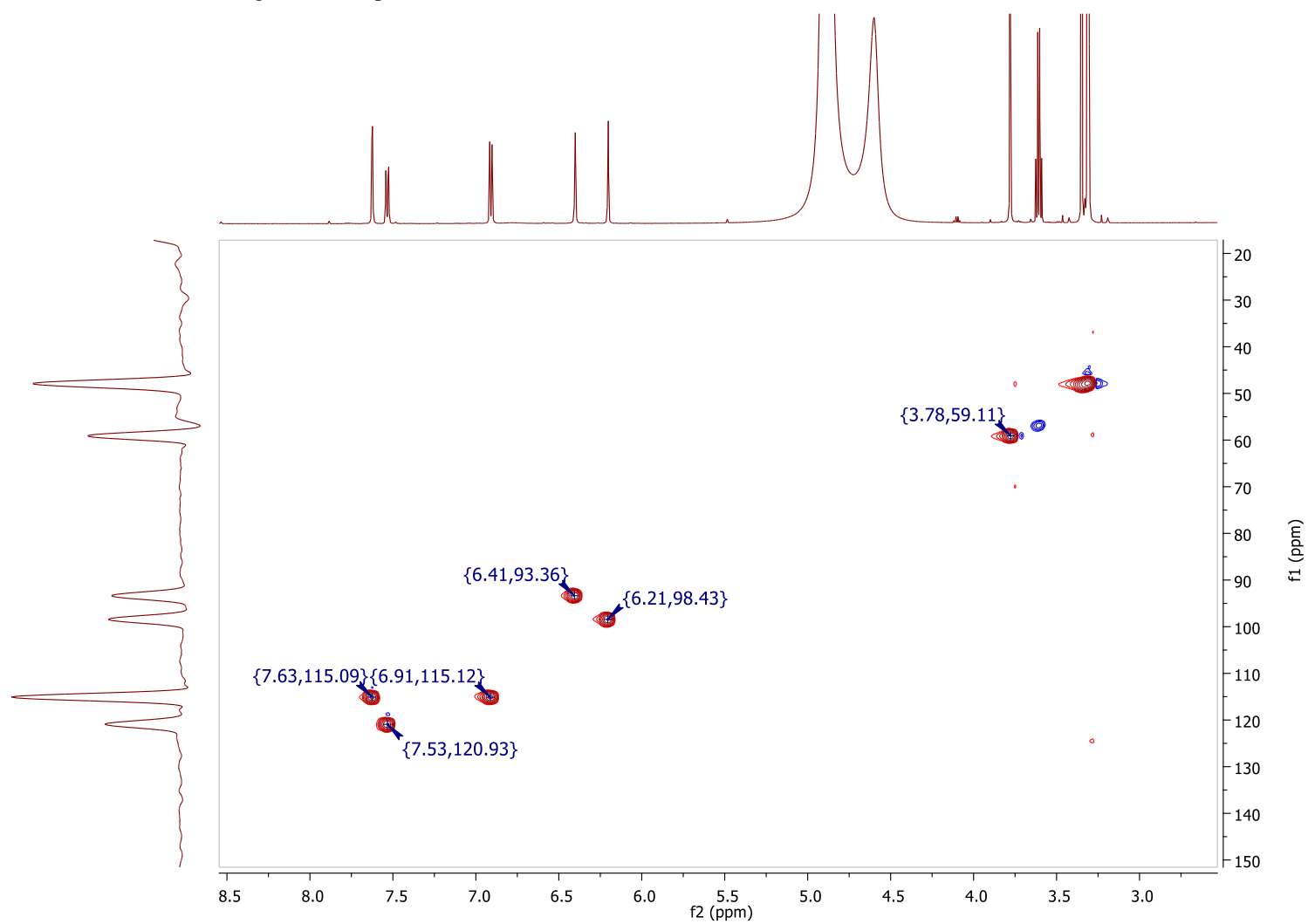
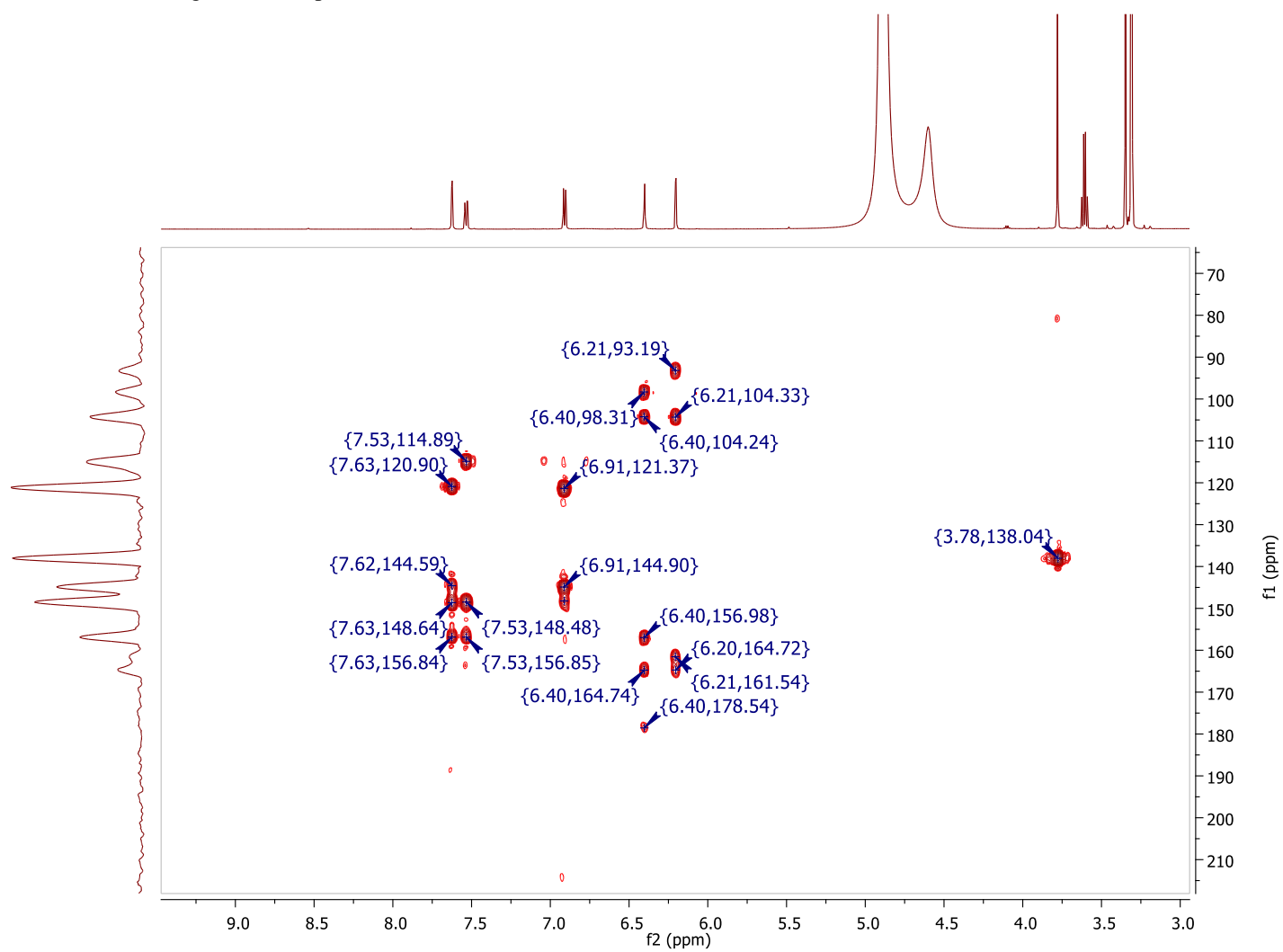
Figura 43 - Mapa de contorno HSQC da substância **HC-13.5** (CD₃OD; 600 e 150 MHz).

Figura 44 - Mapa de contorno HMBC da substância **HC-13.5** (CD₃OD; 600 e 150 MHz).

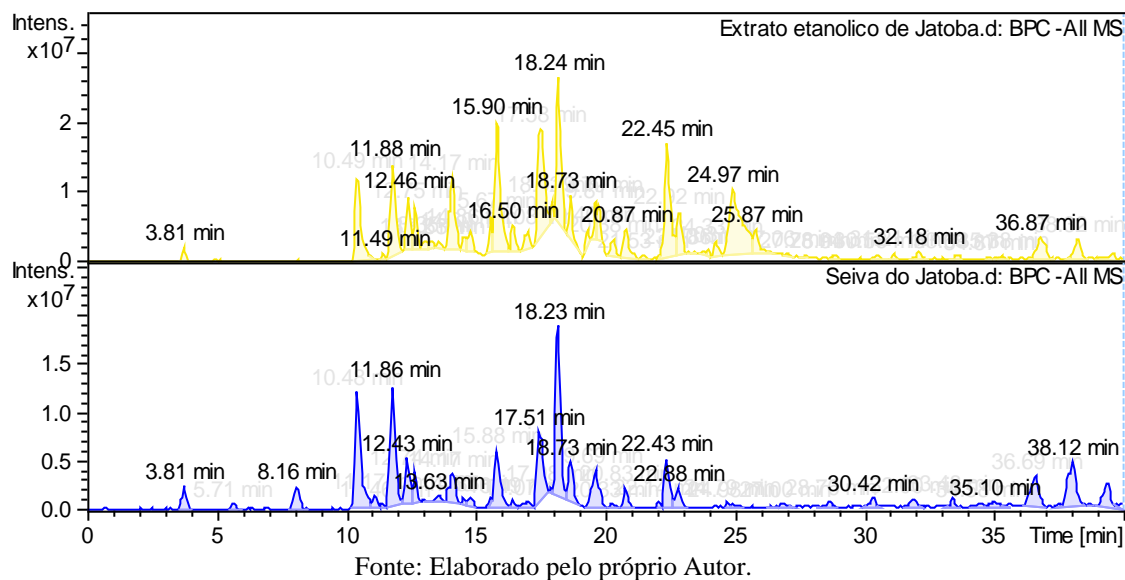
5.2.4 Análises de Cromatografia Líquida de alta eficiência por espectrometria de massas (CLAE-EM)

A partir da combinação da CLAE com a Espectrometria de Massa (EM) foi possível obter as fornecer informações referentes a massa molecular relativa das substâncias, isso se deve a elevada seletividade, sensibilidade e capacidade destes equipamentos (PANG et al., 2016).

Observou-se ainda que a partir da técnica de CLAE com detector de espectrometria de massas utilizando electrospray como fonte de ionização foi apropriada para análise dessas amostras. Autores afirmam que esta técnica é recomendada para análise de moléculas mais polares (LANÇAS, 2009).

É importante enfatizar que o perfil dessas amostras só foi possível devido a combinação de análise do espectro de massa, consulta de bases de dados/literatura, além de ferramentas matemáticas e informáticas (ROUX et al., 2011). Com isso, por meio da caracterização cromatográfica verificou-se que houve uma boa separação dos compostos presentes tanto no extrato etanólico como na seiva elas (Figura 45).

Figura 45 - Perfil do extrato etanólico e da seiva de *H. courbaril* (Jatobá).



A aplicação da análise de espectros EM/EM auxiliou na proposta de compostos presentes no extrato etanólico e na seiva de Jatobá, com base na estrutura química e no padrão de fragmentação dos metabólitos.

5.2.5 Análise das redes de interações moleculares (Molecular Networking – GNPS)

Os dados analisados na plataforma GNPS geraram uma rede molecular com 286 número de nós, 567 número de arestas, 224 componentes ligados e 16 número de nós anotados (Tabela 7) de acordo com a similaridade química (pontuação de cosseno), além de derivados taxifolínicos.

Tabela 7 - Compostos propostos em *H. courbaril* por dados CLAE-EM/EM.

n	Rt (min)	[M-H] ⁻	MS ² fragmentos	Substância	Pico da área do extrato	Pico da área da seiva	Referência
1	3,70	359	360, 179, 161	Ácido rosmarínico	475,43	5792,45	MØLLER et al. (2007).
2	3,71	179	161, 141, 117	Ácido cafeico	64,35	3959,58	(WU et al., 2009)
3	3,81	193	193,175,161,141, 101	Ácido ferúlico	4525,98	16700,42	(SAID et al., 2017)
4	12,75	289	289, 245, 205, 179	(<i>epi</i>)catequina	22075,86	33840,21	GNPS
5	15,80	303	304, 271, 179,139, 123	3- <i>O</i> -metil-(<i>epi</i>)catequina	53245,03	21057,67	Proposta
6	15,93	287	269, 259, 163	Aromadendrina ou Dihidrokaempferol	12780,96	3021,60	CHEN et al. (2016)
7	15,99	269	269, 225	Genisteína	3886,04	1110,02	LIANG et al. (2018)
8	16,58	433	365, 287, 269, 259	Engeletina	584,18	1573,70	BO LI; LI LI (2013); PACHECO et al. (2019)
9	17,40	303	304, 285, 179, 177, 125	Taxifolina	1396,40	-	GNPS
10	18,04	285	285, 241, 199, 175	Kaempferol	24798,28	-	FABRE et al. (2001), IBRAHIM et al. (2016);
11	18,14	449	431, 285, 177	Taxifolina 3- <i>O</i> -deoxihexose (astilbina)	83304,26	145862,83	PACHECO et al. (2019)
12	18,48	431	363, 285, 163	Kaempferol-7- <i>O</i> -deoxihexose	5519,30	-	Proposta
13	20,85	447	301, 285	Quercetina-3- <i>O</i> -deoxihexose (quercitrina)	15691,21	5762,01	GNPS
14	21,05	301	301, 269, 233, 177, 164	Quercetina	3353,55	5796,67	GNPS
15	22,29	299	299, 284	Gliricidina	6963,24	1571,86	YE et al. (2012)
16	25,79	315	315, 300	Isoramnetina	1082,93	524,40	MARTUCCI et a. (2014)

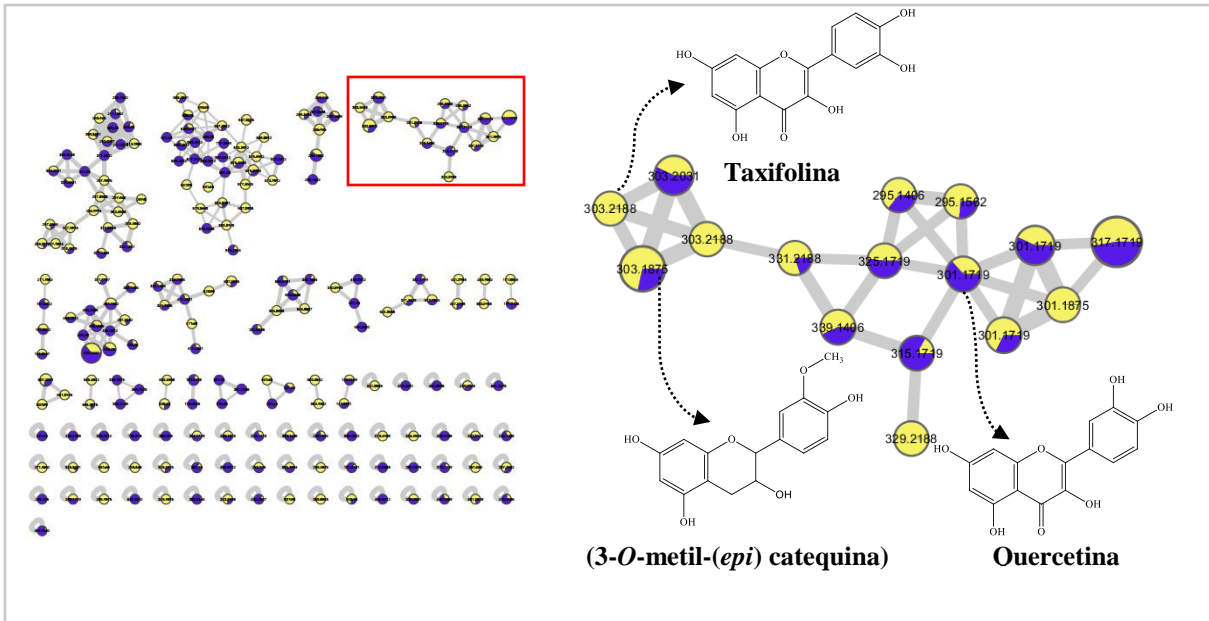
Fonte: Elaborado pelo próprio Autor.

Allard et al. (2020) abordam as vantagens das redes moleculares, enfatizando que esta ferramenta permite o agrupamento de compostos que estão estruturalmente correlacionados, sem conhecimento prévio sobre o comportamento da fragmentação destas substâncias. As cores apresentadas no molecular networking faz referência ao extrato etanólico (amarelo) e a seiva (azul), sendo possível também verificar a quantificação relativa das substâncias nas amostras, pois o tamanho do nodo é proporcional a abundância da substância, ou seja, quanto maior o nodo, maior a abundância do metabólito dentro das condições de análise, o inverso também ocorre. O modo de ionização negativa foi escolhido, uma vez que permitiu uma detecção mais sensível dos compostos fenólicos.

Na rede molecular, os compostos foram separados em diferentes grupos, principalmente como flavonóides nas formas de agliconas e glicosiladas. Estes compostos formam um grupo importante de metabólitos secundários, que desempenham funções essenciais na planta, possuindo várias atividades relacionadas (SAMANTA; DAS, 2011). O fato das substâncias pertencerem à mesma classe de compostos facilitou sua identificação por espectrometria de massa na mesma rede molecular porque apresentam padrão de fragmentação e semelhança em suas estruturas químicas (LYU et al., 2019).

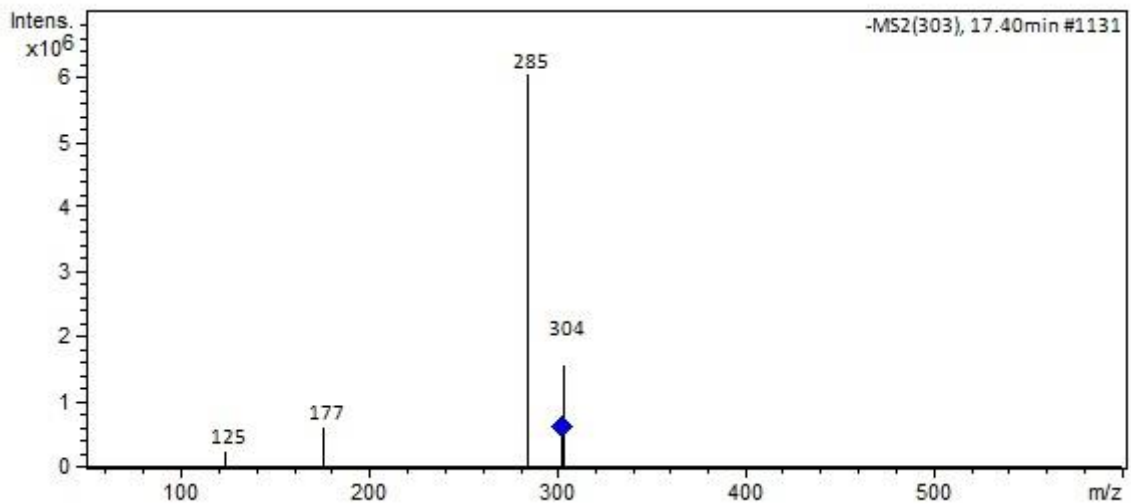
A análise dos dados da rede molecular (Figura 46) demonstraram que as substâncias foram agrupadas de acordo com suas semelhanças de substituição, referente à aglicona ou ao grau de glicosilação. Os íons precursores m/z 303 (taxifolina) (Figura 47), m/z 303 (3-*O*-metil- (epi) catequina) (Figura 48) e m/z 301 (quercetina) (Figura 49) foram agrupados no mesmo *cluster* na rede molecular devido o grupo catecol presente no anel B e também por compartilharem o mesmo padrão de fragmentação, com a perda comum de 124 Da. No caso do 3-*O*-metil-(epi) catequina, que exibe o íon precursor m/z 303, houve a perda neutra de 32 Da, sugerindo a presença do grupo metoxila ligada ao flavonóide. A taxifolina está presente exclusivamente no extrato etanólico de *H. courbaril*, já o 3-*O*-metil-(epi)catequina encontra-se nas duas amostras analisadas, porém em maior quantidade no extrato, enquanto que a quercetina destaca-se na seiva.

