



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

**ESTUDO FITOQUÍMICO E ANTIMICROBIANO DA CASCA DO CAULE
DE *Hymenaea stigonocarpa* MART. EX. HAYNE (JATOBÁ).**

GUSTAVO SANTIAGO DIMECH

**RECIFE
2014**

GUSTAVO SANTIAGO DIMECH

**ESTUDO FITOQUÍMICO E ANTIMICROBIANO DA CASCA DO CAULE
DE *Hymenaea stigonocarpa* MART. EX. HAYNE (JATOBÁ).**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Área de concentração: Fármacos e medicamentos

Linha de pesquisa: Obtenção e avaliação de produtos naturais bioativos

Orientadora: Profa. Dra. Eulália C. P.de A. Ximenes

**RECIFE
2014**

Ficha catalográfica elaborada pela
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4 1010

D582e Dimech, Gustavo Santiago.
Estudo fitoquímico e antimicrobiano da casca do caule de *Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex. Hayne (jatobá) / Gustavo Santiago Dimech. – Recife: O autor, 2014.
197 f: il.; tab.; 30 cm.

Orientadora: Eulália C. P. de A. Ximenes.
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2014.
Inclui referências.

1. Hymenaea. 2. Staphylococcus. 3. Sinergismo. 4. Taninos. 5. Ultraestrutura. I. Ximenes, Eulália C. P. de A. (Orientadora). II. Título.

615.3 CDD (23.ed.) UFPE (CCS2014-089)

GUSTAVO SANTIAGO DIMECH

**ESTUDO FITOQUÍMICO E ANTIMICROBIANO DA CASCA DO CAULE DE
HYMENAEA STIGONOCARPA MART. EX. HAYNE (JATOBÁ).**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em: 19/03/2014

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dr^a Eulália Camelo Pessoa de Azevedo Ximenes (Orientador)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof.^a Dr^a Mônica Camelo Pessoa de Azevedo Albuquerque (Examinadora Interna)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Sebastião José de Melo (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof.^a Dr^a Ana Catarina de Souza Lopes (Examinadora Externa)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof.^a Dr^a Glaucia Manoella de Souza Lima (Examinadora Externa)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

REITOR

Prof. Dr. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

VICE-REITOR

Prof. Dr. Sílvio Romero de Barros Marques

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Dr. Francisco de Sousa Ramos

DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Prof. Dr. Nicodemos Teles de Pontes Filho

VICE-DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Prof.^a Dr^a Vânia Pinheiro Ramos

CHEFE DO DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Prof. Dr. Antônio Rodolfo de Faria

VICE- CHEFE DO DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Prof. Dr. Dalci José Brondani

**COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

Prof. Dr^a Almir Gonçalves Wanderley

**VICE-COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

Prof.^a Dr^a Ana Cristina Lima Leite

Dedico este trabalho aos professores **Salvador** e **Nágela Dimech**, meus pais.

Por sempre me ensinarem o valor da educação.

A minha esposa **Alba** e minha filha **Bruna**,

Para que eu possa servir de exemplo

AGRADECIMENTOS

A Deus, por sempre guiar meus passos, mostrando os verdadeiros valores que devem estar presentes na caminhada.

A meus pais Salvador (*In memorian*) e Nágela meus primeiros educadores, responsáveis pela minha formação como pessoa.

A minha esposa Alba Dimech, por todo companheirismo, paciência e amor, estando sempre do meu lado e ajudando a superar todas as dificuldades durante esta jornada.

A minha filha Bruna Dimech, por sempre proporcionar os melhores momentos da minha vida.

A minha orientadora Eulalia Ximenes, por além de cumprir a sua vocação como educadora, demonstrar sempre amizade, simpatia e um carinho a todos os seus alunos. Sua presença e apoio nos momentos tristes e alegres nunca serão esquecidos.

Aos professores Haroudo Sátiro Xavier e Alexandre Góes pela simpatia, amizade e suas sempre importantíssimas colocações;

A equipe do Herbário Dárdano de Andrade Lima do Instituto Agrônomo de Pernambuco principalmente a Dra. Ana Luíza Du Bocage Neta, Dra. Bernadete Costa e a Dra. Rita de Cássia Araújo Pereira.

Ao professor Sebastião Melo, pelo auxílio na tarefa de identificação dos flavonoides assim como ao professor Norberto Peporine Lopes.

Ao Professor Joás Lucas da Silva, pela disponibilidade e ajuda na realização da microscopia eletrônica na USP São Paulo.

Aos professores Pedro Rolim e Terezinha Gonçalves e Miracy Muniz pela permissão da utilização dos equipamentos em seus laboratórios.

As professoras Elba Lucia Cavalcanti Amorim e Claudia Sampaio, minhas orientadoras na iniciação científica e ao professor Almir Wanderley, que muito contribuíram para minha formação acadêmica.

Ao Professor Luiz Alberto Lira Soares, Magda Ferreira e as professoras Karina Randau e Rejane Pimentel pelo auxílio na execução deste trabalho;

Aos amigos de laboratório, Amanda, Lucas, Tiago, Léo, Renata, George, Emmanuelle, Fabio, Kewdma e Tacilene.

Ao Sr José Ney e seu filho Helson Neves donos da fazenda Saco na cidade de Jati-CE e a Miro. Ao contrario do que torcíamos, tinha em suas terras uma espécie jatobá diferente da estudada neste trabalho, porém sou grato por toda a atenção.

Ao Sr Antônio Severino de Paula, dono fazenda Refúgio na cidade de Camocim de São Félix-PE ao Sr. Elisiario Souza, ao meu sogro Sr. Luiz Carlos Serafim e ao Sr Cacai pelo auxílio na localização e coleta da amostra de *Hymenaea stigonocarpa* utilizada neste estudo.

A minha tia Conceição Alencar pelo apoio que fez toda a diferença durante a execução deste trabalho;

Aos velhos amigos Carlos Fernando Brasileiro e Eduardo Gonçalves (BRASA E DUDA) por serem os grandes responsáveis por plantar a idéia da realização desse Doutorado.

Aos novos amigos Gibson Gomes, Antônio Pereira e Isla Bastos, por serem grandes companheiros de bancada durante a execução deste trabalho.

Aos colegas da Universidade Federal Rural de Pernambuco: Neves, Luana, Rivonilda, Erótildes, Reginete, Walter, Arlindo, Erica e vários outros, por todo apoio;

Ao Professor Jurandi David Da Silva, Farmacêutico que me ensinou os primeiros “segredos” da Microbiologia Clínica

Ao Laboratório de Análises Clínicas e a Comissão de Controle de Infecção Hospitalar do Hospital Aeronáutica de Recife, casa onde iniciei na arte da microbiologia Clínica.

É você olhar no espelho
Se sentir
Um grandessíssimo idiota
Saber que é humano
Ridículo, limitado
Que só usa dez por cento
De sua cabeça animal.

E você ainda acredita
Que é um doutor
Padre ou policial
Que está contribuindo
Com sua parte
Para o nosso belo
Quadro social

Ouro de tolo – Raul Seixas

Ainda que eu tivesse
o dom da profecia e
conhecesse todos os
mistérios e toda a
ciência, se não
tivesse amor, nada
seria.

Corintios, 13-2

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Árvore <i>Hymenaea stigonocarpa</i> com cerca de 20 metros de altura.....	27
Figura 2 - Casca do caule de <i>Hymenaea stigonocarpa</i> Mart. ex Hayne.....	28
Figura 3 - Folhas de <i>Hymenaea stigonocarpa</i> Mart. ex Hayne.....	28
Figura 4 - Inflorescência do jatobá do cerrado (<i>Hymenaea stigonocarpa</i> Mart. ex Hayne).....	29
Figura 5 - Vista frontal do fruto de <i>Hymenaea stigonocarpa</i> Mart. ex Hayne.....	29
Figura 6 - Seção transversal do fruto de <i>Hymenaea stigonocarpa</i> Mart. ex Hayne.....	30
Figura 7 - Seção longitudinal do fruto de <i>Hymenaea stigonocarpa</i> Mart. ex Hayne.....	30
Figura 8 - Aspectos da semente de <i>Hymenaea stigonocarpa</i> Mart.ex Hayne.....	31
Figura 9 - Ácido copálico isolado da resina de <i>H. courbaril</i>	32
Figura 10 - Terpeno labd-13-em-ol 15-oato de metila isolado de <i>H. courbaril</i>	32
Figura 11 - Terpenos isolados da resina do tronco da <i>Hymenaea courbaril</i> coletada na região de Campinas.....	33
Figura 12 - Principais constituintes das resinas encontradas nas folhas da <i>Hymenaea courbaril</i> , cariofileno (1), β -selineno (2) e α -selineno (3).....	33
Figura 13 - Constituintes encontrados em menor escala, das resinas das folhas da <i>Hymenaea courbaril</i> : alfa-cubebreno (1), α -copaeno (2), beta-copaeno (3), alfa e beta-hemuleno (4a e 4b), γ -muroleno (5), delta-cadineno (6) e copacanfeno (7).....	34
Figura 14 - Composto diterpênico identificado na resina proveniente da casca do fruto da <i>Hymenaea courbaril</i> , ácido enatio-8(17),13(16),14-labdatrien-18-oico.....	34
Figura 15 - Compostos sesquiterpênicos identificados na resina proveniente da casca do fruto da <i>Hymenaea courbaril</i> , ciclosativeno (1), β -bourbuneno (2), cariofileno (3), calareno (4), hemuleno22, Selina-4(14)-7-dieno (5), α -himacaleno (6), α -muroleno (7).....	35
Figura 16 - Estruturas dos sesquiterpenos isolados das folhas de <i>H. courbaril</i> , b-cariofileno (1) e γ -muroleno (2).....	36
Figura 17 - Estruturas dos diterpenos isolados das folhas e galhos de <i>H. courbaril</i> , ácido (13R)-13-hidroxi-1(10),14-ent-halimadien-18-oico (1), ácido (2S,13R)-2,13-dihidroxi-1(10),-14-ent-halimadien-18-oico (2), e ácido (13R)-2-oxo-13-hidroxi-1(10),14-ent-halimadien-18-oico (3).....	36
Figura 18 - Estruturas dos diterpenos isolados das sementes de <i>H. courbaril</i> , ácido (5R*,8S*,9S*,10R*)-cleroda-3,13E-dien-15-oico (1) e ácido (5S*,8S*,9S*,10R*)-cleroda-3,13E-dien-15-oico (2).....	37
Figura 19 - Principais constituintes da fração ácida da resina do tronco da <i>Hymenaea oblongifolia</i> , ácido enantio-pinifólico (ácido enantio-labd-8(20-em-15,18 dióico) (1), e o ácido guamáico (ácido enantio-labd-8(20),13-dien-15,18 dioico (2). <i>oblongifolia</i>	38
Figura 20 - Esqueletos estruturais do tipo lábdano (1) e abietano (2) e pimarano (3) da resina de <i>Hymenaea stigonocarpa</i>	39

Figura 21 - sesquiterpenos isolados da fração neutra das folhas de <i>H. stigonocarpa</i> , a-copaeno (1), espatulenol (2) e óxido de cariofileno (3)	40
Figura 22 - Diterpenos majoritários isolados da fração ácida das folhas de <i>H. stigonocarpa</i> , caur-16-en-19-ato de metila (4), caur-15-en-19-ato de metila (5), ozato de metila (6) e isoozato de metila (7).....	40
Figura 23 - Estrutura do ácido enantio-13-epilabdanóico isolada de <i>H. parvifolia</i>	41
Figura 24 - Estrutura da Astilbina	42
Figura 25 - Estruturas de flavonóides isolados das folhas de <i>H. palustres</i> , luteolina (1), crisoeriol (2) e palstatina (3).....	42
Figura 26 - Estruturas dos flavonóides isolados do cerne de <i>H. courbaril</i> , taxifolina (1) e o fisetinidol (2).....	43
Figura 27 - Estruturas das cumarinas isoladas das sementes de <i>H. courbaril</i> , ipomopsina (1) e hymenaina (2).....	44
Figura 28 - Localização geográfica do local de coleta das cascas do caule de <i>Hymenaea stigonocarpa</i> Mart. ex. Hayne.....	69
Figura 29 - Fotomicrografia da casca do caule de ramo adulto de <i>Hymenaea stigonocarpa</i> mostrando a região do súber corada com safranina e azul de astra.....	79
Figura 30 - Fotomicrografia da casca do caule de ramo adulto de <i>Hymenaea stigonocarpa</i> mostrando a região do súber, felogênio, feloderma e parênquima cortical corados com safranina e azul de astra.....	80
Figura 31 - Fotomicrografia da casca do caule de ramo adulto de <i>Hymenaea stigonocarpa</i> mostrando parênquima cortical, esclerênquima e floema corados com safranina e azul de Astra.....	80
Figura 32 - Fotomicrografia da casca do caule de ramo adulto de <i>Hymenaea stigonocarpa</i> mostrando regiões coradas com dicromato de potássio para visualização de regiões com conteúdos fenólicos.....	81
Figura 33 - Fotomicrografia da casca do caule de ramo jovem de <i>Hymenaea stigonocarpa</i> mostrando regiões coradas com vanilina clorídrica visualização de regiões com conteúdos de taninos.....	82
Figura 34 - Fotomicrografia da casca do caule de ramo adulto de <i>Hymenaea stigonocarpa</i> mostrando regiões coradas com vanilina clorídrica visualização de regiões com conteúdos de taninos.....	83
Figura 35 - Cromatograma dos extratos ciclo-hexano, acetato de etila, etanol e água obtidos para avaliação da presença de monoterpenos e sesquiterpenos.....	84
Figura 36 - Cromatograma dos extratos ciclohexano, acetato de etila, etanol e água obtidos para avaliação de triterpenos e esteroides.....	85
Figura 37 - Cromatograma dos extratos ciclohexano, acetato de etila, etanol e água obtidos para avaliação de flavonóides.....	86
Figura 38 - Cromatograma dos extratos ciclo-hexano, acetato de etila, etanol e água obtidos para avaliação de açúcares.....	87
Figura 39 - Cromatograma do extrato etanólico (B), para avaliação de taninos hidrolisados.....	88

Figura 40 - Cromatograma dos extratos ciclo-hexano, acetato de etila, etanol e água obtidos para avaliação de taninos condensados.....	89
Figura 41 - Cromatograma do extrato hidroalcoólico de <i>Hymenaea stigonocarpa</i> para avaliação de flavonóides.....	90
Figura 42 - Cromatograma do extrato hidroalcoólico e da fração aquosa para avaliação de flavonóides.....	91
Figura 43 - Cromatograma do extrato hidroalcoólico e da fração acetato de etila para avaliação de taninos.....	92
Figura 44 - Cromatogramas obtidos por CLAE–DAD de diferentes extratos da casca do caule de <i>Hymenaea stigonocarpa</i>	94
Figura 45 - Imagens da microscopia eletrônica de transmissão da cepa de <i>S. aureus</i> ATCC-33591 tratada com diferentes concentrações do extrato hidroalcoólico de <i>H. Stigonocarpa</i>	100
Figura 46 - Representação do método do tabuleiro de xadrez.....	121
Figura 47 - Isoblograma revelando o efeito sinérgico do extrato hidroalcoólico de <i>Hymenaea stigonocarpa</i> quando associado à oxacilina frente à <i>Staphylococcus aureus</i> AM24.....	129
Figura 48 - Microscopia eletrônica de transmissão da cepa de <i>S. aureus</i> AM 24, submetida a tratamento com oxacilina e o extrato hidroalcoólico de <i>Hymenaea stigonocarpa</i>	131
Figura 49 - Histograma de distribuição granulométrica do triturado da casca do caule de <i>Hymenaea stigonocarpa</i>	153
Figura 50 - Curvas de retenção e passagem da amostra de casca do caule de <i>Hymenaea stigonocarpa</i>	154
Figura 51 - Teor dos resíduos secos obtidos através dos diferentes métodos de extração.....	159
Figura 52 – Cromatogramas demonstrando a presença de flavonoides e taninos nos extratos hidroalcoólicos da casca do caule <i>Hymenaea stiginocarpa</i> obtidos a partir dos diferentes métodos de extração.....	160
Figura 53 - Espectro de varredura do ácido gálico e do extrato de <i>Hymenaea stigonocarpa</i> após reação com Folin-Ciocalteu.....	161
Figura 54 - Gráfico de pareto para efeitos padronizados do fatorial 3^2	162
Figura 55 - Valores de absorvância da fração residual do extrato de <i>Hymenaea stigonocarpa</i> em função da quantidade de caseína.....	163
Figura 56 - Cromatograma obtido por CLAE-DAD dos diferentes extratos hidroalcoólicos da casca do caule de <i>Hymenaea stigonocarpa</i>	166
Figura 57 - Teor de polifenóis totais dos extratos hidroalcoólicos da casca do caule de <i>Hymenaea stigonocarpa</i> obtidos através dos diferentes métodos de extração.....	167
Figura 58 - Espectro de Ultravioleta e espectro de massa do pico A obtido compatível com taxifolina.....	187

Figura 59 - Espectro de UV e de massas dos íons moleculares desprotonados do padrão astilbina.....	189
Figura 60 - Espectro de UV e de massas do pico B compatível com a astilbina (padrão).....	190
Figura 61 - Espectro de UV e de massas do pico C compatível com o flavanonoI engeletina.....	191
Figura 62 - Espectro de UV e de massas do pico D compatível com estereoisômero da astilbina.....	192

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Conteúdo de polifenóis e taninos totais dos diferentes extratos e frações de <i>Hymenaea stigonocarpa</i>	93
Tabela 2 - Concentração inibitória mínima dos extratos e frações de <i>Hymenaea stigonocarpa</i> frente a cocos Gram-positivos.....	97
Tabela 3 - CIM e CBM do extrato hidroalcoólico da casca do caule de <i>Hymenaea stigonocarpa</i> e de agentes antimicrobianos frente cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> com diferentes perfis de resistência.....	125
Tabela 4 - Avaliação da associação do extrato hidroalcoólico de <i>Hymenaea stigonocarpa</i> com agentes antimicrobianos frente a cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> multidroga resistentes.....	127
Tabela 5 - Resultados dos ensaios de perda por dessecação, teor de extrativos e cinzas totais das amostras de <i>Hymenaea stigonocarpa</i>	156
Tabela 6 - Matriz do experimental do desenho aplicado para avaliar a influência da quantidade de Folin, concentração de Carbonato e tempo de leitura sobre a resposta do método em absorvância.....	162
Tabela 7 - Valores médios da absorvância (UA) e CV % obtidos para a fração não tanante com caseína durante análise, em triplicata.....	164
Tabela 8 - Teor de polifenóis, taninos e flavonoides totais nos extratos hidroalcoólicos de <i>Hymenaea stigonocarpa</i> obtidos a partir de diferentes métodos.....	165
Tabela 9 - Valores da Concentração Bactericida Mínima e Concentração Inibitória Mínima dos extratos de <i>Hymenaea stigonocarpa</i> frente a cepas de bactérias Gram positivas.....	169
Tabela 10 - Valores da Concentração Inibitória Mínima do extrato hidroalcoólico de <i>Hymenaea stigonocarpa</i> obtido por maceração frente a diferentes espécies de <i>Candida</i>	171
Tabela 11 - Dados cromatográficos e espectrofotométricos dos componentes identificados no cromatograma da fração acetato de etila de <i>Hymenaea stigonocarpa</i>	186

RESUMO

A rápida disseminação dos micro-organismos multidroga resistentes induz a pesquisa por novos agentes antimicrobianos mais ativos e menos tóxicos. *Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne (*Fabaceae*) é uma planta medicinal de principal ocorrência no cerrado brasileiro e conhecida popularmente como "Jatobá-do-cerrado". As cascas do seu caule são amplamente utilizadas em infusão ou decocção para tratar dor de estômago, asma, bronquite, úlceras, diarreia, gripe e tosse. Entretanto estudos fitoquímicos e antimicrobianos ainda não são escassos. O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antimicrobiana de diferentes extratos da casca do caule de *Hymenaea stigonocarpa* através da determinação da concentração inibitória mínima e bactericida mínima, realizar a caracterização botânica e fitoquímica por cromatografia de camada delgada e cromatografia líquida de alta eficiência e determinar as concentrações dos metabólitos secundários responsáveis pela sua atividade e sua atividade frente a diferentes espécies de *Candida*. Além disso, foi parte deste estudo a avaliação da interação entre o extrato hidroalcoólico de *Hymenaea stigonocarpa* e agentes antimicrobianos de diferentes classes químicas, a determinação das alterações ultraestruturais decorrentes da ação deste extrato em associação, bem como a caracterização físico-química das cascas do caule após coleta, secagem e trituração. Este trabalho também avaliou a influência do método de extração sobre as seguintes variáveis: resíduo seco, atividade antibacteriana e concentração de taninos. *Staphylococcus aureus* mostrou ser o micro-organismo mais sensível a ação dos extratos. Também foi observada uma forte atividade frente as espécies *Candida krusei* e *Candida glabrata* e uma atividade moderada frente as bactérias Gram negativas. A análise ultraestrutural deste micro-organismo, demonstrou alterações na parede celular, bem como no citoplasma decorrentes da ação do extrato hidroalcoólico. A associação com agentes antimicrobianos resultou na maior parte das vezes em um efeito sinérgico, revertendo a multirresistência de algumas cepas de *Staphylococcus aureus* metilicina resistentes. O métodos de extração não influenciaram a concentração final de taninos, assim como a atividade antibacteriana. Entretanto houve diferenças quanto ao resíduo seco, sendo esta a variável utilizada para classificar a maceração dinâmica como o método mais eficaz. Quanto a presença flavonóides, após fracionamento e análise por cromatografia líquida ultra rápida acoplada ao espectrômetro de massas, fortes evidências indicam a presença de engeletina, taxifolina, astilbina e um diasteroisômero da astilbina. Assim concluímos que o extrato hidroalcoólico da casca do caule de *Hymenaea stigonocarpa* tem atividade antimicrobiana sendo mais ativo frente a *Staphylococcus aureus*, como também a cepas de *Candida krusei* e *Candida glabrata*. O modo de extração mais eficiente é a maceração dinâmica e a associação do extrato com antibióticos de referência leva a potencialização do efeito destes.

Palavras-chave: *Hymenaea*. *Staphylococcus*. Sinergismo. Taninos. Ultraestrutura.

ABSTRACT

The rapid spread of multidrug resistant microorganisms induces the search for new, more active and less toxic antimicrobial agents. *Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne (Fabaceae) is a medicinal plant of main occurrence in the Brazilian cerrado and known popularly as "Jatoba-do-cerrado". Its stem peels are widely used in infusion or decoction to treat stomach pain, asthma, bronchitis, ulcers, diarrhea, flu and cough. However phytochemicals and antimicrobial studies are still scarce. The objective of this study was to evaluate the antimicrobial activity of different extracts of the stem bark of *Hymenaea stigonocarpa* by determining the minimum inhibitory concentration and minimum bactericidal, perform the phytochemical and botanical characterization by thin layer chromatography and high performance liquid chromatography to determine the efficiency and concentrations of secondary metabolites responsible for its activity and its activity against various *Candida* species. In addition, part of this study was to evaluate the interaction between the alcoholic extract of *Hymenaea stigonocarpa* and antimicrobials of different chemical classes, the determination of ultrastructural changes resulting from the action of this extract in combination, as well as the physico- chemical characterization of the stem bark after collection, drying and grinding. This study also evaluated the influence of the extraction method on the following variables: dry, antibacteriana activity and concentration of tannins. *Staphylococcus aureus* was found to be the most sensitive microorganism action of the extracts. Strong activity fronts the species *Candida krusei* and *Candida glabrata* and moderate activity against gram-negative bacteria was also observed. The ultrastructural analysis of this microorganism, showed changes in the cell wall and the cytoplasm resulting from the action of the alcoholic extract. Combination with antimicrobial agents resulted in most cases a synergistic effect in reversing the multidrug resistance of some strains of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. The extraction methods did not influence the final concentration of tannins, as well as antibacterial activity. However there were differences in dry matter, which is the variable used to classify the dynamic maceration as the most effective method. As the flavonoids present after fractionation and analysis coupled with mass spectrometry, ultra strong evidence fast performance liquid chromatography indicated the presence of engeletina, taxifolina, astilbin, and a diastereomer of astilbin. Thus we conclude that the hydroalcoholic extract of the stem bark of *Hymenaea stigonocarpa* has antimicrobial activity being more active against *Staphylococcus aureus*, as well as strains of *Candida krusei* and *Candida glabrata*. The most efficient way of extracting the dynamic is mashing and extracts association with antibiotics reference leads to potentiation of the effect of these.

Keywords: *Hymenaea*. *Staphylococcus*. Synergism. Tannins. Ultrastructure.

SUMÁRIO

1 APRESENTAÇÃO.....	20
2 O GÊNERO <i>Hymenaea</i>: ASPECTOS BOTÂNICOS, QUÍMICOS E FARMACOLÓGICOS.....	22
2.1 INTRODUÇÃO.....	22
2.1.1 Classificação.....	22
2.1.1.2 Família <i>Leguminosae</i>	23
2.2 ASPECTOS BOTÂNICOS DO GÊNERO <i>Hymenaea</i>	23
2.2.1 Distribuição do gênero <i>Hymenaea</i>.....	24
2.2.2 Estudos taxonômicos.....	25
2.2.3 Avaliação morfológica.....	25
2.2.4 Desenvolvimento das espécies.....	26
2.2.5 Descrição botânica da espécie <i>Hymenaea stigonocarpa</i>.....	27
2.3 ASPECTOS QUÍMICOS DAS ESPÉCIES DO gênero <i>Hymenaea</i>	31
2.3.1 Terpenos identificados no gênero <i>Hymenaea</i>.....	31
2.3.1.1 <i>Hymenaea courbaril</i>	31
2.3.1.1.1 Terpenos identificados na resina do tronco.....	32
2.3.1.1.2 terpenos identificados nas resinas das folhas.....	33
2.3.1.1.3 terpenos identificados na resina dos frutos.....	34
2.3.1.1.4 terpenos identificados nas folhas.....	35
2.3.1.1.5 terpenos identificados nas cascas dos frutos.....	37
2.3.1.1.6 substâncias isoladas das sementes.....	37
2.3.1.2 <i>Hymenaea oblongifolia</i>	38
2.3.1.3 <i>Hymenaea verrucosa</i>	38
2.3.1.4 <i>Hymenaea stigonocarpa</i>	38
2.3.1.4.1 terpenos identificados nas sementes.....	38
2.3.1.4.2 terpenos identificados nas folhas.....	39
2.3.1.4.3 terpenos identificados no epicarpo.....	39
2.3.1.4.4 terpenos identificados na resina do tronco.....	41
2.3.1.4.5 terpenos identificados no alburno.....	41
2.3.2 flavonóides identificados no gênero <i>Hymenaea</i>.....	41
2.3.2.1 <i>Hymenaea parvifolia</i>	42
2.3.2.2 <i>Hymenaea palustres</i>	42
2.3.2.3 <i>Hymenaea courbaril</i>	43
2.3.2.4 <i>Hymenaea stigonocarpa</i>	43
2.3.2.4.1 flavonóides identificados na casca do caule.....	43
2.3.2.4.2 flavonóides identificados no alburno.....	44
2.3.3 cumarinas identificadas no gênero <i>Hymenaea</i>.....	44
2.3.3.1 <i>Hymenaea courbaril</i>	44
2.3.4 taninos relatados no gênero <i>Hymenaea</i>.....	45
2.3.4.1 <i>Hymenaea courbaril</i>	45
2.3.4.2 <i>Hymenaea stigonocarpa</i>	45
2.4 ASPECTOS FARMACOLÓGICOS DOS EXTRATOS OBTIDOS A PARTIR DE DIFERENTES ESPÉCIES DO GÊNERO <i>Hymenaea</i>	45
2.4.1 Estudos etnofarmacológicos.....	45

2.4.1.1 <i>Hymenaea courbaril</i>	45
2.4.1.2 <i>Hymenaea stigonocarpa</i>	46
2.4.1.3 <i>Hymenaea parvifolia</i>	47
2.4.2 Avaliação farmacológica	47
2.4.2.1 <i>Hymenaea courbaril</i>	47
2.4.2.2 <i>Hymenaea stigonocarpa</i>	49
2.4.2.3 <i>Hymenaea martiana</i>	51
2.4.2.4 <i>Hymenaea parvifolia</i>	52
 REFERÊNCIAS.....	 53
 3 CARACTERIZAÇÃO BOTÂNICA, FITOQUÍMICA E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DOS EXTRATOS E FRAÇÕES DA CASCA DO CAULE DE <i>Hymenaea stigonocarpa</i> Mart. ex Hayne	 63
 3.1 INTRODUÇÃO.....	 63
3.2 OBJETIVOS.....	68
3.2.1 Objetivo geral	68
3.2.2 Objetivos específicos	68
 3.3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	 69
3.3.1 Coleta do material vegetal	69
3.3.2 Caracterização botânica do material vegetal	69
3.3.2.1 Análise microscópica.....	70
3.3.2.2 Análise histoquímica.....	70
3.3.3 Caracterização fitoquímica do material vegetal	70
3.3.4 Quantificação de polifenóis e taninos totais	73
3.3.4.1 Quantificação de polifenóis totais.....	73
3.3.4.2 Determinação de taninos totais.....	73
3.3.4.3 Análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	74
3.3.5 Determinação da atividade antibacteriana	74
3.3.5.1 Preparação das amostras.....	74
3.3.5.2 Determinação da atividade antibacteriana <i>in vitro</i>	75
3.3.5.2.1 Agentes antimicrobianos.....	75
3.3.5.2.2 Micro-organismos e padronização dos inóculos.....	75
3.3.5.2.3 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CMB).....	76
3.3.6 análise ultraestrutural	77
3.3.7 análise estatística	78
 3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	 79
3.4.1 Caracterização botânica do material vegetal	79
3.4.1. Anatomia.....	79
3.4.1.2 Histoquímica.....	81
3.4.1.2.1 Avaliação de Polifenóis.....	81
3.4.1.2.2 Detecção da presença de taninos.....	82
3.4.1.2.2.1 Caules jovens.....	82
3.4.1.2.2.2 Caules adultos.....	82
3.4.2 Caracterização fitoquímica do material vegetal	83