Figura 46 - Cluster 1 dos flavonóides da rede de interação molecular (*Molecular Networking*) do extrato etanólico e seiva de *H. courbaril* no modo negativo.



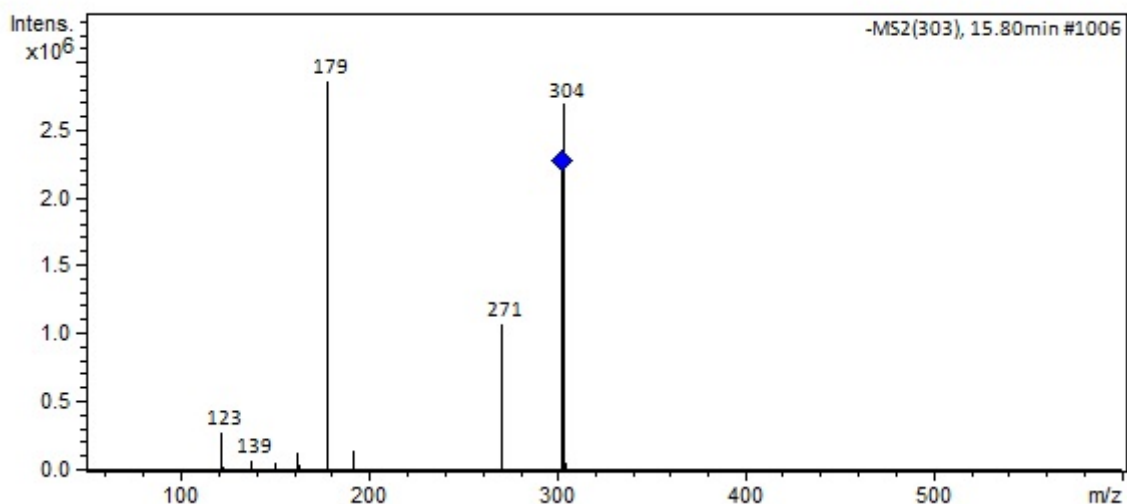
Fonte: Elaborado pelo próprio Autor.

Figura 47 - Espectro de massas por CLAE-IES-EM/EM e suas respectivas fragmentações no modo de ionização negativo, observados no extrato etanólico de *H. courbaril*, correspondente ao íon molecular m/z 303 (taxifolina).



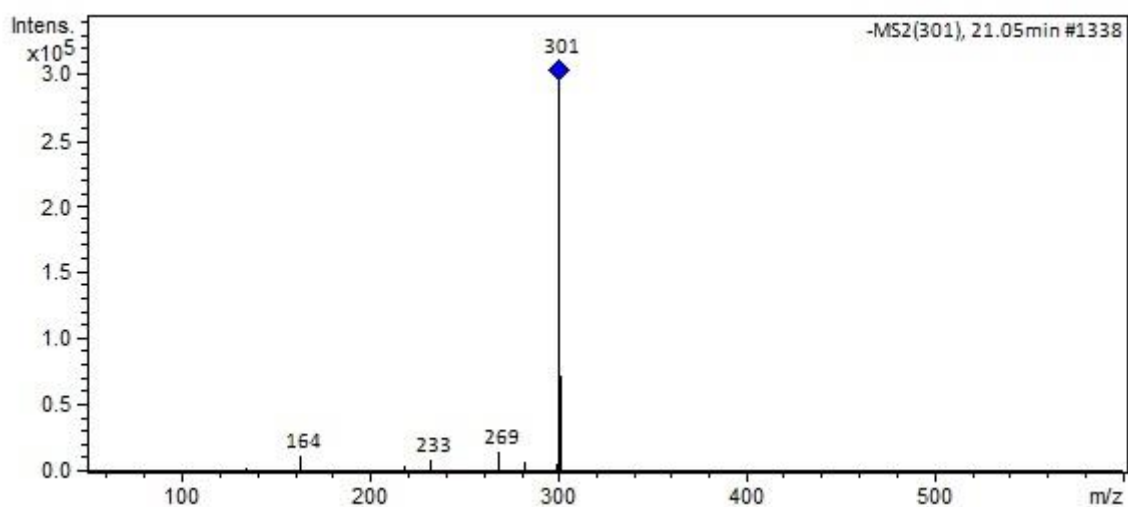
Fonte: Elaborado pelo próprio Autor.

Figura 48 - Espectro de massas por CLAE-IES-EM/EM e suas respectivas fragmentações no modo de ionização negativo, observado no extrato etanólico e seiva de *H. courbaril*, correspondente ao íon molecular m/z 303 (3-*O*-metil-(*epi*) catequina).



Fonte: Elaborado pelo próprio Autor.

Figura 49 - Espectro de massas por CLAE-IES-EM/EM e suas respectivas fragmentações no modo de ionização negativo, observado no extrato etanólico e seiva de *H. courbaril*, correspondente ao íon molecular m/z 301 (quercetina).



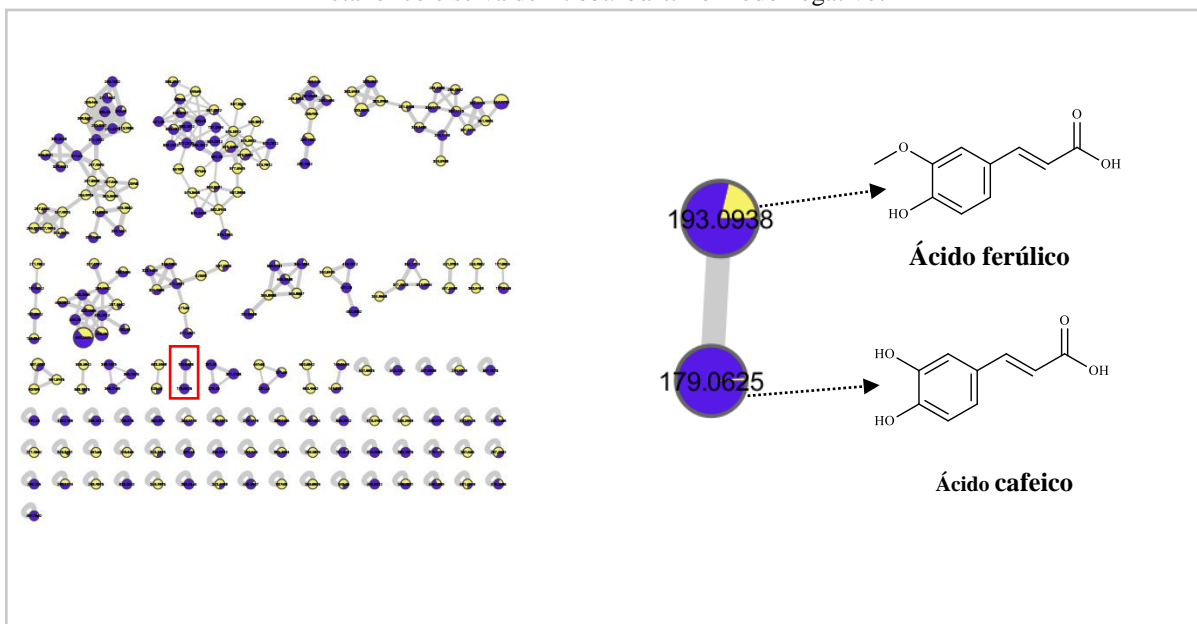
Fonte: Elaborado pelo próprio Autor.

A taxifolina (m/z 303) é uma substância já relatada no alburno de *H. courbaril*, com sua atividade antioxidante confirmada (SUZUKI et al., 2008). Este flavonóide também foi proposto para *H. martiana* (PACHECO et al., 2019), *H. stigonocarpa* (MARANHÃO et al., 2013), e *H. eriogyne* Benth (SILVA, 2019).

Os íons precursores m/z 179 (ácido cafeico) em 3,71 minutos (Figura 51) e m/z 193 (ácido ferúlico) em 3,81 minutos (Figura 52) foram formados, sendo encontrado o íon fragmento comum m/z 161, além da perda neutra de uma molécula de água (18 Da) (Figura 47 e 48).

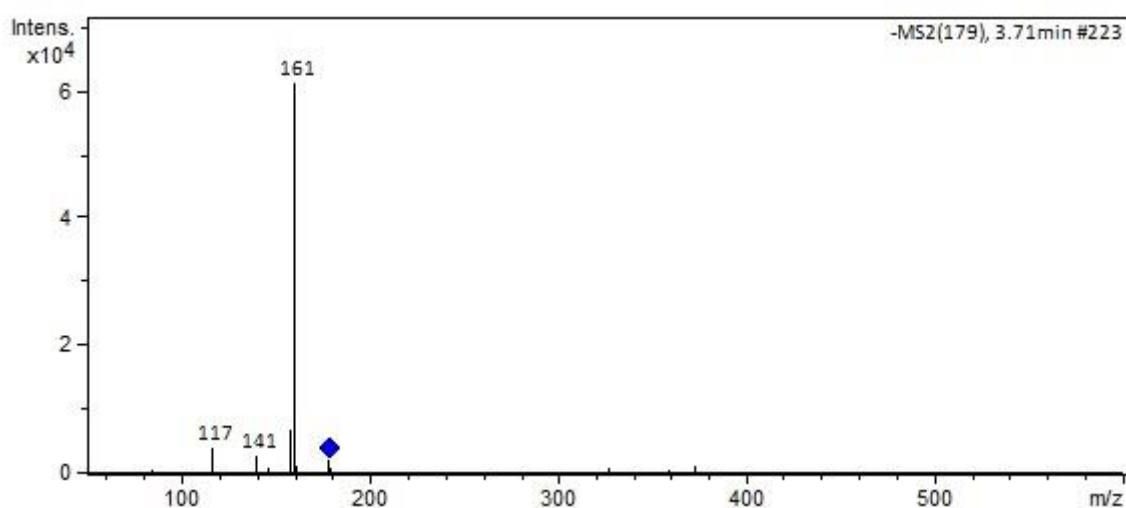
Essas duas substâncias são encontradas em maior quantidade na seiva do que no extrato etanólico de *H. courbaril* (Figura 50), sendo que esses compostos já foram relatados neste gênero (SILVA et al., 2018), no entanto, em termos quantitativos nas amostras em questão, não há descrição na literatura.

Figura 50 - Cluster 2 dos ácidos fenólicos da rede de interação molecular (*Molecular Networking*) do extrato etanólico e seiva de *H. courbaril* no modo negativo.



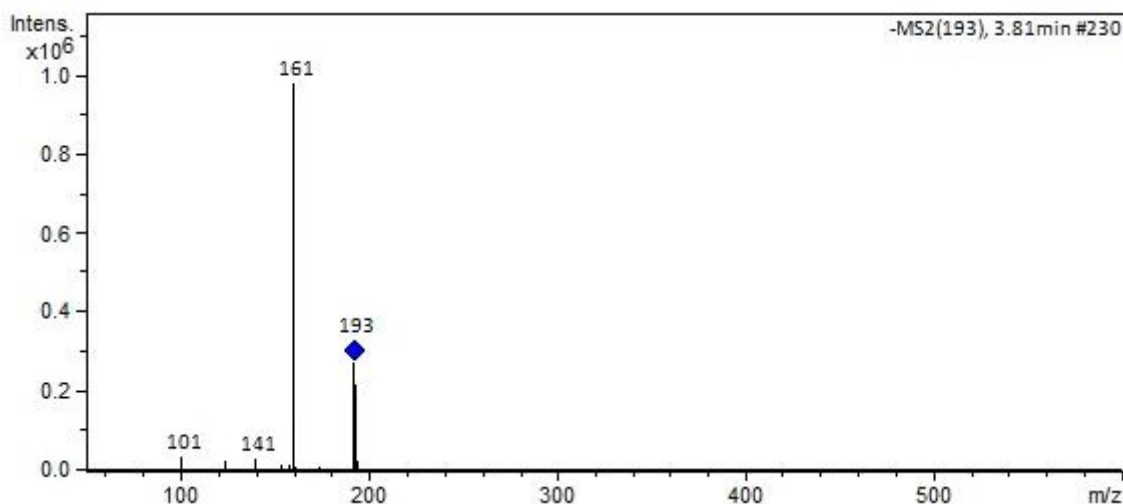
Fonte: Elaborado pelo próprio Autor.

Figura 51 - Espectro de massas por CLAE-IES-EM/EM e suas respectivas fragmentações no modo de ionização negativo, observados no extrato etanólico e seiva de *H. courbaril*, correspondente ao íon molecular m/z 179 (Ácido cafeico).



Fonte: Elaborado pelo próprio Autor.

Figura 52 - Espectro de massas por CLAE-IES-EM/EM e suas respectivas fragmentações no modo de ionização negativo, observados no extrato etanólico e seiva de *H. courbaril*, correspondente ao íon molecular m/z 193 (Ácido ferúlico).

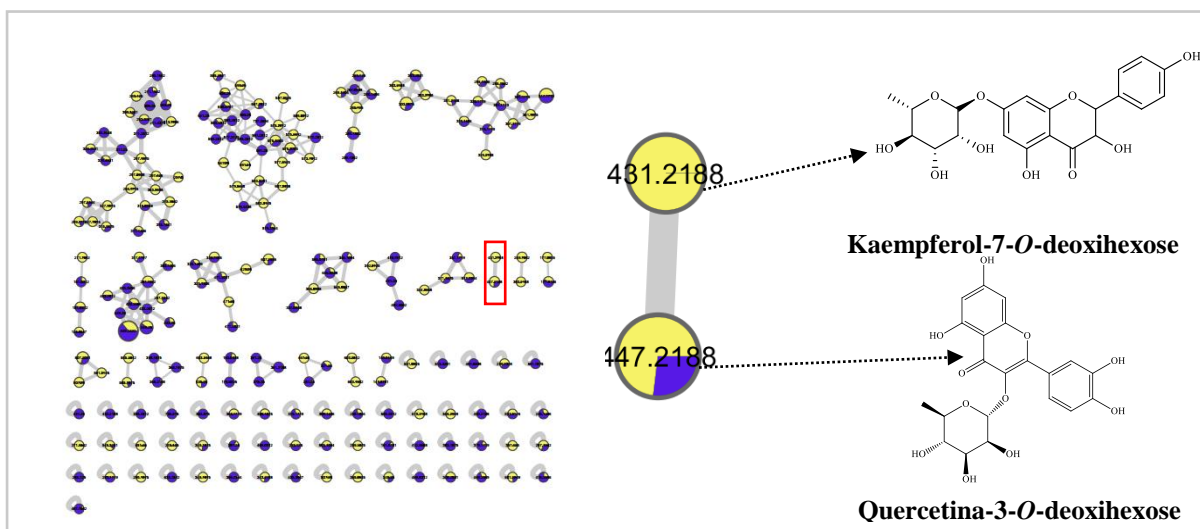


Fonte: Elaborado pelo próprio Autor.

A quantidade de hidroxilas no anel B dos flavonóides pode afetar a atividade do composto. Ao correlacionar a atividade antioxidante com o efeito deste grupo na estrutura de um flavonóide, verificou-se que uma substância contendo dois grupos hidroxila no anel B exibe uma atividade significativamente maior, do que por exemplo a narigenina, com apenas um grupo hidroxil (KONGPICHITCHOKE; HSU; HUANG, 2015).

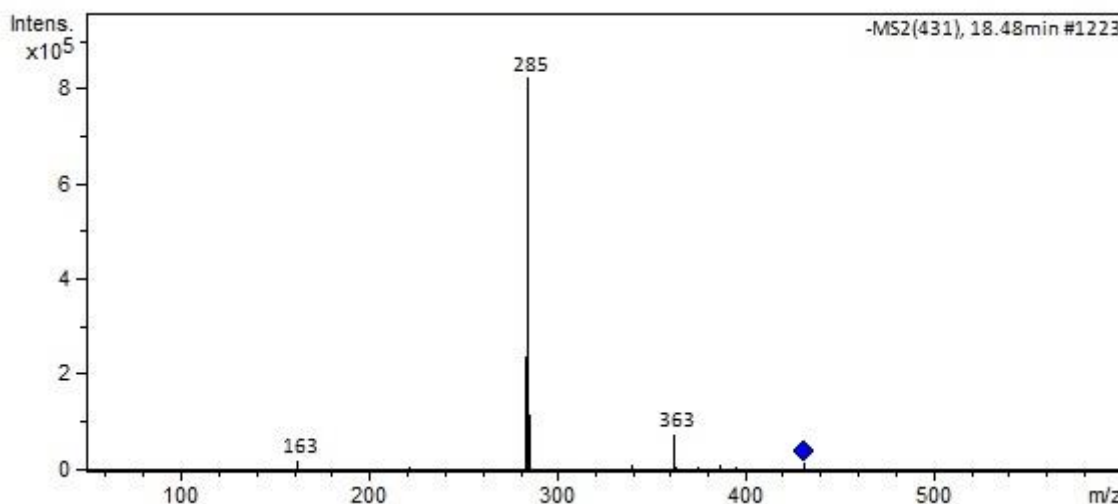
No cluster 3 (Figura 53), é possível observar os íons precursores m/z 431 (Kaempferol-7-*O*-deoxihexose) (Figura 54) e m/z 447 (Quercetina-3-*O*-deoxihexose) (Figura 55) que são flavonóides glicosilados que foram agrupados devido a eliminação da deoxihexose, equivalente a 146 Da, gerando os íons fragmentos m/z 301 e m/z 285, respectivamente.

Figura 53 - Cluster 3 de flavonóides glicosilados da rede de interação molecular (*Molecular Networking*) do extrato etanólico e seiva de *H. courbaril* no modo negativo.



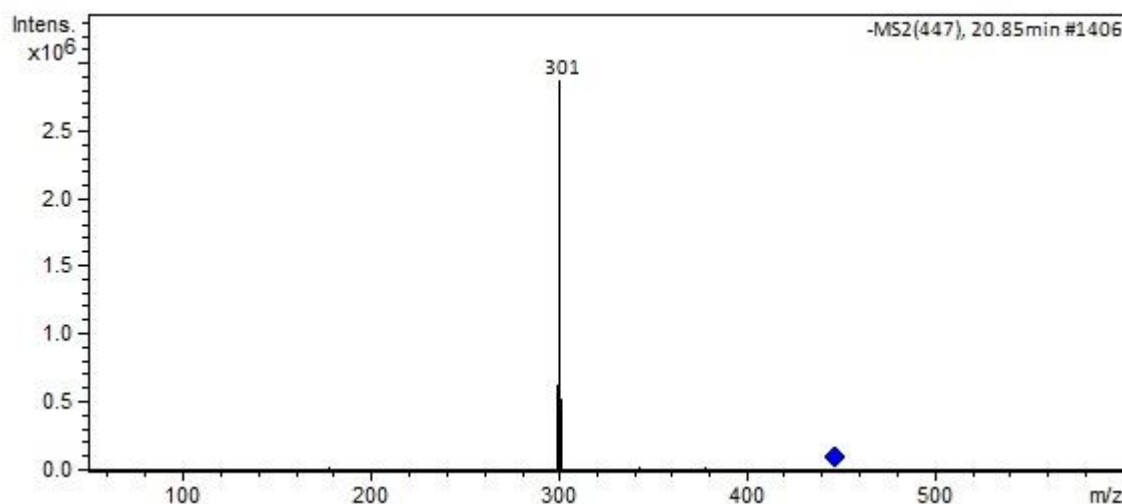
Fonte: Elaborado pelo próprio Autor.

Figura 54 - Espectro de massas por CLAE-IES-EM/EM e suas respectivas fragmentações no modo de ionização negativo, observado no extrato etanólico de *H. courbaril*, correspondente ao íon molecular m/z 431 (Kaempferol-7-*O*-deoxihexose).



Fonte: Elaborado pelo próprio Autor.

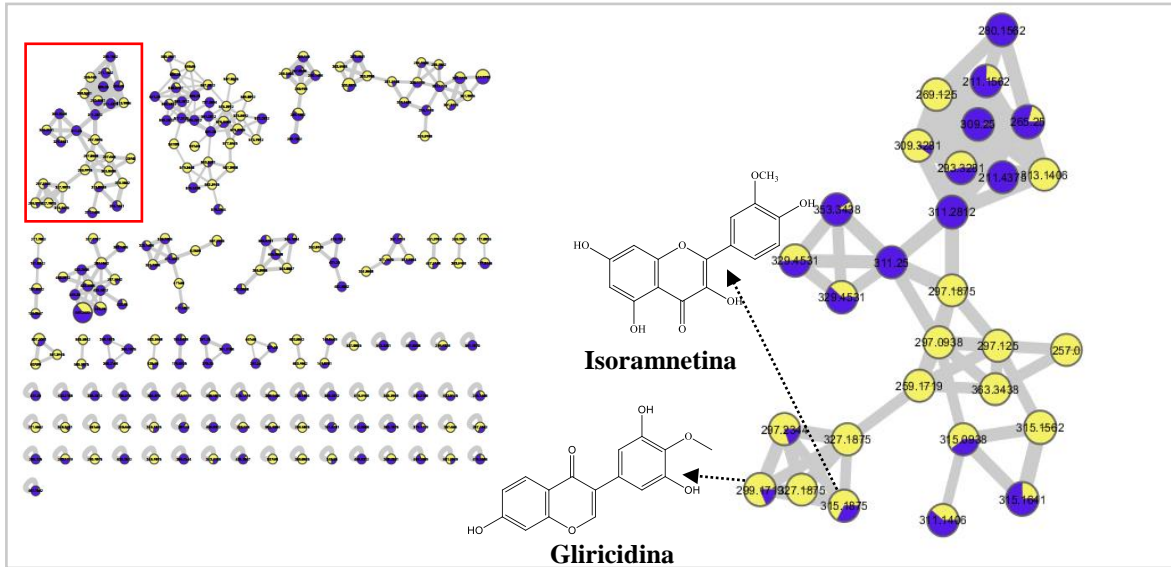
Figura 55 - Espectro de massas por CLAE-IES-EM/EM e suas respectivas fragmentações no modo de ionização negativo, observado no extrato etanólico e seiva de *H. courbaril*, correspondente ao íon molecular m/z 447 (Quercetina-3-*O*-deoxihexose (quercitrina)).



Fonte: Elaborado pelo próprio Autor.

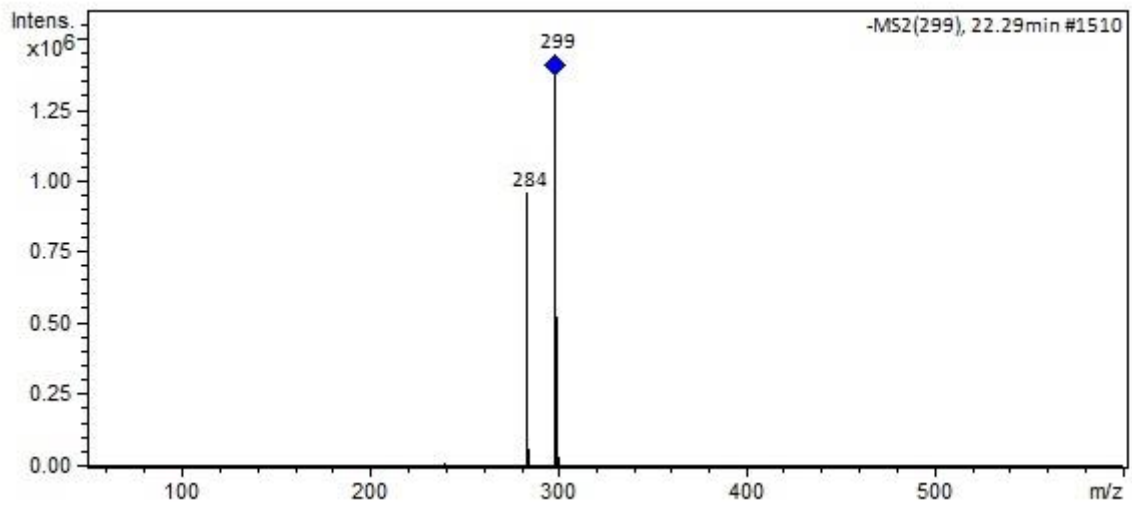
Os compostos presentes no cluster 4 (Figura 56) foram identificados como Gliricidina (m/z 299) (Figura 57) e isoramnetina (m/z 315) (Figura 58), com base nos espectros de massa e na ordem dos tempos de retenção, conforme os relatos na literatura (YE et al., 2012; MARTUCCI et al., 2014). Esses compostos compartilharam em comum uma perda neutra do radical de metila (CH_3 , 15 Da), sendo que essas duas substâncias estavam em maior quantidade no extrato de *H. courbaril*.

Figura 56 - Cluster 4 dos flavonóides da rede de interação molecular (*Molecular Networking*) do extrato etanólico e seiva de *H. courbaril* no modo negativo.



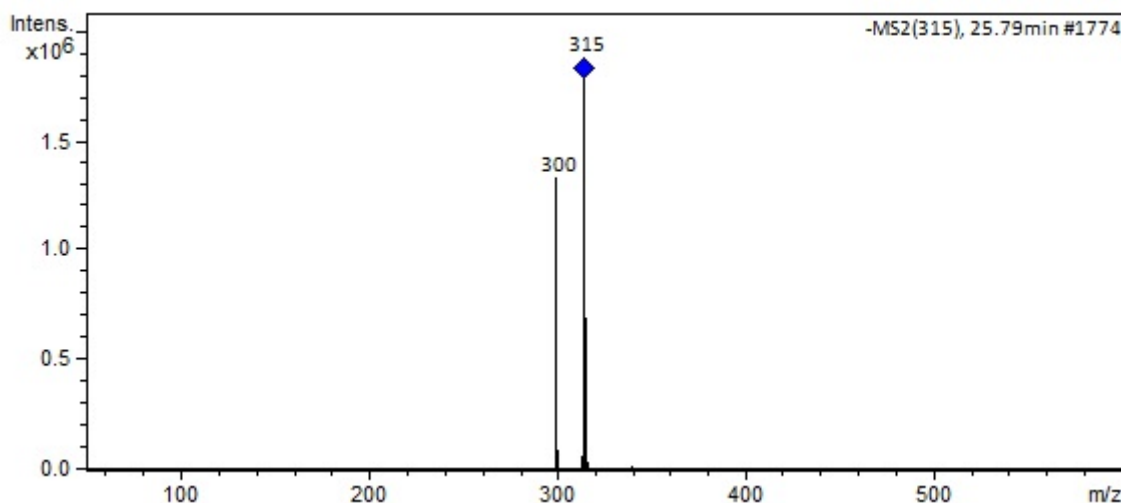
Fonte: Elaborado pelo próprio Autor.

Figura 57 - Espectro de massas por CLAE-IES-EM/EM e suas respectivas fragmentações no modo de ionização negativo, observados nos extratos etanólico e seiva de *H. courbaril*, correspondente ao íon molecular m/z 299 (gliricidina).



Fonte: Elaborado pelo próprio Autor.

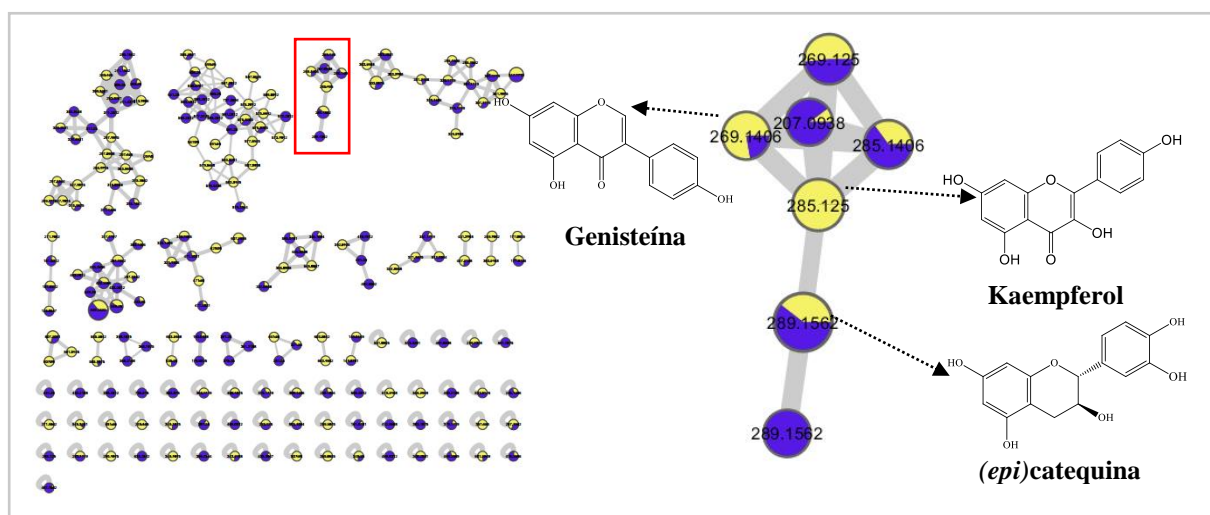
Figura 58 - Espectro de massas por CLAE-IES-EM/EM e suas respectivas fragmentações no modo de ionização negativo, observado no extrato etanólico e seiva de *H. courbaril*, correspondente ao íon molecular m/z 315 (isoramnetina).



Fonte: Elaborado pelo próprio Autor.

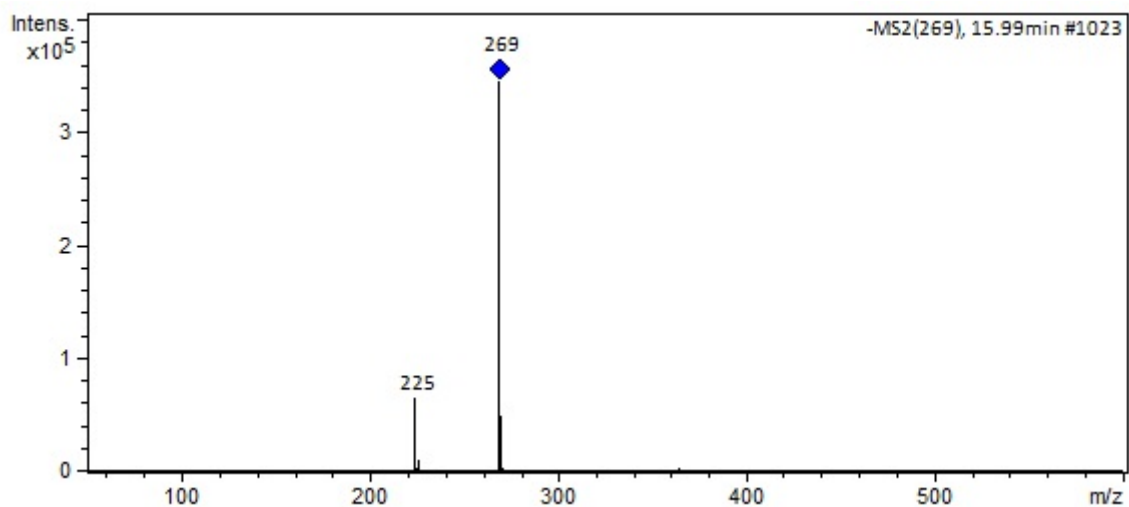
O Cluster 5 (Figura 59) foi constituído por nós de flavonóis, em que estes foram anotados de acordo com a literatura e com base de dados GNPS. Os íons precursoros m/z 269 (Genisteína), presente em maior quantidade no extrato (Figura 60), m/z 285 (kaempferol) que está exclusivamente no extrato (Figura 61), e o íon precursor m/z 289 ((*epi*)catequina), em maior quantidade na seiva (Figura 62), foram agrupados devido à eliminação comum de 44 Da, correspondente ao dióxido de carbono.

Figura 59 - Cluster 5 dos flavonóis da rede de interação molecular (*Molecular Networking*) do extrato etanólico e seiva de *H. courbaril* no modo negativo.



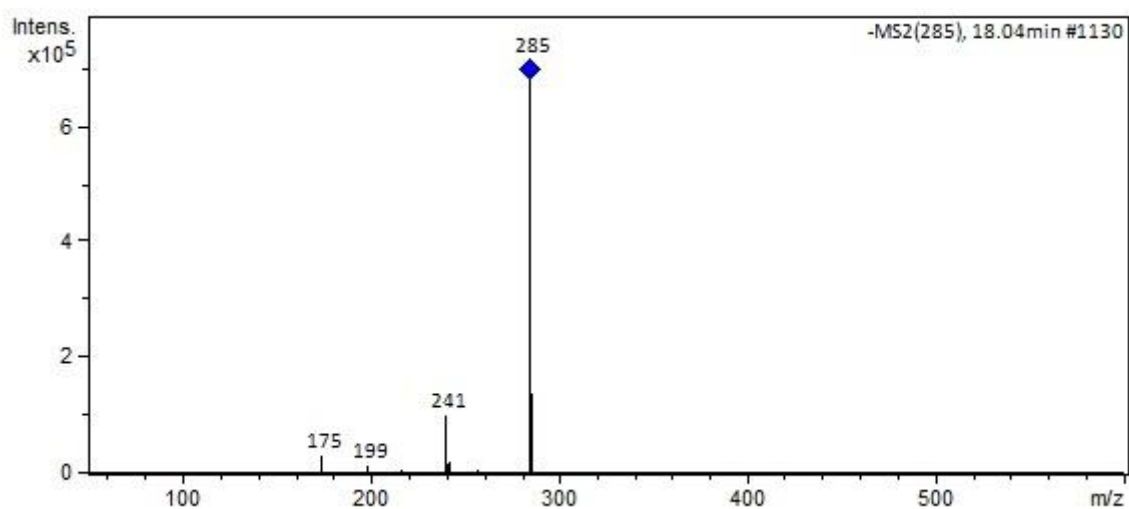
Fonte: Elaborado pelo próprio Autor.

Figura 60 - Espectro de massas por CLAE-IES-EM/EM e suas respectivas fragmentações no modo de ionização negativo, observado no extrato etanólico e seiva de *H. courbaril*, correspondente ao íon molecular m/z 269 (genisteína).



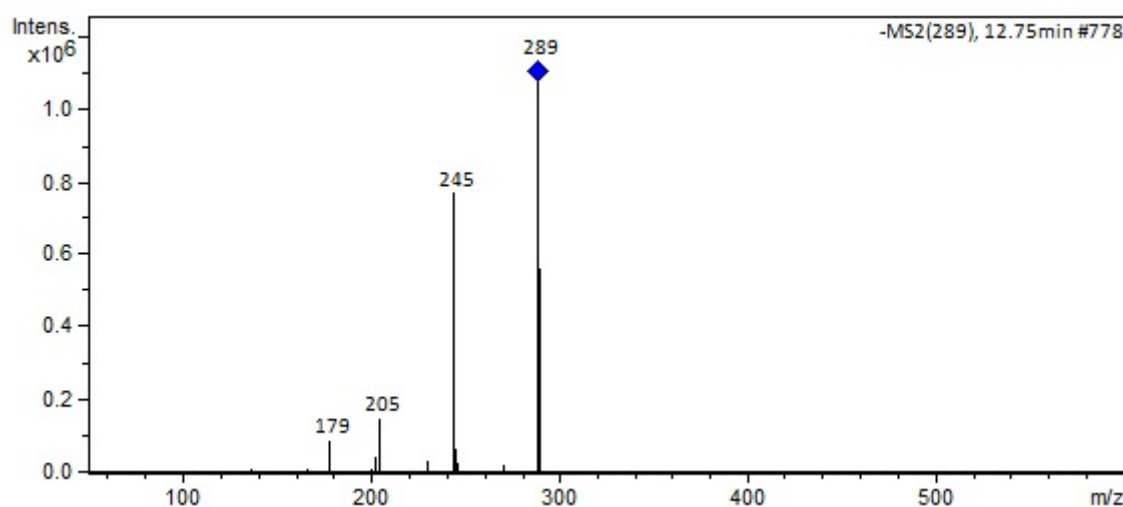
Fonte: Elaborado pelo próprio Autor.

Figura 61 - Espectro de massas por CLAE-IES-EM/EM e suas respectivas fragmentações no modo de ionização negativo, observado no extrato etanólico de *H. courbaril*, correspondente ao íon molecular m/z 285 (kaempferol).



Fonte: Elaborado pelo próprio Autor.

Figura 62 - Espectro de massas por CLAE-IES-EM/EM e suas respectivas fragmentações no modo de ionização negativo, observado no extrato etanólico e seiva de *H. courbaril*, correspondente ao íon molecular m/z 289 (*epi*)catequina.

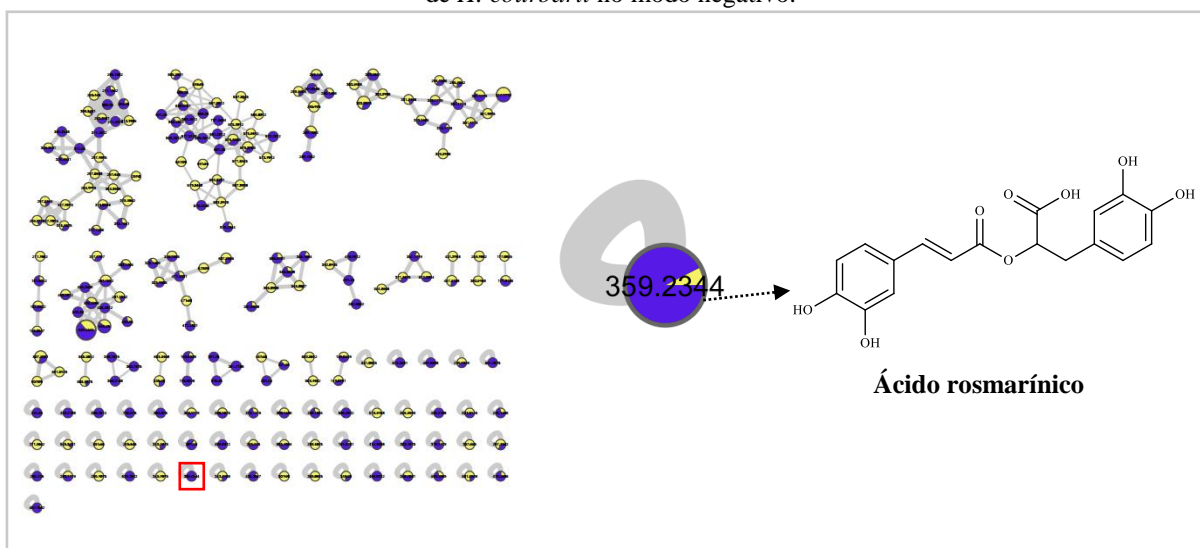


Fonte: Elaborado pelo próprio Autor.

O íon precursor m/z 359 (ácido rosmarínico) não têm qualquer relação estrutural com outra molécula, pois o nó apresentam-se na forma individual na rede de interação molecular (*molecular networking*), além de que este não está ligado a nenhum outro nodo (*node*) e nem inserido a um aglomerado (*cluster*) (Figura 63).