3.4.2.1 Análise fitoquímica.....	84
3.4.2.1.1 Monoterpenos e sesquiterpenos.....	84
3.4.2.1.2 Triterpenos e esteróides.....	85
3.4.2.1.3 Flavonóides e cumarinas.....	86
3.4.2.1.4 Açúcares.....	87
3.4.2.1.5 Taninos condensados e hidrolisáveis.....	87
3.4.2.1.6 Flavonóides após partição.....	90
3.4.2.1.7 Taninos condensados após partição.....	91
3.4.3 Quantificação de polifenóis e taninos totais.....	92
3.4.3.1. Determinação da Curva de calibração do ácido gálico.....	92
3.4.4.2 Determinação do teor de polifenóis e taninos totais.....	92
3.4.4 Análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-DAD).....	93
3.4.5 Atividade antibacteriana.....	95
3.4.6 Alterações ultraestruturais.....	99
 3.5 CONCLUSÕES.....	 102
REFERÊNCIAS.....	103

4 ASSOCIAÇÃO DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DA CASCA DO CAULE DE *HYMENAEA STIGONOCARPA* MART EX HAYNE COM AGENTES ANTIMICROBIANOS FRENTE A CEPAS DE *Staphylococcus aureus* RESISTENTES A METICILINA (MRSA)..... 111

4.1 INTRODUÇÃO.....	111
4.1.1 A evolução da resistência de <i>staphylococcus aureus</i> a agentes antimicrobianos.....	112
4.1.1.1 <i>Staphylococcus aureus</i> resistentes a metilina.....	114
4.1.2 Associações entre polifenóis e agentes antimicrobianos.....	115
4.2 OBJETIVOS.....	116
4.2.1 Objetivo geral.....	116
4.2.2 Objetivos específicos.....	116
4.3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	117
4.3.1 Material vegetal.....	117
4.3.2 Procedimentos extrativos.....	117
4.3.3 Determinação da atividade anti- estafilocócica <i>in vitro</i>.....	117
4.3.3.1 Agentes antimicrobianos.....	118
4.3.3.2 Preparação das soluções.....	119
4.3.3.3 Micro-organismos.....	119
4.3.3.4 Preparação do inóculo.....	119
4.3.3.5 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CMB).....	119
4.3.3.6 Avaliação <i>in vitro</i> da interação entre o extrato hidroalcoólico de <i>Hymeneae stigonocarpa</i> com agentes antimicrobianos.....	120
4.3.4 Microscopia eletrônica de transmissão.....	122
4.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	123
4.5 CONCLUSÕES.....	132

REFERÊNCIAS.....	133
5 O EFEITO DE DIFERENTES MÉTODOS DE EXTRAÇÃO SOBRE O RENDIMENTO, CONCENTRAÇÕES DE FENÓIS TOTAIS E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DA CASCA DO CAULE DE <i>Hymenaea stigonocarpa</i>.....	139
5.1 INTRODUÇÃO.....	139
5.2 OBJETIVOS.....	142
5.2.1 Objetivo geral.....	142
5.2.2 Objetivos específicos.....	142
5.3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	143
5.3.1 Coleta.....	143
5.3.2 Caracterização físico-química do material vegetal.....	143
5.3.2.1 Análise granulométrica por tamisação.....	143
5.3.2.2 Determinação da perda por dessecação.....	144
5.3.2.3 Determinação do teor de extrativos.....	144
5.3.2.4 Determinação de cinzas totais.....	145
5.3.3 Procedimentos extrativos.....	145
5.3.4. Descrição das técnicas extrativas.....	145
5.3.4.1 Maceração	145
5.3.4.2 Maceração dinâmica.....	146
5.3.4.3 Utrassom.....	146
5.3.4.4 Refluxo.....	146
5.3.4.5 Turbo-extração.....	146
5.3.4.6 Infusão.....	146
5.3.5 Prospecção fitoquímica.....	147
5.3.6 Análises quantitativa de polifenóis	147
5.3.6.1 Determinação de polifenóis totais.....	147
5.3.6.1.1 Desenho fatorial 3 ²	147
5.3.6.1.2 Preparação da Solução Padrão	148
5.3.6.2 Determinação de taninos totais.....	148
5.3.6.3 Determinação de flavonoides.....	149
5.3.6.3.1 Análise por cromatografia líquida e alta eficiência acoplada a detector de arranjo de Diodos (CLAE-DAD).....	149
5.3.7 Determinação da atividade antimicrobiana de <i>H. stigonocarpa</i> Mart. ex. Hayne.....	150
5.3.7.1 Determinação da atividade antibacteriana.....	150
5.3.7.1.1 Preparação das soluções de <i>H. stigonocarpa</i>	150
5.3.7.1.2 Micro-organismos.....	150
5.3.7.1.3 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CMB).....	150
5.3.7.2 Determinação da atividade antifúngica.....	151
5.3.7.2.1 Cepas e condições de cultivo	151
5.3.7.2.2 Susceptibilidade antifúngica <i>in vitro</i>	152
5.3.8 Análise estatística.....	152
5.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	153

5.4.1 Caracterização físico-química do material vegetal.....	153
5.4.2 Determinação do rendimento.....	156
5.4.3 Prospeção fitoquímica por cromatografia de camada delgada.....	160
5.4.4 Análise quantitativa dos compostos majoritários.....	160
5.4.4.1 Determinação do método de doseamento de polifenóis totais por espectrofotometria após avaliação das variáveis analíticas.....	164
5.4.4.2 Determinação da concentração de polifenóis totais, taninos e flavonoides.....	164
5.4.5 Determinação da atividade antibacteriana de <i>H. stigonocarpa</i> Mart. ex. Hayne.....	168
5.4.6 Determinação da atividade antifúngica de <i>H. stigonocarpa</i> Mart. ex. Hayne.....	170
5.5 CONCLUSÕES.....	173
REFERÊNCIAS.....	174
6 IDENTIFICAÇÃO DO FLAVONÓIDES PRESENTES NA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DA CASCA DO CAULE DE <i>Hymenaea stigonocarpa</i>.....	179
6.1 INTRODUÇÃO.....	179
6.2 OBJETIVOS.....	182
6.2.1 objetivo geral.....	182
6.2.2 objetivos específico.....	182
6.3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	183
6.3.1 Amostras.....	183
6.3.2 Solventes empregados.....	183
6.3.3 Sistema cromatografia líquida ultrarrápida acoplada a detector de arranjo de díodos e espectrômetro de massas (UFLC-DAD-EM).....	183
6.3.4 Análise por UFLC-DAD-EM.....	184
6.3.4.1 Identificação dos flavonóides.....	184
6.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	186
6.5 CONCLUSÕES.....	194
REFERENCIAS.....	195

1 APRESENTAÇÃO

Os antibióticos são uma das mais importantes armas no combate às infecções bacterianas. No entanto, ao longo das últimas décadas, seus benefícios à saúde estão sob ameaça, pois muitos antibióticos tornaram-se cada vez menos eficazes devido ao aparecimento de bactérias resistentes (RAKHOLIYA et al., 2012).

A crescente resistência bacteriana, principalmente associada a utilização extensiva de agentes antimicrobianos, pode resultar na existência de um arsenal de substâncias ineficazes para combater infecções bacterianas (HOERLLE; BRANDELLI, 2009).

Devido a rápida disseminação dos micro-organismos multidrogas resistentes há uma considerável necessidade por novos agentes antimicrobianos (GIBBONS et al., 2002), tendo sido muitas plantas avaliadas não somente pela atividade antimicrobiana direta, mas também pela modificação do perfil de resistência ao agente antimicrobiano (GIBBONS, 2004; HEMAISWARYA, et al., 2008; WAGNER; ULRICH-MERZENICH, 2009).

Os principais grupos de compostos com propriedades antimicrobianas, extraídos de plantas incluem: terpenóides (TORSSEL, 1989); alcaloides (FESSENDEN, 1982); polipeptídios (TERRAS et al., 1993; ZHANG; LEWIS, 1997) e substâncias fenólicas, que são: fenóis simples, ácidos fenólicos, quinonas (STERN et al., 1996), flavonas, flavonóis e flavonóides (FESSENDEN, 1982), tanino (SCALBERT, 1992) e cumarinas (O'KENNEDY & THORNES, 1997).

Esses metabólitos secundários são considerados uma fonte promissora para a terapia antimicrobiana seja ela combinada ou não, podendo atuar em pontos específicos da célula procariótica, e potencializar o efeito de antimicrobianos sintéticos (CHOVANOVÁ et al., 2013).

Dentro deste contexto destacamos a espécie *Hymenaea stigonocarpa*, popularmente conhecido como jatobá-do-cerrado. Estudos fitoquímicos de *Hymenaea stigonocarpa* mostraram a presença de terpenos e sesquiterpenos, ácidos graxos, flavonóides e taninos, metabólitos reconhecidos pela atividade biológica (LANGENHEIM; HALL, 1983; MATUDA; NETO, 1985; ORSI et al., 2012).

Alguns estudos etnofarmacológicos atribuem a esta espécie algumas atividades tais como fortificante, anti-inflamatória e antimicrobiana (RODRIGUES; CARVALHO, 2001; VILA VERDE et al., 2003; SOUZA; FELFILI, 2006). Existindo

também alguns estudos farmacológicos já realizados comprovando os efeitos citotóxicos, antiinflamatórios e antioxidantes (GUIMARÃES et al., 2009; BRASIL et al., 2009; ORSI, et al., 2012; MARANHÃO et al., 2013).

No entanto, estudos sobre a atividade antimicrobiana desta espécie ainda são escassos (DIMECH, 2013), devido a isso este estudo teve o objetivo de avaliar a atividade antibacteriana da casca do caule de *Hymenaea stigonocarpa* Mart ex Hayne (Jatobá), frente às principais espécies de bactérias comumente causadoras de infecções nosocomiais. Para isto esta tese foi dividida em cinco capítulos.

O primeiro reúne informações dos aspectos botânicos, químicos e farmacológicos do gênero *Hymenaea*, avaliações que colaboram para um maior entendimento da espécie estudada.

Em seguida, foi realizada a caracterização botânica e fitoquímica da casca do caule de *Hymenaea stigonocarpa*, como também a determinação das concentrações dos metabólitos responsáveis pela atividade antibacteriana e avaliação por cromatografia líquida de alta eficiência dos extratos mais ativos.

Ainda neste capítulo foi determinada a espécie mais suscetível aos extratos avaliados e a classe de metabólitos mais ativa baseada na avaliação das concentrações inibitórias e bactericidas mínimas e da análise das alterações ultraestruturais através de microscopia eletrônica de transmissão.

Após a determinação da espécie mais suscetível e do extrato mais ativo foram avaliadas as associações do extrato hidroalcoólico com agentes antimicrobianos pertencentes a diferentes classes farmacológicas utilizadas na rotina médica. Essa associação visa à identificação de possíveis ações sinérgicas, que poderiam levar tanto a reversão da resistência presente em algumas cepas, como a diminuição da toxicidade dos agentes antimicrobianos, pela utilização de doses reduzidas.

No quarto capítulo foi avaliada a influência de diferentes métodos de extração sobre a variação do rendimento e do teor dos compostos majoritários do extrato hidroalcoólico da casca do caule de *Hymenaea stigonocarpa*, variações que poderiam influenciar na atividade antibacteriana. Além disso foi realizada uma otimização do método de doseamento dos taninos, classe de metabólitos mais ativos quanto a ação antibacteriana nesta espécie.

Concluindo, foram identificados os flavonóides presente na fração acetato de etila sendo sugerida a presença de quatro flavonóides.

2 O GÊNERO *Hymenaea*: ASPECTOS BOTÂNICOS, QUÍMICOS E FARMACOLÓGICOS.

2.1 INTRODUÇÃO

As espécies pertencentes ao gênero *Hymenaea* são fornecedores de boa madeira, frutos comestíveis e cascas taníferas (RIZZINI, 1971). As resinas de cor amarela e avermelhada, produzidas pelas árvores do gênero *Hymenaea* L., são produtos economicamente valiosos. Podem ser usadas em esculturas, na fabricação de jóias (índios pré-colombianos já utilizavam para estes fins), como cimento, incenso, e até quando dissolvidas em xilol, no preparo de lâminas permanentes para microscopia (LEE & LANGENHEIM, 1975).

Conhecidas como copal sul americano são utilizadas na fabricação de vernizes e com fins medicinais (LANGENHEIM et al., 1973). A extração ocorre por meio do processo de sangria do tronco ou por escavação do solo, onde a resina se acumula. Neste gênero a resina pode converter-se em âmbar, sendo encontradas resinas fósseis na Colômbia, México e Brasil (CASTELENN, 2005)

2.1.1 Classificação

De acordo com o Sistema de Classificação de Cronquist (1988), a posição taxonômica do gênero *Hymenaea* obedece à seguinte hierarquia: **Divisão:** Magnoliophyta - cujas sementes são protegidas por uma estrutura denominada fruto, Angiospermae - do grego: *angos* - "urna" e *sperma* - "semente". **Classe:** Magnoliopsida (Dicotyledonae) - plantas com flor, cujo embrião (semente) contém dois ou mais cotilédones. **Subclasse:** Rosidae **Ordem:** Fabales - **Família:** Leguminosae - característica típica dessa família é a ocorrência do fruto do tipo legume, também conhecido como vagem, exclusivo desse grupo **Subfamília:** Caesalpinioideae **Gênero:** *Hymenaea* (CARVALHO, 2007).

2.1.1.2 Família *Leguminosae*

A família *Leguminosae* compreende 650 gêneros e mais de 18 mil espécies mundialmente distribuídas (POLHILL; RAVEN, 1981), representando uma das maiores famílias de angiospermas, superada apenas em número de espécies pelas famílias *Orchidaceae* e *Asteraceae* (JOLY, 1998). Esta família é uma das mais ricas na flora brasileira, encontrando-se representada nas várias formações fitogeográficas do país (RIZZINI, 1971).

No bioma cerrado esta é a família botânica que comporta o maior número de espécies e a primeira entre as mais importantes em termos de números de espécies lenhosas, arbustos e árvores (SILVA et al., 2001). A família *Leguminosae* se subdivide em três subfamílias: *Mimosaceae*, que compreende cerca de 60 gêneros e 3000 espécies, sendo a menor dentre as leguminosas; *Caesalpiniaceae*, com cerca de 150 gêneros e 2800 espécies; *Fabaceae*, maior subfamília das leguminosas, com aproximadamente 482 gêneros e 12000 espécies (JOLY, 1998; BARROSO, 2002). As plantas leguminosas apresentam um grande potencial na conservação de solos, pois juntamente com a microbiota do solo fixam o nitrogênio atmosférico, através do processo de nodulação em suas raízes (POLHILL; RAVEN, 1981). Além disso, as leguminosas têm um potencial econômico muito grande, pois são fornecedores de alimentos através de seus frutos, medicamentos ou substâncias medicinais, pesticidas, combustíveis e produtos utilizados nas indústrias (SCHWANTES; WEBERLING, 1981).

2.2 ASPECTOS BOTÂNICOS DO GÊNERO *Hymenaea*.

A palavra *Hymenaea* deriva do grego "*Hymen*" e significa "deus das uniões" em alusão às duas folhas (folíolos) unidas, característica das plantas deste gênero. O nome popular jatobá vem da língua tupi, *va-atã-yba*, que significa "árvore de fruto duro" (BARROSO, 1991).

Ceratia foi o primeiro nome dado ao gênero *Hymenaea* descrito por Bauhin em 1623; duas décadas mais tarde, PISO (1642) e MARCGRAF (1648) descreveram o gênero com o nome de *Jaetaíba* (apud LEE; LANGENHEIM 1975). Meio século depois, ainda PLUMIER (1703), (apud LEE; LANGENHEIM 1975), escolheu o nome *Courbaril* para esse gênero. Apenas em 1737, Linnaeus, ao se referir ao mesmo

gênero, escolheu o nome *Hymenaea*, referência ao deus grego Himeneu, fazendo alusão aos dois folíolos pareados das folhas. Muitas outras espécies desse gênero seriam descritas mais tarde por outros botânicos, por exemplo, HAYNE, BENTHAM, HUBER, DUCKE, LEE e LANGENHEIM (MORENO, 2009).

2.2.1 Distribuição do gênero *Hymenaea*.

Aproximadamente 25 espécies do gênero *Hymenaea* têm sido descritas na literatura como originadas do continente americano. Na maioria das espécies a madeira é de alto valor comercial (MARTIN et al., 1972). Este gênero é considerado predominantemente neotropical com 16 espécies distribuídas desde o México até a América do Sul.

No Brasil, ocorrem 13 espécies (KODAMA; SARTORI, 2007) tanto em matas pluviais como em matas secas, também no México, América Central, Índias Ocidentais e quase todos os países da América do Sul. (CORRÊA, 1984; RIZZINI, 1985) sendo conhecido popularmente como jatobá, jutaí ou jataí (LEE; LANGENHEIM, 1975).

As espécies mais frequentes no Brasil são *Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex. Hayne e *Hymenaea courbaril* L. A *Hymenaea courbaril* podendo ser encontrada desde a floresta amazônica até a floresta estacional semidecidual no sudeste do país, sob a forma de diferentes variedades (CASTELEN, 2005). Já a *Hymenaea stigonocarpa* Mart. Ex. Hayne, também conhecida como jatobá-do-cerrado, jutaí, jatobá-capo, jatobá-de-casca-fina, jitaí ou jutaica ocorre na Caatinga e no Cerrado principalmente nos estados do Piauí, Bahia, Goiás, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul e São Paulo (CORRÊA, 1984; LORENZI, 1992).

Todas as espécies deste gênero têm hábito arbóreo, que vão desde árvores com 3 metros de altura como *H. stigonocarpa*, até representantes com mais de 40 metros vegetando em mata atlântica como *H. courbaril*. Ocorrem em uma diversidade de habitats, variando desde a mata equatorial até o cerrado e a caatinga, (LEE; LANGENHEIM, 1975).

2.2.2 Estudos taxonômicos

Devido a denominações diferentes (*Hymenaea* e *Trachylobium*), houve controvérsias quanto à taxonomia inicial do gênero *Hymenaea*, Lee e Langenheim (1975) realizaram uma pesquisa comparando detalhadamente a morfologia, citologia e a química da resina de exemplares catalogados nestes dois gêneros e optaram pela denominação taxonômica *Hymenaea*.

Porém ainda são necessárias revisões taxonômicas, para agregar categorias infraespecíficas pautadas em características morfológicas inconsistentes. Como exemplo desta falta de especificidade tem-se *H. stigonocarpa* Hayne var. *brevipetiolata* N. Mattos que pode ser diferenciada de sua variedade típica por apresentar folíolos relativamente menores, pubescentes na face adaxial e densamente tomentosos na face abaxial e pecíolos curtos e densamente tomentosos (LEE; LANGENHEIM, 1975).

O estudo morfológico de plântulas pode subsidiar os procedimentos taxonômicos, pois fornece numerosas características que devem contribuir com a melhor delimitação das espécies. Além disso, pode favorecer o reconhecimento de estruturas transitórias, as quais desaparecem com o desenvolvimento da planta, mas que podem ser importantes no estabelecimento das relações filogenéticas. Também o manejo, a conservação e a reconstituição de florestas tropicais são beneficiados com os estudos de morfologia de plântulas que possibilitam a identificação dos táxons em suas fases juvenis (FLORES; BENEVIDES, 1990; FERREIRA, 1997).

2.2.3 Avaliação morfológica

Estudos da morfologia de plântulas em *Hymenaea* realizados por Flores e Benevides (1990) e Ferreira (1997), contribuíram com as descrições de semente, germinação e plântulas para *H. courbaril* L. e *H. stigonocarpa* Mart. ex Hayne, respectivamente. Porém, esses autores não estabeleceram o valor diagnóstico dos caracteres morfológicos das plântulas de *Hymenaea* (KODAMA; SARTORI, 2007).

Segundo De Carvalho et al., (2005), conhecer a biometria de frutos é importante para acrescentar dados morfológicos à espécie e, suas variações em diferentes locais podem ser encaradas como resultado de seleção e adaptação das

espécies em resposta as pressões do ambiente em que vivem. Para Vieira e Gusmão (2008) a biometria de frutos e sementes é importante para a identificação da variabilidade existente nas espécies nativas, podendo com isso, segundo Cruz et al., (2001) fornecer subsídios importantes para a diferenciação de espécies do mesmo gênero.

De Carvalho et al., (2005) estudaram a biometria dos frutos de jatobá-do-cerrado (*Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex. Hayne) e observaram que os frutos apresentaram 5 a 6 sementes em média. O comprimento, a largura e o peso de frutos variaram de 5 a 17 cm, 3,0 a 6,7 cm e 19,95 a 110,06 g, respectivamente.

2.2.4 Desenvolvimento das espécies de *Hymenaea*

Quanto ao desenvolvimento inicial de plântulas, alguns estudos foram realizados com o objetivo de avaliar o desenvolvimento inicial dessa espécie em diferentes condições de sombreamento em viveiro. Foi observado que a espécie *H. courbaril* var. *stilbocarpa* (Hayne) Lee & Lang, de ocorrência em Matas de Galeria, apresenta, aos 21 meses de idade, grande plasticidade de crescimento quanto a diferentes níveis de sombreamento, podendo ser utilizada na recuperação dessas matas de Galeria desde condições de bordas e clareiras até o fechamento de dossel (MAZZEI et al., 1999).

Outra espécie também avaliada é *H. stigonocarpa* que apresenta uma menor plasticidade, se comparada a espécie *H. courbaril* var. *stilbocarpa* (Hayne) Lee & Lang, uma vez que mostra tendência de crescimento mais eficiente sob condições de maior luminosidade o que coincide com a ocorrência da espécie em ambientes naturais mais abertos como o cerrado (MENDONÇA et al., 1998). Esta espécie apresenta, portanto, potencial para plantios a pleno sol podendo ser utilizada em locais onde a vegetação de cerrado foi removida (RAMOS et al., 2004).

Ao avaliar o stress hídrico a que diferentes indivíduos de *Hymenaea* são submetidos, Locosselli (2010) observou que a espécie *H. courbaril* suporta estoque limitado de água do solo, apesar desta espécie apresentar raízes não tão profundas, sendo este estresse contornado pela presença de estômatos menores e de rápido controle de abertura e fechamento.

Outra espécie *H. stigonocarpa*, apresenta outro tipo de stress hídrico, por ocorrer em regiões de maior irradiação solar e em ambientes mais abertos,

apresentando uma maior taxa de perda por transpiração, o que é contornado pela existência de estômatos maiores e de menor controle (LOCOSSELLI, 2010). Além disso, foi avaliado por Gomes et al., (2013) que a manifestação dos eventos reprodutivos nesta espécie ocorrem em função das estações do ano, com frutificação no período seco e floração no final do período seco e início do chuvoso.

2.2.5 A descrição botânica da espécie *Hymenaea stigonocarpa*

A espécie avaliada no presente estudo foi *Hymenaea stigonocarpa* Mart ex Hayne (Jatobá), pertencente ao gênero *Hymenaea*, esta planta foi selecionada, pois, em outras espécies deste gênero foram isoladas várias substâncias que apresentaram importantes atividades farmacológicas comprovadas. Além disso, foi observada uma vasta utilização popular dessa espécie (SOUZA; FELFILI, 2006; NETO G. G., 2006; VILA VERDE et al., 2003; RODRIGUES; CARVALHO, 2001)

Hymenaea stigonocarpa é uma árvore decídua. As árvores maiores atingem dimensões próximas de 20 m de altura e 50 cm de DAP (diâmetro à altura do peito, medido a 1,30 m do solo), na idade adulta apresenta tronco tortuoso, com fuste curto, ramificação dicotômica e a copa baixa (Figura 1).

Figura 1 - Árvore *Hymenaea stigonocarpa* com cerca de 20 metros de altura.



Fonte: Dimech, G.S Fazenda refúgio - Camocim de São Félix – PE.

A casca mede até 3 cm de espessura, sendo a superfície da casca externa ou ritidoma profundamente sulcada, de coloração pardo-avermelhada, com cristas planas e duras e a casca interna apresenta-se estratificada, com listras paralelas mais claras e escuras (Figura 2).

Figura 2 - Casca do caule de *Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne.



Fonte: Dimech, G.S Fazenda refúgio - Camocim de São Félix – PE

As folhas são alternas, compostas bifolioladas, pecioladas, com estípulas caducas; folíolos curtos peciolulados e subsésseis; limbo com 6 cm a 23,5 cm de comprimento e 3,5 cm a 7 cm de largura, elíptico a ovado-reniforme, de pergaminoso a coriáceo (Figura 3), freqüentemente com pontuações translúcidas (CARVALHO, 2007).

Figura 3 - Folhas de *Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne.



Fonte: Dimech, G.S Fazenda refúgio - Camocim de São Félix – PE.

A Inflorescência apresenta-se em cimeiro terminal, bracteada, com até 30 flores que são grandes, com pétalas pouco excedentes ao cálice (Figura 4).

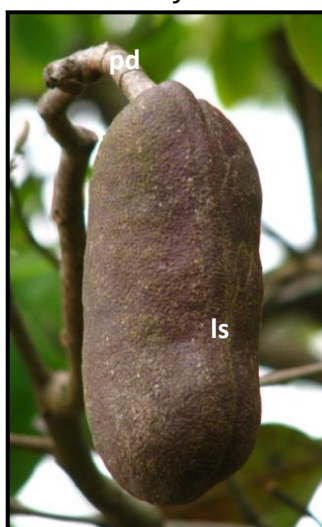
Figura 4 - Inflorescência do jatobá do cerrado (*Hymenaea stigonocarpa* Mart.ex Hayne)



Fonte: <http://www.portalsaofrancisco.com.br/alfa/jatoba/jatoba-3.php>

O fruto é um legume seco, indeiscente, monospérmico ou polispérmico (mais comum), alongado, ápice arredondado ou levemente retuso, base arredondada e margem inteira ou levemente ondulada, medindo 8,7 cm a 20 cm de comprimento, 2,1 cm a 6,5 cm de largura e 2,0 cm a 4,3 cm de espessura (Figura 5).

Figura 5 - Vista frontal do fruto de *Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne:



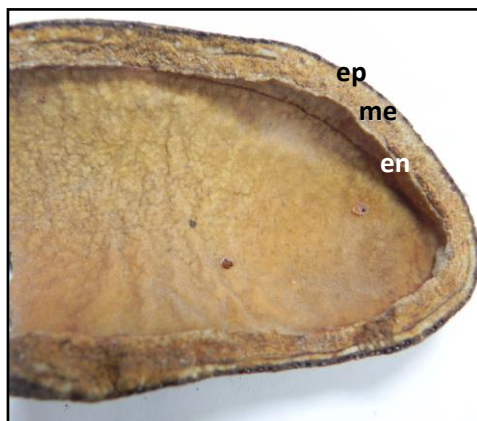
ls – linha de sutura; pd – pedúnculo.

Fonte: Dimech, G.S Fazenda refúgio - Camocim de São Félix – PE

A textura é rugosa devido à presença de pontuações, pequenas, salientes e arredondadas (Figura 6). Apresenta a linha de sutura proeminente circundando todo

o fruto; a cor varia do marrom-claro ao marrom-escuro (quase negro). Em cada fruto, ocorrem de uma a seis sementes.

Figura 6 - Seção longitudinal do fruto de *Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne



en - endocarpo; ep - epicarpo; me - mesocarpo.