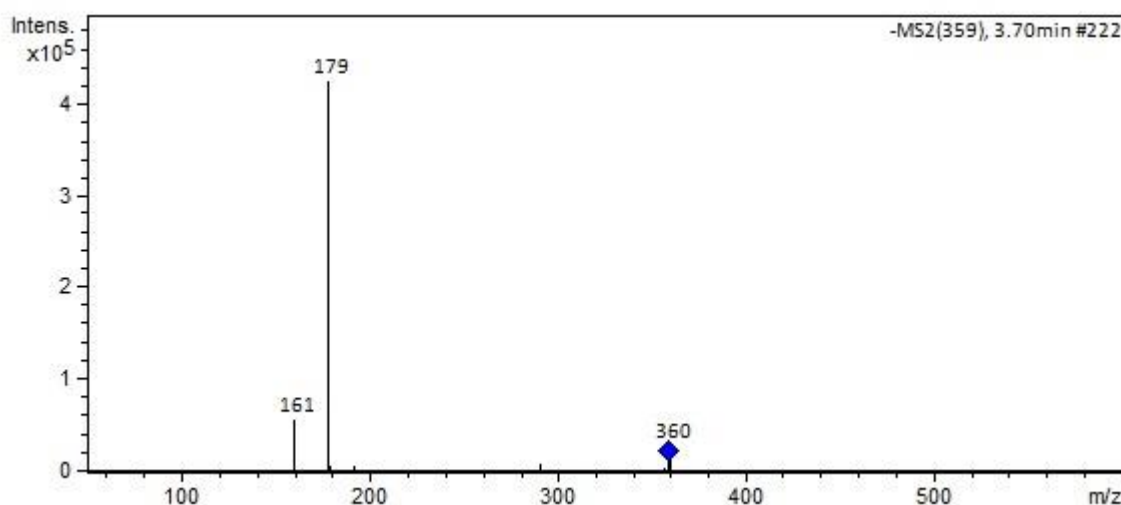
O íon precursor m/z 359 é um ácido carboxílico fenólico que tem um padrão de fragmentação que revela o íon fragmento m/z 179, corresponde a forma desprotonada do ácido cafeico (Figura 64). O ácido rosmarínico é uma substância encontrada em grande quantidade na seiva e a fragmentação foi conforme proposto por Møller et al. (2007).

Figura 63 - Nodo individual da rede de interação molecular (*Molecular Networking*) do extrato etanólico e seiva de *H. courbaril* no modo negativo.



Fonte: Elaborado pelo próprio Autor.

Figura 64 - Espectro de massas por CLAE-IES-EM/EM e suas respectivas fragmentações no modo de ionização negativo, observados no extrato etanólico e seiva de *H. courbaril*, correspondente ao íon molecular m/z 359 (ácido rosmarínico).

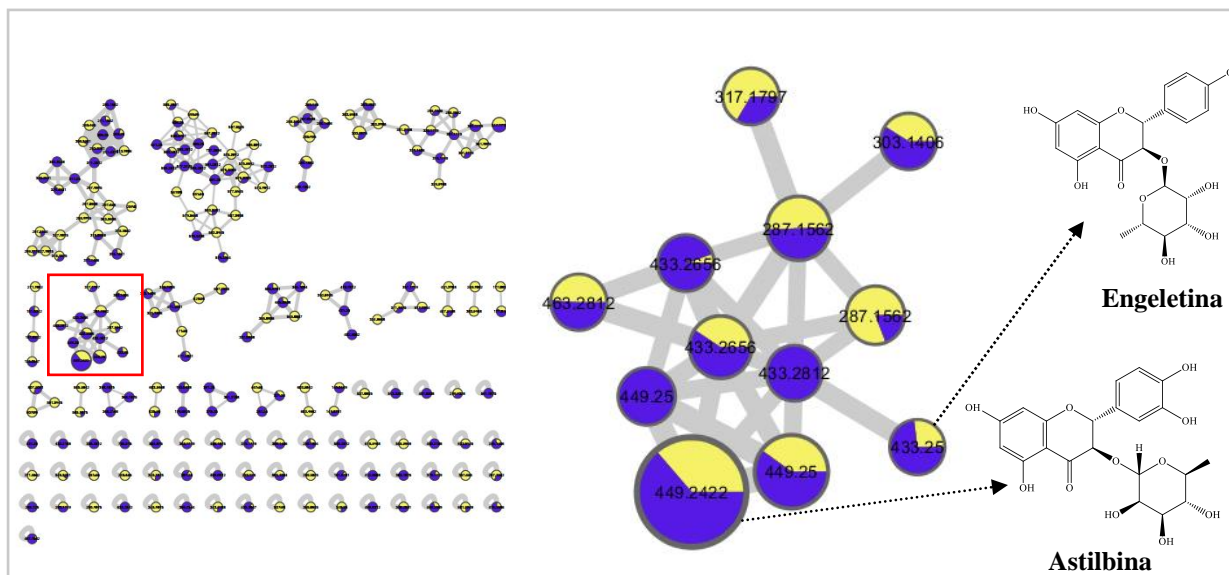


Fonte: Elaborado pelo próprio Autor.

No cluster 9 (Figura 65) observa-se os íons precursores m/z 433 (engeletina) (Figura 66) e m/z 449 (astilbina) (Figura 67), no qual, partindo do padrão de fragmentação, há a perda comum de uma deoxihexose (164 Da). O padrão de fragmentação da Astilbina foi semelhante ao encontrado por Pacheco et al. (2019). Na literatura, descreve-se que astilbina é um marcador químico do gênero *Hymenaea*, e foi previamente identificado em *H. parvifolia* (ISHIBASHI et al., 1999), *H. courbaril* L. (BEZERRA et al., 2013), *H. eriogyne* Benth (SILVA et al., 2019), *H. martiana* (PACHECO et al., 2019) e *H. stigonocarpa* Mart. ex Hayne (DIMECH et al., 2013).

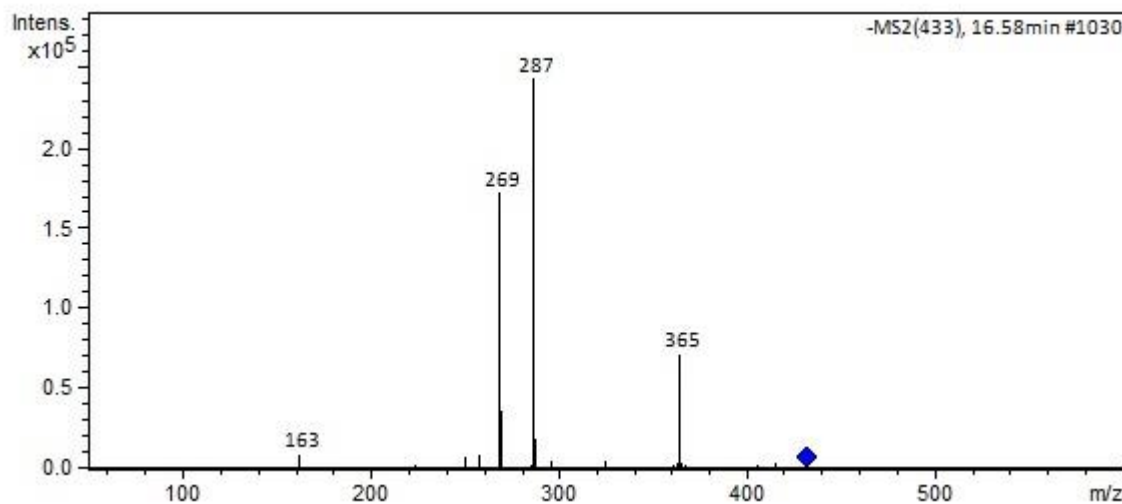
A astilbina e a engeletina estão presentes em maior quantidade na seiva do Jatobá, com isso, confirma-se uma maior afinidade das substâncias glicosiladas nesta amostra de *H. courbaril*, devido a sua maior polaridade quando comparado ao extrato etanólico.

Figura 65 - Cluster 6 dos flavonóides glicosilados da rede de interação molecular (*Molecular Networking*) do extratos etanólico e seiva de *H. courbaril* no modo negativo.



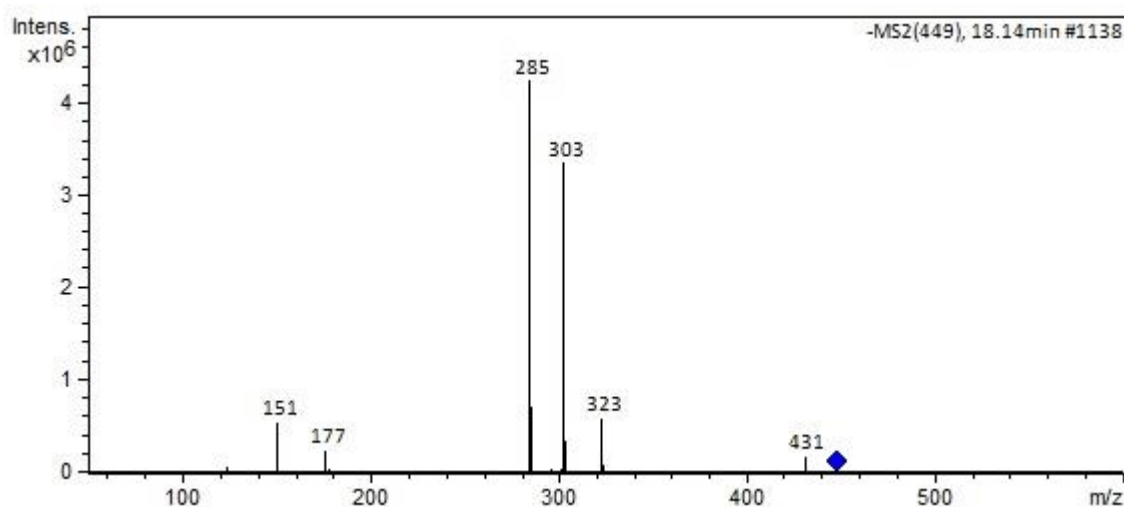
Fonte: Elaborado pelo próprio Autor.

Figura 66 - Espectro de massas por CLAE-IES-EM/EM e suas respectivas fragmentações no modo de ionização negativo, observados no extrato etanólico e seiva de *H. courbaril*, correspondente ao íon molecular m/z 433 (engeletina).



Fonte: Elaborado pelo próprio Autor.

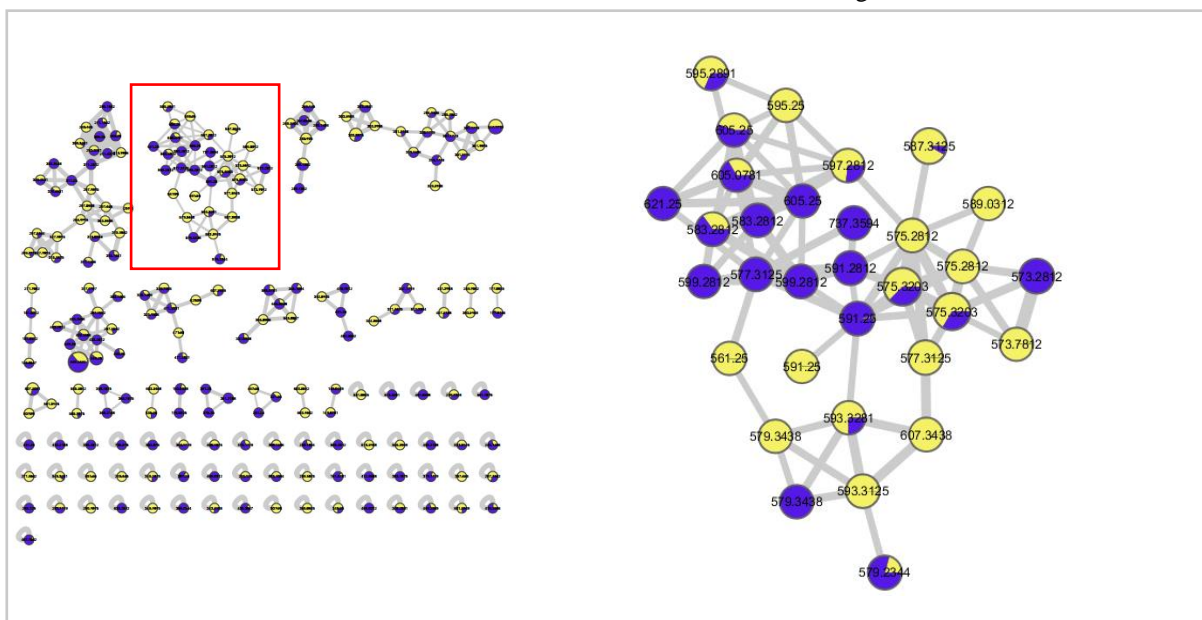
Figura 67 - Espectro de massas por CLAE-IES-EM/EM e suas respectivas fragmentações no modo de ionização negativo, observados no extrato etanólico e seiva de *H. courbaril*, correspondente ao íon molecular m/z 449 (Taxifolina 3-*O*-rhamnoseo (astilbina)).



Fonte: Elaborado pelo próprio Autor.

É possível inferir que no cluster 10 da rede molecular existem possivelmente dímeros e/ou derivados taxifolínicos, isso se deve a formação do íon m/z 303 nos espectros de massa das substâncias, referentes a taxifolina (Figura 68).

Figura 68 - Cluster 7 de derivados da taxifolina da rede de interação molecular (*Molecular Networking*) do extrato etanólico e seiva de *H. courbaril* no modo negativo.



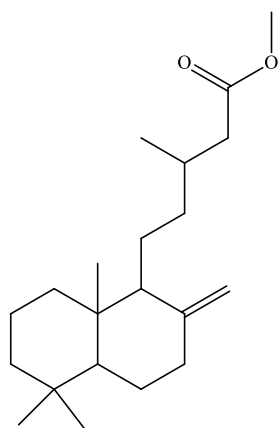
Fonte: Elaborado pelo próprio Autor.

5.2.6 Compostos orgânicos voláteis presentes no extrato etanólico de *H. courbaril*

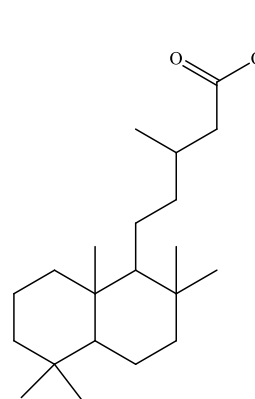
5.2.6.1 Análise do extrato bruto

A técnica de CG-EM foi aplicada para o extrato do resíduo madeireiro do Jatobá para verificar tentativamente os compostos voláteis presentes nesta amostra. Inicialmente, não foi possível identificar nenhuma substância, porém após a derivatização, constatou-se a presença do Éster metílico do ácido 5,5,8a-betadecahidrotetrametil-2-metileno-1-naftalenopentanoico e do Éster metílico do ácido 2-hidroxibetadecahidro-2,5,5,8a-pentametil naftalenopentanoico (Figura 69).

Figura 69 – Substâncias encontradas no extrato etanólico bruto de *H. courbaril*



Éster metílico do ácido 5,5,8a-betadecahidrotetrametil-2-metileno-1-naftalenopentanóico



Éster metílico do ácido 2-hidroxibetadecahidro-2,5,5,8a-pentametil naftalenopentanoico

Fonte: Elaborado pelo próprio Autor.

As substâncias mencionadas acima são terpenos relatados pela primeira vez por Sousa et al. (2020) para a espécie de *H. courbaril*. Os terpenos são bastante encontrados no gênero *Hymenaea*, sendo atribuído ações biológicas a eles (NOGUEIRA et al., 2002; DIAS; LUZIA; JORGE, 2013). As correlações das atividades com esta classe de composto são mencionadas na literatura, a exemplo disto temos a atividade antimicrobiana de *H. stignocarpa* (VALENTIM, 2006) e a ação inseticida, antibacteriana e antifúngica de *H. courbaril* (MERCÊS, 2015).

5.2.6.2 Substâncias encontradas nas frações obtidas pela partição líquido-líquido.

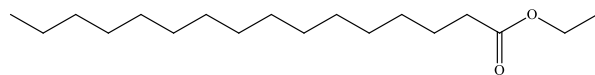
Na fração diclorometânica e na fração acetato de etila não foi possível identificar nenhum composto por meio da comparação com a base de dados utilizada. Por outro lado, na fração hexânica do Jatobá verificou-se substâncias de características apolares, e embora tenham sido identificados poucos compostos, foi possível observar um padrão no perfil de massas moleculares, indicando as possíveis classes as quais esses metabólitos pertencem, sendo registrados alguns ácidos graxos, diterpenos e fitoesteróides (Tabela 8, Figura 70).

Tabela 8 – Composição química da fração hexânica de *H. courbaril* analisada por CG-EM.

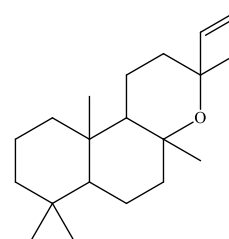
Tempo de retenção	Analito	MM (Massa Molecular)	Fórmula molecular	Classe do metabólito secundário	Porcentagem relativa
3.418	-	162	-	-	0,572
3.653	-	162	-	-	0,901
16,504	-	249	-	-	0,894
16,924	-	249	-	-	0,895
18,241	-	264	-	-	0,925
18,311	-	264	-	-	1,342
18,394	-	264	-	-	1,305
18,788	Éster etílico do Ácido palmítico	284	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	Ácido graxo	2,204
18,877	-	275	-	-	4,558
19,291	Óxido de Epimanoil	290	C ₂₀ H ₃₄	Diterpeno	2,572
20,048	-	257	-	-	0,857
20,951	-	281	-	-	1,252
21,855	Éster etílico do Ácido linoleico	308	C ₂₀ H ₃₆ O ₂	Ácido graxo	2,361
21,963	Éster etílico do Ácido oleico	310	C ₂₀ H ₃₈ O ₂	Ácido graxo	1,814
22,962	-	320	-	-	0,945
23,102	-	320	-	-	0,603
24,132	-	334	-	-	11,546
24,285	-	334	-	-	7,104
24,775	-	334	-	-	6,120
25,525	-	306	-	-	0,621
25,691	-	306	-	-	0,744
26,632	-	429	-	-	2,001
26,760	-	334	-	-	3,476
28,210	-	341	-	-	0,602
31,563	-	429	-	-	4,640
31,811	-	405	-	-	0,868
32,282	-	415	-	-	1,222
36,742	-	430	-	-	0,840
38,447	-	429	-	-	3,640
39,248	-	429	-	-	1,762
40,451	Beta-sisterol (stigmasterol-22,23-dihidro)	429	C ₂₉ H ₅₀ O	Fitoesteróide	24,985
42,346	-	429	-	-	2,949
43,981	-	429	-	-	2,881

Fonte: Elaborado pelo próprio Autor.

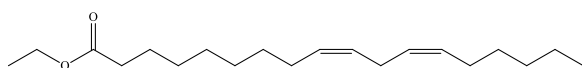
Figura 70 – Estrutura das substâncias encontradas na fração hexânica de *H. courbaril*



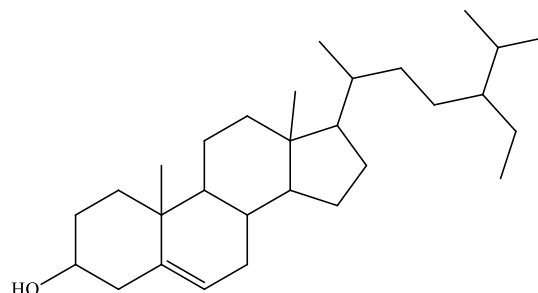
Éster etílico do ácido palmítico



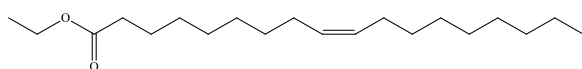
Óxido de epimanoil



Éster etílico do Ácido linoleico



Beta-sisterol (stigmasterol-22,23-dihidro)



Éster etílico do Ácido oleico

Fonte: Elaborado pelo próprio Autor.

O processo de derivatização permitiu que os ácidos graxos se tornassem mais voláteis, transformando-se então em Éster etílico do Ácido palmítico, Éster etílico do Ácido linoleico e Éster etílico do Ácido oleico. Os ácidos insaturados foram relatados na polpa de *H. courbaril*, tendo destaque na literatura o ácido oleico e o ácido linoleico (DIAS et al., 2013).

5.3 Atividade antioxidante, fenóis e flavonóides totais

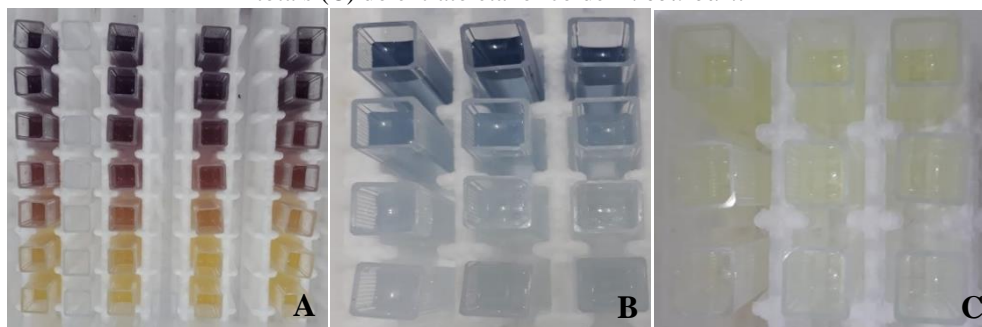
A partir da determinação da atividade antioxidante (DPPH e FRAP) verificou-se que o extrato etanólico de Jatobá tem maior potencial quando comparado com a seiva, podendo esta atividade estar correlacionada aos altos teores de fenólicos e flavonóides no extrato do resíduo dos galhos de *H. courbaril* (Tabela 9) (Figura 71).

Tabela 9 - Atividade antioxidante do extrato etanólico de *H. courbaril* determinada pelo método de DPPH e FRAP.

Amostra	DPPH	FRAP
	CE ₅₀ ± DP (µg.mL ⁻¹)	(µM Eq Trolox.mg ⁻¹)
Extrato etanólico	215,32±0,20 b	419,95±12,38 a
Seiva	410,25±3,00 a	123,95±1,36 b

Fonte: Elaborado pelo próprio Autor.

Figura 71 - Avaliação da atividade antioxidante pelo método de DPPH (A), fenólicos totais (B) e flavonóides totais (C) do extrato etanólico de *H. courbaril*



Fonte: Elaborado pelo próprio Autor.

Os achados neste trabalho para a atividade antioxidante a partir do método DPPH para a seiva ($410,25 \pm 3,00 \mu\text{g.mL}^{-1}$) foi similar ao encontrado na literatura para o extrato etanólico 70% das folhas ($415,80 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e das cascas ($428,10 \mu\text{g.mL}^{-1}$) de *H. courbaril* (FIGUEIREDO et al., 2016).

Com referências ao poder de redução do Fe^{+3} , o resultado mais expressivo foi apresentado para o extrato ($419,95 \pm 12,38 \mu\text{M Eq Trolox.mg}^{-1}$). Pode-se inferir que a atividade antioxidante do extrato etanólico de Jatobá pode estar relacionada ao teor de compostos fenólicos presentes na sua constituição química, corroborando com os resultados achados na literatura para a espécie e sugerindo a influência dessa classe de metabólito nas atividades biológicas deste material que é tratado como resíduo, mas que tem potencial para aproveitamento farmacêutico.

A tabela 10 demonstra que o extrato etanólico apresenta maior quantidade de conteúdos fenólicos ($418,67 \pm 9,15 \text{ EAG.mL}^{-1}$) em relação a seiva ($227,22 \pm 1,35 \text{ EAG.mL}^{-1}$) de *H. courbaril*.

Antioxidantes podem proteger o corpo humano dos radicais livres, retardando o progresso de algumas doenças crônicas. Além disso, podem retardar o processo de envelhecimento e diminuem o risco de doenças degenerativas, tais como o cancro, doenças cardiovasculares, cerebrais e aquelas relacionados ao sistema imunitário (BAYDAR; GÜLCAN; YAŞAR, 2007).

Tabela 10 – Determinação do teor de fenólicos totais e flavonóides totais do extrato etanólico de *H. courbaril*

Amostra	Fenólicos totais (EAG. mL ⁻¹)	Flavonóides totais (ER.mg ⁻¹)
Extrato etanólico	418,67±9,15 a	54,63±0,36 a
Seiva	227,22±1,35 b	1,24±0,23 b

Fonte: Elaborado pelo próprio Autor.

As substâncias fenólicas presentes em extratos vegetais são considerados metabólitos secundários com atividades biológicas, sintetizados pelas plantas em reação a situações de estresse como exposição a radiações ultravioleta intensas e infecções por patógenos (SILVA et al., 2012).

Os resultados encontrados neste trabalho, demonstraram maiores teores de flavonóides também no extrato (54,63±0,36 ER.mg⁻¹), diferenciando-se estatisticamente da seiva (1,24±0,23 ER.mg⁻¹) (Figura 13C). A relação dos flavonóides com a atividade antioxidante é devido aos anéis aromáticos fenólicos ligados a um ou mais grupos hidroxila em sua estrutura, o que os torna capazes de se ligar aos radicais livres (SARAÇ; ŞEN, 2014). Na literatura também pode ser comprovada a atividade antioxidante do extrato hidroetanólico das sementes de *H. courbaril* (SPERA et al., 2019).

O alto teor de flavonóides presentes na constituição química do extrato de Jatobá, pode também correlacionar-se a atividade antimicrobiana, o que justifica aprofundar as pesquisas direcionadas ao aproveitamento farmacêutico deste resíduo. Estudos com o extrato do resíduo (galhos) de *H. courbaril*, como o que estamos relatando neste trabalho, ainda não foram descritos na literatura, sendo possível encontrar apenas pesquisas que utilizam outras partes da planta, onde também é comprovada a presença deste metabólito secundário (flavonóide) (MARANHÃO et al., 2013; SILVA et al., 2013; MIRANDA; CASTRO; SILVÉRIO, 2014), havendo também diferenças em termos de quantificação desses compostos nas amostras.

5.4 Ação antimicrobiana do extrato e da seiva de *H. courbaril*.

5.4.1 Antibiograma

Os resultados constatados para os microrganismos testados frente a antimicrobianos padrões estão descritos na tabela 11. A leitura interpretativa do antibiograma foi dividida em sensível, quando a tensão bacteriana foi inibida *in vitro* por uma concentração do antimicrobiano que está associado a uma alta probabilidade de sucesso terapêutico;

intermediário, quando a tensão bacteriana for inibida *in vitro* por uma concentração do antimicrobiano que está associado a um efeito terapêutico incerto; e resistente quando a tensão bacteriana do antibiótico for inibido *in vitro* por uma concentração do antimicrobiano que está associado a um alta probabilidade de fracasso terapêutico (CANTÓN, 2010).

Tabela 11 – Antibiograma obtido para os microrganismo testados.

Antibiótico	Microrganismos												
	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>M. luteus</i>	<i>C. tetani</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>A. hydrophyla</i>	<i>G. vaginalis</i>	<i>N. gonorrhoeae</i>	<i>S. marcescens</i>	<i>S. enterica</i>	<i>E. coli</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. krusei</i>
Cefepime 30 µg	R	R											
Ciprofloxacino 5 µg	S	S	S	S		S	S	S	S	S	S		
Cloranfenicol 30 µg	S	S		S	S								
Gentamicina 10 µg	R	S	S	S	S	S			S	S	S		
Cloridrato de Clindamicina 2 µg	R	S	S	S	S		S						
Eritromicina 15 µg	R				R								
Penicilina 10µg	S		S	S	R		S	S					
Rifampicina 5 µg	R	I	I	I	I								
Oxacilina 1 µg	R	R	R	R	R		R						
Vancomicina 30 µg	R	S	S	S	I		S						
Sulfametoxazol + Trimetoprima 23,75 / 1,25µg	S	R	S	S	R		S		S	S			
Tetraciclina 30µg	R	S	S	S	S		I	S					
Cefalotina 30µg							S		S	S	R		
Ceftriaxona 30 µg			S				S		S	S	R		
Amicacina 30 µg							S	S	S	S	S		
Amoxicilina + clavulanato 20/10 µg							S		S	S	R		
Ampicilina 10 µg							S	S	S	S	R		
Ceftazidima 30 µg							R		R	R	R		
Cefepime 30 µg			S	S			S		S	S	R		
Meropenem 10 µg							S	R	S	S	S		
Cefoxitina 30 µg							S		S	S	R		

Continuação

Tabela 11 – Antibiograma obtido para os microrganismo testados.

Azitromicina 15 µg	S	S	S	S	
Imipenem 10 µg			S	S	
Moxifloxacina 5 µg				S	
Estreptomicina 10 µg				S	
Anfotericina 100 µg				S	S
Fluconazol 25 µg				S	S
Nistatina 100 IU					
Cetoconazol 50 µg				S	S

S- sensível; I- intermediário; R – resistente

Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Autores confirmam resistência da bactéria *E. coli* aos antibióticos tetraciclina, estreptomicina, sulfonamidas, ampicilina e canamicina, carbenicilina, rifampicina e eritromicina (HIRSH; ZEE, 1999; DIAS et al., 2010).

Os antibióticos fornecem a pressão seletiva necessária para o aumento e dispersão de bactérias resistentes, sendo que o uso contínuo e o seu mau uso são os fatores mais fortes à essa resistência, sendo as informações obtidas e extraídas desse antibiograma têm grande importância tanto clínica como epidemiológica (CORONELL-RODRÍGUEZ; ARTETA-ACOSTA; DUEÑAS-CASTELL, 2018).

5.4.2 Ação fungicida e bactericida do extrato etanólico e da seiva de *H. courbaril*

Com relação aos fungos leveduriformes, o extrato etanólico foi mais ativo para a espécie de *C. kruzei* ATCC34135, a qual mostrou CIM e CBM de 62,5 µg.mL⁻¹ (Tabela 12). A importância de resultados para *Candida* sp. é realçado porque este microrganismo está entre os principais agentes ameaçadores a nível mundial, isso se deve a gravidade e/ou maior incidência das doenças causada por este microrganismo, além de que este gênero é a levedura mais isolada entre infecções fúngicas sistêmicas (GANESAN et al., 2018, 2019; ALMEIDA et al., 2019; ABOODY; MICKYMARAY, 2020). Algumas substâncias são relatadas na literatura com atividade antimicrobiana frente a *C. albicans* e *C. kruzei*, a exemplo são a quercitrina, quercetina e kaempferol, todas essas relatadas neste trabalho (DJOUOSSI et al., 2015; SALAZAR-ARANDA et al., 2015; SHAO et al., 2015; ANDRADE et al., 2018). A

catequina também possui atividade antifúngica contra *C. albicans* na concentração entre 15-30 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (SILVA et al., 2013), sendo esta substância também confirmada em *H. courbaril*.

Verificou-se que tanto o extrato etanólico quanto a seiva de *H. courbaril* apresentaram atividade antimicrobiana. A ação fungicida do extrato etanólico foi confirmada para 92,30% dos isolados, já para a seiva, verificou-se ação fungistática e bacteriostática para todos os microrganismos testados.

Tabela 12 - Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) do extrato etanólico e da seiva do resíduo de *H. courbaril* contra os microrganismos testados

Microrganismos	Extrato de <i>H. courbaril</i>		Seiva de <i>H. courbaril</i>		Controle	
	CIM	CBM/ CFM	CIM	CBM/ CFM	CIM	CBM/ CFM
	$\mu\text{g.mL}^{-1}$					
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC23235	500,00	500,00	250,00	*	7,81	7,81
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC12228	250,00	*	>1000	*	7,81	7,81
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 7468D	15,62	1000	>1000	*	7,81	7,81
<i>Clostridium tetani</i> PINCQS 00067	15,62	31,25	>1000	*	7,81	7,81
<i>Enterococcus faecalis</i> NEWP 0033	125,00	250,00	>1000	*	7,81	7,81
<i>Aeromonas hydrophila</i> CP007518-2	15,62	31,25	>1000	*	7,81	7,81
<i>Gardinerella vaginalis</i> ATCC 49154	15,62	31,25	>1000	*	7,81	7,81
<i>Neisseria gonorrhoeae</i> ATCC 9826	15,62	31,25	>1000	*	7,81	7,81
<i>Serratia marcescens</i> ATCC 14756	15,62	31,25	>1000	*	7,81	7,81
<i>Escherichia coli</i> ATCC25922	250,00	1000	>1000	*	7,81	7,81
<i>Salmonella enterica subsp. enterica</i> BM/NIHT 00236	15,62	500,00	>1000	*	7,81	7,81
<i>Candida kruzei</i> ATCC34135	62,50	62,50	>1000	*	125	125
<i>Candida albicans</i> UFPEDA 1007	250,00	1000	>1000	*	*	*

*ação fungistática e/ou bacteriostática
 CBM - Concentração bactericida mínima
 CFM – Concentração fungicida mínima
 Fonte: Elaborado pelo próprio Autor.

A efetividade de Jatobá frente a *S. aureus* foi confirmada por alguns autores, em que testaram a susceptibilidade de 52 cepas frente ao extrato hidroetanólico de *H. courbaril* var. *stilbocarpa*, verificando ação muito superior aos extratos de *Psidium guajava* var. *pomifera* e *Pothomorphe umbellata* e *Bidens pilosa* (GARCIA; UEDA; MIMICA, 2011). A ação *in vitro* desta espécie evidenciou a presença de princípios ativos antibacterianos, sendo encontrado no estudo, halos de inibição de crescimento bacteriano de 8-10 mm. Outras partes da planta

(fruto) também são relatadas em literatura com atividade antimicrobiana frente a *S. aureus* (CORREA; AGUIRRE; PALACIOS, 2020).

Por meio da avaliação da atividade antimicrobiana, constatou-se que o extrato etanólico de Jatobá foi bastante efetivo para a bactéria Gram-positiva *C. tetani* PINCQS 00067 e as gram-negativas *A. hydrophila* CP007518-2, *G. vaginalis* ATCC 49154, *N. gonorrhoeae* ATCC 9826, *S. marcescens* ATCC 14756, sendo encontrado as CIM de 15,62 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e CBM de 31,25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para estas. E ao analisar os resultados do antibiograma (Tabela 11) com os antibióticos testados no combate desses microrganismos, verifica-se que *C. tetani* e *G. vaginalis* foram resistentes a oxacilina, por outro lado, *A. hydrophila* e *S. marcescens* se mostraram resistente a ceftazidima, além de que *G. vaginalis* foi resistente a meropenem. Com isso, verifica-se a importância de testar novos produtos, subprodutos e substâncias isoladas a partir de plantas, sendo estas em potencial para serem utilizadas no controle de microrganismos resistentes.

A concentração bactericida do extrato etanólico de *H. courbaril* para *S. aureus* foi de 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e para *S. epidermidis* verificou-se ação bacteriostática, nesta concentração. Ao avaliarem a atividade antimicrobiana *in vitro* do extrato etanólico e hidroetanólico das folhas da *H. martiana* Hayne frente às *Staphylococcus* spp., foi possível constatar CBM média de 358 $\mu\text{g.}\mu\text{L}^{-1}$ e 520,82 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente (VIEIRA et al., 2018).

A atividade antimicrobiana do extrato etanólico do resíduo madeireiro de *H. courbaril* L. foi comprovada também frente a fungos fitopatogênicos, sendo citada concentração inibitória mínima até 15,625 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para *Macrophomina phaseolina*. Esses dados comprovam a ampla efetividade deste extrato para microrganismos de diferentes interesses (SOUSA et al., 2020).

Diferentes partes da planta *H. courbaril* possuem atividade biológica contra isolados clínicos bacterianos. O extrato bruto da casca é relatado na literatura com ação bacteriostática frente a *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* com CIM variando de 125 a 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, além de ser bactericida para *E. faecalis* em uma concentração considerada alta (1250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) (ALEIXO et al., 2013). Os resultados da CIM encontrados por esses autores para *S. aureus* (500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), *E. coli* (250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e *E. faecalis* (125 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) corroboram com os achados para o extrato etanólico do resíduo madeireiro de Jatobá.

A seiva extraída do fuste de *H. courbaril* foi menos ativa que o extrato etanólico de Jatobá, pois, verifica-se na Tabela 12 que 92,30% tiveram CIM superior a 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, exceto para *S. aureus* ATCC23235 a qual apresentou CIM de 250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Ressalta-se ainda

que para a seiva, a atividade foi bacteriostática/ fungistática. Costa et al. (2014) ao testarem a seiva de *H. courbaril* em fungos leveduriformes observou-se a inibição do crescimento de leveduras do complexo *Cryptococcus neoformans* com concentração inibitória mínima (CIM <256 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), além de que, o flavonóide fisetina, composto isolado da seiva desta espécie, é muito ativo (CIM <128 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). Na literatura é mencionado que as alterações nos teores de flavonóides totais é capaz de proporcionar uma variação nas atividades biológicas de uma planta, sendo que esta afirmação foi comprovada neste trabalho, pois verifica-se maior teor de compostos fenólicos e melhor atividade antimicrobiana para o extrato etanólico do que à seiva.

Verifica-se que 61,54% dos microrganismos apresentaram concentrações inibitórias menores que 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para o extrato etanólico de jatobá. A atividade antimicrobiana de extratos podem ser classificados conforme os resultados obtidos na CIM, onde concentrações abaixo de 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ é considerada alta atividade, valores entre 100 e 625 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ é considerada com atividade moderada e CIM > 625 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ com atividade fraca (KUETE, 2010). Com base nesta análise, verifica-se que as concentrações inibitórias do extrato etanólico de Jatobá encontrados neste trabalho possui alta e moderada atividade antimicrobiana. A análise dos dados químicos verifica que a classe metabólica predominante no Jatobá são os flavonóides, e a sua natureza química depende de fatores como estrutura, grau de hidroxilação, substituições, conjugações e grau de polimerização (HEIM; TAGLIAFERRO; BOBILYA, 2002), sendo descrito na literatura que esses compostos tem ação biológica significativa a diversos microrganismos.

O flavonóides podem agir em um lugar específico da célula ou em múltiplos locais. Essas ações englobam a formação de complexos com proteínas por meio de forças inespecíficas que pode ser de ligação de hidrogênio, efeitos hidrofóbicos, ou por ligações covalentes. Isso faz com que a atividade antimicrobiana dos flavonóides esteja ligado a habilidade dessa classe em inativar adesivos microbianos, enzimas e proteínas de transporte (COWAN, 1999; MISHRA et al., 2009; KUMAR; PANDEY, 2013). Alguns tipos de flavonóides, como os lipófilos tem a capacidade de romper a membrana microbiana, sendo que a ação desta classe de composto pode relacionar-se a fatores como a inibição da síntese de ácido nucleico (DNA girase), ação do metabolismo energético bacteriano, ou ainda sobre a alteração da função da membrana citoplasmática (CUSHNIE; LAMB, 2005; FULLERTON et al., 2011; KUMAR; PANDEY, 2013).

Os flavonóides possuem uma ampla capacidade em inibir a germinação de esporos, sendo frequentemente indicados para serem utilizados no combate de infecções causadas por

fungos patogênicos ao homem (SALAS et al., 2011). A atividade antifúngica pode ainda estar associada a natureza lipofílica dos flavonóides, as quais são descritas como capazes de romperem as membranas dos microrganismos (ARIF et al., 2009)

A atividade antibacteriana dos flavonóides é descrita como conflitante pois alguns autores relatam que a ação dessa classe se dá principalmente por meio de sua capacidade de interação com a membrana plasmática, sendo capaz de inibir sua função, e posteriormente, influenciar e/ou destruir a integridade celular (JÚNIOR SOUZA; SALES; MARTINS, 2009).

Ao correlacionar os principais componentes químicos do Jatobá com às análises microbiológicas verifica-se que alguns compostos propostos tanto para a seiva como para o extrato etanólico tem elevado efeito biológico devido ao sinergismos dessas substâncias ou a uma molécula específica. A astilbina é uma substância encontrada em quantidade significativa nos materiais analisados, sendo mais expressivo na seiva de *H. courbaril*. Ao avaliarem os efeitos inibitórios desta substância frente aos microrganismos *M. luteus* e *S. epidermidis*, verificou-se que esta molécula é ativa frente a esses patógenos, sendo a quantidade inibitória mínima de 25 e 50 µg (MOULARI et al., 2006).