Fonte: Dimech, G.S Fazenda refúgio - Camocim de São Félix – PE

Figura 7 - Seção transversal do fruto de *Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne

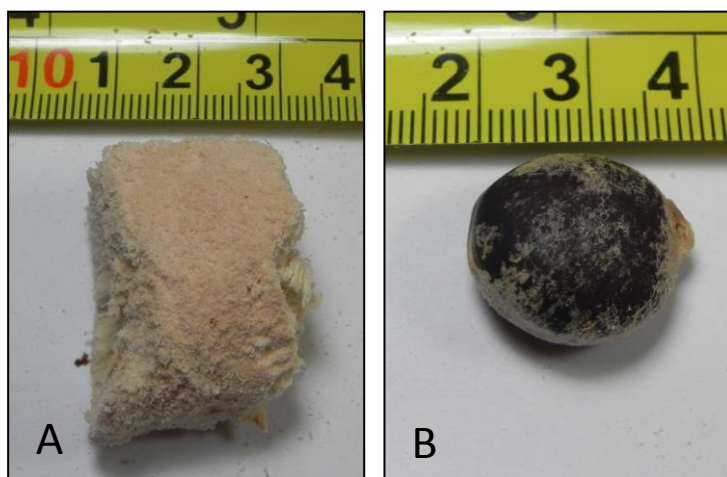


ar - arilo; cv - cavidade do fruto; en - endocarpo; ep - epicarpo; me - mesocarpo; ls - linha de sutura.

Fonte: Dimech, G.S Fazenda refúgio - Camocim de São Félix – PE

A Semente é globosa, largo-oblonga, obovada, comprimida, com ápice arredondado ou levemente truncado e base arredondada ou afinada; superfície irregular, com algumas depressões, medindo 17,8 mm a 28,4 mm de comprimento e 9,3 mm a 19,7 mm de espessura. Envolvendo as sementes, há o arilo, amarelo-esverdeado, macio, fibroso-farináceo (Figura 7 e 8), com cheiro característico e sabor doce, constituindo a polpa (CARVALHO, 2007).

Figura 8 - Aspectos da semente de *Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne.



A: semente envolvida por arilo; B: Semente sem arilo.

Fonte: Dimech, G.S Fazenda refúgio - Camocim de São Félix – PE

2.3 ESTUDOS QUÍMICOS NAS ESPÉCIES DO gênero *Hymenaea*.

Das espécies de *Hymenaea* já estudadas, verifica-se que entre as classes de compostos isoladas predominam os terpenóides e flavonóides. Os flavonóides destacam-se como fitoalexinas que atuam na defesa das plantas (INGHAM, 1982). As espécies do gênero *Hymenaea* tem predominância de diterpenóides baseados nos esqueletos do labdano, abietano e pimarano (FARIA *et al* , 2004), sendo diterpenos bicíclicos já isolados de espécies de *Hymenaea* como *H. verrucosa*, *H. oblongifolia* e *H. parvifolia*.

2.3.1 Terpenos identificados no gênero *Hymenaea*.

Foram identificados terpenos em diferentes espécies do gênero *Hymenaea*.

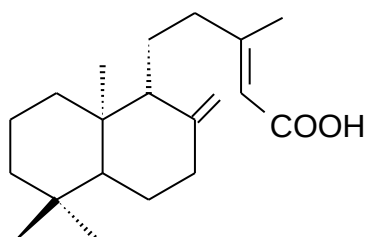
2.3.1.1 *Hymenaea courbaril*

Do gênero *Hymenaea* a espécie *H. courbaril* é a espécie mais estudada (NAKANO; DJERASSI 1961) e a mais difundida (LANGENHEIM *et al.*,1973).

2.3.1.1.1 Terpenos identificados na resina do tronco.

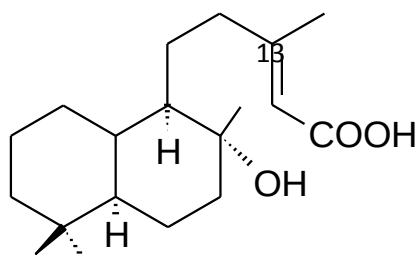
A investigação da resina comercial da *Hymenaea courbaril* realizada por Nakano e Djerassi (1961), levou ao isolamento de um composto diterpênico oleoso denominado ácido copálico (Figura 9).

Figura 9 - Ácido copálico isolado da resina de *H. courbaril*.



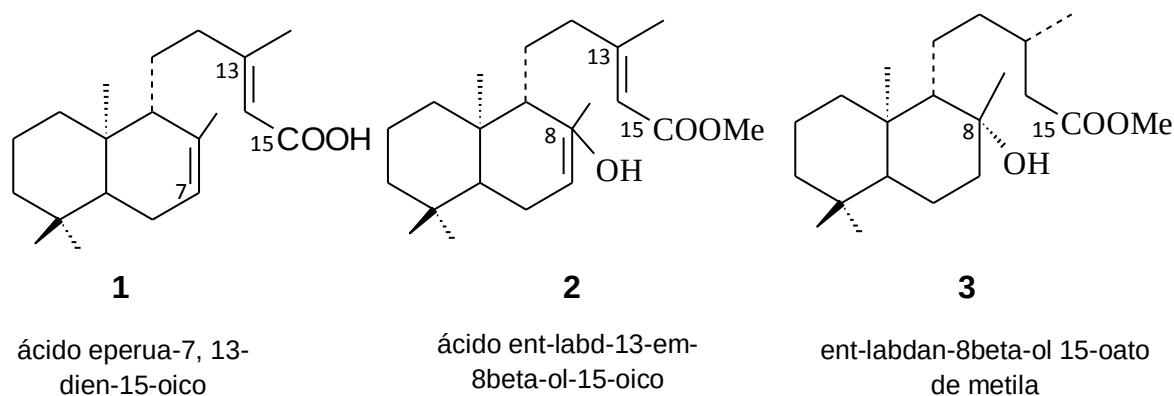
A partir da resina do tronco da *Hymenaea courbaril* coletada na região amazônica, analisada por Langenheim et al., (1973), foi isolado e identificado, após metilação com diazometano, um composto diterpênico o labd-13-em-ol 15-oato de metila (Figura 10).

Figura 10 - terpeno labd-13-em-ol 15-oato de metila isolado de *H. courbaril*.



Na avaliação da resina do tronco da *Hymenaea courbaril* coletada na região de Campinas (São Paulo), em 1975, Marsaioli et al., isolaram os seguintes compostos: ácido eperua-7, 13-dien-15-oico (1), ácido ent-labd-13-em-8beta-ol-15-oico (2) e um composto na forma de éster metílico, após tratamento com diazometano, o ent-labdan-8beta-ol 15-oato de metila (3) (Figura 11).

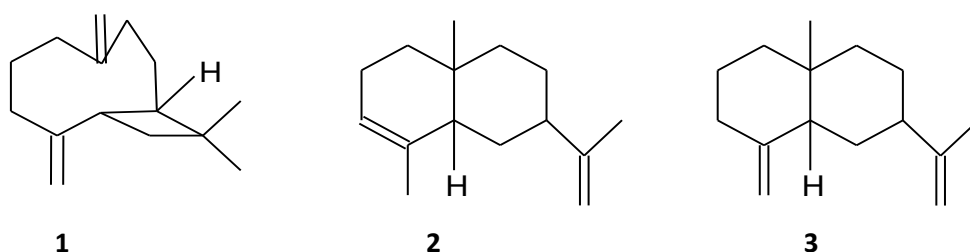
Figura 11 - Terpenos isolados da resina do tronco da *Hymenaea courbaril* coletada na região de Campinas.



2.3.1.1.2 Terpenos identificados nas resinas das folhas.

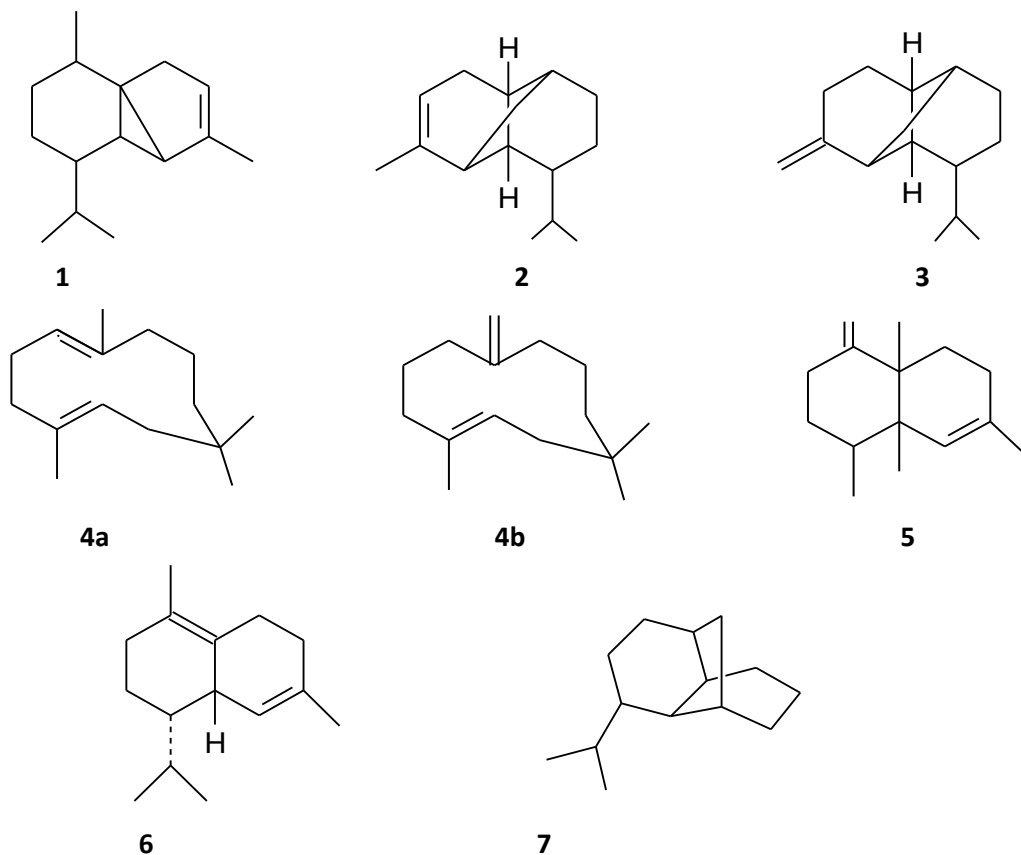
Também em 1972, Langenheim estudando agora as resinas encontradas nas folhas da *Hymenaea courbaril*, constatou a presença de vários compostos sesquiterpênicos. Foram identificados nove compostos, onde o principal constituinte foi o cariofileno (26,6%) (1) seguido por β -selineno (18,4%) (2) e α -selineno (17,6%) (3) (Figura 12).

Figura 12 - Principais constituintes das resinas encontradas nas folhas da *Hymenaea courbaril*, cariofileno (1), β -selineno (2) e α -selineno (3).



Os demais compostos encontrados em menor escala foram: alfa-cubebeno (1) (0,8%), α -copaeno (2) (9,4%), beta-copaeno (3) (5,7%), alfa e beta-hemuleno (4a e 4b) (5,7%), γ -muroleno (5) (3,5%) e delta-cadineno (6) (6,6%) e mais um composto não identificado (3,4%) que através do tempo de retenção foi sugerido ser copacanfeno (7), (Figura 13).

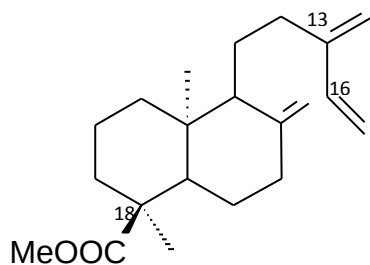
Figura 13 – Constituintes encontrados em menor escala, das resinas das folhas da *Hymenaea courbaril*: alfa-cubebeno (1), α -copaeno (2), beta-copaeno (3), alfa e beta-hemuleno (4a e 4b), γ -muroleno (5), delta-cadineno (6) e copacanfeno (7).



2.3.1.1.3 Terpenos identificados na resina dos frutos.

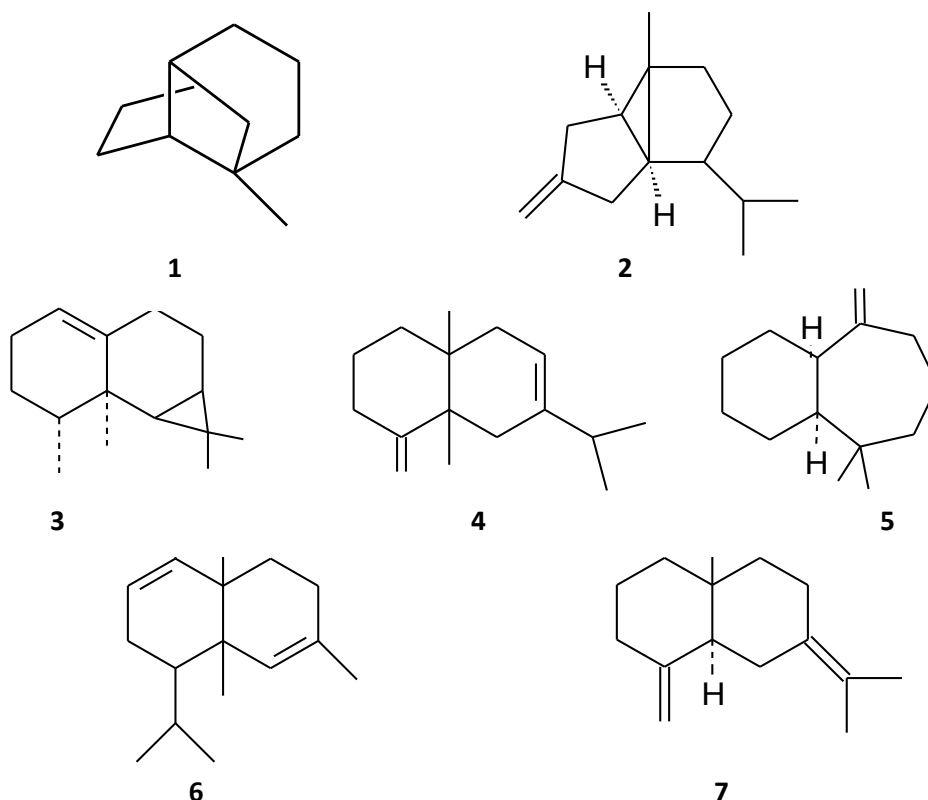
Ourisson et al., (1973) estudando a resina da casca do fruto da *Hymenaea courbaril*, isolaram quatro diterpenos bicíclicos, os quatro compostos foram: ácido enatio-8(17),13(16),14-labdatrien-18-oico (1) e os outros compostos. (Figura 14).

Figura 14 - Composto diterpênico identificado na resina proveniente da casca do fruto da *Hymenaea courbaril*, ácido enatio-8 (17),13(16),14-labdatrien-18-oico.



Além destes compostos diterpênicos, foram identificados compostos sesquiterpênicos (Figura 15) como ciclosativeno (1), β -bourbuneno (2), cariofileno (3), calareno (4), hemuleno²², Selina-4(14)-7-dieno (5), α -himacaleno (6), α -muroleno (7), δ -cadileno²⁴, Selina-4(14)-7-dieno e catorze compostos não identificados.

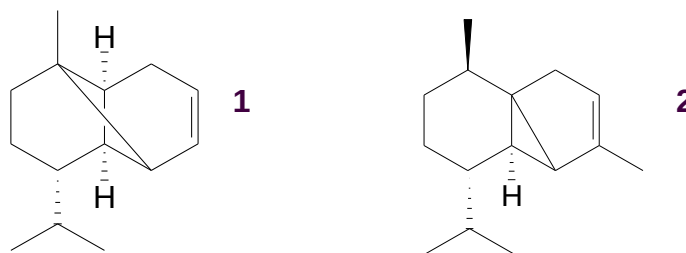
Figura 15 - Compostos sesquiterpênicos identificados na resina proveniente da casca do fruto da *Hymenaea courbaril*, ciclosativeno (1), β -bourbuneno (2), cariofileno (3), calareno (4), hemuleno²², Selina-4(14)-7-dieno (5), α -himacaleno (6), α -muroleno (7)



2.3.1.1.4 Terpenos identificados nas folhas

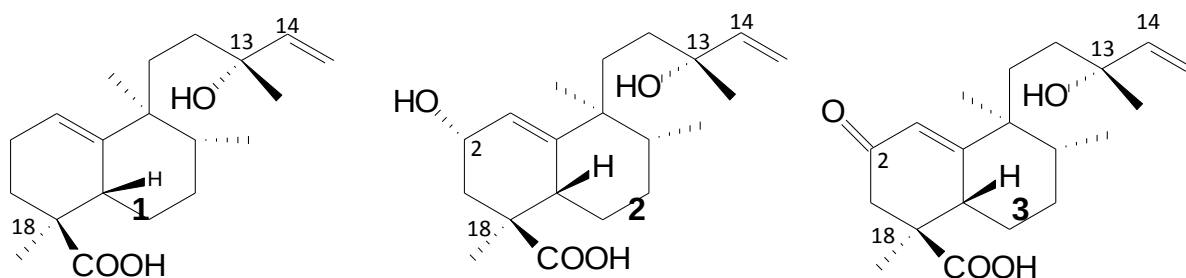
Em 1972 Martin et al., isolaram das folhas os sesquiterpenos α -copaeno (1) e α -cubebeno (2), com atividade antimicrobiana (Figura 6). Em 1986, Langenheim et al., isolaram também das folhas da *Hymenaea courbaril* os sesquiterpenos: β -cariofileno e γ -muroleno (Figura 16).

Figura 16 - Estruturas dos sesquiterpenos isolados das folhas de *H. courbaril*, b-cariofileno (1) e γ -muroleno (2).



Abdel-Kader et al., em 2002 isolaram das folhas e galhos diterpenos do tipo halimadieno, ácido (13*R*)-13-hidroxi-1(10),14-*ent*-halimadien-18-oico (1), ácido (2*S*,13*R*)-2,13-dihidroxi-1(10),-14-*ent*-halimadien-18-oico (2), e ácido (13*R*)-2-oxo-13-hidroxi-1(10),14-*ent*-halimadien-18-oico (3) (Figura 17) com atividade citotóxica.

Figura 17 - Estruturas dos diterpenos isolados das folhas e galhos de *H. courbaril*, ácido (13*R*)-13-hidroxi-1(10),14-*ent*-halimadien-18-oico (1), ácido (2*S*,13*R*)-2,13-dihidroxi-1(10),-14-*ent*-halimadien-18-oico (2), e ácido (13*R*)-2-oxo-13-hidroxi-1(10),14-*ent*-halimadien-18-oico (3)



Das folhas, galhos e do tronco foram isolados diterpenos do tipo halimadieno (CUNNINGHAM et al., 1974), os quais apresentaram atividade citotóxica frente a células tumorais humanas de ovário, linhagem A2780 (ABDEL-KADER et al., 2002). Também foi avaliado o efeito repelente do jatobá a formigas por Wiemer e Hubbel em 1983, após alguns ensaios, os autores verificaram que o epóxido do cariofileno era o composto responsável pela resistência nessa espécie de planta contra o ataque de formigas.

Barbosa et al., 2007 estudando o extrato hidroacetônico de folhas de *H.courbaril* var. *stilbocarpa* obtiveram, após partição líquido-líquido com *n*-

hexano/água, uma fase orgânica (FO, 2%) e uma aquosa (FA, 8%) sendo identificados os sesquiterpenos muuroladieno e patchuleno e um diterpeno clerodânico.

2.3.1.1.5 Terpenos identificados nas cascas dos frutos

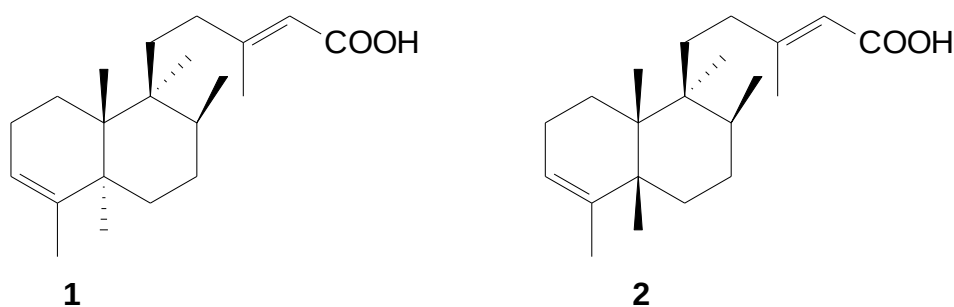
Aguiar et al., (2010) avaliando a composição química dos óleos essenciais das cascas de frutos de *Hymenaea courbaril* identificaram a presença de vários terpenos. Quanto às cascas dos frutos maduros os principais constituintes foram os sesquiterpenos alfa-copaeno (11,1%), espatulenol (10,1%) e beta-selineno (8,2%), enquanto germacreno-D (31,9%), beta-cariofileno (27,1%) e biciclogermacreno (6,5%) foram os principais constituintes a partir de frutos verdes.

Também foram identificados a partir da casca de frutos maduros, os diterpenos ácido zanzibarico e ácido isoozico, juntamente com o sesquiterpeno caryolane-1, 9 β -diol, sendo o primeiro relato desse sesquiterpeno neste gênero.

2.3.1.1.6 Substâncias isoladas das sementes

Em 2001, Nogueira et al., isolaram das sementes diterpenos e entre eles dois novos clerodanos (Figura 18).

Figura 18 - Estruturas dos diterpenos isolados das sementes de *H. courbaril*, ácido (5R*,8S*,9S*,10R*)-cleroda-3,13E-dien-15-oico (1) e ácido (5S*,8S*,9S*,10R*)-cleroda-3,13E-dien-15-oico (2).



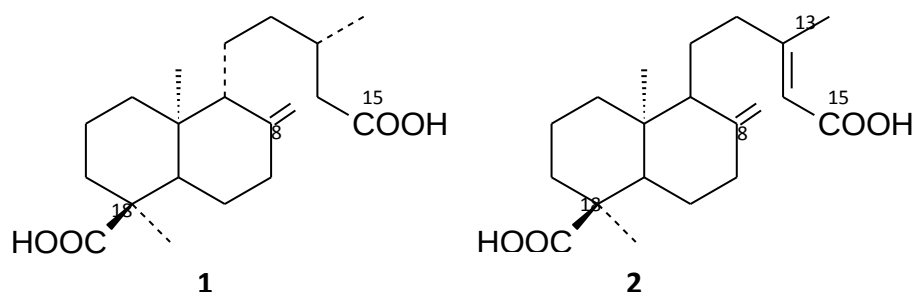
Em (2013) em um estudo realizado por Dias et al., quanto a composição nutricional das sementes e da polpa de *H. courbaril*, foi identificado que os

componentes bioativos mais abundantes são α -tocopherol (886.37 e 993.63 mg/kg) e β -sitosterol (61.83 e 91.09 mg/kg) para o óleo das sementes na poupa respectivamente

2.3.1.2 *Hymenaea oblongifolia*

A partir da análise da resina do tronco da *Hymenaea oblongifolia*, Langenheim et al., (1973) verificaram que 75% da fração ácida era constituída essencialmente por dois compostos (Figura 19).

Figura 19 - Principais constituintes da fração ácida da resina do tronco da *Hymenaea oblongifolia*, ácido enantio-pinifólico (ácido enantio-labd-8(20-em-15,18 dióico) (1), e o ácido guamáico (ácido enantio-labd-8(20),13-dien-15,18 dioico (2).



2.3.1.3 *Hymenaea verrucosa*

A partir da resina do tronco da *Hymenaea verrucosa*, Langenheim et al., (1973), isolaram o ácido enantio-8(17),13 (16),14-labdatrien-18-ico28, anteriormente estudado por Ourisson et al., (1973).

2.3.1.4 *Hymenaea stigonocarpa*

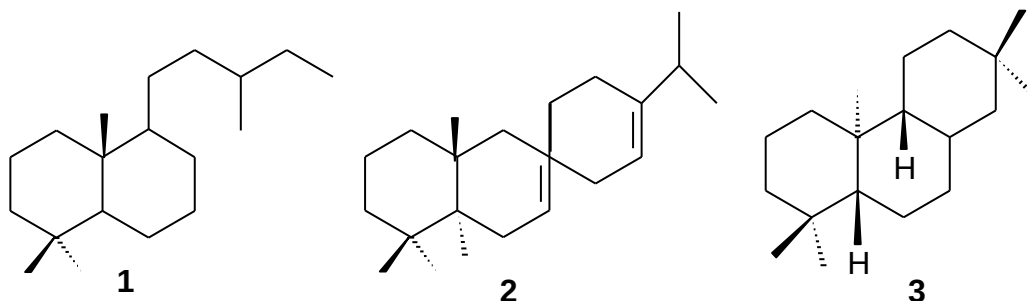
A resina produzida pela espécie *H. stigonocarpa* conhecida como "jutaicaica" e "copal", é utilizada na indústria de vernizes e como medicamento no tratamento de cistite e problemas respiratórios (ALMEIDA et al., 1998).

2.3.1.4.1 Terpenos identificados nas sementes

Na avaliação química da resina extraída das sementes desta planta observou-se que ela contém diterpenóides que possuem esqueletos estruturais do

tipo labdano (1), abietano (2) e pimarano (3), conforme demonstrado na Figura 20 (FARIA et al., 2004).

Figura 20 - Esqueletos estruturais do tipo lábdano (1) e abietano (2) e pimarano (3) da resina de *Hymenaea stigonocarpa*.



Em outro estudo, Matuda *et al.*, (2005), avaliaram que as sementes do jatobá apresentam alto teor de fibras totais, baixo teor de proteínas e lipídios. A fração lipídica apresentou predominância de 86% em ácidos graxos insaturados. A semente de jatobá mostrou-se pobre em macronutrientes quando comparada a leguminosas utilizadas na alimentação, mas o alto teor de fibras, possivelmente constituídas de xiloglucanas e galactomananas, pode levar ao aproveitamento rentável destas sementes.

Wiemer e Hubbel em (1983) pesquisaram o efeito repelente a formigas de algumas espécies de plantas, como por exemplo, o jatobá. Após alguns ensaios, os autores verificaram que o epóxido do cariofileno era o composto responsável pela resistência nessa espécie de planta contra o ataque de formigas.

2.3.1.4.2 Terpenos identificados nas folhas

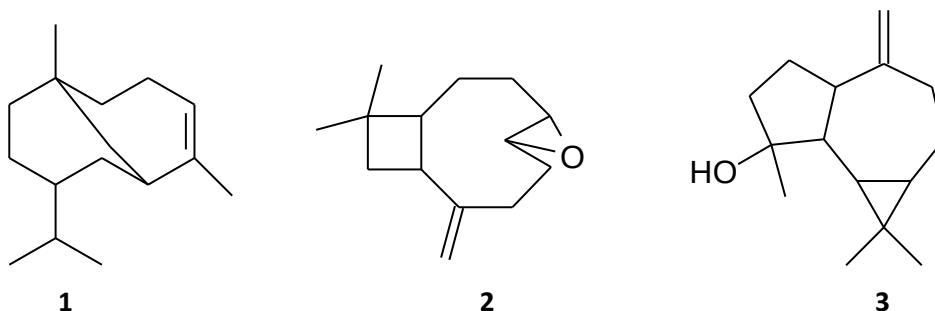
Das folhas desta espécie foram isolados dois sesquiterpenos o β -cariofileno e α -muroleno, com atividade antifúngica e ação repelente contra insetos (LANGENHEIM et al, 1986), já relatada por Wiemer & Hubbel em 1983.

2.3.1.4.3 Terpenos identificados no epicarpo

Foi realizada por Giacomini et al., (2006) a obtenção do extrato hexânico do epicarpo de *H. stigonocarpa*, obtendo-se uma fração ácida (FA) e uma neutra (FN).

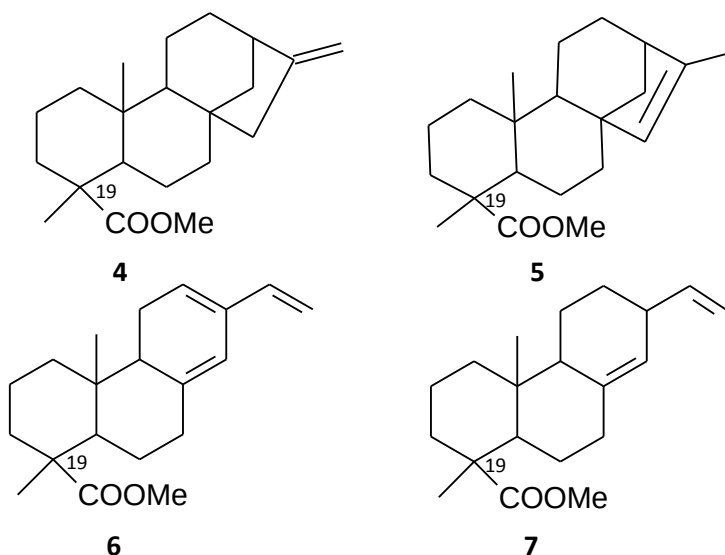
Cada fração correspondeu a aproximadamente 50% do total do extrato hexânico. Foram caracterizados três sesquiterpenos da fração neutra: α -copaeno (1) 4%, espatulenol (2) 13% e óxido de cariofileno (3) 9% (Figura 21).

Figura 21 - sesquiterpenos isolados da fração neutra das folhas de *H. stigonocarpa*, α -copaeno (1), espatulenol (2) e óxido de cariofileno (3).



Na fração ácida observou-se a presença de 4 isômeros diterpênicos majoritários: caur-16-en-19-ato de metila (4) 52%, caur-15-en-19-ato de metila (5) 20%, ozato de metila (6) 17% e isoozato de metila (7) 9%, (Figura 22), separados por cromatografia em sílica-gel.

Figura 22 - Diterpenos majoritários isolados da fração ácida das folhas de *H. stigonocarpa*, caur-16-en-19-ato de metila (4), caur-15-en-19-ato de metila (5), ozato de metila (6) e isoozato de metila (7).



2.3.1.4.4 Terpenos identificados na resina do tronco

Estudos realizados por Doménech-carbó et al., (2009), para caracterização da resina do tronco coletada de espécies de *Hymenaea stigonocarpa* Mart. Espécies coletadas da região de Minas Gerais mostraram que o ácido eperuico e seus isômeros, juntos com ácido copálico são os principais componentes da resina estudada. Outros componentes tais como ácido colavenico, ácido iso-ozico e ácido epi-pinifolico são também presentes na resina em menor proporção.

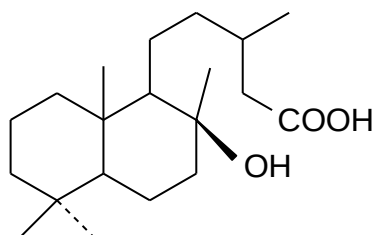
2.3.1.4.5 Terpenos identificados no alburno

O alburno foi submetido à extração com o solvente etanol e particionado entre o ciclohexano e acetato de etila e o extrato ciclohexânico foi submetido a fracionamento. A abordagem fitoquímica revelou a presença de esteróides e triterpenóides. Foram identificados cinco compostos no extrato ciclohexânico: N-N-dietildecanamida, Hexadecanoato de metila, Ácido hexadecanóico, Ácido 9-octadecenóico, Ácido octadecanóico (VALENTIN, 2006).

Do extrato de acetato de etila foram identificados os ácidos oleico, linoleico, estearico e palmítico (MARANHÃO et al., 2013).

A análise da resina do tronco da *Hymenaea parvifolia* por CLG mostrou que 62% dela era constituída por ácido enantio-13-epilabdanóico (Figura 23) de acordo com NORIN et al., (1963).

Figura 23 - Estrutura do ácido enantio-13-epilabdanóico isolada de *H. parvifolia*.



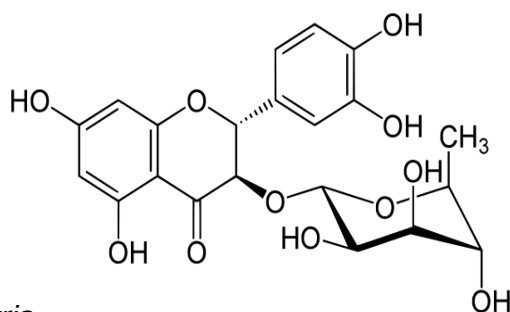
2.3.2 Flavonóides identificados no gênero *Hymenaea*.

Foram identificados flavonóides em diferentes espécies do gênero *Hymenaea*.

2.3.2.1 *Hymenaea parvifolia*

Em 1999 Ishibashi et al., isolaram também da resina do tronco de *Hymenaea parvifolia*, o flavonóide glicosilado astilbina (Figura 24).

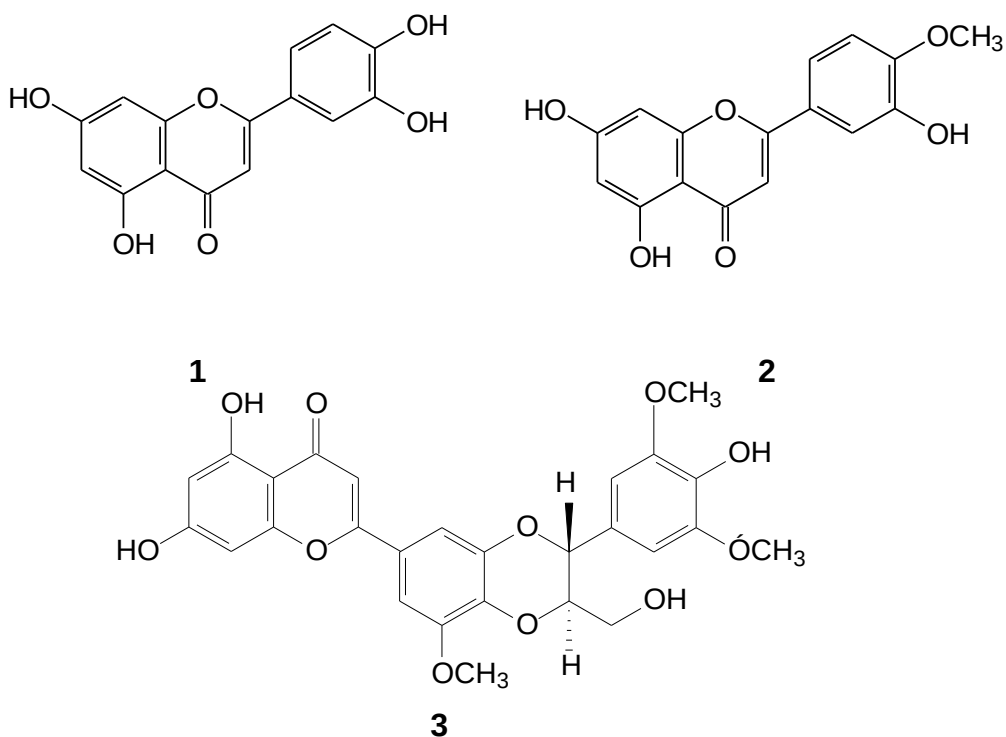
Figura 24 - Estrutura da astilbina



2.3.2.2 *Hymenaea palustris*

Pettit et al., (2003) isolaram os flavonóides do tipo luteolina (1), crisoeriol (2), palstatina (3), entre outros das folhas de *Hymenaea palustris* (Figura 25), esses compostos apresentaram potente atividade inibitória frente a patógenos Gram-negativos como a *Neisseria gonorrhoeae*. A palstatina atua como inibidor do crescimento de células leucêmicas linfóticas tipo P388

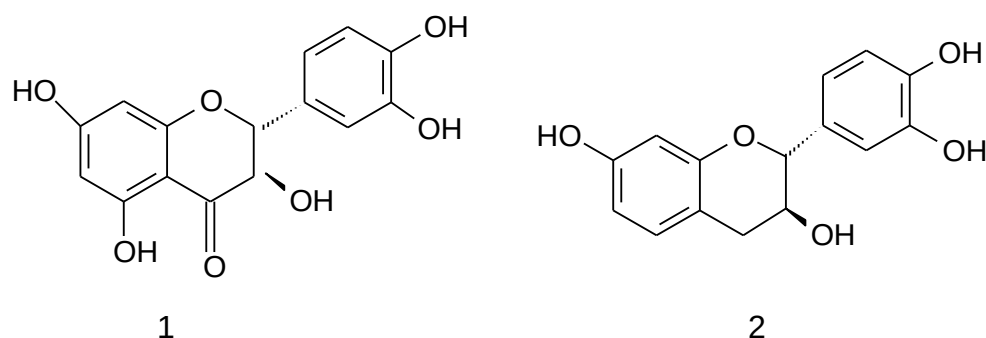
Figura 25 - Estruturas de flavonóides isolados das folhas de *H. palustres*, luteolina (1), crisoeriol (2) e palstatina (3).



2.3.2.3 *Hymenaea courbaril*

Suzuki et al., (2008) isolaram dois flavonóides do alburno de *H. courbaril*, a taxifolina (1) e o fisetinidol (2), ambos com atividade antioxidante (Figura 26).

Figura 26 - Estruturas dos flavonóides isolados do cerne de *H. courbaril*, taxifolina (1) e o fisetinidol (2).



2.3.2.4 *Hymenaea stigonocarpa*

Foram identificados flavonóides em diferentes partes da espécie *Hymenaea stigonocarpa*.

2.3.2.4.1 Flavonóides identificados na casca do caule

As análises cromatográficas realizadas do extrato de acetato de etila da casca de *Hymenaea stigonocarpa* realizadas por Lovato e Nunes em 2007 sugeriram que este extrato contém como principal componente o flavonóide astilbina (diidroquercetina-3-O-ramnosil). O fracionamento do extrato em coluna de sílica levou ao isolamento de dois flavonóides, dos quais o mais abundante (F34/42) foi identificado como astilbina por CCD, em comparação com amostra autêntica.

O espectro de infravermelho obtido para a amostra isolada corresponde exatamente ao da amostra autêntica. O comportamento cromatográfico e o espectro de infravermelho do segundo flavonóide isolado (F27/28) sugerem fortemente que se trata de quercetina-3-ramnosil.

Em um estudo realizado por Moulari et al., em 2006, foi isolado e caracterizado nas folhas de *Harungana madagascariensis* o flavonóide astilbina, o

mesmo isolado por Ishibashi et al., (1999) em *H. parvifolia* e por Lovato e Nunes (2007) em *H. stigonocarpa*, segundo Moulari é a astilbina a responsável pela atividade antibacteriana do extrato de acetato de etila de *Harungana madagascariensis*.

Este flavononol também foi isolado de flores de *Dimorphandra mollis* Benth. (Fabaceae, Caesalpinioideae), e apresentou um importante efeito inibitório sobre a enzima mieloperoxidase, enzima implicada em processos oxidativos em sistemas biológicos. (PETACCI, et al., 2008).

2.3.2.4.2 Flavonóides identificados no alburno.

O alburno foi submetido à extração com o solvente etanol e particionado entre o ciclohexano e acetato de etila, do extrato de acetato de etila foram identificados quatro flavonoides. Dentre os flavonoides o principal constituinte (uma flavonona) foi identificado como hultenina, os outros flavonoides identificados foram taxifolina, quercetina e 7-methoxcatequina (MARANHÃO et al., 2013).

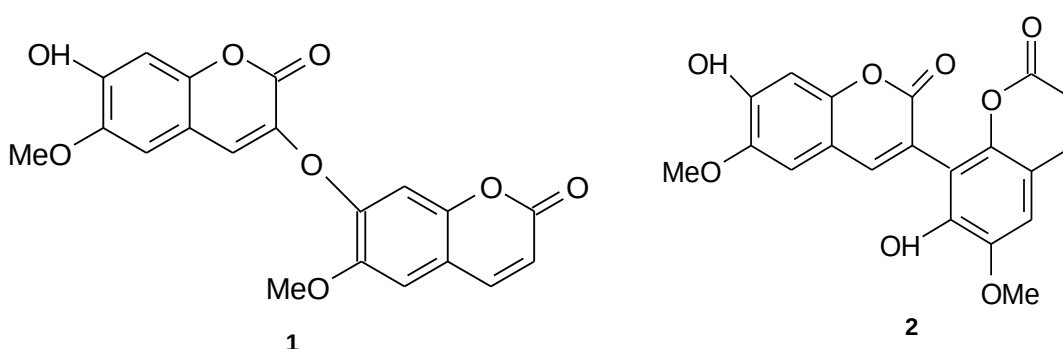
2.3.3 Cumarinas identificadas no gênero *Hymenaea*.

Foi identificada a presença de cumarinas apenas na espécie *Hymenaea courbaril*.

2.3.3.1 *Hymenaea courbaril*

Em 2009 Simões et al., isolaram duas cumarinas (Figura 27), das sementes de *H. courbaril* com atividade antifúngica.

Figura 27 - Estruturas das cumarinas isoladas das sementes de *H. courbaril*, ipomopsina (1) e hymenaina (2).



2.3.4 Taninos relatados no gênero *Hymenaea*.

Foram identificados taninos em diferentes espécies do gênero *Hymenaea*.

2.3.4.1 *Hymenaea courbaril*

Em estudo realizado por Caramori et al., (2004) foi observado que as sementes de *H. courbaril* apresentam uma grande quantidade de taninos.

Sasaki et al., (2009) descrevem que *H. courbaril* contém compostos bioativos tais como terpenóides e açúcares, além disso, há relatos que vários terpenóides ou compostos fenólicos possuem atividade antibacteriana. A casca do jatobá contém um grande número de procianidinas e parece ser um bom material para investigação de sua bioatividade, ela pode aliviar alguns dos sinais clínicos associados com a encefalite alérgica experimental (EAE), uma doença desmielinizante inflamatória do sistema nervoso central, sendo os componentes ativos responsáveis pela atividade biológica as procianinas do jatobá.

2.3.4.2 *Hymenaea stigonocarpa*

Orsi e colaboradores (2012) descrevem no extrato metanólico da casca do caule de *Hymenaea stigonocarpa*, após a análise por CLAE-DAD, a ocorrência de picos com espectros de UV característicos de derivados de catequinas e de ácido gálico além da ocorrência de catequinas poliméricas.

2.4 ESTUDOS FARMACOLÓGICOS NOS EXTRATOS OBTIDOS A PARTIR DE DIFERENTES ESPÉCIES DO GÊNERO *Hymenaea*.

2.4.1 Estudos etnofarmacológicos

Foram realizados estudos etnofarmacológicos em diferentes espécies do gênero *Hymenaea*.

2.4.1.1 *Hymenaea courbaril*

Segundo Martins (1989), na Amazônia, os nativos costumam ingerir a seiva da *Hymenaea courbaril* para tratamento das afecções pulmonares, devendo, entretanto, fazê-lo em pequenas doses, pois como é adstringente, causa constipação intestinal; acrescenta ainda que da casca do caule, pode ser feito chá pelo método de decocção para lavar ferimentos e para irritações vaginais.

A casca do ramo é utilizada para problemas como tosse, bronquite, catarro, asma e fraqueza pulmonar, sendo utilizada uma colher de sopa da casca do ramo picada em uma xícara (café) de água em fervura, sendo fervido durante 5 minutos e posteriormente coado, acrescentando-se uma colher (café) de açúcar cristal e uma colher (sopa) de mel de abelha. Deve-se ingerir uma colher (sopa), de 1 a 3 vezes ao dia (PANIZZA, 1998).

Numa descrição realizada por BONTEMPO (2000), a casca em cozimento é aconselhada para combater hemoptises, hematúria (emissão de urina com sangue), diarreia, disenteria, cólicas ventosas, e acrescenta que o vinho de jatobá retirado do caule é um poderoso fortificante. LEONARDI (2002) relata que o chá da casca é bom medicamento para a próstata, podendo ser ingerido várias vezes ao dia, e a resina pode ser aplicada em forma de emplastro sobre as partes doloridas do corpo. Veiga Júnior (2005) descreve que em doses elevadas, o jatobá (*H. courbail*), são utilizadas como expectorante e fortificante, mas podem desencadear reações alérgicas.

2.4.1.2 *Hymenaea stigonocarpa*

Em mais um levantamento realizado junto às comunidades rurais do sul do Estado de Minas Gerais, na microrregião do Alto Rio Grande, sobre quais as espécies nativas eram utilizadas na medicina popular. Contando-se com a colaboração de 13 raizeiros em campo, foi descrito que a *Hymenaea stigonocarpa* esteve entre as espécies utilizadas na medicina popular, sendo preparado como decocto ou infuso as partes como casca e ramos mais velhos, tendo indicação para bronquites, tosses, coqueluche, adstringente e nas afecções da bexiga e próstata (RODRIGUES; CARVALHO, 2001).

Hymenaea stigonocarpa também está entre as principais plantas medicinais do cerrado utilizadas pela população da cidade de Mossâmedes, estado de Goiás. As principais formas de utilização da planta são através da decocção da casca do

caule, resina e polpa da fruta, que são indicados como depurativas contra afecções pulmonares (VILA VERDE et al., 2003). Em um levantamento etnobotânico que teve como alvo comunidades do entorno do Parque Nacional da Chapada dos Veadeiros e da cidade de Alto Paraíso observou-se que no elenco das dez espécies medicinais mais utilizadas, o jatobá (*Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne) foi coincidente na indicação de todos os entrevistados: tendo seu uso relatado como depurativo, antiinflamatório, estimulante de apetite, fortificante e rico em ferro. (SOUZA; FELFILI, 2006).

Outro estudo que relatou o uso de plantas medicinais entre os habitantes do pantanal mato-grossense, a espécie *Hymenaea stigonocarpa* Mart. teve a atividade da resina, que desprende da casca do caule, relatada que quando moída e aspirada é utilizada no tratamento da sinusite (NETO, 2006). Quando deixada de molho, serviria para as dores de estômago, do peito e das costas. O chá da casca seria utilizado nas machucaduras do corpo humano e nas fraturas. Também é preparado um vinho da seiva desta espécie, é tido como fortificante.

2.4.1.3 *Hymenaea parvifolia*

Em estudo etnobotânico, realizado na comunidade negra de Curiaú no estado do Amapá, apontam que o chá ou xarope da casca do caule de *Hymenaea parvifolia* é utilizado para o tratamento de tosse, bronquite, febre, diarreia, disenteria, cólicas e asma, como também como hemostático, fortificante e vermífugo (SILVA, 2002).

2.4.2 Avaliação farmacológica

Foram realizadas avaliações farmacológicas em diferentes espécies do gênero *Hymenaea*.

2.4.2.1 *Hymenaea courbaril*

Vários estudos farmacológicos também já foram realizados comprovando o uso popular desta espécie. Estudos quanto à toxicidade da resina da *Hymenaea courbaril* relatam que ela apresenta efeito tóxico e inibidor do apetite sobre o inseto *Spodoptera exigua* (STUBBLEBINE; LANGENHEIN, 1977).

Extratos das suas cascas apresentaram atividade moluscicida (MARSTON et al., 1996), assim como atividade *in vitro* anti-plasmódio (KÖHLER et al., 2002).

Quanto aos estudos relacionados a atividades inseticida, três diterpenos isolados por Aguiar (2009) dos frutos de *Hymenaea courbaril*: ácido zanzibárico e ácido isoóxico e o sesquiterpeno caryolano-1,9-diol, identificado pela primeira vez nesta espécie, apresentaram ação larvicida frente ao *Aedes aegypti*, cujos valores de CL_{50} foram iguais a $14,85 \pm 0,44$ ppm e $28,44 \pm 0,27$ ppm para frutos verdes e maduros respectivamente (AGUIAR, 2009)..

Quanto à avaliação da atividade antiinflamatória, o pericarpo da planta apresentou atividade antiinflamatória, 5-lipooxigenase e ação inibitória contra tiroquinase (TAKAGI et al., 1999) e inibição da pigmentação induzida pela radiação UV (TAKAGI et al., 2002).

Jayaprakasam et al., (2007) isolou dos frutos de *H. courbaril* o ácido labdanólico e espatulenol, terpenos que possuem atividade antiinflamatória cuja inibição da ciclo-oxigenase II (COX II) foi da ordem de 43 e 54% para ácido labdanólico e espatulenol, respectivamente.

Em estudo realizado por Bezerra et al., (2013) foi demonstrado que a fração acetato de etila da casca do caule de *Hymenaea courbaril* apresenta potencial atividade antioxidante, miorelaxante além da anti-inflamatória já anteriormente descrita, confirmando o uso popular no tratamento de doenças inflamatórias aéreas, tais como a asma, não sendo porém determinadas os metabólitos responsáveis por esta ação.

Quanto a atividade antioxidante, Aguiar et al., (2009) descreve a atividade do extrato metanólico que apresentou valores de CI_{50} de 0,04 mg/L. Atividade também observada por Peixoto et al (2013) avaliando os extratos hidroalcoólico e metanólico das sementes, polpa, folha e casca de *Hymenaea courbaril* que apresentaram altos teores de fenóis totais e flavonóides

Na avaliação da atividade antimicrobiana foi observado que diterpenos isolados das folhas de *Hymenaea courbaril* apresentam marcada atividade fungicida (HUBBELL et al., 1983). Esta espécie também foi descrita como capaz de tratar infecções urinárias, sendo observado em estudo realizado por CARAMORI et al. (2004) altos níveis de atividade enzimáticas do extrato etanólico da semente.

FERNANDES et al. (2005), realizou uma avaliação da atividade antimicrobiana de extratos pela técnica de difusão em ágar empregando-se o método de difusão em poço e determinou a concentração inibitória mínima (CIM) para o extratos de *H. courbaril*, mediante a utilização de estreptococos do grupo

mutans (EGM) e *Staphylococcus* sp. Na concentração de 2,5 mg/mL, 54,0% dos *Staphylococcus* sp. foram inibidos, enquanto para os estreptococos do grupo *mutans* a dose de 1,25mg/mL foi capaz de inibir apenas 35% da população.

Esses extratos apresentaram atividade frente os micro-organismos Gram-positivos, principalmente contra *Staphylococcus aureus*, mas não inibiram os micro-organismos Gram-negativos e a *Candida albicans*.

Resultados confirmados por GONÇALVES et al., (2005), que também descrevem que o extrato hidroalcoólico preparado a partir da casca de planta exerce atividade contra *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus*. Como também por Aleixo et al., (2013) que demonstrou a ação do extrato hidroalcoólico da casca frente a isolados clínicos de *Staphylococcus aureus* meticiclina resistente (MRSA) apresentando uma CIM de 500µg/mL.

Aleixo et al., (2013) ainda descreve que a associação do extrato hidroalcoólico de *Hymenaea courbaril* com o extrato de *Stryphnodendron adstringens* na proporção de 1:1 levou a redução da CIM para 31,25µg/mL demonstrando assim a existência de um efeito sinérgico.

2.4.2.2 *Hymenaea stigonocarpa*

Extratos obtidos a partir de ciclohexano, acetato de etila e metanol a partir do alburno apresentaram grupo de compostos que se mostraram tóxicos e com propriedades contra cupins (*Nasutitermes corniger*) (SANTANA et al., 2010).

Maranhão et al., (2013) avaliando a ação do extrato de acetato de etila do alburno e dos flavonoides isolados a partir desta fração (hultenina, quercetina, taxifolina and 7-metoxcatequina) frente à *Nasutitermes corniger*, observou que todos apresentam atividade, sendo o extrato de acetato de etila, mais ativo que as frações isoladas, não existindo diferenças significativas entre os diferentes flavonoides isolados.

Quanto a citotoxicidade, a avaliação da ação de compostos isolados do epicarpo de *Hymenaea stigonocarpa* frente a células tumorais humanas observou-se que de três substâncias isoladas a partir do extrato hexânico do epicarpo de *Hymeneae stigonocarpa* caur-16-en-18-ato de metila (1), caur-15-en-18-ato de metila (2) e caur-16-en-18-ol (3) respectivamente. A substância caur-16-en-18-ol foi capaz

de inibir significativamente o crescimento das três linhagens de células avaliadas: H460, Colo 205 e U937 (BRASIL et al., 2009).

Analizando a citotoxicidade celular dos compostos medida pela quantificação de LDH (Desidrogenase láctica) demonstrou-se que os compostos 1 e 2 anteriormente descritos, não foram capazes de induzir a liberação da enzima enquanto que o 3 foi capaz de induzir a liberação de LDH nas maiores concentrações testadas (BRASIL et al., 2009).

Guimarães et al., (2009), avaliando a toxicidade aguda do extrato metanólico da entrecasca de *Hymenaea stigonocarpa* observou que o ele não produz alterações comportamentais até a dose de 1000mg/Kg, porém a partir desta dose os camundongos apresentam diarreia e letargia, reversíveis em 24h. Quanto ao trânsito gastrointestinal o mesmo no intestino mostrou-se aumentado, enquanto o esvaziamento gástrico mostrou-se reduzido.

Estudos de Orsi et al., (2012) mostraram que a administração por via oral de 5mg/Kg do extrato metanólico da casca do caule não produz nenhum sinal de toxicidade aguda em animais machos ou fêmeas (ratos), assim como não leva a mortes, nem mudanças de peso corporal ou de órgãos quando avaliados por um período de 14 dias após a administração.

Guimarães et al., (2009) avaliando a atividade antiulcerogênica da entrecasca observaram que o extrato metanólico possui atividade nos modelos de úlcera gástrica induzida por indometacina e isquemia-reperfusão e sendo portante no modelo de úlcera gástrica induzida por etanol. Também foi observado que o extrato metanólico (obtido por maceração) apresenta atividade inibitória sobre a liberação induzida de histamina a partir de mastócitos (FERREIRA, 2011).

Além disso, outros estudos demonstram que o extrato metanólico da casca apresenta efeito antidiarreico, gastroprotetor, contra vários agentes ulcerogênicos, esse efeito gastroprotetor é acompanhado da prevenção da depleção de GSH e inibição da atividade de mieloperoxidase na mucosa duodenal, e atividade cicatrizante. Esses efeitos observados são atribuídos à ação antioxidante devido à presença de taninos condensados e flavonoides (ORSI et al., 2012)

O extrato de acetato de etila do alburno mostrou também atividade antioxidante contra radicais DPPH, sendo mais ativo quando comparado a flavonoides isolados a partir deste mesmo extrato, sendo sugerida por Maranhão et al. (2013) que pode ocorrer um efeito sinérgico entre os flavonoides presentes no

extrato o que explicaria essa maior atividade. Mesma atividade antioxidante observada por Peixoto et al (2013), que avaliou a atividade dos extratos hidroalcoólico e metanólico do fruto da *Hymenaea stigonocarpa*.

Quanto à ação antimicrobiana, em estudo realizado por Valentim (2006) utilizando o alburno de *Hymenaea stigonocarpa*, o extrato em acetato de etila apresentou atividade antimicrobiana, pelo método de difusão em disco, frente ao *Staphylococcus aureus*, tendo também apresentado resultado significativo frente à bactéria álcool-ácido-resistente (*Mycobacterium smegmatis*).

Valeriano et al., (2010) avaliando a atividade antimicrobiana a partir do alburno observaram que o extrato ciclohexânico apresentou atividade frente ao *Staphylococcus aureus*, confirmando os resultados de Valentin (2006), deste extrato foram identificados os compostos: hexadecanoato de metila, ácido hexadecanóico, ácido octadecanóico e ácido 9-octadecenóico.

Novamente avaliando a ação antimicrobiana, foi preparado um extrato etanólico da casca de *Hymenaea stigonocarpa* que apresentou uma CIM de 250 µg/mL para *Staphylococcus aureus*, *Candida krusei* e *Cryptococcus neoformans*, porém não apresentou atividade significativa frente à *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans* CIM de 1000 µg/mL além de significativa atividade antioxidante, provavelmente associadas à presença de taninos (MARQUES et al., 2013).

2.4.2.3 *Hymenaea martiana*

Foram isolados a partir do extrato etanólico da casca de *Hymenaea martiana*, β-sitosterol-3-O-glicosídeo e três ramnosídeos (eucrypina, engelitina e astilbina). O glicosídeo eucrypina causou um deslocamento dependente de concentração da curva de resposta da bradicinina (BK) do útero isolados de ratas. Em contraste, astilbina e engelitina causaram apenas um discreto deslocamento à direita do BK (antagonismo) as contrações induzidas (CARNEIRO et al., 1993).

Em outro estudo, o extrato etanólico da casca do caule obtido por maceração e as frações hexano, clorofórmio e acetato de etila, apresentam atividade antinociceptiva observada pelo método das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético, possivelmente pela inibição da síntese de prostaglandinas (SILVA et al., 2011).

Silva et al, (2010) avaliando o extrato etanólico e as frações hexano, clorofórmio e acetato de etila, descreveu a existência de atividade antioxidante, sendo o extrato acetato de etila o mais ativo, seguido pelo extrato etanólico e as frações hexano e clorofórmio.

Resultados confirmados por SILVA et al., (2011), onde foi observado que o extrato etanólico da casca de *Hymenaea martiana* e a fração de acetato de etila obtida por partição apresentaram uma marcada atividade antioxidante. Análises fitoquímicas demonstraram que a fração etanólica contém polifenóis, flavonoides, esteroides e terpenóides, sendo a presença de polifenóis nestes extratos essencial para essa propriedade, os polifenóis descritos são possivelmente ácido cinâmico, flavan-3-ol ou derivados de flavanonas.

Quanto a atividade antimicrobiana, os extratos aquoso, butanólico e hidroalcoólico obtidos da casca de *Hymenaea martiana* apresentam atividade frente a *Cryptococcus neoformans* e *C. gatii* com CIM entre 2 a 64 µg/ML, sendo as frações etanólica e hidroalcoólica as mais ativas. Souza et al., (2010) também demonstraram a atividade da *H. martiana* frente à dermatófitos (*Trichophytum rubrum*, *Trichophytum mentagrophytes*, *M. canis*), sendo os menores valores de CIM os obtidos a partir das frações aquosa e butanólica nas três espécies estudadas.

2.4.2.4 *Hymenaea parvifolia*

Em 1999 Ishibashi et al., identificaram dois dihidroflavonois rhamnosídeos isolados da casca de *Hymenaea parvifolia*: neoastilbina e astilbina, que apresentaram efeitos inibitórios sobre a caseína quinase II (CK-II) de forma dose-dependente.