A forte atividade antimicrobiana da astilbina frente aos microrganismos gram-positivos *M. luteus* e *S. epidermidis*, está intimamente relacionada à estrutura química deste composto, sendo verificado a essencialidade da presença de grupos na posição 3, 4-hidroxila, além da dihidroxilação nas posições 5 e 7 (MOULARI et al., 2006).

A quercetina é um flavonóide conhecido por sua atividade antimicrobiana. Ao avaliar as propriedades antibacterianas desta substância contra o *S. aureus*, *E. coli* e *P. aeruginosa* por meio do método diluição em caldo verificou-se que este composto foi mais efetivo para *S. aureus* e *P. aeruginosa*, sendo a concentração mínima inibitória encontrada de 20 µg.mL⁻¹ para ambos. No caso da *E. coli* foi determinada a CIM de 400 µg.mL⁻¹, sendo a concentração maior aos demais patógenos testados (JAISINGHANI, 2017).

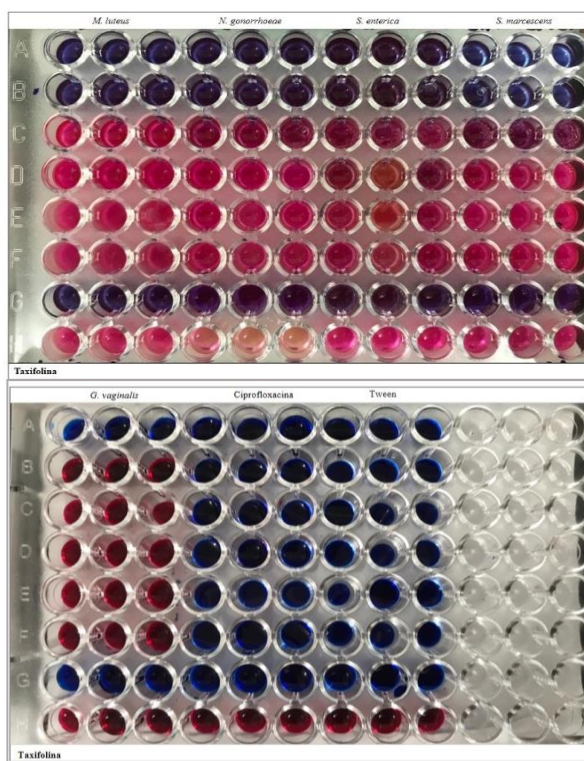
Ulanowska et al. (2006) ao avaliarem a atividade antimicrobiana da narigenina e genisteína frente a bactéria *E. coli*, verificaram que esta é resistente aos flavonóides mencionados em concentrações superiores a 0,1 milimolar. Constatamos também neste trabalho, a partir da análise química, a presença da genisteína, em maior quantidade no extrato etanólico de *H. coubaril*, a qual podemos inferir que a molécula pode estar em concentração suficiente para contribuir ou ser responsável pela atividade biológica desta espécie.

5.4.3 Ação bacteriostática da Taxifolina

Após a identificação por ressonância magnética nuclear, procedeu-se o ensaio de atividade antimicrobiana da substância taxifolina, substância que foi isolada em maior quantidade (6,6 mg) a partir do extrato etanólico de *H. courbaril*. A partir dos ensaios microbiológico verificamos que os resultados foram similares para quase todas bactérias testadas (*M. luteus* ATCC 7468D, *N. gonorrhoeae* ATCC 9826, *S. enterica* subsp. *Enterica* BM/NIHT 00236, *S. marcescens* ATCC 14756) com CIM de 125 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, exceto para e *G. vaginalis* (CIM>250 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). Quando observadas as CBM, constatou-se que esta substância possui ação bacteriostática frente a estes microrganismos (Figura 72).

A análise dos dados nos permite inferir que a taxifolina pode não ser a principal responsável pela atividade microbiológica, visto que o extrato bruto teve maior ação contra os microrganismos testados. Verifica-se ainda que quando comparado ao antibiótico ciprofloxacina (controle), a substância isolada foi menos eficiente.

Figura 72 - CIM da taxifolina frente a patógenos de interesse clínico.



Fonte: Elaborado pelo próprio Autor.

Artem'Eva, Pereselkova e Fomichev (2015), determinaram a atividade da taxifolina em 0,5, 1,0, 2,0 e 5,0% frente aos microrganismos *S. epidermidis* ATCC 14990, *M. luteus* ATCC 4698, *M. luteus* ATCC 10240, *E. coli* VL-613 e *P. aeruginosa*. Estes autores verificaram que

as bactérias *S. epidermidis* ATCC 14990 e *M. luteus* ATCC 4698 são altamente sensíveis a essa substância na concentração de 5,0%.

Foi testado e comprovado a atividade desta substância em outros microrganismos como *E. coli* VL-613, *S. epidermidis* ATCC 14990 e *P. aeruginosa* 98, *E. faecalis* (GYAWALI; IBRAHIM, 2014; ARTEM'EVA; PERESELKOVA; FOMICHEV, 2015).

Alguns dos patógenos possuem resistência a múltiplos antibióticos quando ensaiados (Tabela 11). Na literatura pode ser constatado que a taxifolina pode melhorar a eficácia de antibióticos tradicionais como a ceftazidima e a levofloxacina (KATAVIC et al., 2007).

A ação terapêutica da taxifolina frente a *E. faecalis* ($CIM \leq 128 \mu\text{g.mL}^{-1}$) também é citada, inclusive esta bactéria mostrou-se resistente à vancomicina (JEONG et al., 2009). Neste trabalho, o antibiótico em questão foi classificado como intermediário para o tratamento deste microrganismo.

6 CONCLUSÃO

O estudo químico do resíduo madeireiro de *H. courbaril* está sendo descrito pela primeira vez neste trabalho. Tanto a seiva como o extrato etanólico do resíduo madeireiro de *H. courbaril* são fontes de substâncias fenólicas e flavonoídicas, sendo encontradas moléculas desta classe consideradas os marcadores quimiotaxonômicos do gênero *Hymenaea*.

O método desenvolvido pela análise de cromatografia líquida CLAE-IES-EM/EM ofereceu uma forma rápida e eficiente de determinar os flavonóides presentes nesta espécie.

A abordagem de redes moleculares comparando extrato etanólico e seiva de *H. courbaril* foi considerado um diferencial neste estudo, onde a substituição do solvente não trouxe prejuízo ao processo analítico, e sua aplicação demonstra vantagens e benefícios ambientais, econômicos, além da menor exposição operacional.

A combinação das técnicas de CLAE-IES-EM/EM e de *Molecular Networking* possibilitou uma adequada interpretação dos resultados. A partir da aplicação das redes moleculares para análise do extrato etanólico dos resíduos madeireiro e da seiva de *H. courbaril* foi possível anotar 16 substâncias, sendo predominantemente da classe dos flavonóides como ácido rosmarínico, ácido cafeico, ácido ferúlico, (*epi*)catequina, 3-*O*-metil-(*epi*)catequina, aromadendrina ou dihidrokaempferol, genisteína, engeletina, taxifolina, kaempferol, taxifolina 3-*O*-deoxihexose (astilbina), kaempferol-7-*O*-deoxihexose, quercetina-3-*O*-deoxihexose (quercetina), quercetina, gliricidina, isoramnetina, além de derivados da taxifolina.

O fracionamento do extrato etanólico do resíduo madeireiro de *H. courbaril* por CLAE permitiu o isolamento das substâncias fustina, taxifolina, 3-metóxi-quercetina e a quercetina e sua identificação por Ressonância Magnética Nuclear.

Por meio da análise da CG-MS identificamos compostos orgânicos voláteis no extrato etanólico de *H. courbaril*, quando constatou-se a presença de substâncias Éster metílico do ácido 5,5,8a-betadecahidrotetrametil-2-metileno-1-naftalenopentanóico, Éster metílico do ácido 2-hidroxibetadecahidro-2,5,5,8a-pentametil naftalenopentanoico, Éster etílico do Ácido palmítico, Óxido de Epimanoil, Éster etílico do Ácido linoleico, Éster etílico do Ácido oleico e Beta-sisterol (stigmasterol-22,23-dihidro).

Os resultados do presente estudo indicaram que tanto o extrato etanólico como a seiva de *H. courbaril* apresentam atividade antioxidante nos testes de DPPH e FRAP, podendo ser considerado uma fonte de compostos fenólicos. No entanto, observou-se maior atividade

antioxidante, teor de fenólicos e flavonóides para a amostra do extrato etanólico do resíduo madeiro de jatobá.

O extrato etanólico também destacou-se por ter maior potencial antimicrobiano *in vitro*, sendo ativo nas bactérias *C. tetani* PINCQS 00067, *A. hydrophila* CP007518-2, *G. vaginalis* ATCC 49154, *N. gonorrhoeae* ATCC 9826 e *S. marcescens* ATCC 14756. A seiva, no entanto, teve menor atividade biológica, sendo bacteriostática/ fungistática para todos os patógenos. Com isso, pode-se inferir que o teor de fenólicos pode estar diretamente relacionado à referida atividade nesta planta.

Ao ser avaliada a atividade antimicrobiana da taxifolina, verificou-se que esta possui menor efeito quando comparado ao extrato bruto, demonstrando que a junção das substâncias ou outra molécula específica podem ser responsáveis pela atividade desta parte da planta.

O efeito antimicrobiano juntamente com o entendimento e análise das substâncias presentes em *H. courbaril* nos demonstra o potencial terapêutico desta espécie, sendo importante e necessário futuros experimentos que façam ênfase a esses constituintes fenólicos para o tratamento de infecções bacterianas e fúngicas (problemática mundial). Além de que este estudo contribui para a segurança da utilização tradicional de produtos e subprodutos do Jatobá, bem como, a longo prazo, para a preparação de formulações à base de plantas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABOODY, M. S. AL; MICKYMARAY, S. Anti-fungal efficacy and mechanisms of flavonoids. **Antibiotics**, v. 9, n. 2, p. 43, 2020.
- ADAMS, R. P. **Identification of the essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy**, 4 ed., Illinois/USA: Allured Publish Corporation, 2007, 798 p.
- ALLARD, S. et al. Comparative molecular networking analysis of a Rauwolfia plant powder and biological matrices in a fatal ingestion case. **Forensic Toxicology**, v. 38, n. 2, p. 447–454, 2020.
- ALEIXO, A. A. et al. Propriedades antibióticas dos extratos de *Stryphnodendron adstringens* e *Hymenaea courbaril* (Fabaceae), frente ao isolado clínico meticiclina-resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA). **Biochemistry and Biotechnology Reports**, Londrina, v. 2, n. 1, p. 85-88, 2013.
- ALMEIDA, P. A. et al. Development, optimization and validation of an HPLC-PDA method for quantification of taxifolin in the bark extract of *Pinus pinaster*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 27, n. 9, p. 1648–1656, 2016.
- ALMEIDA, R. F. M. et al. New diphenylphosphane derivatives of ketoconazole are promising antifungal agents. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–14, 2019.
- ALVES, C. Q. et al. Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos. **Química Nova**, v. 33, p. 2202-2210, 2010.
- AMORIM, L. D. M. et al. Fabaceae na Floresta Nacional (FLONA) de Assú, semiárido potiguar, nordeste do Brasil. **Rodriguesia**, v. 67, n. 1, p. 105–123, 2016.
- ANDRADE, J. T. et al. Design, synthesis, biological activity and structure-activity relationship studies of chalcone derivatives as potential anti-Candida agents. **Journal of Antibiotics**, v. 71, n. 8, p. 702–712, 2018.
- ANDRADE, M. C. N. et al. Uso de resíduos madeireiros da Amazônia brasileira no cultivo in vitro de *Lentinus strigosus* / Use of wood waste from the Brazilian Amazon in the in vitro cultivation of *Lentinus strigosus*. **Revista Ambiente**, v. 9, n. 1, p. 189–196, 2013.
- ANVISA. Diretriz Nacional para Elaboração de Programa de Gerenciamento do Uso de Antimicrobianos em Serviços de Saúde. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**, p. 90, 2017.
- ARAPITSAS, P. Identification and quantification of polyphenolic compounds from okra seeds and skins. **Food chem** 110: 1041 – 1045, 2008.
- ARAÚJO, L. S.; LEMOS, J. R. Fabaceae do Norte do Piauí: Distribuição geográfica e potencial econômico de suas espécies. In: ANTENA (Ed.). **Os Percursos da Botânica e suas Descobertas**. 1. ed. Belo Horizonte: [s.n.]. p. 58–76, 2020.

- ARIF, T. et al. Natural products - Antifungal agents derived from plants. **Journal of Asian Natural Products Research**, v. 11, n. 7, p. 621–638, 2009.
- ARON, A. T. et al. Reproducible molecular networking of untargeted mass spectrometry data using GNPS. **Nature Protocols**, v. 15, n. 6, p. 1954–1991, 2020.
- ARTEM'EVA, O. A.; PERESELKOVA, D. A.; FOMICHEV, Y. P. Dihydroquercetin, the bioactive substance, to be used against pathogenic microorganisms as an alternative to antibiotics. **Agricultural biology**, v. 50, n. 4, p. 513–519, 2015.
- BAHIA, M. V et al. Occurrence of biflavones in leaves of *Caesalpinia pyramidalis* specimens. **Química nova**, v. 33, n. 6, p. 1297–1300, 2010.
- BAUER, A.; KIRBY, W. M.; SHERRIS, J.C.; TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 45, n. 4, p. 493, 1966.
- BARRECA, D. et al. Citrus flavones: An update on sources, biological functions, and health promoting properties. **Plants**, v. 9, n. 3, p. 1–23, 2020.
- BAYDAR, N. G.; GÜLCAN, Ö.; YAŞAR, S. Evaluation of the antiradical and antioxidant potential of grape extracts. **Food Control**, v. 18, n. 9, p. 1131–1136, 2007.
- BENABDERRAHMANE, W. et al. Polyphenolic content and bioactivities of *Crataegus oxyacantha* L. (Rosaceae). **Natural Product Research**, v. 35, n. 4, p. 627–632, 2021.
- 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.
- BFG. Growing knowledge: An overview of Seed Plant diversity in Brazil. **Rodriguesia**, v. 66, n. 4, p. 1085–1113, 2015.
- BFG. Brazilian flora 2020: Innovation and collaboration to meet target 1 of the global strategy for plant conservation (GSPC). **Rodriguesia**, v. 69, n. 4, p. 1513–1527, 2018.
- BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de nutrição**, v. 12, p. 123-130, 1999.
- BITTENCOURT, D. M. C.; RIOS, S. A. Biotechnology and the sustainable use of Amazon biodiversity. **Amazon: Biodiversity conservation, economic development and human impact**, New York: Nova Science Publishers, New York, USA, p. 155-172, 2013.
- BOAVENTURA JR.; S. **Síntese de derivados da artemisinina e estudos da atividade *is vitro* contra *Schistosoma mansoni***. 2007, 117 f. Dissertação (Mestrado) – Curso mestrado em Biociências e Tecnologia de produtos bioativos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas. 2015.
- BOHM, B. Extraction, Purification and Identification of Flavonoids. Introduction to Flavonoids. Amsterdam: Harwood Academic Publishers, 1998, 200-204 p.

BONIFACE, P. K.; FERREIRA, S. B.; KAISER, C. R. 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, E. M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H. Possibilidades e Limitações No uso da temperatura em cromatografia líquida de fase reversa. **Química Nova**, v. 33, n. 4, p. 945–953, 2010.

BOROSKI, M. *et al.* **Antioxidantes- princípios e métodos analíticos**. Curitiba: Appris, 2015.

BRAGHIROLI, F. L.; PASSARINI, L. Valorization of Biomass Residues from Forest Operations and Wood Manufacturing Presents a Wide Range of Sustainable and Innovative Possibilities. **Current Forestry Reports**, v. 6, n. 2, p. 172–183, 2020.

BRASIL, Ministério do Meio Ambiente. Instrução Normativa MMA nº 5, de dezembro de 2006, **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Judiciário, Brasília, DF, n. 1, p. 155.

BRITO, J. P. **Ação de cupins de madeira seca (*Cryptotermes brevis*) e de solo (*Nasutitermes corniger*) nas madeiras termorretrificadas de *Pinus taeda* e de *Corymbia citriodora***. [s.l.] Universidade de São Paulo, 2015.

CALDEIRA, M. V. W. *et al.* Serapilheira e nutrientes acumulados sobre o solo em plantios de leguminosas e em área restaurada com espécies nativas da Floresta Atlântica. **Advances in Forestry Science**, v. 7, n. 2, p. 961–971, 2020.

CANTÓN, R. Interpretive reading of the antibiogram: A clinical necessity. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 28, n. 6, p. 375–385, 2010.

CARNEIRO, E. *et al.* Isolation, chemical identification and pharmacological evaluation of eucryphin, astilbin and engelitin obtained from the bark of *Hymenaea martiana*. **Pharmaceutical Biology**, v. 31, n. 1, p. 38–46, 1993.

CARTAXO, S. L.; ALMEIDA SOUZA, M. M.; ALBUQUERQUE, U. P. Medicinal plants with bioprospecting potential used in semi-arid northeastern Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 131, n. 2, p. 326–342, 2010.

CARVALHO FILHO, J. L. S. *et al.* Produção de mudas de jatobá (*Hymenaea courbaril* L.) em diferentes ambientes, recipientes e composições de substratos seedling production of *Hymenaea courbaril* L. in different environments, recipients and substrate compositions. **Cerne**, v. 9, n. 1, p. 109–118, 2003.

CARVALHO, M. G. *et al.* Triterpenos e flavonóides isolados de flores de *Laseguea erecta* (Apocynaceae). **Rev. colomb. ciencias quim. farm**, v. 36, n. 2, p. 127–133, 2007.

CAVALCANTI, R. C. Espectrometria de massa acoplada à cromatografia líquida e gasosa : sua aplicação nas ciências forenses. **Acta de Ciências e Saúde**, v. 01, n. 2007, p. 57–61,

2016.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Normas de desempenho para testes de sensibilidade antimicrobiana**: 15 suplemento informativo. Tradução: Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 15. ed. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, [2005]. 177 p. (CLSI document M100-S15). Substitui a Norma M100-S14; Apresenta tabelas atualizadas para as normas M2-A8 e M7-A6.

CECHINEL-FILHO, V. et al. Antinociceptive and anti-oedematogenic properties of astilbin, taxifolin and some related compounds. **Arzneimittel-Forschung/Drug Research**, v. 50, n. 3, p. 281–285, 2000.

CHEN, G. et al. Analysis of flavonoids in *Rhamnus davurica* and its antiproliferative activities. **Molecules**, v. 21, n. 10, p. 1275, 2016.

CHIARADIA, M. C.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. The state of the art of chromatography associated with the tandem mass spectrometry for toxic compound analyses in food. **Química Nova**, v. 31, n. 3, p. 623–636, 2008.

CHITECULO, V. et al. Management of Brazilian hardwood species (Jatoba and garapa) wood waste biomass utilization for energy production purposes. **Agronomy Research**, v. 16, n. 2, p. 365–376, 2018.

CIPRIANO, J. et al. O gênero *Hymenaea* e suas espécies mais importantes do ponto de vista econômico e medicinal para o Brasil. **Caderno de pesquisa, série biologia**, v. 26, n. 89, p. 41–51, 2014.

CORONELL-RODRÍGUEZ, W.; ARTETA-ACOSTA, C.; DUEÑAS-CASTELL, C. Interpretive reading of the antibiogram: A tool for clinical practice. **Sepsis**, v. 3, p. 95–115, 2018.

CORRÊA, J. J. L. **Copal do Brasil: Ocorrência e caracterização físico-química da resina Jataica de Santarém**. 2015. 95 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-graduação em Recursos Naturais da Amazônia, Universidade Federal do Oeste do Pará, Santarém, 2015.