REFERÊNCIAS

- ABDEL-KADER, M., BERGER, J.M., SLEBODNICK, C., HOCH, J., MELONE, S., WISSE, J.H., WERKHOVEN, M. C. M., MAMBER, S., KINGSTON, D. G. I. Isolation and absolute configuration of ent-halimane diterpenoids from *Hymenaea courbaril* from the Suriname rain forest. **Journal of Natural Products**. v.65 n.1, p. 11-15, 2002.
- AGUIAR, J. C. D. A., Estudo fitoquímico e biológico de *Hymenaea Courbaril* L. 139p. **Dissertação de Mestrado (Química)** – Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, Fortaleza, CE. 2009.
- AGUIAR, J. C., SANTIAGO, G. M., LAVOR, P. L., VERAS, H. N., FERREIRA Y. S., LIMA M. A., ARRIAGA, A. M., LEMOS T. L, LIMA JQ, DE JESUS HC, ALVES PB, BRAZ-FILHO R. Chemical Constituents and Larvicidal Activity of *Hymenaea courbaril* Fruit Peel. **Natural Product Communications**. v.5, n.12, p.1977-80, 2010.
- ALEIXO, A. A., CAMARGOS, V. N., ANDRADE, A. C. S. P., SANTOS, M., CARVALHO, R. S., MIRANDA, V. C., HERRERA, K. M. S., MAGALHÃES, J. T., LIMA, L. A. R. S., FERREIRA, J. M. S. Propriedades antibióticas dos extratos de *Stryphnodendron adstringens* E *Hymenaea courbaril* (Fabaceae), frente ao isolado clínico *Staphylococcus aureus* metecicina-resistente (MRSA), **Biochemistry and Biotechnology Reports**, v. 2, n. 2, p. 85-88, 2013.
- ALMEIDA, S. P., PROENÇA, C. E. B., SANO, S. M. RIBEIRO, J. F. **Cerrado: espécies**
BARBOSA M. P. C. , GIAMPIETRO G. S., CARDOSO-LOPES E. M., YOUNG M. C. M.
BARROSO, G. M. **Sistemática de angiospermas do Brasil**. Viçosa: UFV, Imprensa Universitária, v.2, 1991.
- BARROSO, G. M., PEIXOTO, A. L., COSTA, C. G. **Sistemática de angiospermas do Brasil**. Viçosa: UFV, Imprensa Universitária, 2002.
- BOLZANI V. S., TORRES L. M. B., Sesquiterpenos e diterpeno clerodânico do extrato hidroacetônico de folhas de *Hymenaea courbaril* var. *Stilbocarpa* (Heyne) Lee & Lang. In: **30ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, águas de Lindoia, 2007.
- BONTEMPO, M. **Medicina natural**. São Paulo – SP: Nova Cultural, 584p, 2000.
- BRASIL, T. R., ANDREÃO, P. S. S., MIRANDA, P. C. M. L, GIACOMINI R. A, BORGES, F. V., KANASHIRO, M. M. avaliação in vitro da atividade citotóxica frente a células tumorais humanas de compostos isolados do epicarpo de *Hymenaea stigonocarpa*. CONFICT - **Congresso Fluminense de Iniciação Científica e Tecnológica**, UENF, Rio de Janeiro, RJ, 2009.
- CARAMORI, S. S., LIMA, C. S., FERNANDES, K. F. Biochemical characterization of selected plant species from Brazilian savannas. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 47, n. 2, p. 253-259, 2004.

CARNEIRO, E., CALIXTO, J. B., MONACHE, F. D., YUNES, R. A. 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

CARVALHO, P. E. R., **Jatobá-do-Cerrado *Hymenaea stigonocarpa*, circular técnica 133**, Colombo, Embrapa, Paraná, 2007.

CASTELLEN, M. S. Avaliação do estado de conservação de populações naturais de jatobá (*Hymenaea courbaril* L.) por meio de análises de estrutura genética e autocorrelação espacial. 2005. 104p. **Tese (Doutorado em Ecologia)** – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, USP, Piracicaba, 2005.

CHOVANOVÁ, R., MIKULÁŠOVÁ, M., VAVERKOVÁ, S. In Vitro Antibacterial and Antibiotic Resistance Modifying Effect of Bioactive Plant Extracts on Methicillin-Resistant *Staphylococcus epidermidis*. **International journal of microbiology**, v. 2013, p. 1-9, 2013.

CORRÊA, M. P. **Dicionário das Plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro, Ministério da Agricultura, IBDF, v.4, p. 500-503, 1984.

CRONQUIST, A. **An integrate system of classification of flowering plants**. New York: Columbia University Press, 1262p, 1981.

CUNNINGHAM, A. MARTIN, S. S., LANGENHEIM J. H., Labd-13-en-8-ol-15-oic acid in the trunk resin of amazonian *Hymenaea courbaril*, **Phytochemistry**, v.13, n.1, p. 294-295, 1974.

DE CARVALHO, P. S., MIRANDA, S. C., SANTOS, M. L. Germinação e dados biométricos de *Hymenaea stigonocarpa* Mart. Ex Hayne (Leguminosae salpinoideae jatobá do cerrado). **Revista Anhanguera**, v. 6, n. 1, p.101 - 116. 2005.

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, Pages 610-618, 2013.

DIMECH, G. S., SOARES, L. A. L., FERREIRA, M. A., DE OLIVEIRA, A. G. V., CARVALHO, M. D. C., & XIMENES, E. A. 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. 1–8, 2013.

DOMÉNECH-CARBÓ, M. T., CRUZ-CAÑIZARES, J., OSETE-CORTINA, L., DOMÉNECH-CARBÓ, A., DAVID, H., Ageing behaviour and analytical characterization of the Jatobá resin collected from *Hymenaea stigonocarpa* Mart. **International Journal of Mass Spectrometry** v. 284, n. 1-3, 1, p. 81-92, 2009.

FARIA, D. L. A., EDWARDS, H. G.M., AFONSO, M. C., BRODY, R. H., MORAIS J. L. Raman spectroscopic analysis of a *tembetá*: a resin archaeological artefact in need of conservation. **Spectrochimica Acta**, v.60, p.1505–1513, 2004.

FERNANDES, T. T., SANTOS A. T. F., 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.

FERREIRA, R. A. *Caracterização morfológica de frutos, sementes, plântulas e mudas de espécies arbóreas do cerrado de Minas Gerais*. **Dissertação de Mestrado**, Curso de Pós-Graduação em engenharia Florestal, UFLA, Lavras, 1997.

FERREIRA, T. L. Prospecção de inibidores da secreção de histamina a partir de espécies vegetais do Cerrado e da Mata Atlântica. 81p. **Dissertação de Mestrado** - Curso de Pós-Graduação Ciências Biológicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2011

FESSENDEN, R. J. **Organic chemistry**. Boston: Willard Grant Pres, 1982.

FLORES, E. M. & BENEVIDES, C. E. Germinación y morfología de la plántula de *Hymenaea courbaril* L. (Caesalpinaceae). **Revista de Biología Tropical**, v. 38, n., p. 91-98, 1990.

GIACOMINI, R. A., LIGIÉRO, C. B. P., ANDREÃO, P. S. S., MIRANDA, P. C. M. L., BRAZ-FILHO, R., Estudo Fitoquímico do Extrato Hexânico do Epicarpo de *Hymenaea stigonocarpa* (Jatobá do Cerrado) Sociedade Brasileira de Química (SBQ) **29ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, 2006.

GIBBONS, S. Anti-staphylococcal plant natural products. **Natural products reports**. v. 21; p. 263-277, 2004

GIBBONS, S., OHLENDORF, B., JOHNSON, I. The genus *Hypericum*-available resource of anti-Staphylococcal Leads. **Fitoterapia**, v.73, n.4, p.300-304, July 2002.

GOMES, J. M., CARDOSO, J. A., PAULA, T. E. G., UCHÔAS, E. G., MARANGON, L. C. Padrões reprodutivos e marcação de árvores matrizes de Jatobá, *Hymenaea stigonocarpa* (FABACEAE), Araçuaí – MG. In: **64º Congresso Nacional de Botânica**, Belo Horizonte, 2013.

GONÇALVES, A. L., ALVES FILHO, A., MENEZES, H., Estudo comparativo da atividade antimicrobiana de extratos de algumas árvores nativas, **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.72, n.3, p.353-358, 2005.

GUIMARÃES, M. A. F., PIRES, R. A., LIMA, J. C. S., MARTINS, D.T.O., Avaliação da atividade antiulcerogênica de *Hymenaea stigonocarpa* (Mart.) Hayne (Caesalpinaceae), In: **IV simpósio ibero-americano de plantas medicinais**, Cuiabá, 2009

HEMAISWARYA, S., KRUTHIVENTI, A. K., DOBLE, M. Synergism between natural products and antibiotics against infectious diseases.(REVIEW). **Phytochemistry**. v. 15; p. 639 – 652. 2008

HOERLLE, J. L., BRANDELLI, A., Antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from the intensive care unit of a general hospital in southern Brazil, **The Journal of Infection in Developing Countries**, v. 3, n.7, p. 504-510, 2009.

HUBBELL, S. P., WIEMER, D. F., ADEJARE, A. An antifungal terpenoid defends a neotropical tree (*Hymenaea*) against attack by fungus-growing ants (*Atta*). **Oecologia** v.60, p.321-327, 1983.

INGHAM, J. L., Phytoalexin production by *Ononis* species. **Biochemical Systematics and Ecology** v. 10, n.3, p. 233-237, 1982

ISHIBASHI, M., ODA, H., MITAMURA, M., OKUYAMA, E., KOMIYAMA, K., KAWAGUCHI, H., WATANABE, T., ALVES, S. M. MAEKAWA, T., OHTSUK, K. Casein Kinase II Inhibitors isolated from two Brazilian plants *Hymenaea parvifolia* and *Wulffia baccata*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v9, p. 2157-2160, 1999.

JAYAPRAKASAM, B., ALEXANDER-LINDO, R. L., DEWITT, D. L., MURALEEDHARAN, N. G. Terpenoids from Stinking toe (*Hymenaea courbaril*) fruits with cyclooxygenase and lipid peroxidation inhibitory activities. **Food Chemistry**, 2007.

JOLY, A. B. **Botânica: Introdução à taxonomia vegetal**. 12^a ed., São Paulo: Companhia Editora Nacional, p. 371-380, 1998.

KODAMA, M. T., SARTORI, A. L. B., Caracterização morfológica de plântulas de *Hymenaea stigonocarpa* var. *stigonocarpa* Mart. Ex Hayne, *H. stigonocarpa* Hayne var. *brevipetiolata* N. Mattos e *H. courbaril* L. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, supl. 1, p. 663-665, 2007

KÖHLER, I., JENETT-SIEMS, K., SIEMS, K., HERNÁNDEZ, M. A., IBARRA, R. A., BERENDSOHN, W. G., BIENZLE, U., EICH, E. *In vitro* antiplasmodial investigation of medicinal plants from El Salvador. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 57, p. 277-281, 2002.

LANGENHEIM, J. H., CONVIS, C. L., MACEDO, C. A. STUBBLEBINE, W. H., *Hymenaea* and *Copaifera* leaf sesquiterpenes in relation to lepidopteran herbivory in southeastern Brazil, **Biochemical Systematics and Ecology** v. 14, n.1, p. 41-49, 1986.

LANGENHEIM, J. H., HALL G. D., "Sesquiterpene deterrence of a leaf-tying lepidopteran, *Stenoma ferrocaneola*, on *Hymenaea stigonocarpa* in Central Brazil," **Biochemical Systematics and Ecology**, n.11, p. 29–36, 1983.

LANGENHEIM, J. H., LEE, Y., MARTIN, S. S. An evolutionary and ecological perspective of Amazonian *Hylaea* species of *Hymenaea* (Leguminosae: Caesalpinioideae). **Acta amazonica**, v.3, n.1 p. 5-38, 1973.

LANGENHEIM, J. H. Leguminous resin-producing trees in Africa and South America. Pages 89-104 in: **Tropical Forest Ecosystems in Africa as South America: A comparative review** MEGGERS, B. J., AYENSU, E. S., DUCKWORTH, W. D., eds. Smithsonian Press, Washington DC. 1972.

LEE, Y. T. & LANGENHEIM, J. H. Systematics of genus *Hymenaea* L. (Leguminosae, Caesalpinioideae, Detarieae). **University of California Publication in Botany**, v.69: n 98, 1975.

LEONARDI, C. R. *Etnofitoterapia regional utilizada pela população de Paranaíta, MT*. 43f. **Monografia de Conclusão de Curso** (Licenciatura Plena em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual de Mato Grosso, Campus Universitário de Alta Floresta, Alta Floresta, MT, 2002.

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

LOCOSSELLI, G M, Análise integrada de dendrocronologia, anatomia e isótopos estáveis de carbono a duas espécies de Jatobá (*Hymenaea*, LEGUMINOSAE) para a identificação de possíveis efeitos da elevação de CO₂ atmosférico e mudanças climáticas. 91p. **Dissertação de Mestrado (Ciências)** - Instituto de Biociências – Departamento de Botânica, USP, São Paulo, 2010.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa: Ed. Plantarum, 352p. 1992.

LOVATO, G. A. & NUNES, D. S. Obtenção de astilbina de *Hymenaea stigonocarpa* martius. In: **VII Encontro de Pesquisa da UEPG**, Ponta Grossa, 2007.

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

MARQUES, M. C. S., HAMERSKI, L., GARCEZ, F. R., TIEPPO, C., VASCONCELOS, M., TORRES-SANTOS, E. C., CHANG, M., GARCEZ, W. S. Vitrobiological screening and evaluation of free radical scavenging activities of medicinal plants from the Brazilian Cerrado, **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 7, n.15, p. 957-962, 2013.

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

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

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

MARTINS, J. E. C. **Plantas medicinais de uso na Amazônia**. 2. ed., Belém – Pará: Cultural CEJUP, 107p. 1989.

MATUDA T. G. & NETTO, F. M., Semente de jatobá-do-cerrado: caracterização química, **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.25, n.2, p.353-357, 2005.

MAZZEI, L. J., SOUSA-SILVA, J. C., FELFILI, J. M., RESENDE, A. V., FRANCO, A. C. Crescimento de plântulas de *Hymenaea courbaril* L.var. *stilbocarpa* (Hayne) em viveiro. **Boletim do Herbário Ezechias Paulo Heringer**, Brasília, v.4, p.21-29, 1999.

MENDONÇA, R. C., FELIFILI, J. M., WALTER, B. M. T., SILVA JUNIOR, M. C., REZENDE, A. V., FILGUEIRAS, T. S., NOGUEIRA, P. E. Flora vascular do Cerrado. In: SANO, S.M., ALMEIDA, S.P.de. **Cerrado: ambiente e flora**. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, P.289-556, 1998.

MORENO, M A, Estrutura e diversidade clonal de jatobá-do-cerrado (*Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex. Hayne) em duas populações no Cerrado do Estado de São Paulo. 115p. **Dissertação de Mestrado (Recursos Florestais)** – Escola superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2009.

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

NAKANO, T. & DJERASSI, C., Terpenoids. XLVI. Copalic Acid. **Journal of Organic Chemistry**. v. 26, p.167–173, 1961.

NETO G. G., O saber tradicional pantaneiro: as plantas medicinais e a educação ambiental, **Revista eletrônica do Mestrado de Educação Ambiental**, v. 17, p. 71-89, 2006.

NOGUEIRA, R. T., SHEPHERD, G. J., LAVERDE, A., MARSAIOLI, A J., & IMAMURA, P. M. Clerodane-type diterpenes from the seed pods of *Hymenaea courbaril* var. *stilbocarpa*. **Phytochemistry**, v. 58, n.8, 1153–7, 2001.

NORIN T., APLIN R. T., HALSALL T. G., The chemistry of triterpenes and related compounds. Part XLIII. The constituents of the bark of *Platanus x hybrida* Brot. and the structure of platanic acid. **Journal Chemical Society**, v. 1963, p. 3269-3273, 1963.

O'KENNEDY, R. & THORNES, R.D. **Coumarins: biology, applications and mode of action**. New York: John Willey, 1997.

ORSI, P. R. 1 BONAMIN, F., SEVERI, J. A., SANTOS, R. C., VILEGAS, W., HIRUMA-LIMA, C. A., DI STASI, L. C., "Hymenaea stigonocarpa Mart. ex Hayne: A Brazilian medicinal plant with gastric and duodenal anti-ulcer and antidiarrheal effects in experimental rodent models," **Journal of Ethnopharmacology**, no.143, pp.81–90, 2012.

OURISSON, G., KHOO, S. F., OEHLSCHLAGER, A. C., Structure and stereochemistry of the diterpenes of *Hymenaea courbaril* (Caesalpinioideae) seed pod resin, **Tetrahedron**, v.29 n.21, p.3379-88, 1973.

PANIZZA, S. **Plantas que curam (cheiro de mato)**. 15. ed. São Paulo: IBRASA, 279p, 1998.

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

PETACCI, F., FREITAS, S. S., OLIVEIRA, O. M. M. F., FERNANDES J. B., KHALIL, N. M., BRUNETTI, I. L., Efeito do flavonol astilbina sobre a atividade da mieloperoxidase, In: **Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, 31, 2008, Águas de Lindóia – SP,

PETTIT, G., MENG, Y., STEVENSON, C., DOUBEK, D., KNIGHT, J., CICHACZ, Z, PETTIT, R., CHAPUIS, J., SCHMIDT, J., Isolation and structure of palstatin from the Amazon tree *Hymenaea palustris*. **Journal of Natural Products** v.66, p.259-262. 2003.

POLHILL, R. M. & RAVEN, P. H. Advances in Legume Systematics. **Kew Royal Botanic. Gardens**, v.1, 1981.

RAKHOLIYA, K., & CHANDA, S. In vitro interaction of certain antimicrobial agents in combination with plant extracts against some pathogenic bacterial strains. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v.2, n.3, p.1466–1470, 2012.

RAMOS, K. M. O., FELFILI, J. M., SILVA, J. C. S., FAGG, C. W., FRANCO, A. C. Desenvolvimento inicial de Plântulas de *Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex. Hayne, sob diferentes condições de sombreamento.. **Brasil Florestal**, Brasília-DF, v. 1, n. 1, p. 1-1, 2004.

RIZZINI, C. T. **Plantas do Brasil - Árvores e madeiras úteis do Brasil: manual de dendrologia brasileira**. São Paulo: Edgard Blücher, 296 p.,1971.

RODRIGUES V. E. G & CARVALHO D. A., Levantamento etnobotânico de plantas medicinais no domínio do cerrado na região do Alto Rio Grande – Minas Gerais. **Ciência e Agrotecnologia**, v.25, n.1, p.102-123, 2001

SANTANA, A. L. B. D., , MARANHÃO O, C. A., SANTOS, J. C., CUNHA, F. M., CONCEIÇÃO, G. M., BIEBER L.W., NASCIMENTO, M. S. Antitermitic activity of extractives from three Brazilian hardwoods against *Nasutitermes corniger*. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 64, p. 7-12, 2010.

SASAKI K., MATSUKURA, Y., SHIJIMA K., MIYAKE M., FUJIWARA D., KNISHI Y., High-performace liquid chromatographic purification of oligomeric procyanidins, timers up to nonamers, derived from the bark of jatoba (*Hymenaea courbaril*), **Biosci. Biotechnol. Biochem**, v.73, n.6, p. 1274-1279, 2009.

SCALBERT, A. Quantitative methods for the estimation of tannins in plant tissues. In: HEMINGWAY, R. W.; LAKS, P. E. **Plant Polyphenols**. New York: Plenum Press, p. 259-280, 1992.

SCHWANTS, H. O. & WEBERLING, F. **Taxionomia vegetal**. São Paulo: Ed. Pedagógica e Universitária Ltda., p. 72-73, 1981.

SILVA, M. E. G. C., GUIMARAES, A. L., OLIVEIRA, A. P., SIQUEIRA FILHO, J. A., FONTANA A. P., DAMASCENO, P. K. F., BRANCO, C. R. C., BRANCO, A., ALMEIDA, J. R. G. S. HPLC-DAD analysis and antioxidant activity of *Hymenaea martiana* Hayne (Fabaceae), **journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, v.24 n.2 p.1160-1166, 2012.

SILVA, M. E. G. C., OLIVEIRA, A. C. B., BATISTA, C. C. M., ARAUJO, L. C., RODRIGUES, P. S., FONTANA, A. P., ALMEIDA, J. R. G. S. Fenóis totais e atividade antioxidante in vitro de *Hymenaea martiana* Hayne (Fabaceae) In: **XXI Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil**, João Pessoa-PB, 2010.

SILVA, M. E. G. C., OLIVEIRA, A. C. B., GUIMARAES, S. P. G. S., OLIVEIRA, A. L., A. P., NUNES, X. P., ALMEIDA, J. R. G. S. Atividade antinociceptiva das fases obtidas por partição do extrato etanólico de *Hymenaea martiana* (Fabaceae) In: VI Jornada de Iniciação Científica da UNIVASF, Juazeiro-BA, 2011.

SILVA, R. B. L. A. etnobotânica de plantas medicinais da comunidade quilombola de Curiaú, Macapá - AP, **Dissertação de Mestrado**, Programa de Pós-graduação em Agronomia, Universidade Federal Rural da Amazônia, 2002.

SILVA, S. R., SILVA, A. P., MUNHOZ, C. M., SILVA JUNIOR, M. C., MEDEIROS, M.B. **Guia de plantas do cerrado utilizadas na Chapada dos Veadeiros**. Brasília, 2001.

SIMÕES, K. D. U. J., PESSONI R. A. B., CARDOSO-LOPES E. M., VIVANCO J. M., STERMITZ F. R., BRAGA, M. R., Ipomopsin and hymenain, two biscoumarins from seeds of *Hymenaea courbaril*, **Phytochemistry Letters**, v.2, p.59–62, 2009.

SOUZA A. C. M., KATO L, SILVA C., CIDADE, A., OLIVEIRA, C. M. A., SILVA, M. R. R. Antimicrobial activity of *Hymenaea martiana* towards dermatophytes and *Cryptococcus neoformans*. **Mycoses**. Nov, 53(6): 500-3, 2010.

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

STERN, J. L.; HAGERMAN, A. E.; STEINBERG, P. D.; MASON, P. K. Phlorotannin-protein interactions. **Journal of Chemical Ecology**, v.22, p.1887-1899, 1996.

STUBBLEBINE, W. H., & LANGENHEIN, J.H. Effects os hymenaea courbaril leaf resin on the the generalist herbivore *Spodoptera exigua* (beet armyworm). **J Chem. Ecol.** 3: 633-647, 1977.

SUZUKI, R., MATSUSHITA, Y., IMAI, T., SAKURAI, M., JESUS, S. J. M. H., OZAKI, K., FUKUSHIMA, Z. F. K., Characterization and antioxidant activity of Amazonian Woods, **J Wood Sci** v.54 p.174–178, 2008.

TAKAGI, K., ITOH, S., NASU, S., YAMADA, S., NOMURA, S., SHIMOMURA, K., ONISHI, K. Anti-inflammatory effect and pigmentation inhibitory effect of the pericarp of *Jatoba* (*Hymenaea courbaril* L.). **Nature Medicine**, v. 56, p.108-112, 2002.

TAKAGI, K., SHIMOMURA, K., KOIZUMI, Y., MITSUNAGA, T., ABE, I. Tyrosinase inhibitors from the pericarp of *Jatoba* (*Hymenaea courbaril* L.). **Nat Med** v. 53, p. 15-21, 1999.

TERRAS, F. R. G., SCHOOFS, H. M. E., THEVISSSEN, H. M. E., BROEKAERT, W. F. Synergistic enhancement of the antifungal activity of wheat and barley thionins by radish and oilseed rape 2S albumins and by barley trypsin inhibitors. **Plant Physiology**, v.103, p.1311-1319, 1993.

TORSSEL, B. G. **Natural product chemistry. A mechanistic and biosynthetic approach to secondary metabolism**. New York: John Willey, p. 401, 1989.

VALENTIM, A. P. T. Atividade Antimicrobiana, Estudo Fitoquímico e Identificação de Constituintes Apolares do Alburno de *Hymenaea stigonocarpa* Mart. Ex. Hayne (Jatobá). **Dissertação (Mestrado em Biotecnologia de Produtos Bioativos)** – Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 109 f. 2006.

VALERIANO, J, J. L. OLIVEIRA, LS, NASCIMENTO, M. S., XIMENES, E. A., Estudo químico e atividade antimicrobiana do extrato em ciclohexano do alburno de *Hymenaea stigonocarpa*, In: 33a **Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, águas de Lindóia, 2010

VEIGA JUNIOR, V. F., PINTO, A. C., MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura? **Química nova**, São Paulo, v.28, n.3, p.519-528, 2005.

VILA VERDE, G. M., PAULA, J. R., CANEIRO, D. M., Levantamento etnobotânico das plantas medicinais do cerrado utilizadas pela população de Mossâmedes (GO). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.13, p. 64-66, 2003.

WAGNER, H., ULRICH-MERZENICH, G. Synergy research: approaching a new generation of phytopharmaceuticals. **Phytomedicine**. v. 16; n. 2. p. 97-110. 2009.

WIEMER, D. F. & HUBBEL, S. P., Host plant selection by an attine ant. In: JAISSON, P. (Ed.) **Social insects in the tropics**. Paris: Université Paris-Nordp. 133-153, 1983.

ZHANG, Y. & LEWIS, K. Fabaatins: new antimicrobial plant peptides. *FEMS Microbiological Letters*, v.149, p.59-64, 1997.

3 CARACTERIZAÇÃO BOTÂNICA, FITOQUÍMICA E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DOS EXTRATOS E FRAÇÕES DA CASCA DO CAULE DE *Hymenaea stigonocarpa* MART. EX HAYNE.

3.1 INTRODUÇÃO

A utilização de plantas medicinais tem suas raízes fortemente ligadas à cultura indígena e a colonização europeia. Essa influência contribuiu para o enriquecimento da cultura popular, e serviu como alicerce para os estudos científicos (MARTINS et al., 1994). Entretanto, atualmente as pesquisas relacionadas às ações terapêuticas de plantas medicinais no Brasil ainda são incipientes (VEIGA JÚNIOR; PINTO, 2005) continuando a maioria das espécies brasileiras sem qualquer avaliação, principalmente referente às propriedades farmacológicas (PINTO et al., 2002).

A criação da Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS, criada pelo ministério da saúde em 2006, tendo como um dos focos a fitoterapia como prática terapêutica levou ao aumento no consumo de medicamentos a base de produtos naturais (KLEIN et al., 2009).

Esse aumento também pôde ser associado ao fato de que as populações questionam os perigos do uso irracional dos medicamentos alopáticos associados a seus custos muitas vezes dispendiosos e procuram substituí-los pelo uso de plantas medicinais. A comprovação da ação terapêutica, associada à insatisfação da população perante o sistema de saúde, tem favorecido essa dinâmica (TOMAZZONI et al., 2006).

A descoberta e o desenvolvimento dos processos de síntese a partir de moléculas isoladas de produtos naturais para a produção de fármacos culminaram com a introdução no mercado de diversos medicamentos. Entretanto, devido aos efeitos colaterais destas moléculas sintéticas e dos altos custos, houve um resgate incentivado pela Organização Mundial de Saúde para a pesquisa e aplicação de fitoterápicos (VOLAK; STODOLA, 1990).

As plantas têm uma capacidade quase ilimitada para sintetizar substâncias aromáticas, a maioria das quais são fenóis ou derivados oxigênio-substituído. (COWAN, 1999). A pesquisa de novos medicamentos originados a partir de plantas

medicinais deve ser iniciada a partir de uma seleção baseada em alguns critérios. Esta seleção pode ser baseada no conhecimento antecipado de efeitos terapêuticos, como a pesquisa etnofarmacológica que utiliza o conhecimento pré-existente nas comunidades nativas; por acesso a bancos de moléculas disponíveis; ou por pesquisa aleatória, com espécies existentes e disponíveis em local previamente escolhido (MARINHO 2008).

Na década de 80, em todo o mundo, foram identificados 121 compostos de origem vegetal, provenientes de 95 espécies, os quais têm sido usualmente empregados como produtos terapêuticos nos países ocidentais. Quanto aos medicamentos aprovados para comercialização no período de 1983-1994, 6% foram obtidos diretamente de espécies vegetais, 24% são compostos derivados e 9% foram desenvolvidos a partir de compostos de vegetais, cuja estrutura molecular serviu como unidade precursora em processo de síntese (MARASCHIN e VERPOORTE, 1999).

No período entre 2005 e 2010 um total de 19 medicamentos à base de produtos naturais foram aprovados para comercialização em todo o mundo, entre os quais sete são classificadas como produtos naturais, dez produtos naturais semissintéticos e dois como drogas derivadas de produtos naturais (MISHRA, 2011).

São exemplos de medicamentos sintéticos desenvolvidos a partir de moléculas oriundas do metabolismo secundário das plantas, a procaína, cloroquina, vimblastina, vincristina, podofilotoxina, taxol e camptotecina (PINTO et al., 2002).

Dados atualizados são escassos, porém segundo o Ministério da saúde (2006) tomando como referência o ano de 1996, descreve que a quarta parte dos oito bilhões de dólares do faturamento da indústria farmacêutica nacional, foram resultantes de medicamentos derivados de produtos vegetais. Entretanto, apenas 8% das espécies botânicas brasileiras foram estudadas com o objetivo de obter moléculas bioativas.