CORREA, M. N.; AGUIRRE, O. E. R.; PALACIOS, J. D. C. A. Antimicrobial Activity of *Hymenaea Courbaril* L. Fruit. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, v. 13, n. 6, p. 200–203, 2020.

CORRÊA, M. P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. 1. ed. Rio de Janeiro: IBDF, 1984.

COSTA, C. B. et al. Analysis of viability of seed and flour production of jatobá (*Hymenaea* spp) in the southern region of goiás state. **Ciencia Florestal**, v. 26, n. 3, p. 1023–1035, 2016.

COSTA, D. L. et al. Multipropósito de *Hymenaea courbaril* L. em uma área de manejo florestal comunitário na Amazônia. **Advances in Forestry Science**, v. 6, n. 2, p. 691–697, 2019.

COSTA, J. A. et al. Fotodegradação de duas espécies de madeiras tropicais: Jatobá

(*Hymenaea courbaril*) e tauari (*Couratari oblongifolia*) submetidas à radiação ultravioleta. **Cerne**, v. 17, n. 1, p. 133–139, 2011.

COSTA, M. P. **Atividade biológica de compostos e seiva da planta *Hymenaea courbaril* sobre leveduras e fungos filamentosos**. 2012. 56 f. Dissertação (mestrado) - Programa de pós-graduação em medicina tropical e saúde pública, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2012.

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, p. 1–7, 2014.

COWAN, M. M. Plant products as antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, n. 4, p. 564–582, 1999.

CUSHNIE, T. P. T.; LAMB, A. J. Assessment of the antibacterial activity of galangin against 4-quinolone resistant strains of *Staphylococcus aureus*. **Phytomedicine**, v. 13, n. 3, p. 187–191, 2006.

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

CUYCKENS, F.; CLAEYS, M. Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 39, n. 1, p. 1–15, 2004.

CZAPLICKI, S. Chromatography in bioactivity analysis of compounds. **Column chromatography**, p. 99–122, 2013

DAJAS, F. Life or death: Neuroprotective and anticancer effects of quercetin. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 143, n. 2, p. 383–396, 2012.

DAYRIT, F. M.; DIOS, A. C. ¹H and ¹³C NMR for the Profiling of Natural Product Extracts: Theory and Applications. In: **Spectroscopic Analyses - Developments and Applications**. 1. ed. London: InTech, v. 1p. 1–24, 2017.

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

DIAS, M. T. et al. Avaliação da sensibilidade de cepas de *Escherichia coli* isoladas de mexilhões (*Perna perna linnaeus*, 1758) à antimicrobianos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, n. 2, p. 319–324, 2010.

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, p. 8, 2013.

DJOUOSSI, M. G. et al. Antimicrobial and antioxidant flavonoids from the leaves of *Oncoba spinosa* Forssk. (Salicaceae). **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 15, n. 1,

p. 4–11, 2015.

DUQUE, J. G. **O Nordeste e as lavouras xerófilas**. 4. ed. Fortaleza: [s.n.]. v. 4
EL-ANEED, A.; COHEN, A.; JOSEPH, B. Erratum: Mass spectrometry, review of the basics: Electropray, MALDI and commonly used mass analyzers. **Applied Spectroscopy Reviews**, v. 44, n. 4, p. 362, 2009.

Fabaceae in **Flora do Brasil 2020**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB115>>. Acesso em: 05 ago. 2021

FABRE, N. et al. Determination of flavone, flavonol, and flavanone aglycones by negative ion liquid chromatography electrospray ion trap mass spectrometry. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 12, n. 6, p. 707–715, 2001.

FALCONE FERREYRA, M. L.; RIUS, S. P.; CASATI, P. Flavonoids: Biosynthesis, biological functions, and biotechnological applications. **Frontiers in Plant Science**, v. 3, n. 222, p. 1–16, 2012.

FARIA, D. L. A. et al. Raman spectroscopic analysis of a tembetá: A resin archaeological artefact in need of conservation. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 60, n. 7, p. 1505–1513, 2004.

FARIAS, K. S. et al. Adulteration and contamination of commercial sap of *Hymenaea* species. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2017, p. 13, 2017.

FERNANDES, H. P. **Estudo fitoquímico e atividade biológica em sementes e cascas do caule de *Hymenaea courbaril* L. var *courbaril***. 2014. 117 f. Dissertação (mestrado) - Programa de Pós- Graduação em Química, Universidade Federal de Mato Grosso, Goiânia, 2014.

FERNANDES, H. P. et al. New glycosylated biscoumarins from *Hymenaea courbaril* L. seeds. **Phytochemistry Letters**, v. 13, n. 1, p. 413–416, 2015.

FERNANDES, T. T.; SANTOS, A. T. F. S.; PIMENTA, F. C. Atividade antimicrobiana das plantas *Plathymenia reticulata*, *Hymenaea courbaril* e *Guazuma ulmifolia*. **Revista de Patologia Tropical**, v. 34, n. 2, p. 113–122, 2005.

FIGUEIREDO, P. A. et al. Antioxidant activity and chemical characterization of extracts from the Genus *Hymenaea*. **Research Journal of Medicinal Plant**, v. 10, n. 5, p. 330–339, 2016.

FLORES, A. S.; RODRIGUES, R. S. Diversidade de Leguminosae em uma área de savana do estado de Roraima, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 24, n. 1, p. 175–183, 2010.

FORBES, B. A.; SAHM, D.F.; WEISSFELD, A. S. Diagnostic microbiology. 12th ed. St. Louis, MO: Mosby Elsevier; 2007.

FRIEDRICH, A. et al. Antibiotic stewardship: Structure and implementation. **Medizinische Klinik - Intensivmedizin und Notfallmedizin**, v. 116, n. 1, p. 81–92, 2021.

- FULLERTON, M. et al. Determination of antimicrobial activity of sorrel (*Hibiscus sabdariffa*) on *Escherichia coli* O157: H7 isolated from food, veterinary, and clinical samples. **Journal of medicinal food**, v. 14, n. 9, p. 950-956, 2011.
- GANESAN, K. et al. Causal relationship between diet-induced gut microbiota changes and diabetes: A novel strategy to transplant *Faecalibacterium prausnitzii* in preventing diabetes. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 12, p. 1–28, 2018.
- GANESAN, K. et al. Targeting programmed fusobacterium nucleatum fap2 for colorectal cancer therapy. **Cancers**, v. 11, n. 10, p. 13–15, 2019.
- GARCIA, C. S.; UEDA, S. M. Y.; MIMICA, L. M. J. de plantas sobre *Staphylococcus aureus* MRSA e MSSA Evaluation of in vitro antibacterial activity of hydro-ethanol from vegetable extracts against MRSA and MSSA *Staphylococcus aureus*. **Rev Inst Adolfo Lutz**, v. 70, n. 4, p. 589–598, 2011.
- GARCIA, E. J. et al. Antioxidant activity by DPPH assay of potential solutions to be applied on bleached teeth. **Brazilian dental journal**, v. 23, p. 22-27, 2012.
- GAZZANEO, L. R. S.; LUCENA, R. F. P. DE; ALBUQUERQUE, U. P. Knowledge and use of medicinal plants by local specialists in an region of Atlantic Forest in the state of Pernambuco (Northeastern Brazil). **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, v. 9, n. 1, p. 1–8, 2005.
- GHANJAOU, M. E. A. et al. High performance liquid chromatography quality control. **International Journal of Advanced Chemistry**, v. 8, n. 1, p. 1–11, 2020.
- GIAM, X. et al. Future habitat loss and the conservation of plant biodiversity. **Biological Conservation**, v. 143, n. 7, p. 1594–1602, 2010.
- GIBELLINI, L. et al. Quercetin and cancer chemoprevention. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2011, p. 15, 2011.
- GOMES, C. H. M. et al. Determinação in vitro da Atividade Antibacteriana dos Extratos Brutos da Casca e Polpa Farinácea de *Hymenaea courbaril* L. **Investigação**, v. 2, n. 3, p. 1–7, 2010.
- GONÇALVES, A. L.; ALVES FILHO, A.; MENEZES, H. Estudo comparativo da atividade antimicrobiana de extratos de algumas árvores nativas. **Arq. Inst. Biol.**, v. 72, n. 3, p. 353–358, 2005.
- GONZÁLEZ, M. A. Aromatic abietane diterpenoids: Their biological activity and synthesis. **Natural Product Reports**, v. 32, n. 5, p. 684–704, 2015.
- GYAWALI, R.; IBRAHIM, S. A. Natural products as antimicrobial agents. **Food Control**, v. 46, p. 412–429, 2014.
- HALBWIRTH, H. The creation and physiological relevance of divergent hydroxylation patterns in the flavonoid pathway. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 11, n. 2, p. 595–621, 2010.

HAQUE, M. W. et al. Cloning, identification, and in silico analysis of terpene synthases involved in the competing pathway of artemisinin biosynthesis pathway in *Artemisia annua* L. **Pharmacognosy Magazine**, v. 15, n. 62, p. 38–46, 2019.

HASSAN, S. et al. RESEARCH ARTICLE Quercetin potentializes the respective cytotoxic activity of gemcitabine or doxorubicin on 3D culture of AsPC-1 or HepG2 cells, through the inhibition of HIF-1 α and MDR1. **PLoS ONE**, v. 15, p. 1–12, 2020.

HAWKEY, P. M. The origins and molecular basis of antibiotic resistance. **British Medical Journal**, v. 317, n. 7159, p. 657–660, 1998.

HEIM, K. E.; TAGLIAFERRO, A. R.; BOBILYA, D. J. Flavonoid antioxidants: Chemistry, metabolism and structure-activity relationships. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 13, n. 10, p. 572–584, 2002.

HILLIG, E.; SCHNEIDER, V. E.; PAVONI, E. T. Generation of wood waste and derivatives on furniture industry related to production's variables. **Producao**, v. 19, n. 2, p. 292–303, 2009.

HIRSH, D. C.; ZEE, Y. C. Veterinary Microbiology. Blackwell Science, Malden, p. 69-74, 1999.

HOLMES, A. H. et al. Understanding the mechanisms and drivers of antimicrobial resistance. **The Lancet**, v. 387, p. 176–187, 2016.

HORAI, H. et al. MassBank: a public repository for sharing mass spectral data for life sciences. **Journal of mass spectrometry**, v. 45, n. 7, p. 703-714, 2010.

IGOLI, J. NMR structure elucidation of natural products and synthesized compounds in Nigeria. **Tropical Journal of Natural Product Research**, v. 1, n. 4, p. 135–136, 2017.

INSTITUTO DE PESQUISAS TECNOLÓGICAS- IPT. Informações sobre madeiras: Jatobá, São Paulo, 2018. Disponível em <http://www.ipt.br/informacoes_madeiras/14.htm> Acesso em: 22 de março de 2018.

ISHIBASHI, M. et al. Casein kinase II inhibitors isolated from two Brazilian plants *Hymenaea parvifolia* and *Wulffia baccata*. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 9, n. 15, p. 2157–2160, 1999.

JAISINGHANI, R. N. Antibacterial properties of quercetin. **Microbiology Research**, v. 8, n. 1, p. 13–14, 2017.

JEONG, K. et al. Screening of flavonoids as candidate antibiotics against *Enterococcus faecalis*. **Journal of natural products**, v. 72, n. 4, p. 719–724, 2009.

JÚNIOR SOUZA, I. T.; SALES, N. L. P.; MARTINS, E. R. *gloeosporioides*, isolado do maracujazeiro amarelo material e métodos isolamento do patógeno. **Revista Biotemas**, 22, v. 22, n. 3, p. 77–83, 2009.

KÄHKÖNEN M. P.; HOPIA A.I.; VUORELA H. J.; RAUHA J.P.; PIHLAJA K.; KUJALA, T. S.; HEINONEN, M. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. **Journal Agric Food Chem**, Washington, v. 47, n. 10, p.3954-3962, 1999.

KASPER, A. A. M. et al. Aproveitamento dos resíduos de priprioica (*Cyperus articulatus* L.) no controle alternativo de fungos fitopatogênicos. **Revista Ibero-Americana de Ciências Ambientais**, v. 11, n. 1, p. 80–88, 6 jan. 2020.

KATAVIC, P. L. et al. Flavonoids as opioid receptor ligands: identification and Preliminary Structure–Activity Relationships. **Journal of natural products**, v. 70, n. 8, p. 1–11, 2007.

KHURM, M. et al. The genus *Cassia* L.: Ethnopharmacological and phytochemical overview. **Phytotherapy Research**, v. 1, p. 1–50, 2020.

KLITZKE, R. J. et al. Caracterização dos lenhos de cerne , alburno e transição de jatobá (*Hymenaea* sp .) visando ao agrupamento para fins de secagem convencional characterization of heartwood , sapwood and transition wood of jatoba wood (*Hymenaea* sp.) aiming at its grouping. **Scientia Forestalis**, v. 36, n. 80, p. 279–284, 2008.

KONGPICHITCHOKE, T.; HSU, J. L.; HUANG, T. V. Number of hydroxyl groups on the b-ring of flavonoids affects their antioxidant activity and interaction with phorbol ester binding site of PKC δ C1B domain: in vitro and in silico studies. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 63, n. 18, p. 4580–4586, 2015.

KUETE, V. Potential of Cameroonian plants and derived products against microbial infections: A review. **Planta Medica**, v. 76, n. 14, p. 1479–1491, 2010.

KUKONGVIRIYAPAN, U. et al. Preventive and therapeutic effects of quercetin on lipopolysaccharide-induced oxidative stress and vascular dysfunction in mice. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 90, n. 10, p. 1345–1353, 2012.

KUMAR, S.; PANDEY, A. K. Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. **The Scientific World Journal**, v. 2013, p. 16, 2013.

KUMBOONMA, P. et al. New histone deacetylase inhibitors from the twigs of *Melanorrhoea usitata*. **Medicinal Chemistry Research**, v. 27, n. 8, p. 2004–2015, 2018.

LAMAISON, J. L. C.; CARNET, A. Teneurs en principaux flavonoids des fleurs de *Crataegus monogyna* Jacq et de *Crataegus laevigata* (Poiret D. C) en fonction de la vegetation. **Pharm Acta Helvetiae**, n 65, p. 315-320, 1990.

LANÇAS, F. M. Cromatografia líquida e a espectrometria de massas: finalmente “compatíveis”? **Scientia Chromatographica**, v. 1, n. 2, p. 1–27, 2009.

LANÇAS, F. M. Efeitos de Temperatura em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC). **Scientia Chromatographica**, v. 4, n. 1, p. 7–13, 2012.

LEE, Y.-T.; LANGENHEIM, J. H. **Systematics of the genus *Hymenaea* L. (Leguminosae, Caesalpinioideae, Detarieae)**. Califórnia: UC Press ed. Califórnia. v. 1, 1975.

LEUZINGER, M. D. et al. **Governance for megadiversity: Brazil/Australia**. Brasília: UniCEUB. v. 1, 2019, 261 p.

LESJAK, M. et al. Antioxidant and anti-inflammatory activities of quercetin and its derivatives. **Journal of Functional Foods**, v. 40, n. 2018, p. 68–75, 2018.

LI, K. K. et al. Dihydrofisetin exerts its anti-inflammatory effects associated with suppressing ERK/p38 MAPK and Heme oxygenase-1 activation in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages and carrageenan-induced mice paw edema. **International Immunopharmacology**, v. 54, p. 366–374, 2018.

LIANG, Y. et al. A comprehensive screening and identification of genistin metabolites in rats based on multiple metabolite templates combined with UHPLC-HRMS analysis. **Molecules**, v. 23, n. 8, p. 1862, 2018.

LIMA, N. M.; SANTOS, V. N. C.; LA PORTA, F. A. Chemodiversity, bioactivity and chemosystematics of the genus *Inga* (FABACEAE): A brief review. **Revista Virtual de Química**, v. 10, n. 3, p. 459–473, 2018.

LIU, J. et al. Synthesis, characterization and in vitro anti-diabetic activity of catechin grafted inulin. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 64, p. 76–83, 2014.

LIU, T. et al. Composition analysis and antioxidant activities of the *Rhus typhina* L. stem. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 9, n. 5, p. 332–338, 2019.

LORENZI, H. **Árvores Brasileiras. Manual de Identificação e Cultivo de Plantas Arbóreas Nativas do Brasil**. 5. ed. Nova Odessa: Plantarum, 2008. v. 1

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas Medicinais no Brasil: Nativas e Exóticas**. 2. ed. Nova Odessa: Plantarum, 2002.

LOUREIRO, R. J. et al. Use of antibiotics and bacterial resistances: Brief notes on its evolution. **Revista Portuguesa de Saúde Pública**, v. 34, n. 1, p. 77–84, 2016.

LPWG. Legume phylogeny and classification in the 21st century: Progress, prospects and lessons for other species-rich clades. **Taxon**, v. 62, n. 2, p. 217–248, 2018.

LUZ, M. S. **Padrões espaciais de diversidade de leguminosas (Fabaceae) e seus determinantes climáticos**. 2016. 119 f. Dissertação (mestrado) - Pós-Graduação em Engenharia Floresta, Universidade Federal de Lavras, 2016.

LYU, Q. et al. Comprehensive structural characterization of phenolics in litchi pulp using tandem mass spectral molecular networking. **Food Chemistry**, v. 282, p. 9–17, 2019.

MACIEL, M. A. M. . et al. Estudo fitoquímico de folhas de *Croton cajucara* Benth e determinação da sua propriedade antioxidante/Phytochemical investigation of the leaves of *Croton cajucara* Benth and its antioxidative. **Revista Fitos**, v. 4, p. 71–89, 2009.

MARANHÃO, C. A. et al. Antitermitic and antioxidant activities of heartwood extracts and main flavonoids of *Hymenaea stigonocarpa* Mart. **International Biodeterioration and**

Biodegradation, v. 79, n. 1, p. 9–13, 2013.

MARANHÃO, C. DE A. **Estudo químico , antimicrobiano , larvicida e Hymenaea stigonocarpa Mart . ex Hayne**. 2009. 111 f. Tese (doutorado) - Programa de pós graduação em química, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2009.

MARCHETTI, M. M.; SANTOS, J. C. P.; BARATTO, C. M. Caracterização de bactérias em nódulos de leguminosas arbóreas de fragmentos da floresta ombrófila mista. **Scientia Agraria**, v. 18, n. 4, p. 50, 2017.

MARINHO, J. V. N. **Estudo comparativo do emprego de reator encamisado, ultrassom e maceração no preparo de extratos padronizados de três espécies de Alternanthera (amaranthaceae) e desenvolvimento de procedimentos analíticos**. 2016. 147 f. Dissertação (mestrado) –Programa de Pós-graduação em Biociências e Tecnologia de Produtos Bioativos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2016.

MARÓSTICA, M. R. **Biotransformação de terpenos para a produção de compostos de aroma e funcionais**. 2006. 195 f. Tese (doutorado) – Programa de pós graduação em Ciência de alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

MARTINS, L. R. R. et al. Atribuição dos deslocamentos químicos dos átomos de ¹H e ¹³C do acetato de acantoaustralida. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 4, p. 490–496, 2006.

MERCÊS, P. F. F. **Variação da composição química e da atividade antifitopatogênica dos óleos essenciais das folhas e frutos de Hymenaea courbaril L. var. courbaril (Fabaceae) coletadas em área de extrema importância biológica para a conservação**. 2015. 103 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2015.

MARTUCCI, M. E. P. et al. Metabolomics as a potential chemotaxonomical tool: Application in the genus *Vernonia* Schreb. **PLoS ONE**, v. 9, n. 4, 2014.

MENIN, M. **Amazônia : diversidade biológica e história geológica**. 1ª ed. Manaus: UFAM, 2005.

MIRANDA, A. R.; CASTRO, C. F. S.; SILVÉRIO, M. D. O. Avaliação da atividade antioxidante e inibição da tirosinase do extrato das folhas do jatobá (*Hymenaea stigonocarpa* mart. ex hayne). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 16, n. 3, p. 693–699, 2014.

MISHRA, A. K. et al. Inhibitory activity of Indian spice plant *Cinnamomum zeylanicum* extracts against *Alternaria solani* and *Curvularia lunata*, the pathogenic dematiaceous moulds. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 8, p. 1–7, 2009.

MITTERMEIER, R. A.; ROBLES; MITTERMEIER, C. **Megadiversity: Earth's Biologically**. 1. ed. Canadá: CEMEX/Agrupación Sierra Madre, 1997. v. 1

MØLLER, J. K. S; CATHARINO, R. R.; EBERLIN, M. N. Electrospray ionization mass spectrometry fingerprinting of essential oils: Spices from the Labiatae family. **Food Chemistry**, v. 100, n. 3, p. 1283-1288, 2007.

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.

MORS, W. B., MAGALHAES, T., GOTTLIEB, O. R., FORTSCHR. **Chem. Org. Naturst.**, v. 20, p.132, 1962.

MORS, W. B. et al. **Medicinal plants of Brazil**. Rio de Janeiro: Reference Publications, 2000.

MOTA, F. M. Atividade antibacteriana in vitro de inflorescências de *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC.-Asteraceae - (“macela”, “marcela”) como fator de proteção em zoonoses. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 36, n. 3, p. 337–338, 30 mar. 2008.

MOULARI, B. et al. Isolation and in vitro antibacterial activity of astilbin, the bioactive flavanone from the leaves of *Harungana madagascariensis* Lam. ex Poir. (Hypericaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 106, n. 2, p. 272–278, 2006.

NAM, L.; WEI, W.; HUA, Z. J.; XIA, G. aplicação da cromatografia líquida de média pressão na separação e purificação de produtos naturais. **Journal of Food Safety and Quality**, v.7, n. 11. p. 1-4, 2016.

NI, Y. et al. ADAP-GC 3.0: Improved Peak Detection and Deconvolution of Co-eluting Metabolites from GC/TOF-MS Data for Metabolomics Studies. **Analytical chemistry**, v. 88, n. 17, p. 1–10, 2016.

NOGUEIRA, R. T. et al. A new ent-clerodane diterpene from *Hymenaea courbaril* var. *altissima*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 13, n. 3, p. 389–391, 2002.

NOTHIAS, L.-F. et al. Feature-based molecular networking in the GNPS analysis environment. **Nature Methods**, v. 17, n. 9, p. 905–908, 2020.

OLIVEIRA, F. et al. Influence of the extractive method on the recovery of phenolic compounds in different parts of *Hymenaea martiana* hayne. **Pharmacognosy Research**, v. 8, n. 4, p. 270–275, 2016.

OLIVEIRA, F. C. D. E. *Lippia rigida* Schauer (VERBENACEAE) *Lippia rigida* Schauer (VERBENACEAE). 2012. 205 f. Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-graduação em química, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2012.

OLIVEIRA, G. G. et al. Dereplication of flavonoid glycoconjugates from *adenocalymma imperatoris-maximiliani* by untargeted tandem mass spectrometry-based molecular networking. **Planta Medica**, v. 83, n. 7, p. 636–646, 2017.

OMEJE, E. O. et al. In-vitro anti-inflammatory activities of 3-methoxy quercetin isolated from nigerian mistletoe parasitic on *garcinia kola* heckel, clusiaceae. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 16, n. 5, p. 1059–1067, 2017.

ORDOÑEZ, E. Y. et al. Determination of artificial sweeteners in beverages with green mobile phases and high temperature liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Food**

Chemistry, v. 169, p. 162–168, 2015.

PACHECO, A. G. M. et al. Identification of flavonoids in *Hymenaea martiana* Hayne (Fabaceae) by HPLC-DAD-MSn analysis. **Natural Product Research**, v. 2019, p. 1–6, 2019.

PAN, A. et al. Effects of a flaxseed-derived lignan supplement on C-reactive protein, IL-6 and retinol-binding protein 4 in type 2 diabetic patients. **British Journal of Nutrition**, v. 101, n. 8, p. 1145–1149, 2009.

PANG, B. et al. The applications and features of liquid chromatography-mass spectrometry in the analysis of traditional Chinese medicine. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2016, p. 7, 2016.

PETTIT, G. R. et al. Isolation and structure of palstatin from the amazon tree *Hymenaea palustris*. **Journal of Natural Products**, v. 66, n. 2, p. 259–262, 2003.

PILON, A. C. et al. Correction: mass spectral similarity networking and gas-phase fragmentation reactions in the structural analysis of flavonoid glycoconjugates. **Analytical Chemistry**, v. 91, n. 22, p. 14780–14781, 2019.

PILON, A. C. et al. Redes moleculares: uma análise sobre anotações e descoberta de novos ativos. **Química nova**, v. XY, n. 00, p. 1–12, 2021.

PIO CORRÊA, M. Dicionário das Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas. 5º ed. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, 1974.

PITT, J. J. Principles and applications of liquid chromatography - mass spectrometry in clinical biochemistry. **Clin Biochem Rev.**, v. 30, p. 19–34, 2009.

PLUSKAL, T. et al. MZmine 2: Modular framework for processing, visualizing, and analyzing mass spectrometry-based molecular profile data. **BMC Bioinformatics**, v. 11, n. 1, p. 1–11, 2010.

QU, Z. et al. Advances in physiological functions and mechanisms of (-)-epicatechin. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 61, n. 2, p. 211–233, 2021.

RAMOS, R. R. **Desenvolvimento de uma metodologia de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) para análise SARA de petróleo**. 2014. 87 f. Dissertação (Mestrado) – Escola Politécnica, Universidade de São Paulo. São Paulo, 2014.

RAMOS, W. F. et al. Análise da indústria madeireira na Amazônia: gestão, uso e armazenamento de resíduos. **Revista Brasileira de Ciências Ambientais (Online)**, n. 43, p. 1–16, 2017.

RAVISANKAR, P. et al. Fundamental Chromatographic Parameters. **International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research**, v. 55, n. 2, p. 46–50, 2019.

RIBEIRO, C. M. R.; SOUZA, N. Â. Esquema geral para elucidação de substâncias orgânicas usando métodos espectroscópico e espectrométrico. **Química Nova**, v. 30, n. 4, p. 1026–1031, 2007.

RIBEIRO, R. B. DA S. et al. Métodos para estimar o volume de fustes e galhos na floresta nacional do Tapajós. **Revista Arvore**, v. 40, n. 1, p. 81–88, 2016.

RINALDI, P. L. Three-dimensional solution NMR spectroscopy of complex structures and mixtures. **Analyst**, v. 129, n. 8, p. 687–699, 2004.

RIZZINI, C. T. **Arvores e madeiras úteis do Brasil: manual de dendrologia brasileira**. 2. ed. São Paulo: Blucher, 1971.

RIZZINI; MORS, Botânica Econômica Brasileira. 2ª Ed.. Rio de Janeiro: Ambito Cultural Ltda, 1995.

ROSS, J. A.; KASUM, C. M. Dietary flavonoids: Bioavailability, metabolic effects, and safety. **Annual Review of Nutrition**, v. 22, p. 19–34, 2002.

ROUX, A. et al. Applications of liquid chromatography coupled to mass spectrometry-based metabolomics in clinical chemistry and toxicology: A review. **Clinical Biochemistry**, v. 44, n. 1, p. 119–135, 2011.

ROY, S.; DHAR, D. Isolation, characterization and antibiotic sensitivity pattern of different bacteria in pus sample. **Journal of Pure and Applied Microbiology**, v. 11, n. 2, p. 885–889, 2017.

RUBIÓ, L.; MOTILVA, M. J.; ROMERO, M. P. Recent advances in biologically active compounds in herbs and spices: a review of the most effective antioxidant and anti-inflammatory active principles. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 53, n. 9, p. 943–953, 2013.

RUFINO, M. D. S. M. et al. **Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pelo método de redução do ferro (FRAP)**. Comunicado técnico Embrapa Agroindústria Tropical (INFOTECA-E), Fortaleza: EMBRAPA, nº 125, 2006, p. 1-4.

RUFINO, M.S.M. et al., **Determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH**. Comunicado Técnico Embrapa, Fortaleza: EMBRAPA, nº. 127, 2007, p.1-4.

RUMA, K.; SUNIL, K.; PRAKASH, H. S. Antioxidant, anti-inflammatory, antimicrobial and cytotoxic properties of fungal endophytes from *Garcinia* species. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 5, n. 3, p. 889–897, 2013.

SAAL, U.; WEIMAR, H.; MANTAU, U. Wood processing residues. In: **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**. Heidelberg: Springer Science and Business Media Deutschland GmbH, 2017. v. 166p. 27–41.

SAID, R. BEN et al. Tentative characterization of polyphenolic compounds in the male flowers of *Phoenix dactylifera* by liquid chromatography coupled with mass spectrometry and DFT. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 3, p. 1–18, 2017.

- SAKA, İ.; GENÇTEN, A.; GÜMÜŞ, S. A Product Operator Theory of DEPTQ NMR Spectroscopy for IS_n (I= 1/2; S= 1; n= 0, 1, 2, 3) Spin Systems. **Acta Physica Polonica A**, v. 120, n. 3, p. 541-544, 2011.
- SALAS, M. P. et al. Antifungal activity of natural and enzymatically-modified flavonoids isolated from citrus species. **Food Chemistry**, v. 124, n. 4, p. 1411–1415, 2011.
- SALAZAR-ARANDA, R. et al. Activity of polyphenolic compounds against candida glabrata. **Molecules**, v. 20, n. 10, p. 17903–17912, 2015.
- SALVADOR, M.J. **Estudo químico, biológico e biotecnológico de Alternanthera maritima e Alternanthera tenella (Gomphreneae, Amaranthaceae)**. 2005, 410 f. Tese (Doutorado) – Programa de pós graduação em química, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2005.
- SAMANTA, A.; DAS, S. K. Roles of flavonoids in plants. **Carbon**, v. 100, n. 1, p. 6, 2011.
- SANTANA, D. A. **Análise de compostos fenólicos e atividade antioxidante em cachaças baianas**. 2014. 162 f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em química, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2014.
- SANTANA, T. C. **Uso do extrato de folhas do jatobá (Hymenaea martiana Hayne) na redução das contagens de Salmonella spp., Escherichia coli e Staphylococcus aureus em leite cru**. 52 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de pós-graduação em agricultura e biodiversidade, Universidade Federal de Sergipe, Sergipe, 2015.
- SANTOS, V. N. C. **Estudo fitoquímico e bioatividade de extratos de Andira retusa (Poir.) Kunth**. 171 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de pós-graduação multi-institucional em biotecnologia, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2012.
- SARAÇ, N.; ŞEN, B. Antioxidant, mutagenic, antimutagenic activities, and phenolic compounds of *Liquidambar orientalis* Mill. var. orientalis. **Industrial Crops and Products**, v. 53, p. 60–64, 2014.
- SEELINGER, G.; MERFORT, I.; SCHEMPP, C. M. Anti-oxidant, anti-inflammatory and anti-allergic activities of luteolin. **Planta Medica**, v. 74, n. 14, p. 1667–1677, 2008.
- SENGUPTA, P. et al. Lab-on-a-chip sensing devices for biomedical applications. **Bioelectronics and Medical Devices: From Materials to Devices - Fabrication, Applications and Reliability**, v. 2019, p. 47–95, 2019.
- SERVIÇO FLORESTAL BRASILEIRO (SFB). BOLETIM SNIF 2020. Brasília, 2020. 1ª ed. Disponível em: < <http://snif.florestal.gov.br/pt-br/>>. Acesso em: 10 de nov 2021.
- SHANLEY, P.; MEDINA, G. **Ilustradores Silvia Cordeiro • Miguel Imbiriba Frutíferas e Plantas Úteis na Vida Frutíferas e Plantas Úteis na Vida Amazônica**. 1ª ed. Belém: CIFOR, 2005.
- SHANNON, P. et al. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. **Genome research**, v. 13, n. 11, p. 2498–2504, 2003.

- SHAO, J. et al. The roles of CDR1, CDR2, and MDR1 in kaempferol-induced suppression with fluconazole-resistant *Candida albicans*. **Pharmaceutical Biology**, v. 54, n. 6, p. 984–992, 2015.
- SILVA, C. R. et al. Synergistic effect of the flavonoid catechin, quercetin, or epigallocatechin gallate with fluconazole induces apoptosis in *Candida tropicalis* resistant to fluconazole. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 3, p. 1468–1478, 2013.
- SILVA, D. M. M. H.; BASTOS, C. N. Antifungal activity of essential oils of *Piper* species against *Crinipellis perniciosus*, *Phytophthora palmivora* and *Phytophthora capsici*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 32, n. 2, p. 143–145, 2007.
- SILVA, C. P. et al. Quantificação de Resíduos Produzidos nas Indústrias Madeireiras de Gurupi, TO. **Floresta e Ambiente**, v. 24, n. 1, p. 1–9, 2017.
- SILVA, C. P. et al. Identification and action of phenolic compounds of Jatobá-do-cerrado (*Hymenaea stignocarpa* Mart.) on α -amylase and α -glucosidase activities and flour effect on glycemic response and nutritional quality of breads. **Food Research International**, v. 116, p. 1076–1083, 2018.
- SILVA, E. S. et al. Análise físico-química do óleo-resina e variabilidade genética de copaíba na Floresta Nacional do Tapajós. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 47, n. 11, p. 1621–1628, 2012.
- SILVA, S. L. et al. Phytochemical analysis and evaluation of the antimicrobial and antioxidant activities of extracts and fractions of *Hymenaea eriogyne* Benth. **Natural Product Research**, v. 0, n. 0, p. 1–5, 2019.
- SILVA, S. L. **Prospecção fitoquímica e avaliação das atividades antimicrobiana e antioxidante de extratos e frações enriquecidas a partir de *Hymenaea eriogyne* Benth.** 2019. 90 f. (Dissertação) – Mestrado - Programa de pós-graduação em inovação terapêutica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2019.
- SKOOG, D. A., et al. **Fundamentals of Analytical Chemistry**. 7 Ed. Harcourt: Fort Worth, 1996.
- SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.de; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. (Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 1.ed. Porto Alegre: UFSC, 1999. 821p.
- SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. J. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, Califórnia, v. 16, n. 16, p. 144-158, 1965.
- SIUZDAK, G. An introduction to mass spectrometry ionization: an excerpt from the expanding role of mass spectrometry in biotechnology; MCC Press: San Diego, 2005. **JALA: Journal of the Association for Laboratory Automation**, v. 9, n. 2, p. 50-63, 2005.

- SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de nutrição**, v. 15, p. 71-81, 2002.
- SOUSA, S. F. et al. Análise fitoquímica e atividade antimicrobiana do extrato etanólico do resíduo madeireiro de *Hymenaea courbaril* L. **Revista Ibero-Americana de Ciências Ambientais**, v. 11, n. 4, p. 72–80, 2020.
- SOUZA, R. F. V.; GIOVANI, W. F. Synthesis, spectral and electrochemical properties of Al(III) and Zn(II) complexes with flavonoids. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 61, n. 9, p. 1985–1990, 2005.
- SOUZA, S. A. et al. Composition and antioxidant activity of geopropolis collected by *Melipona subnitida* (jandaíra) bees. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, p. 1–6, 2013.
- SPERA, K. D. et al. Genotoxicity, anti-melanoma and antioxidant activities of *Hymenaea courbaril* L. seed extract. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 91, n. 4, 2019.
- SUNIL, A. et al. HPLC Detectors, Their Types and Use: A Review. **Organic & Medicinal Chemistry International Journal**, v. 6, n. 5, p. 143-146, 2018.
- SUZUKI, R. et al. Characterization and antioxidant activity of Amazonian woods. **Journal of Wood Science**, v. 54, n. 2, p. 174–178, 2008.
- THUAN, N. H. et al. Microbial production of astilbin, a bioactive rhamnosylated flavanonol, from taxifolin. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 33, n. 2, p. 1–10, 2017.
- TOMEI, R. R. **Prospecção de antioxidantes em *Alternanthera maritima* (planta in natura e obtida por cultura de células)**. 2008. 123 f. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Universidade do Vale do Paraíba, 2008.
- TONHI, E.; COLLINS, K. E.; JARDIM, I. C. S. F. Fases estacionárias para cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE–FR) baseadas em superfícies de óxidos inorgânicos funcionalizados. **Química nova**, v. 25, n. 4, p. 616–623, 2002.
- TORRES, L. et al. Biologic activities and chemical composition of the *Hymenaea courbaril* var. *stilbocarpa* (Jatobá) extracts. **Planta Medica**, v. 78, n. 11, p. PI201, jul. 2012.
- TSIMOGIANNIS, D. et al. Characterization of flavonoid subgroups and hydroxy substitution by HPLC-MS/MS. **Molecules**, v. 12, n. 3, p. 593-606, 2007.
- ULANOWSKA, K. et al. Differential antibacterial activity of genistein arising from global inhibition of DNA, RNA and protein synthesis in some bacterial strains. **Archives of Microbiology**, v. 184, n. 5, p. 271–278, 2006.
- VALENTIM, A. P. T. **Atividade antimicrobiana, estudo fitoquímico e identificação de constituintes apolares do alburno de *Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne (jatobá)**. 2006. 109 f. Dissertação (Mestrado) –Programa de pós-graduaçãoem biotecnologia de produtos bioativos, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2006.

- VEGGI, P. C. et al. Obtaining phenolic compounds from jatoba (*Hymenaea courbaril* L.) bark by supercritical fluid extraction. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 89, p. 68–77, 2014.
- VIEIRA, D. S. et al. In vitro antimicrobial activity of ethanolic extract of *Hymenaea martiana* Hayne leaf on strains of *Staphylococcus* spp. and evaluation of its potential as a disinfectant in goats. **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, v. 38, n. 3, p. 462–469, 2018.
- WALDVOGEL, F.A. *Staphylococcus aureus* (Including Staphylococcal Toxic Shock). In: MANDELL, G.L.; BENNETT, J. E.; DOLIN, R., E. D. S., Principles and Practice of Infectious Diseases, Churchill Livingstone, Philadelphia, 2069-2092, 2000.
- WANG, M. et al. Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking. **Nature Biotechnology**, v. 34, n. 8, p. 828–837, 2016.
- WANG, X. DAN et al. Permeation of astilbin and taxifolin in Caco-2 cell and their effects on the P-gp. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 378, n. 1–2, p. 1–8, 2009.
- WONGKITTIPONG, R. et al. Solid-liquid extraction of andrographolide from plants - Experimental study, kinetic reaction and model. **Separation and Purification Technology**, v. 40, n. 2, p. 147–154, 2004.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO. **Antimicrobial resistance: global report on surveillance**. World Health Organization, 2014. 256p.
- WU, Z. et al. Analysis of caffeic acid derivatives from *Osmanthus yunnanensis* using electrospray ionization quadrupole time-of-flight mass spectrometry. **European journal of mass spectrometry (Chichester, England)**, v. 15, n. 3, p. 415–429, 2009.
- WUNGSINTAWEEKUL, B. et al. Estrogenic and anti-estrogenic compounds from the Thai medicinal plant, *Smilax corbularia* (Smilacaceae). **Phytochemistry**, v. 72, n. 6, p. 495–502, 2011.
- YANG, J. Y. et al. Molecular networking as a dereplication strategy. **Journal of Natural Products**, v. 76, n. 9, p. 1686–1699, 2013.
- YE, M. et al. Characterization of flavonoids in *Millettia nitida* var. *hirsutissima* by HPLC/DAD/ESI-MSn. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 2, n. 1, p. 35–42, 2012.
- YOUNG, L. K.; SEOK, L. K.; HWAN, L. C. Antioxidative and antimicrobial effects of taxifolin isolated from a Cactus Cheonnyeoncho (*Opuntia humifusa*). **The FASEB Journal**, v. 21, n. 6, p. A1083–A1084, 2007.
- ZIMERMAN, R. . **Uso indiscriminado de antimicrobianos e resistência microbiana** Secretária de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. 3 ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2010. Disponível em: <www.saude.gov.br/horus%0Ahttps://meet.google.com/ivo-prct-tbv>. Acesso em: 18 agosto 2021.