Apesar das vantagens relatadas anteriormente, introduzir um novo medicamento na terapêutica é um processo longo e bastante oneroso. Todo o processo de pesquisa e desenvolvimento dura cerca de doze anos, com probabilidade de sucesso muito pequena (LIMA et al., 2003).

As propriedades medicinais apresentadas pelas plantas se devem a variedade e complexidade de seus metabólitos. Estes metabólitos secundários, os quais são produzidos como mecanismo de defesa dos vegetais às condições

ambientais e a presença de micro-organismos, insetos ou animais (MONTARI e BOLZANI, 2001).

Os metabólitos secundários de vegetais superiores apresentam uma ampla diversidade estrutural e distribuição muito variada em várias partes da planta. Por representar uma interface química entre a planta e o ambiente circundante, sua síntese é frequentemente influenciada por fatores relacionados à fisiologia da própria planta e mudanças ambientais.

Os metabólitos secundários frequentemente estão restritos a uma espécie ou gênero vegetal e muitas vezes podem ser ativados somente durante um determinado estágio do desenvolvimento vegetal, em estações específicas do ano, sob condições de estresse ou de restrição hídrica ou de nutrientes (LOURENÇO 2003; GOBBO-NETO; LOPES 2007).

A pesquisa relacionada a moléculas bioativas de origem vegetal constituem uma estratégia para inovação farmacêutica e competitividade neste setor, tendo em vista a singularidade estrutural das substâncias encontradas, sua importância como protótipos moleculares para o desenvolvimento de novos fármacos e sua perspectiva de patenteamento (OLIVEIRA, 2003).

Várias atividades são comprovadamente atribuídas a moléculas de origem natural, principalmente as obtidas a partir de plantas. Sendo as atividades antinociceptiva, anti-inflamatória, antioxidante, anticâncer, anti-hipertensiva, antidiabética e antimicrobiana as mais frequentemente relatadas (BORGES et al., 2013; ASMAWI et al., 2013; LIMA et al., 2012; MISHRA et al., 2013).

Devido à rápida disseminação dos micro-organismos multidroga resistentes há uma considerável necessidade por novos agentes antimicrobianos (GIBBONS et al, 2002).

Assim as pesquisas têm se intensificado no Brasil devido à diversidade de espécies presentes na flora brasileira e a necessidade de busca desses novos agentes (ADEBAJO *et al.*, 1989; BRITO; BRITO, 1993; MIGUEL et al., 1996; LIMA, 2001), tendo sido assim muitas plantas avaliadas não somente pela atividade antimicrobiana direta, mas também pela modificação do perfil de resistência ao agente antimicrobiano (GIBBONS, 2004; HEMAISWARYA, et al., 2008; WAGNER; ULRICH-MERZENICH G., 2009).

Um indicativo da efetividade dos mecanismos de defesa desenvolvido por alguns vegetais é a reduzida ocorrência de doenças infecciosas em certas plantas.

As plantas são conhecidas por produzirem uma enorme variedade de moléculas, com atividade antimicrobiana, geralmente classificada como fitoalexinas. Sua composição química é diversificada, apresentando terpenóides, glicosteróides, flavonóides e polifenóis (HEMAISWARYA, 2008).

Os principais grupos de compostos com propriedades antimicrobianas, extraídos de plantas incluem: terpenóides (TORSSEL, 1989); alcaloides (FESSENDEN, 1982); polipeptídios (TERRAS et al., 1993; ZHANG; LEWIS, 1997) e substâncias fenólicas, que são: fenóis simples, ácidos fenólicos, quinonas (STERN et al., 1996), flavonas, flavonóis e flavonóides (FESSENDEN, 1982), tanino (SCALBERT, 1992) e cumarinas (O'KENNEDY; THORNES, 1997).

Compostos isolados de plantas são substâncias cuja estrutura química, muitas vezes, apresentam grandes diferenças estruturais em relação aos antibióticos derivados de micro-organismos. Estes agentes antimicrobianos isolados de plantas podem agir como reguladores do metabolismo intermediário, ativando ou bloqueando reações enzimáticas, afetando diretamente as sínteses enzimáticas seja em nível nuclear ou ribossomal, ou mesmo alterando estruturas de membranas (SINGH; SHUKLA, 1984).

O Brasil é um país de dimensões continentais e de grande biodiversidade. Os ecossistemas brasileiros respondem pela maior variedade genética vegetal do mundo, sendo que 30% das florestas tropicais mundiais estão situadas em território brasileiro (CECHINEL FILHO; YUNES, 1998). Neste sentido, a pesquisa relacionada a produtos naturais apresenta um grande potencial quanto à descoberta de novos agentes terapêuticos.

Hymenaea stigonocarpa Mart. ex Hayne (Leguminosae) é uma planta medicinal encontrada no cerrado brasileiro e conhecida popularmente como "Jatobá-do-cerrado" (BATISTA, 2011). As suas cascas do caule são amplamente utilizados em infusão ou decocção para tratar a dor de estômago, asma, bronquite, úlceras, diarreia, gripe e tosse (GRANDI et al., 1989, VILA-VERDE, et al., 2003; BIESKI, et al., 2012).

Recentemente foi demonstrada a atividade antidiarréica e ação contra úlceras gástricas e duodenais experimentais do extrato metanólico da casca do caule de *H. stigonocarpa* (ORSI et al., 2012).

Estudos fitoquímicos de *Hymenaea stigonocarpa* mostraram a presença de terpenos e sesquiterpenos, ácidos graxos, flavonóides e taninos, metabólitos

reconhecidos pela atividade biológica (LANGENHEIM; HALL, 1983; MATUDA; NETO, 1985; ORSI et al., 2012). Porém poucas pesquisas tem avaliado a atividade farmacológica de cascas do caule de *Hymenaea stigonocarpa* e estudos sobre a sua atividade antimicrobiana ainda são escassos (DIMECH et al., 2013)

3.2 OBJETIVOS

Os objetivos gerais e específicos deste estudo são descritos abaixo:

3.2.1 Objetivo geral

Realizar o estudo fitoquímico e a caracterização botânica da casca do caule de *Hymenaea stigonocarpa* e avaliar a atividade antibacteriana de diferentes extratos e frações frente a bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

3.2.2 Objetivos específicos

- Realizar a caracterização botânica e fitoquímica do material vegetal;
- Avaliar a atividade antibacteriana dos extratos de *Hymenaea stigonocarpa*.
- Determinar as classes de metabólitos secundários responsáveis pela atividade antibacteriana e suas concentrações;
- Caracterizar por meio de CLAE-DAD os extratos mais ativos;
- Observar as alterações ultraestruturais provocadas pelo extrato mais ativo;

3.3 MATERIAIS E MÉTODOS

Os materiais e métodos deste estudo são descritos a seguir:

3.3.1 Coleta do material vegetal

Cascas do caule de *Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex. Hayne. foram coletadas em outubro de 2009 na Fazenda Refúgio localizada na cidade de Camocim de São Félix (figura 28), Pernambuco (localizado: latitude 8°21'30.00"S e longitude 35°47'56.70"O)

A identificação foi realizada pela botânica do Instituto Agrônomo de Pernambuco Dra. A. Bocage, sendo a exsicata depositada sob o número 83563 no Herbário Dárdano de Andrade Lima, pertencente ao mesmo instituto.

Figura 28 – Local da coleta das cascas do caule de *Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex. Hayne.



Fonte: http://nl.wikipedia.org/wiki/Bestand:Camocim_de_S%C3%A3o_F%C3%A9lix.png

Na preparação da matéria-prima vegetal, as cascas do caule, foram submetidas à secagem em estufa, a uma temperatura de 40°C, durante 72 horas, em seguida pulverizadas em moinho de martelos (Tigre ASN5), e estocada em frascos a temperatura ambiente.

3.3.2 Caracterização botânica do material vegetal

Amostras de caule jovem e maduro foram coletadas em indivíduo adulto de *Hymenaea stigonocarpa*, ocorrendo espontaneamente em uma área do agreste, no município de Camocim de São Félix.

Foram coletados ramos (40 cm de comprimento, com ramos jovens e adultos), os mais expostos ao sol de um indivíduo adulto. As amostras foram acondicionadas em sacos plásticos, mantidos em caixa de isopor contendo gelo. As amostras de caule foram fixadas em formaldeído a 40%, ácido acético e etanol 95% (FAA 50), por 48 horas (JOHANSEN, 1940).

3.3.2.1 Análise microscópica

Secções transversais foram obtidas, à mão livre, do caule jovem e adulto e da região mediana do pecíolo. As secções foram clarificadas em solução comercial de hipoclorito de sódio a 50%, neutralizadas em ácido acético numa concentração de 0,2%, lavadas em água destilada, coradas com safranina e azul de astra (Bukatsch, 1972). Este material foi montado em glicerina a 50% (Johansen, 1940) e as lamínulas foram então fixadas. Todas as análises microscópicas foram realizadas em imagens digitais obtidas sob microscópio ótico acoplado com câmera digital, utilizando o programa de análise de imagens Image Tool (Wilcox et al .,2002).

3.3.2.2 Análise histoquímica

Para a análise histoquímica parte das secções histológicas jovens e adultas de indivíduo adulto foram submetidas a reagentes tradicionais para investigação histoquímica: (a) dicromato de potássio (GABE, 1968), para compostos fenólicos totais; (b) vanilina clorídrica (RICCO, 2002), para evidenciação de taninos; (c) Reagente de Neu, para evidenciação de flavonóides. (NEU, 1956).

3.3.3 Caracterização fitoquímica do material vegetal

Cerca de 50 g de amostra oriunda da casca do caule de *Hymenaea stigonocarpa* foi submetido à extração exaustiva seriada por maceração (1:2 p/v) por períodos de 24 horas com solventes de polaridades crescentes (ciclohexano, acetato de etila, etanol e água). Um extrato hidroalcoólico (EH), foi também obtido por maceração de 60g (1:2 p/v) em etanol/água (1:1). Uma parte do resíduo seco do extrato hidroalcoólico (5g), foi particionada (1:1) em água (FA) e outra parte em

acetato de etila (FAE). Posteriormente todos os extratos foram filtrados em papel Whatman No. 1 e evaporados a 50°C sob pressão reduzida, com exceção do extrato aquoso e fração aquosa que foram liofilizados.

Desta forma obtiveram-se cinco extratos: Extrato ciclohexano (EC), extrato de acetato de etila (EAE), extrato etanólico (EE), extrato aquoso (EA) e extrato hidroalcoólico (EH) e duas frações: fração aquosa (FA) e fração acetato de etila (FAE).

Todos os extratos foram analisados por cromatografia em camada delgada (CCD) quanto à presença de: alcalóides, flavonóides, terpenóides, ácido gálico, fenilpropanoglicosídeos, cumarinas, taninos condensados e hidrolisáveis, açúcares e quinonas. Para obtenção de soluções com concentrações padronizadas, todos os extratos foram solubilizados na concentração de 0,5%.

Volumes de 15 µL de cada extrato: EC, EAE, EE, EA, EH, FA, FAE, foram utilizados para a realização de cada CCD, utilizando-se placas de gel de sílica (Merck -105553). As análises foram realizadas a partir de diferentes sistemas de eluição: EtOAc-HCOOH-AcOH-H₂O (100 : 11 : 11 : 26, v:v), EtOAc-HCOOH-AcOH-H₂O (100 : 0.5 : 0.5 : 0.5, v:v), Et₂O-tolueno-AcOH 10 % (50: 50 : 50, v:v), Tolueno-AcOEt (97 : 3 v/v), n-BuOH-Me₂CO-tampão fosfato pH = 5,0 (40 : 50 : 10 v/v) e AcOEt – MeOH – H₂O (81 : 11 : 8 v/v) e revelados utilizando diferentes substâncias (Quadro1).

Quadro 1 - Metabólitos secundários pesquisados, sistemas de eluição e reveladores utilizados na avaliação fitoquímica da casca do caule de *Hymenaea stigonocarpa*.

METABÓLITO	ELUIÇÃO	REVELADOR	RESULTADO POSITIVO	REFERÊNCIA
Alcalóides	A	Dragendorff	Coloração Laranja	(WAGNER, 1996)
Monoterpenóides, Sesquiterpenóides e Diterpenóides	B	Vanilina sulfúrica	Coloração Azul escura	(WAGNER, 1996)
Triterpenóides e Esteróides	C	Liebermann Burchard	Coloração rosa a vermelho (UV)	(SHARMA, 1991)

METABÓLITO	ELUIÇÃO	REVELADOR	RESULTADO POSITIVO	REFERÊNCIA
Iridóides	A	Vanilina sulfúrica	Coloração violeta	(HARBONE, 1998)
Saponinas	A	Anisaldeído	Coloração verde escura	(WAGNER, 1996)
Glicosídeos cardíacos	F	KEDD	Coloração Violeta a azul-violeta	(WAGNER, 1996)
Cumarinas	E	Análise por U.V.	Surgimento de fluorescência azul (UV)	(WAGNER, 1996)
Derivados cinâmicos	A	NEU	Surgimento de fluorescência (UV)	(WAGNER, 1996)
Fenilpropanoglicosídeos	A	NEU	Surgimento de fluorescência verde limão (UV)	(WAGNER, 1996)
Flavonóides	A	NEU	Surgimento de fluorescência laranja, verde e amarela (UV)	(MARKHAM, 1982) (HARBORNE, 1998)
Taninos condensados	A	Vanilina Clorídrica	Coloração vermelha	(ROBERTSON, 1955)
Taninos hidrolisáveis	A	NEU*	Negro (Visível) Fluorescência azul (UV)	(NEU, 1956)
Açúcares	D	Cloridrato de 2,3,5 Trifeniltetrazólio	Coloração avermelhada	(WALLENFELS, 1950)

A - EtOAc-HCOOH-AcOH-H₂O (100 : 11 : 11 : 26, v:v)

B - Tolueno-AcOEt (97 : 3 v/v),

C - EtOAc-HCOOH-AcOH-H₂O (100 : 0.5 : 0.5 : 0.5, v:v),

D - Et₂O-tolueno-AcOH 10 % (50: 50 : 50, v:v).

E - n-BuOH-Me₂CO-tampão fosfato, pH = 5,0 (40 : 50 : 10 v/v).

F - AcOEt – MeOH – H₂O (81 : 11 : 8 v/v)

*Solução metanólica de 2- aminoetil difenilborinato 1% e solução etanólica de polietilenoglicol 5%

3.3.4 Quantificação de polifenóis e taninos totais

A quantificação de polifenóis e taninos totais foram realizados como descrito na Farmacopéia Européia como descrito a seguir.

3.3.4.1 Quantificação de polifenóis totais

A Quantificação de polifenóis totais foi realizada de acordo com o método de Folin-Ciocalteu, como descrito na Farmacopéia Européia (2005). Os extratos e frações da casca do caule de *Hymenaea stigonocarpa*, EAE, EE, EA, EH, FA, FAE, foram solubilizados em etanol (10%) para obtenção de uma concentração final de 500 µg/mL. Cinco mililitros de cada solução foram diluídos para 25 ml com água destilada. Destas soluções, 2 mL foram transferidos para um balão volumétrico contendo água destilada (10 ml) e depois foi adicionado 1mL do reagente de Folin-Ciocalteu não diluído sendo o volume finalmente completado para 25 mL com Na₂CO₃ (10% v/v).

A solução foi mantida a temperatura ambiente (25°C) por 30 minutos, quando a absorbância das amostras foi lida a 760 nm em um espectrofotômetro UV/Vis (Evolution 60S, Thermo Scientific). Água destilada foi usada como branco.

A concentração de polifenóis totais foi determinada pela extrapolação da curva de calibração, a qual foi obtida a partir das soluções de ácido gálico (Sigma Chemical Co., St. Louis, USA) que variaram entre 2.0 – 8.0µg/mL. A concentração polifenóis totais foi calculada em triplicata foi expresso em miligramas de equivalente de ácido gálico por grama de amostra seca.

3.3.4.2 Determinação de taninos totais

Com o objetivo de determinar os taninos totais, 100 mg de caseína (Merck®), foi adicionada a 10 mL de cada extrato ou fração, sendo a mistura homogeneizada por 60 minutos e depois filtradas em papel de filtro Whatman No. 1. O procedimento para determinação dos taninos foi similar ao descrito no item 3.4.1.

O conteúdo de polifenóis nas frações não tanantes foi calculado pela curva padrão de ácido gálico. A concentração de taninos totais foi calculada como: Taninos totais = polifenóis totais – polifenóis não tanantes.

3.3.4.3 Análise por Cromatografia Líquida de alta Eficiência (CLAE)

Cromatogramas dos extratos e frações da casca do caule de *Hymenaea stigonocarpa* que apresentaram os maiores teores de taninos e atividade antibacteriana (EE, EH e FA), foram obtidos por Cromatografia Líquida de alta Eficiência com arranjo de diodos (CLAE-DAD).

Os extratos e o padrão astilbina, foram solubilizados em metanol para a obtenção de soluções de concentração de 400 µg/mL e 25µg/mL, respectivamente. Essas soluções foram filtradas em membrana de politetrafluoretileno de 0,20 µm (Chromafil®) e depois adicionadas frascos âmbar. As análises foram realizadas em equipamento CLAE-DAD (Ultimate® 3000, Thermo Scientific®) equipado com bomba binária HPG-3x00RS, 3000 (RS) detector de arranjo de diodo e coletor de amostra automático ACC-3000.

As separações foram realizadas com uma coluna (C18), 256 x 4.6 mm d.i., 5 µm (Acclaim 120, Dionex®) equipada com (C18, 4 x 3 mm d.i. Phenomenex®). A fase móvel foi composta por água MiliQ® (eluente A), e acetonitrila (eluente B, Tedia®), ambos acidificados com 0,1 % de solução de ácido trifluoroacético variando de 10-23 % em 35 min para 23–90 % em 50 min do eluente B a um fluxo de 1mL/min. O software Chromeleon 6.0 (Dionex®) foi utilizado para processamento e aquisição dos dados.

3.3.5 Determinação da atividade antibacteriana

A avaliação da atividade antibacteriana foi realizada a partir do estudo com diferentes extratos e frações.

3.3.5.1 Preparação das amostras

Para determinação da atividade antimicrobiana da casca do caule de *H. stigonocarpa* foram avaliados os cinco extratos: ciclohexânico (EC), acetato de etila (EAE), etanólico (EE), aquoso (EA), hidroalcoólico (EH) e as frações obtidas por partição do extrato Hidroalcoólico: o de acetato de etila (FAE) e o de Água (FA).

3.3.5.2 Determinação da atividade antibacteriana *in vitro*

A determinação da atividade antibacteriana *in vitro* foi realizada como descrito a seguir.

3.3.5.2.1 Agentes antimicrobianos

O laboratório Eurofarma forneceu oxacilina, ciprofloxacina, teicoplanina e o laboratório Sanofi-Aventis a polimixina B. A resistência foi definida para cada caso: a oxacilina (OXA, MIC $\geq 4\mu\text{g/mL}$), ciprofloxacina (CIP, MIC $\geq 1\mu\text{g/mL}$), teicoplanina (TEI $\geq 32\mu\text{g/mL}$), e polimixina B (POL, MIC $\geq 8\mu\text{g/mL}$) de acordo com os critérios estabelecidos pelo Clinical Laboratory standard Institute (2012).

Os extratos EC e EAE foram solubilizados em dimetil sulfóxido - Tween80 - água (1:1:8 v/v), EE, EAE, EH, FAE, e FA em etanol-água (1:9 v/v), enquanto que os agentes antimicrobianos foram solubilizados em água. As soluções de estoque foram esterilizados por filtração através de uma membrana Millipore, com uma porosidade de 0,22 μm .

3.3.5.2.2 Micro-organismos e padronização dos inóculos.

Bactérias (n = 28) foram obtidas de culturas estoque e mantidas em nosso laboratório (Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Micro-organismos - LFBM) em meio Mueller Hinton Agar, sob óleo mineral. Para este estudo foram usadas as seguintes cepas bacterianas isoladas de amostras clínicas: *Staphylococcus aureus* (LFBM05, UFPEDA 01, AM 02, AM 04, AM 05, LFBM 25, AM 13, AM 18, AM 19, and AM 21); *Enterococcus faecalis* (245, 272, 292 e 335); *Klebsiella pneumoniae* LFBM 01; *Pseudomonas aeruginosa* LFBM 01; *Proteus mirabilis* LFBM 01 e LFBM 02; *Salmonella enterica* LFBM 01; *Shigella sonnei* LFBM 01 e *Vibrio cholera* LFBM 01.

Staphylococcus aureus ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* ATCC 33591, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Escherichia coli* ATCC 35218 foram usadas como cepas padrão.

Esses micro-organismos foram cultivados em caldo Mueller Hinton por um período de 18h a 37°C e em seguida foram cultivados em agar Mueller Hinton (AMH)

(Acumedia Manufacturers, Baltimore, USA) sendo incubados a 37°C por 18 horas. Algumas colônias foram selecionadas e inoculadas em caldo Mueller Hinton (Acumedia Manufacturers, Baltimore, USA) para comparação da turbidez com padrões 0,5 McFarland os quais são equivalentes a contagem de aproximadamente 10^8 UFC/mL. Posteriormente, essas suspensões bacterianas foram diluídas para obtenção de um inóculo de 10^7 UFC/mL.

3.3.5.2.3 - Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CMB)

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi determinada pelo método de microdiluição em caldo, seguindo as recomendações estabelecidas pela Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI, 2012), com algumas modificações. Os ensaios foram realizados em microplacas estéreis de 96 poços com fundo em forma de “U”.

Inicialmente as soluções estoque dos extratos e agentes antimicrobianos na concentração de 2048 µg/mL foram esterilizadas por filtração através de membranas de porosidade de 0,22 µm milipore®, em seguida, um volume de 200 µL foi adicionado nos poços de 1 a 12 da linha A. Os demais poços foram preenchidos inicialmente apenas com 100 µL de caldo Mueller-Hinton.

Logo após, foi realizada transferência de 100µL do conteúdo dos poços da linha A para os da linha B e assim sucessivamente até a linha H, sendo desprezados os últimos 100 µL, obtendo-se assim concentrações decrescentes dos extratos (1024 a 7,81 µg/mL).

Após a diluição dos extratos e agentes antimicrobianos, foi acrescido em todos os poços um volume de 5 µL dos inóculo microbiano padronizado. As microplacas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37°C por 24 horas.

Foi considerado crescimento total (100%) na placa controle, onde foi adicionado apenas caldo Muller Hinton e os inóculos. A redução do crescimento foi avaliado nos orifícios onde foram adicionados os extratos.

Para determinar a Concentração Bactericida Mínima (CBM), os conteúdos dos poços que mostraram inibição de crescimento foram semeados em MHA. Após 24h de incubação a 37°C, o número de micro-organismos viáveis foi determinado. A CMB foi definida como a menor concentração do extrato em que 99,9% da

população foram inviabilizadas. Todos os experimentos foram realizados em duplicata em dias diferentes.

Após a realização da avaliação quantitativa, foi realizada a determinação da viabilidade dos micro-organismos, por comprovação, através da adição de solução aquosa a 0,5% de cloridrato de 2,3,5 trifeniltetrazólio (TTC).

As microplacas foram novamente incubadas por mais três horas a 37°C. Após esse intervalo de tempo, a leitura da placa foi realizada: a presença de uma coloração vermelha nos poços foi interpretada como prova negativa do efeito inibitório do extrato, ou seja, houve crescimento bacteriano; enquanto que a ausência de cor foi considerada prova positiva da ação antimicrobiana dos extratos. A CIM foi definida como sendo a menor concentração da droga antimicrobiana que impede o crescimento visível do micro-organismo semeado.

3.3.6 Análise ultraestrutural

Staphylococcus aureus ATCC 33591 na concentração de 10^4 UFC/mL foi cultivado em caldo Muller Hinton (grupo controle) e em caldo adicionado de extrato hidroalcoólico a 256 e 128 µg/mL (CIM e $\frac{1}{2}$ CIM) respectivamente. Após isso as culturas foram incubadas a 37°C por 24 horas. Essas culturas foram centrifugadas e os precipitados foram fixados em paraformaldeído 4% e glutaraldeído 2,5% em 0,1 M de tampão cacodilato de sódio (pH 7,2) por 4 horas a temperatura ambiente.

Os precipitados foram lavados e centrifugados por 10 minutos no mesmo tampão. Sendo esse procedimento repetido por três vezes. Posteriormente os precipitados foram pós-fixados em tetróxido de ósmio 2%, ferrocianeto de potássio 0,8% e cloreto de cálcio 5 mM em tampão cacodilato de sódio 0,1 M por 1 hora e lavada em tampão cacodilato de sódio.

As amostras foram desidratadas utilizando gradientes de soluções de acetona e depois adicionadas à resina Epon 812 (Sigma, EUA). Em seguida seções ultrafinas foram obtidas através de um ultramicrotomo (Leica UC6), coradas com acetato de uranila e citrato de chumbo e examinado em microscópio eletrônico de transmissão Morgani-FEI®.

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada utilizando Anova one-way e teste de comparação múltiplas Newman-Keuls usando o software GraphPad Prism versão 5.0 para Windows, GraphPad Software (San Diego, CA) e $p < 0.05$ foi usado como nível de significância.

3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos neste estudo estão descritos a seguir.

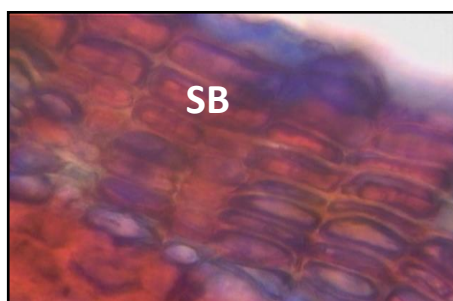
3.4.1 Caracterização botânica do material vegetal

A descrição dos aspectos anatômicos do material vegetal é um importante passo para caracterização e padronização dos espécimes vegetais que servem de matéria prima para a produção de medicamentos. Assim após avaliação farmacobotânica foi possível observar que o caule de *Hymenaea stigonocarpa* apresentou estrutura semelhante àquela descrita na literatura para espécies do gênero (WATSON; DALLWITZ, 2012).

3.4.1.1 Anatomia

Em uma amostra do caule de *Hymenaea stigonocarpa* com aproximadamente, 4 mm de diâmetro, a região da casca apresentou, mais externamente, oito camadas de súber (Figura 29), constituído por células achatadas periclinamente (paralelas à superfície do caule).

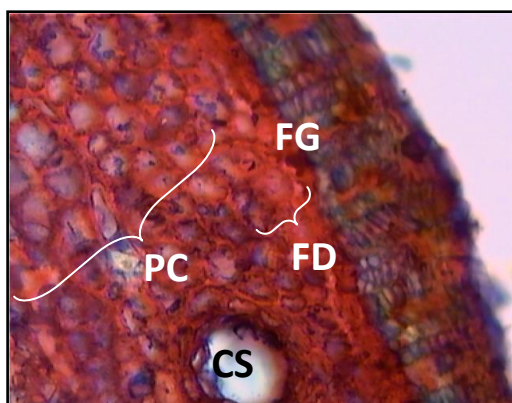
Figura 29 - Fotomicrografia da casca do caule de ramo adulto de *Hymenaea stigonocarpa* mostrando a região do súber corada com safranina e azul de astra.



SB – súber (aumento de 400x)

Imediatamente abaixo do súber foi encontrada uma faixa estreita, constituída por apenas uma camada de células, o felogênio, tecido indiferenciado que origina o súber para fora e a feloderme para dentro (Figura 30). A feloderme estava constituída por duas camadas; após o feloderme foi encontrado o parênquima cortical, com 10 camadas de células. O conjunto destes tecidos secundários constitui a periderme.

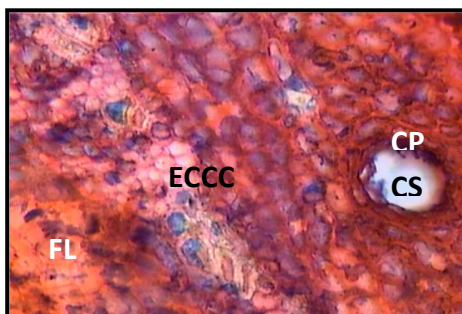
Figura 30 - Fotomicrografia da casca do caule de ramo adulto de *Hymenaea stigonocarpa* mostrando a região do súber, felogênio, feloderma e parênquima cortical corados com safranina e azul de astra.



FG- Felogênio; FD-Feloderme; PC- Parênquima cortical; CS- Canal secretor. (aumento 100x)

Na região da feloderme foram encontrados canais de secreção com revestimento interno de células pequenas e achatadas periclinamente (Figura 31).

Figura 31 - Fotomicrografia da casca do caule de ramo adulto de *Hymenaea stigonocarpa* mostrando parênquima cortical, esclerênquima e floema corados com safranina e azul de Astra.



S- Canal secretor; CP – células pequenas; EC – esclerênquima; FL – Floema. Aumento 100x

Mais internamente, após a feloderme, foram observados grupos de fibras de esclerênquima em forma de feixe. Após o faixa de esclerênquima é observada a presença do floema, tecido responsável pela condução da seiva elaborada.

Foram encontradas cavidades secretoras em maior quantidade no parênquima cortical de porções jovens dos ramos se comparadas às porções adultas. Em estrutura secundária, o número dessas cavidades se mostrou bastante

reduzido; isto pode ser devido ao esmagamento de algumas dessas cavidades em consequência da pressão radial exercida pelo crescimento da feloderme e da atividade do câmbio.

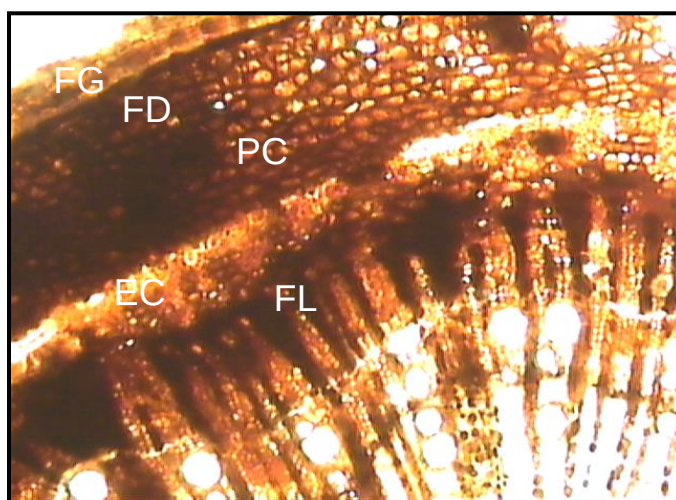
3.4.1.2 Histoquímica

Na análise histoquímica foi realizada a avaliação da presença de polifenóis e taninos.

3.4.1.2.1 Avaliação de Polifenóis

Foi observada a ocorrência de polifenóis nos elementos: feloderme, parênquima cortical e floema, regiões coradas em marrom, (Figura 32).

Figura 32 - Fotomicrografia da casca do caule de ramo adulto de *Hymenaea stigonocarpa* mostrando regiões coradas com dicromato de potássio para visualização de regiões com conteúdos fenólicos.



FG- felogênio; FD – feloderme; PC- Parênquima cortical; EC – esclerênquima; FL – Floema. (aumento. 40x)

A análise histoquímica da casca do caule forneceu informações quanto à presença e localização dos compostos fenólicos, evidenciados pela reação ao dicromato de potássio e vanilina clorídrica, que revelam a presença de compostos fenólicos totais e taninos, respectivamente.

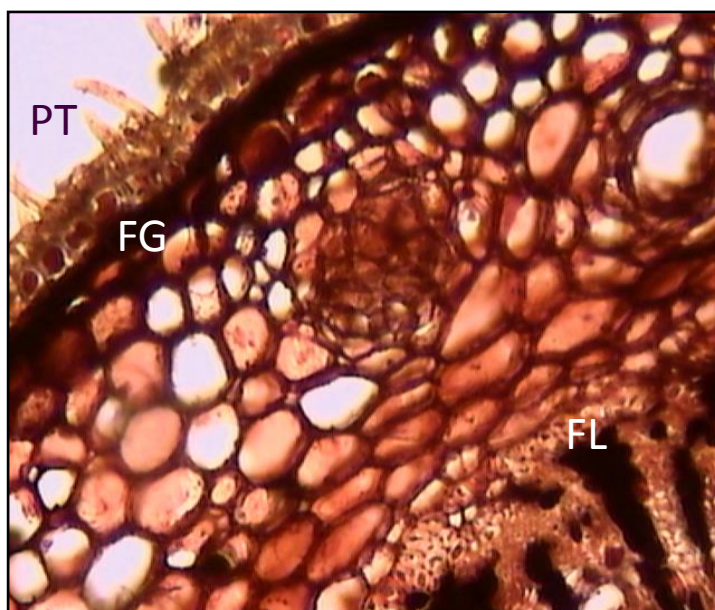
3.4.1.2.2 Detecção da presença de taninos.

A avaliação da presença de taninos foi realizada em caules jovens e adultos

3.4.1.2.2.1 caules jovens

O caule jovem, identificado pela presença de pelo tector (figura 33), na região do córtex, observamos a ocorrência de taninos nos elementos feloderme, parênquima cortical e floema (FL) (regiões coradas em vermelho).

Figura 33 - Fotomicrografia da casca do caule de ramo jovem de *Hymenaea stigonocarpa* mostrando regiões coradas com vanilina clorídrica visualização de regiões com conteúdos de taninos.

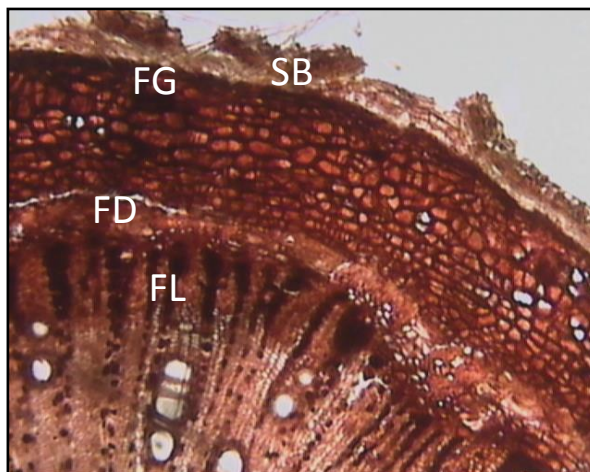


PT- Pelo tector; FG – felogênio; FL – floema.
(aumento de 100x)

3.4.1.2.2.2 caules adultos

Na região do córtex de caule adulto (presença de súber), observamos a ocorrência de taninos nos elementos de felogênio, feloderme e floema (Figura 34).

Figura 34 - Fotomicrografia da casca do caule de ramo adulto de *Hymenaea stigonocarpa* mostrando regiões coradas com vanilina clorídrica visualização de regiões com conteúdos de taninos.



SB - Súber; FG – felogênio; FD-feloderme; FL – floema. (aumento de 40x)

A presença de taninos foi evidenciada em amostras de caule jovens e adultas, indicando a manutenção de sua presença na estrutura, no parênquima cortical e na feloderme. Isto indica que a produção de taninos é continuada nas células de feloderme produzidas pelo felogênio, confirmando a avaliação fitoquímica, que indicou a presença de taninos em amostras de casca de caule.

Em virtude da maior espessura de parênquima cortical constituído por células contendo tanino em ramos mais maduros, a extração da casca nos mesmos implica na possível exposição do floema ao ataque de micro-organismos, levando estas células à morte, além de possibilitar sua proliferação ao longo dos feixes vasculares, e em casos mais extremos podendo levar à morte de partes da planta ou do próprio indivíduo. Assim, a extração de taninos poderia ser mais viável e eficiente através de podas periódicas em ramos mais jovens, levando a uma obtenção continuada de taninos.

3.4.2 Caracterização fitoquímica do material vegetal

O rendimento obtido após a extração com ciclohexano, acetato de etila, etanol e água foi de 0,35%, 2,65%, 11,98% e 2,09%, respectivamente.

A extração hidroalcoólica levou a um rendimento de 15,49%. As frações acetato de etila e aquosa obtidas a partir da fração hidroalcoólica, tiveram rendimentos de 22,08% e 57% respectivamente.

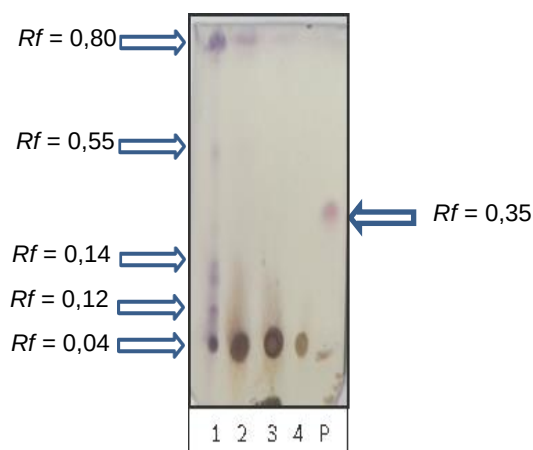
3.4.2.1 Análise fitoquímica

A prospecção fitoquímica nos extratos ciclo hexano, acetato de etila, etanol e água através de CCD, sugere a presença de flavonóides, açúcares redutores, taninos condensados, proantocianidinas, leucoantocianidinas, monoterpenos, sesquiterpenos, triterpenos, esteroides e cumarinas, nos diferentes extratos de *Hymenaea stigonocarpa*, devido a avaliação pelo uso de reveladores e comparação com a coloração dos padrões.

3.4.2.1.1 Monoterpenos e sesquiterpenos

A presença de monoterpenos e sesquiterpenos (não diferenciados entre pelo uso do revelador) foi identificada no extrato EC (Figura 35), a partir da visualização de várias bandas de coloração variando de violeta a azul escuro, as quais foram comparadas com a coloração produzida pelo padrão timol ($R_f = 0,35$).

Figura 35 - Cromatograma dos extratos ciclo-hexano, acetato de etila, etanol e água obtidos para avaliação da presença de monoterpenos e sesquiterpenos.

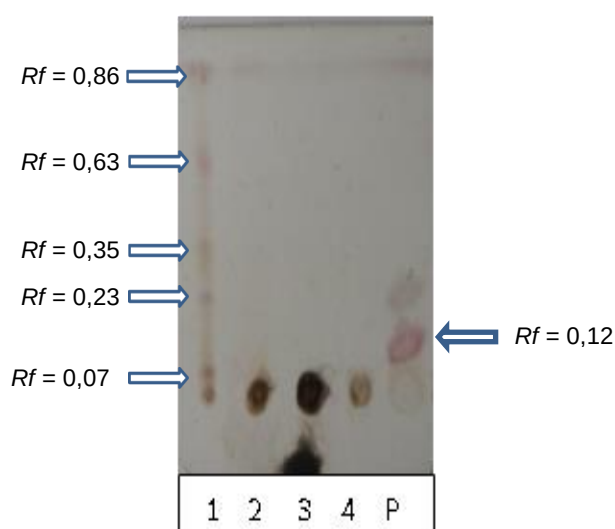


Sistema de eluição: Tolueno – AcOEt (97 : 3 v/v); 1 – Extrato ciclo hexano; 2 – Extrato acetato de etila; 3 – Extrato etanólico; 4 – Extrato aquoso; P - Padrão de Timol ($R_f = 0,35$); revelador: vanilina sulfúrica

3.4.2.1.2 Triterpenos e esteróides

A presença de triterpenos e esteroides (não diferenciados entre si) foram identificados apenas no extrato EC (Figura 36), a partir da visualização de várias bandas de coloração variando de rosa a vermelho, as quais foram comparadas com a coloração produzida a partir da utilização do padrão de β -sitosterol (R_f 0,12).

Figura 36 - Cromatograma dos extratos ciclohexano, acetato de etila, etanol e água obtidos para avaliação de triterpenos e esteróides.



Sistema de eluição: EtOAc-HCOOH-AcOH-H₂O (100 : 0.5 : 0.5 : 0.5, v:v); 1 – Extrato ciclo hexano; 2 – Extrato acetato de etila; 3 – Extrato etanólico; 4 – Extrato aquoso; P - Padrão de β -sitosterol; (R_f = 0,12); revelador: Liebermann Burchard.

A ocorrência de terpenos nas espécies do gênero *Hymenaea* já é amplamente conhecida, resinas de cor amarela e avermelhada, produzidas pelas árvores do gênero *Hymenaea* L., são descritas desde o período dos índios pré-colombianos devido a seu uso na fabricação de joias (LEE; LANGENHEIM, 1975),

Dentre as espécies do gênero *Hymenaea* a mais estudada é a *Hymenaea courbaril*, nela também são descritas a ocorrência de terpenos em diferentes partes da planta tais como: folhas (MARTIN et al., 1972; LANGENHEIM et al., 1986), resina das folhas (LANGENHEIM, 1972; ABDEL-KADER et al., 2002), resina do troco (LANGENHEIM, 1973; MARSAIOLI et al., 1975; ABDEL-KADER et al., 2002), resina dos frutos (OURISSON et al., 1973) e sementes (NOGUEIRA, 2001).

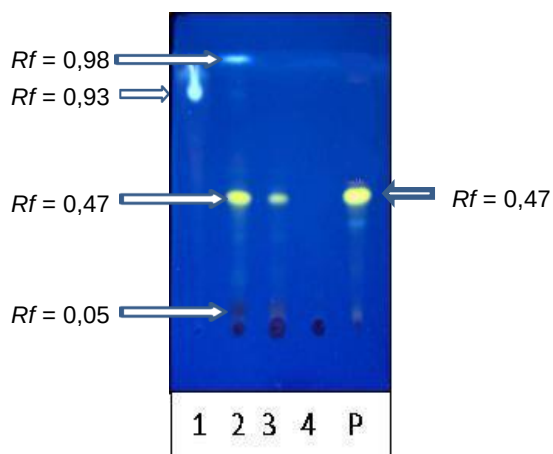
Quanto à presença de terpenos na casca do caule de *Hymenaea stigonocarpa* nossos resultados estão de acordo com o que foi descrito por Giacomini e colaboradores, (2006), que relatam a presença de terpenos isolados a partir de extrato hexânico do epicarpo, assim como o que relatam Doménech-carbó e colaboradores (2009) que identificaram o ácido eperuico e seus isômeros, juntos com ácido copálico como os principais componentes da resina da casca do caule de *Hymenaea stigonocarpa*.

Se analisarmos a presença de terpenos nas diferentes partes da planta, podemos observar que eles são de ocorrência frequente nesta espécie, como descrevem Faria e colaboradores (2004). Esses autores demonstram a presença de diterpenos nas sementes e Langenheim e colaboradores (1986), que descreve nas folhas a ocorrência de β -cariofileno e α -muroleno, sesquiterpenos com atividade antifúngica e ação repelente contra insetos.

3.4.2.1.3 Flavonóides e cumarinas

Da casca do caule foram evidenciadas duas bandas nos extratos acetato de etila (2) e etanólico (2) com características de flavonoides (amarelo e laranja) de R_f 0,05 e 0,47 (Figura 37). Esta CCD também indica a presença de cumarinas R_f 0,98 e 0,93 (coloração azul) nos extratos ciclohexano e acetato de etila.

Figura 37 - Cromatograma dos extratos ciclohexano, acetato de etila, etanol e água obtidos para avaliação de flavonoides.



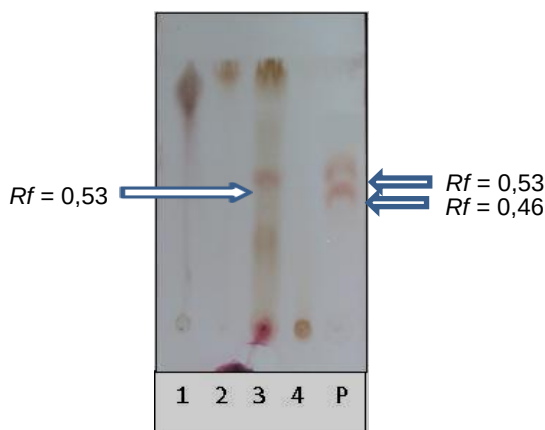
Sistema de eluição: EtOAc-HCOOH-AcOH-H₂O (100 : 11 : 11 : 26 v:v); 1 – Extrato ciclo hexano; 2 – Extrato acetato de etila; 3 – Extrato etanólico; 4 – Extrato aquoso; P - Padrão luteolina (R_f = 0,47); revelador: NEU.

Simões e colaboradores (2009) descreveram a ocorrência de cumarinas em espécies do gênero *Hymenaea*. Estes autores isolaram duas cumarinas, a ipomopsina e hymenaina, das sementes de *H. courbaril*, ambas com atividade antifúngica. No entanto este é o primeiro relato da presença de cumarinas em *H. stigonocarpa*.

3.4.2.1.4 Açúcares

A presença de açúcares foi observada no extrato etanólico a partir da visualização de banda de coloração avermelhada, a qual foi comparada com a coloração produzida a partir da utilização dos padrões glicose e raminose após a revelação com 2,3,5 cloridrato de trifeniltetrazólio (Figura 38). Após a comparação entre os fatores de retenção uma das bandas foi identificada como supostamente glicose (Rf 0,53)

Figura 38 - Cromatograma dos extratos ciclo-hexano, acetato de etila, etanol e água obtidos para avaliação de açúcares.



Sistema de eluição: n-BuOH-Me₂CO-tampão fosfato, pH = 5,0 (40 : 50 : 10 v/v). ; 1 – Extrato ciclo hexano; 2 – Extrato acetato de etila; 3 – Extrato etanólico; 4 – Extrato aquoso; P - Padrões de glicose (Rf = 0,53) e ramnose (Rf = 0,46), revelador: 2,3,5 cloridrato de trifeniltetrazólio

3.4.2.1.5 Taninos hidrolisáveis e condensados

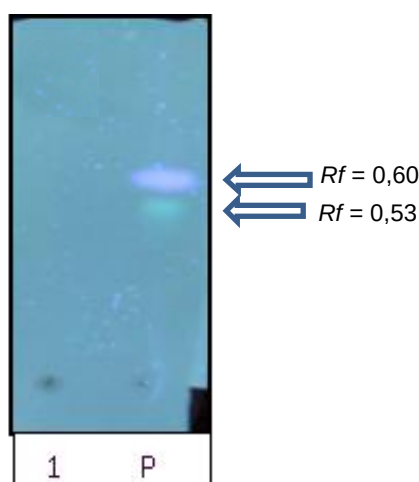
Nenhum tanino hidrolisado foi identificado nos extratos obtidos, sendo utilizados o ácido gálico e o elágico como padrões e como revelador o reagente de

Neu (Figura 39). A presença de taninos condensados foi identificada após revelação com vanilina clorídrica (Figura 40), nos extratos de EAE, EE e EA.

A quantidade e o tipo de taninos sintetizados pelas plantas variam consideravelmente dependendo da espécie, do cultivo, do tecido e de condições ambientais. Geralmente a concentração é maior em espécies que prosperam em solos agrícolas pobres ou de baixa calagem, tal como ocorre nas regiões tropicais e subtropicais (OTERO; HIDALGO, 2004). Além disso, as concentrações de taninos são maiores nas partes dos vegetais expostas ao sol, indicando, portanto, uma relação entre a fase dependente de luz da fotossíntese com a produção de taninos (HEIL et al., 2002).

Tradicionalmente os taninos são classificados segundo a sua estrutura química em dois grupos: taninos hidrolisáveis e taninos condensados. Taninos hidrolisáveis são caracterizados por um poliol central, geralmente β -D-glicose, cujas funções hidroxilas são esterificadas. Após a hidrólise ácida das ligações ester os dois principais representantes gerados são o ácido gálico e o elágico. Os taninos condensados proantocianidinas, são oligômeros e polímeros formados pela policondensação de duas ou mais unidades flavan-3-ol e flavan-3,4-diol. Dentre os taninos condensados pode ser descrito outra classe, as leucoantocianidinas (flavan-3,4-dióis), classe intermediária na via de formação dos taninos condensados. (SIMÕES et al., 2004)

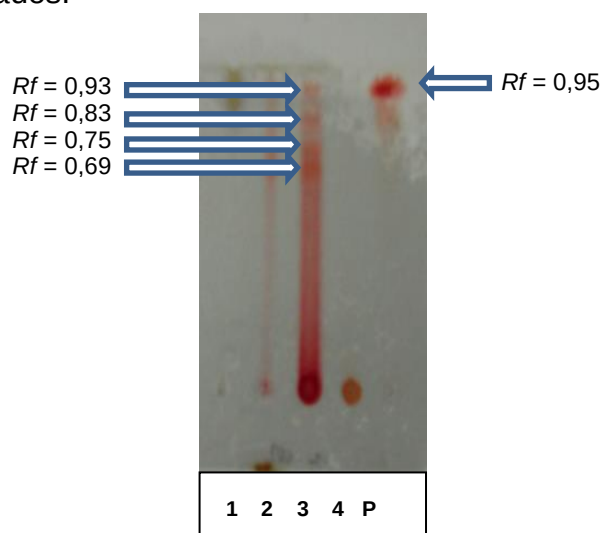
Figura 39 - Cromatograma do extrato etanólico (B), para avaliação de taninos hidrolisáveis.



Sistema de eluição: EtOAc-HCOOH-AcOH-H₂O (100 : 11 : 11 : 26, v:v) ; 1 – Extrato etanólico; P – ácido gálico e elágico (Rf = 0,53) e (Rf = 0,60); revelador: Reagente de Neu

A presença de taninos condensados foi identificada nos extratos EAE, EE e EA (Figura 40), a partir da visualização de várias bandas de coloração avermelhadas, as quais foram comparadas com a coloração produzida a partir da utilização do padrão de epicatequina (R_f 0,95) revelado com vanilina clorídrica.

Figura 40 - Cromatograma dos extratos ciclo-hexano, acetato de etila, etanol e água obtidos para avaliação de taninos condensados.



Sistema de eluição: EtOAc-HCOOH-AcOH-H₂O (100 : 11 : 11 : 26 v:v); 1 – extrato ciclo hexano; 2 – extrato acetato de etila; 3 – extrato etanólico; 4 – extrato aquoso; P - padrão epicatequina (R_f = 0,95); revelador: vanilina clorídrica.

Os taninos condensados em geral estão amplamente distribuídos em plantas lenhosas. Já os taninos hidrolisáveis não são frequentes neste tipo de plantas. Dentre os metabólitos secundários presentes, os taninos condensados perfazem, aproximadamente, metade da matéria seca, constituindo a segunda fonte de polifenóis no reino vegetal, perdendo apenas para a lignina (HAGERMAN et al., 1997; ARGYROPOULOS, 1999).

Nos extratos avaliados foram identificadas a presença de proantocianidinas e leucoantocianidinas, essas classes podem ser identificadas através da realização de cromatografia em camada delgada devido à diferença das suas polaridades, onde as leucoantocianidinas apresentam diferente fator de retenção em relação às proantocianidinas apresentando uma maior migração em solventes mais polares.

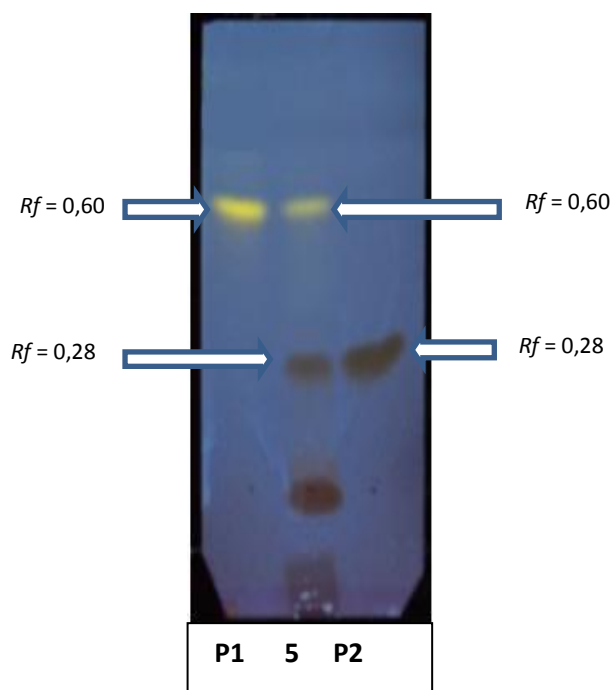
Após a análise fitoquímica nos quatro extratos obtidos através de extração exaustiva seriada por maceração, o extrato hidroalcoólico foi obtido por maceração após a identificação da maior atividade antibacteriana nos extratos que continham maiores teores dos metabólitos secundários polares.

Foram identificados metabólitos secundários no extrato hidroalcoólico (EH) e em suas frações aquosa (FA) e acetato de etila (FAE).

3.4.2.1.6 Flavonóides após partição

Foi observada uma banda no extrato EH (Figura 41), uma delas comparada ao padrão de astilbina apresentou o mesmo fator de retenção (R_f 0,28) a outra comparada ao padrão luteolina apresentou também o mesmo fator de retenção (R_f 0,60).

Figura 41 - Cromatograma do extrato hidroalcoólico de *Hymenaea stigonocarpa* para avaliação de flavonóides.



Sistema de eluição: EtOAc-HCOOH-AcOH-H₂O (100 : 11 : 11 : 26 v:v); 5 – Extrato Hidroalcoólico; P1 – Padrão de astilbina (R_f = 0,60); P2 - Padrão luteolina (R_f = 0,28); revelador: NEU.

Avaliando a presença de flavonóides na casca do caule de *Hymenaea stigonocarpa*, foram observadas duas bandas na análise por CCD, uma após uso de padrões, apresentou o mesmo fator de retenção que o flavonóide astilbina e a outra

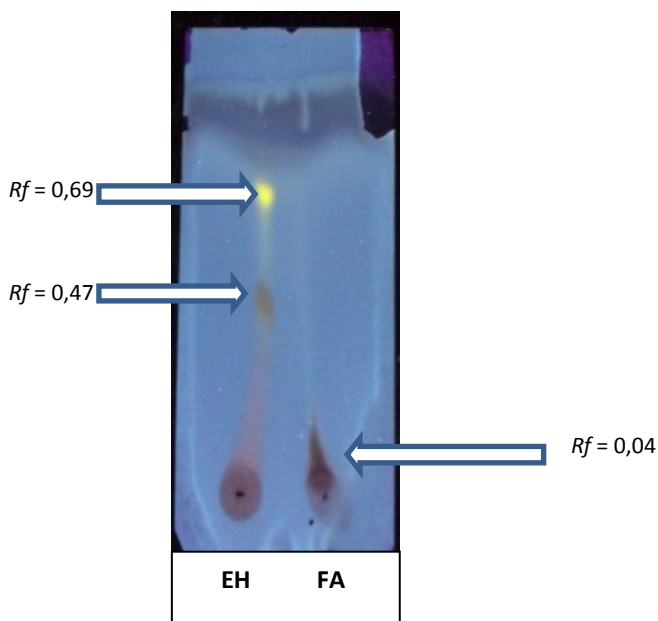
o mesmo da luteolina. A astilbina tem ocorrência descrita para o gênero *Hymenaea*, sendo relatada nas espécies: *Hymenaea parvifolia* identificada na resina do caule (ISHIBASHI et al., 1999), e em *Hymenaea stigonocarpa*, identificada na casca do caule por espectro de infravermelho (LOVATO & NUNES, 2007).

3.4.2.1.7 Taninos condensados após partição

Os taninos condensados estão presentes no EH e nas frações FA e FAE. No FA (Figura 42), há presença apenas de proantocianidinas (banda não revelada pelo reagente NEU que ficou retida no ponto de aplicação), na fração FAE há ocorrência de leucoantocianidinas (Figura 43) e flavonóides.

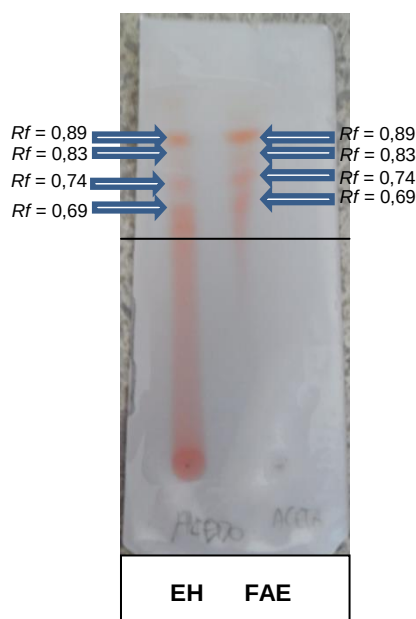
Na figura 42 apesar do uso do revelador Neu, pode-se observar a presença de taninos condensados no ponto de aplicação do cromatograma e a ausência de flavonóides quando comparamos a FA e o EH. Na figura 43 pode-se observar a ausência das proantocianidinas na FAE quando comparada ao EH.

Figura 42 - Cromatograma do extrato hidroalcoólico e da fração aquosa para avaliação de flavonóides.



Sistema de eluição: EtOAc-HCOOH-AcOH-H₂O (100 : 11 : 11 : 26 v:v); EH – Extrato Hidroalcoólico; FA – Fração aquosa; revelador de Neu.

Figura 43 - Cromatograma do extrato hidroalcoólico e da fração acetato de etila para avaliação de taninos.



Sistema de eluição: EtOAc–HCOOH–AcOH–H₂O (100 : 11 : 11 : 26 v:v); EH – Extrato Hidroalcoólico ; FAE – Fração acetato de etila; revelador: vanilina clorídrica.

3.4.3 Quantificação de polifenóis e taninos totais

Foram quantificados polifenóis e taninos nos diferentes extratos obtidos.

3.4.3.1. Determinação da Curva de calibração do ácido gálico

A concentração polifenóis totais foi determinada pela extrapolação da curva de calibração ($y = 0.1037 x + 0.0024$, $R^2 = 0.9992$), a qual foi obtida a partir das soluções de ácido gálico (Sigma Chemical Co., St. Louis, USA) que variaram entre 2.0–8.0 $\mu\text{g/mL}$.

3.4.4.2 Determinação do teor de polifenóis e taninos totais

Utilizando a equação da reta foram obtidos os valores de polifenóis totais em equivalentes miligramas de ácido gálico por grama de resíduo seco conforme expresso na tabela 1.

Tabela 1 - Conteúdo de polifenóis e taninos totais dos diferentes extratos e frações de *Hymenaea stigonocarpa*

Extratos/Frações	Polifenóis totais	Taninos totais
Ciclohexano (EC)	0,00	0,00
Acetato de etila (EAE)	6,63 ± 0,13	1,82 ± 0,17
Etanólico (EE)	7,26 ± 0,04	2,76 ± 0,10*
Aquoso (EA)	4,95 ± 0,02	1,46 ± 0,06
Hidroalcoólico (EH)	6,96 ± 0,09	2,96 ± 0,08*
Aquoso (FA)	6,16 ± 0,03	2,71 ± 0,05*
Acetato de etila (FAE)	7,12 ± 0,03	2,00 ± 0,04

O teor de polifenóis e taninos totais foi expresso em mg GAE/g de resíduo seco. As medias marcadas com (*) não são significativamente diferentes ($p < 0,05$).

O conteúdo de polifenóis totais variou de $4,95 \pm 0,02$ a $7,12 \pm 0,03$ mg GAE/g de resíduo seco. Esses resultados indicam uma alta concentração desses componentes nos extratos polares. Os conteúdos de polifenóis foram até cerca de 30 vezes maiores que os valores obtidos no extrato etanólico da madeira de *Hymenaea stigonocarpa* obtidos por Oliveira e colaboradores (2010).

3.4.4 Análise por cromatografia liquida de alta eficiência (CLAE-DAD)

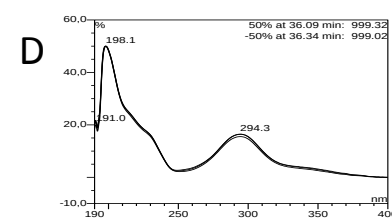
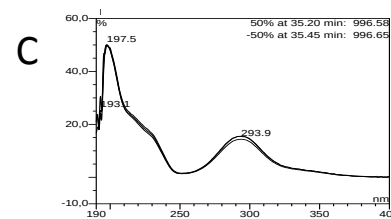
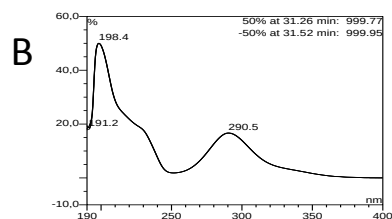
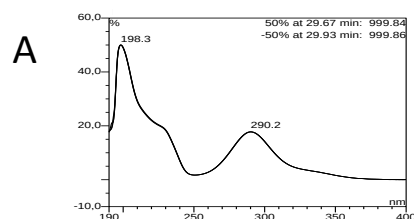
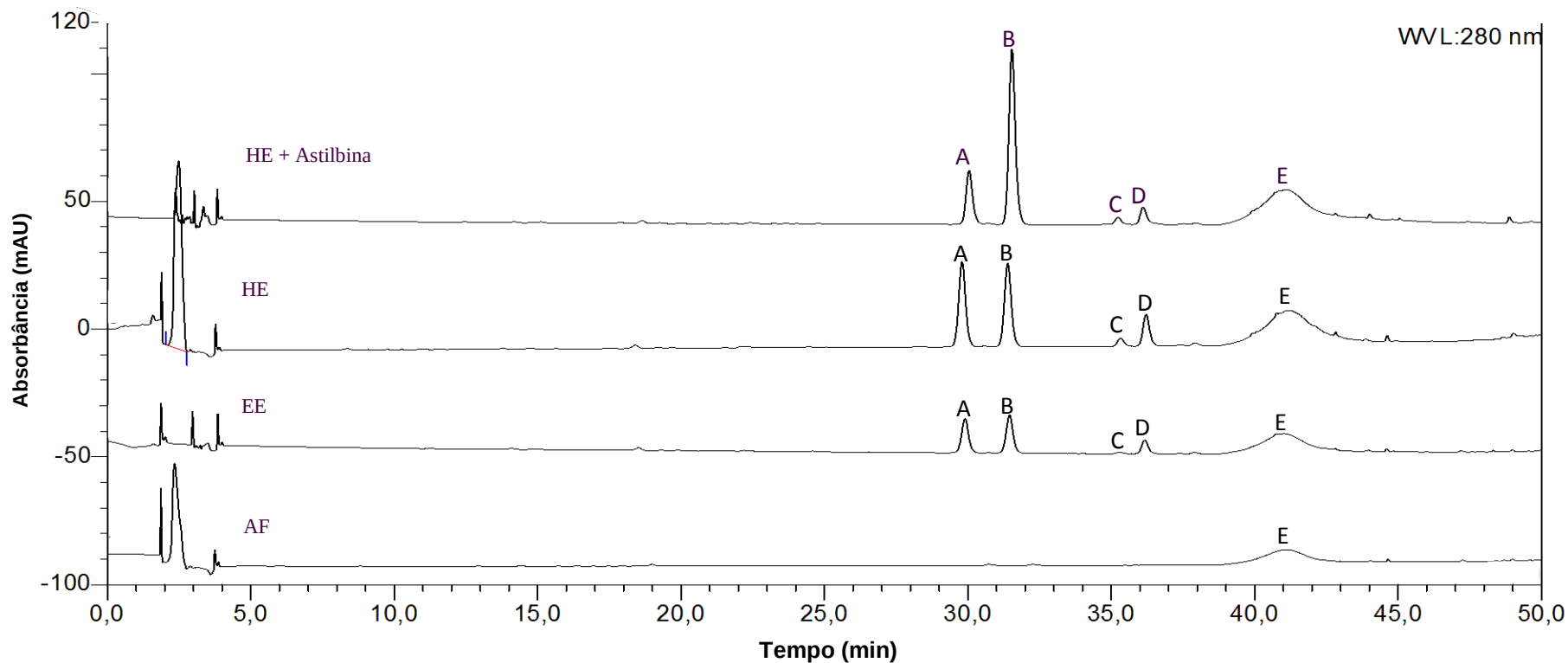
Os extratos e frações EE, EH e FA com os maiores conteúdos de taninos foram selecionados para serem analisados por CLAE-DAD. O cromatograma desses extratos e frações é mostrado na figura 44.

Picos A, B C e D, presentes em todos os cromatogramas, eluidos no tempo de retenção 29-37 min e absorvidos em 280 nm, com um braço próximo a 198 nm, e uma absorção máxima entre 290 e 294 nm são sugestivos de derivados de flavonoides. Esses espectros estão de acordo com dados da literatura (MABRY et al., 1970)

O pico B com o tempo de retenção de 31.453 minutos foi identificado como astilbina. Essa identificação foi possível devido a comparação entre o espectro de absorção do EE, EH e EH + astilbina, com absorção máxima de 290,3 nm.

A onda E com o tempo de retenção entre 39 – 48 min parece estar relacionada a taninos condensados observados neste estudo na análise por CCD.

Figura 44 - Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD de diferentes extratos da casca do caule de *Hymenaea stigonocarpa*



Extrato Hidroalcoólico (EH) + Astilbina (98%), Extrato Hidroalcoólico (EH), Extrato Etanólico (EE) e Fração Aquosa (FA) obtidos por CLAE-DAD a 280nm. Cada pico cromatográfico aparece com seu correspondente tempo de retenção. Espectro de UV com padrão derivado de flavonoides (A, C e D) e identificado como astilbina (B).

Apenas monômeros e oligômeros até tetrâmeros de catequinas e proantocianidinas podem ser separadas e detectadas como um pico definido (ANDERSEN, 2006; PARK, 2012). Catequinas poliméricas presentes em muitos materiais vegetais não resultam em picos bem definidos. Eles provocam uma deriva na linha de base e a formação de ondas características nos cromatogramas em CLAE.

3.4.5 Atividade antibacteriana

Não existe um consenso científico sobre os valores de concentrações inibitórias mínimas aceitáveis para produtos naturais quando comparados com antibióticos padrões, alguns autores consideram somente resultados similares aos de antibióticos, enquanto outros consideram com eficácia mesmo aqueles com níveis de inibições superiores.

Sartoratto et al. (2004), propôs uma classificação com base nos resultados da CIM, considerando como: forte inibição quando obtida para valores de CIM entre 50 e 500 µg/ml, uma atividade moderada para valores de CIM entre 600 e 1500 µg/ml, e uma atividade fraca, para valores acima de 1,500 µg/ml.

No presente estudo foi observado que a atividade antimicrobiana dos extratos EC, EAE, EE e EA da casca do caule de *Hymenaea stigonocarpa*, frente às bactérias Gram negativas, apresentaram atividade moderada. A CIM para os extratos foi de 1024 µg/mL frente às espécies de bacilos Gram negativos avaliados.

O extrato EC constituído por terpenos, esteróide e cumarina, também apresentou moderada inibição frente os Bacilos Gram negativos avaliados, apresentando valores de CMI de 1024 µg/mL para as enterobacterias e bactérias não fermentadoras. Os extratos EAE, EE e EA apresentando taninos e flavonóides, apresentaram também inibição moderada sobre as bactérias Gram negativas avaliadas com valores de CMI de 1024µg/mL para as enterobacterias e bactérias não fermentadoras.

Quanto à atividade antimicrobiana dos extratos frente às bactérias Gram negativas, os extratos apresentaram atividade moderada em relação a todas as espécies avaliadas, devido a presença de forte carga negativa na parede celular deste tipo de bactéria, em decorrência da presença de lipopolissacarídeos (IKIGAI et al.,1993), o que dificultaria a interação dos compostos do extrato com o micro-

organismo. Fato que não ocorre em bactérias Gram positivas, pela diferença na característica elétrica.

Os extratos avaliados frente à *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis* apresentaram uma melhor atividade quando comparadas aos bacilos Gram negativos, (tabela 2).

O extrato EC obtido por extração com ciclohexano, constituído por terpenos, esteróides e cumarina, apresentou moderada atividade sobre as cepas de *S.aureus* e *Enterococcus faecalis*. As CMI foram de 1024 µg/mL para *Enterococcus faecalis* e *S. aureus* (Tabela 2).

Quanto ao extrato EAE obtido por extração com acetato de etila como solvente e constituído por flavonóides e taninos condensados, foi observado uma maior atividade, cujas CIM, foram de 512 µg/mL para *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis* (tabela 2).

O extrato EE obtido através do uso de álcool etílico como líquido extrativo, constituído também por flavonóides e taninos condensados, apresentou melhor atividade quando comparada aos dois extratos anteriores, cujos valores de CIM variaram de 128 a 256 g/mL para *Staphylococcus aureus* e foi 256 µg/mL para *Enterococcus faecalis* (tabela 2).

O extrato EA obtido a partir do uso maceração utilizando água como solução extrativa foi constituído, por flavonóides, e taninos condensados, apresentou frente as cepas avaliadas se comparada ao extrato extratos anteriormente relatados, com valores de CMB e CIM de 512 µg/mL para *Staphylococcus aureus*.

O extrato EH obtido por maceração, utilizando etanol: água 50 v/v como solução extrativa, constituído por flavonóides e taninos condensados, não apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) se comparado ao extrato EE frente à *Staphylococcus aureus* (tabela 2).

Cepas de *Staphylococcus aureus* mostraram ser mais susceptíveis aos extratos EC, EAE, EE, EA e EH, sendo este micro-organismo selecionado para os estudos posteriores.

Para avaliarmos que classes de metabólitos secundários poderiam apresentar maior atividade antibacteriana frente às cepas de *Staphylococcus aureus*, foram avaliadas as frações FA e FAE, obtidos após partição do extrato EH, ricos em taninos condensados e flavonóides respectivamente.

Tabela 2 - Concentração inibitória mínima dos extratos e frações de *Hymenaea stigonocarpa* frente a cocos Gram-positivos.

Cocos Gram positivos	Origem	Concentração Inibitória Mínima (µg/mL)									
		EC	EAE	EE	EA	EH	FA	FAE	AST	OXA	TEI
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25293	ATCC	512	512	256	512	128	128	128	1024	0.12	ND
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 33591	ATCC	1024	512	256	512	256	256	512	1024	64	ND
<i>Staphylococcus aureus</i> AM 02	Hemocultura	1024	512	256	512	256	125	512	1024	32	ND
<i>Staphylococcus aureus</i> AM 04	Escarro	512	512	128	128	128	128	256	1024	1.0	ND
<i>Staphylococcus aureus</i> AM 05	Sec. Vaginal	512	512	512	512	128	64	512	1024	1.0	ND
<i>Staphylococcus aureus</i> UFPEDA 01	Escarro	512	512	128	512	64	64	256	1024	0.12	ND
<i>Staphylococcus aureus</i> AM 13	Hemocultura	512	512	256	512	256	125	256	1024	0.12	ND
<i>Staphylococcus aureus</i> IC 17	Secreção	512	512	256	512	256	256	256	1024	256	ND
<i>Staphylococcus aureus</i> AM 18	Hemocultura	512	512	256	512	64	64	512	1024	256	ND
<i>Staphylococcus aureus</i> AM 19	Hemocultura	1024	512	256	512	256	128	512	1024	16	ND
<i>Staphylococcus aureus</i> AM 20	Sec. Traqueal	1024	512	256	512	256	256	512	1024	8.0	ND
<i>Staphylococcus aureus</i> AM 21	Sec. Traqueal	1024	512	256	512	256	256	512	1024	16	ND
<i>Enterococcus faecalis</i> 245	Hemocultura	1024	512	256	256	256	256	512	1024	ND	8.0
<i>Enterococcus faecalis</i> 272	Hemocultura	1024	512	256	512	512	256	512	1024	ND	8.0
<i>Enterococcus faecalis</i> 292	Urina	1024	512	256	512	256	256	512	1024	ND	0.25
<i>Enterococcus faecalis</i> 335	Hemocultura	1024	512	256	512	256	256	512	1024	ND	4.0

American Type Culture Collection **ATCC**; Extrato Ciclohexano **CE**; Extrato Acetato de Etila **EAE**; Extrato Etanólico **EE**; Extrato Aquoso **AE**; extrato Hidroalcoólico **HE**; Fração Aquosa **FA**; Fração Acetato de Etila **FAE**; oxacillina **OXA**; Teicoplanina **TEI**; Astilbina **AST**; Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Micro-organismos **LFBM**, não determinado **ND**.

A fração FA constituída apenas por taninos condensados (figura 15) apresentou atividade estatisticamente semelhante aos extratos EE e EH cujo valor de CMI variou entre 64 e 256 µg/mL para cepas MSSA e MRSA (tabela 2).

A fração FAE, rica em flavonóides, apresentou uma menor atividade quando comparada a fração FA para as cepas MSSA e MRSA ($p < 0,05$). Os valores de CIM variaram de 128 a 512 µg/mL e 256 a 512 µg/mL respectivamente. (tabela 2).

Com o objetivo de avaliar a influência da astilbina na atividade antibacteriana da fração FAE, foi realizada uma avaliação utilizando um padrão de astilbina com 98% de pureza. Quando comparada sua resposta ao extrato FAE, podemos concluir que a atividade antimicrobiana não sofre grande influencia dos flavonóides, pois os valores de CMI foram de 1024µg/mL na maioria das cepas estudadas tanto para MRSA como MSSA. Apesar da astilbina também apresentar atividade antimicrobiana, pois apresentou CIM entre 512µg/mL para cepas MSSA e MRSA (tabela 2).

Após a avaliação de todos os extratos obtidos a partir de diferentes extrações foi possível agrupar os valores de CIM obtidos frente a cepas de *Staphylococcus aureus* testadas, assim de acordo com a atividade dos extratos observamos a seguinte sequência de quanto os valores da CMI

Os extratos EC e EAE (apolares), constituídos por terpenos, esteroides e cumarinas foram os menos ativos. A atividade frente à *Staphylococcus aureus*, porém é relatada quando avaliado o óleo de capim limão (*Cymbopogon citrates*), rico em terpenos tais como: citral, geraniol e myrceno (AIEMSAARD *et al.*, 2011).

O mecanismo de ação destas substâncias ainda não é completamente entendido, mas especula-se que está envolvido no rompimento de constituinte lipofílicos das membranas (COWAN, 1999). Os terpenos parecem ter múltiplos alvos na célula bacteriana, dependendo da concentração utilizada assim como da composição do extrato avaliado (AIEMSAARD *et al.*, 2011).

Atividades melhores foram obtidas, porém pelos extratos mais polares tais como EA e a fração FAE, mas as melhores atividades foram observadas após a avaliação dos extratos EE, EH e FA. Avaliando os constituintes destes extratos foi possível observar que os extratos com ausência de taninos condensados foram os menos ativos, sendo os mais ativos os que continham essa classe de metabólitos.

3.4.6 Alterações ultraestruturais

Para esta análise foi utilizado o extrato Hidroalcoólico de *Hymenaea stigonocarpa*. A seleção deste extrato não foi apenas devido a sua atividade, pois o extrato etanólico e a fração aquosa não apresentam diferenças significativas em relação a este. Além da atividade antibacteriana, o hidroalcoólico apresentou mais fácil obtenção, menor toxicidade em relação ao solvente utilizado além de maior conteúdo de flavonoides, metabólitos de grande potencial farmacológico.

Quanto ao micro-organismo avaliado foi utilizada cepa padrão de *Staphylococcus aureus* ATCC 33591 resistente a metilina. As alterações provocadas na cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 33591 exposta ao extrato Hidroalcoólico de *Hymenaea stigonocarpa* presente na concentração inibitória mínima, e na metade da concentração inibitória mínima podem ser observadas na figura 45.

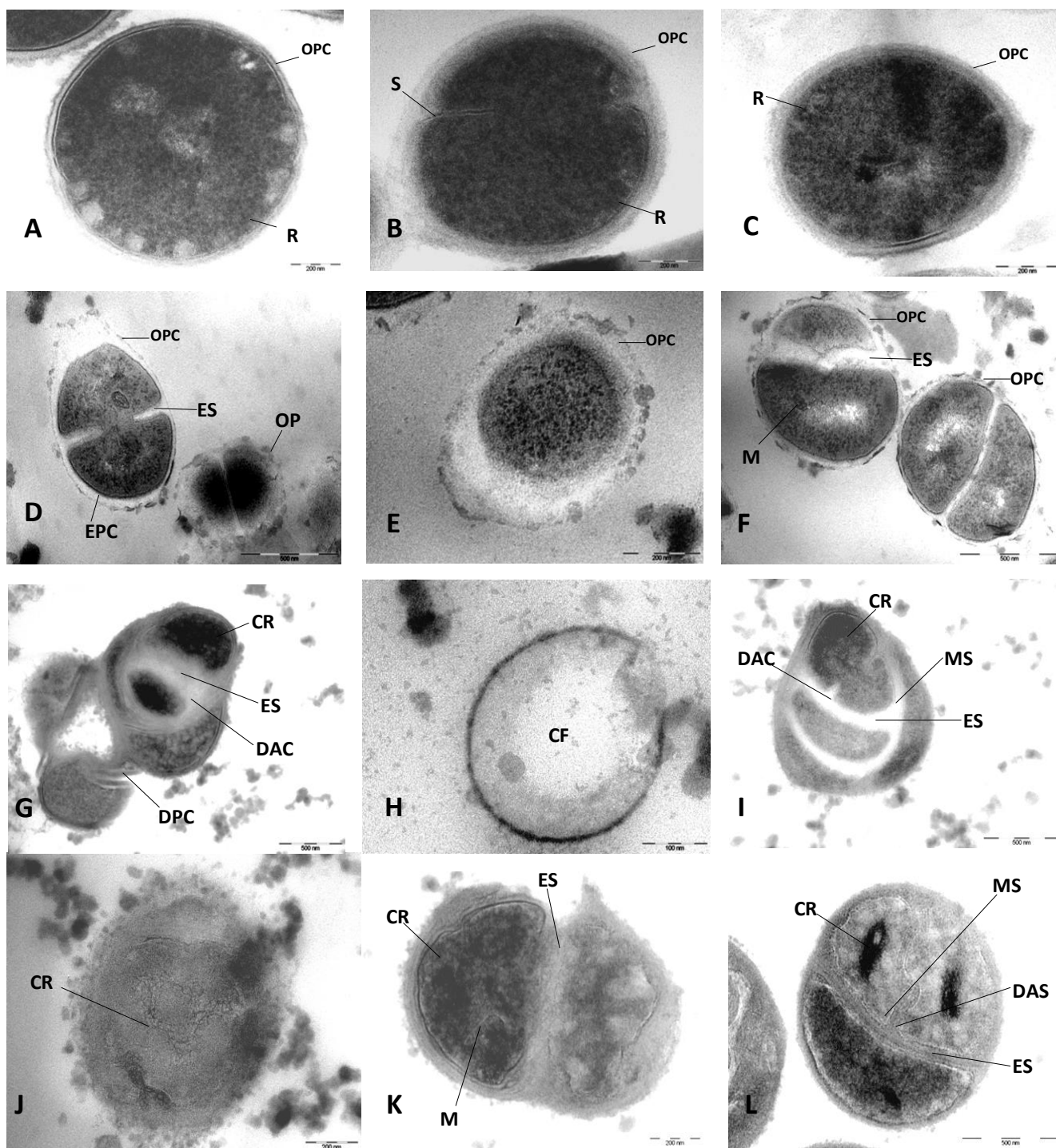
O tratamento na metade da concentração inibitória mínima (Figura 45 D a F) levou ao aparecimento de orifícios na parede celular (OPC), a aparência de parede parcialmente digerida, a esfoliação na superfície bacteriana, ao espessamento do septo (ES) e exposição das amostras da membrana citoplasmática.

O surgimento de pequenos orifícios na parede celular (OPC) ocorre devido à ação enzimas bacterianas chamadas autolisinas presentes entre os peptidoglicanos, a fim de permitir a inserção de novas moléculas. Em bactérias tratadas com determinadas classes de agentes antimicrobianos, a inserção de peptidoglicano não acontece. Assim, os monómeros não são anexados à extremidade crescente da parede celular bacteriana pelas as enzimas transglicosidase e transpeptidase, ocorrendo falhas na parede celular (SANTHANA, 2007).

A concentração inibitória mínima o extrato hidroalcoólico (256 µg/ml) provocou alterações em várias estruturas celulares. Foram observados condensação dos ribossomos (CR), desligamento parede celular (DPC), divisão anormal da célula (DAC), espessamento dos septos (ES) assim como múltiplos septos (MS), presença de células fantasmas (CF) (Figura 45 G a L).

Também foram observadas paredes celulares sendo rompidas e danificadas, resultando numa libertação de materiais celulares para o citoplasma.

Figura 45 - Imagens da microscopia eletrônica de transmissão da cepa de *S. aureus* ATCC 33591 tratada com diferentes concentrações do extrato hidroalcoólico de *H. stigonocarpa*.



Células não tratadas (A-C) mostram parede celular (PC), ribossomos (R) e septo (S) da bactéria bem distinta. Tratados com extrato hidroalcoólico de *Hymenaea stigonocarpa* na metade da concentração inibitória mínima (D-F) mostram formação de orifícios na parede celular (OPC), Mesossomos (M) e espessamento da parede celular (EPC) assim como espessamento do septo (ES). Tratados com a concentração inibitória mínima (G-L) mostram condensação dos ribossomos (CR), desprendimento da parede celular (DPC), espessamento (ES) e múltiplos septos (MS) divisão aberrante da célula (DAC), células fantasmas (CF), Mesossomos (M) e DNA coagulado (DC). Aumento de A, B C E J e K de 30000X e de D, F, G, H e L de 65120X.

Polifenóis podem ligar-se diretamente para parede celular e interferir com a sua integridade (ZHAO, 2001). A falha na inserção de peptidoglicano pode causar na parede celular o surgimento desses pequenos orifícios (OPC), que são provocados pelo movimento da molécula de água a partir do ambiente externo para a região intracelular. Isso ocorre devido à diferença de pressão osmótica entre os dois ambientes. Se este evento prolongar, pode causar a lise das bactérias (SCHITTO, 2006).

O espessamento da parede celular e a condensação dos ribossomos (CR) em bactérias indica a presença de mecanismos de defesa para manter a pressão osmótica após ação extrato hidroalcoólico. Bactérias também produzem mais peptidoglicano para se proteger e desenvolver mesossomos (ME), implicados com a respiração celular (SANTHANA, 2007).

Alterações nos componentes intracelulares tais como ácidos nucleicos, proteínas, ribossomos agregados são visualizadas nas figuras 45 G – L, elas podem sugerir a expressão possíveis efeitos sobre a função do DNA girase (ROMANO et. Al. 2013), que ficaria impedido de cumprir o sua função durante a replicação do DNA. O RNAm que seria liberado a partir do DNA super-enrolamento não poderia ser enrolado de volta porque a DNA girase estaria imobilizada.

Assim, as alterações citológicas observadas por TEM após o uso de diferentes concentrações do extrato hidroalcoólico da casca do caule de *Hymenaea stigonocarpa* demonstram a sua ação antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus*.

3.5 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos permitem constatar que a análise fitoquímica da casca do caule de *Hymenaea stigonocarpa* Mart. revelou a presença de terpenos, esteróides, flavonóides, cumarinas e taninos condensados, sendo os taninos condensados e os flavonóides os metabólitos majoritários.

Dentre os metabólitos presentes nos extratos de *Hymenaea stigonocarpa* avaliados por CLAE-DAD foram observados quatro picos correspondentes a flavonoides, um deles foi é sugestivo de astilbina, de acordo com o tempo de retenção e o espectro de UV.

Quanto à avaliação botânica pôde-se observar que os sítios de armazenamento dos taninos na casca do caule de *Hymenaea stigonocarpa* são: feloderme, parênquima cortical e floema em amostras de indivíduos jovens e adultos e que a casca do caule de ramos jovens pode servir como fonte para obtenção de taninos condensados.

Quanto à atividade antibacteriana todos os extratos obtidos apresentam atividade moderada frente a Bacilos Gram negativos, como também a fração rica em terpenos, esteróides e cumarinas, frente às bactérias Gram positivas. O micro-organismo *Staphylococcus aureus* foi das bactérias Gram positivas avaliadas, a mais suscetível à ação dos extratos, sendo os extratos que continham taninos condensados os que apresentaram as melhores atividades. Dentre os extratos com maiores teores de taninos condensados, a fração aquosa e os extratos etanólico e hidroalcoólicos, não apresentaram diferenças significativas quanto à atividade antibacteriana, sendo o extrato hidroalcoólico selecionado por ser o de mais fácil obtenção.

O extrato Hidroalcoólico avaliado na concentração inibitória mínima e na metade da CIM levou a alterações ultraestruturais da parede celular, septo e citoplasma de *Staphylococcus aureus* ATCC 33591.

REFERÊNCIAS

- ABDEL-KADER, M., BERGER, J. M., SLEBODNICK, C., HOCH, J., MELONE, S., WISSE, J.H., WERKHOVEN, M. C. M., MAMBER, S., KINGSTON, D. G. I. Isolation and absolute configuration of ent-halimane diterpenoids from *Hymenaea courbaril* from the Suriname rain forest. **Journal of Natural Products** 65(1): 11-15, 2002.
- ADEBAJO, A. C., OLOREK, K. J., ALADESANMI, A. J. Antimicrobial activities and microbial transformation of volatile oils of *Eugenia uniflora*. **Fitoterapia**, v. 15, p. 451-455, 1989.
- AIEMSAARD, J.; AIUMLAMAI, S.; AROMDEE, C.; TAWEECHASUPAPONG, S.; KHUNKITTI, W. The effect of lemongrass oil and its major components on clinical isolate mastitis pathogens and their mechanisms of action on *Staphylococcus aureus* DMST 4745. **Research in veterinary science**, v. 91, n. 3, p. 31–7, 2011.
- AMORIM, E. L. C.; LIMA, C. S. A.; HIGINO, J. S.; SILVA, L. R. S.; ALBUQUERQUE, U. P. Fitoterapia: instrumento para uma melhor qualidade de vida. **Infarma**. v. 15, n.1-3. 66-69. 2003
- ANDERSEN O. M., MARKHAM K. R., **Flavonoids: Chemistry, biochemistry and applications**. Flórida: Taylor & Francis, pp.17-20, 2006.
- ARGYROPOULOS, D. S. **Advances in lignocellulosics characterization**. Atlanta: TAPPI Press, p. 157-180, 1999.
- ASMAWI, M. Z., RIANSE, U., SAHIDIN, I., DHIANAWATY, D., SOEMARDJI, A. A. Anti-hypertensive activity of Alang Imperata cylindrica (L.) Beauv. root methanolic extract on male Wistar rat, **International Journal of Research in pharmaceutical sciences** 4, 537–542, 2013.
- BATISTA A. G., ESTEVES E. A., DESSIMONI-PINTO N. A. V., OLIVEIRA L. G., PIRES S. T., SANTANA R. C., “Chemical composition of jatobá-do-cerrado (*Hymenaea stigonocarpa* Mart.) flour and its effect on growth of rats,” **Alimentos e Nutrição Araraquara**, no. 2, pp.173-180, 2011.
- BIESKI G. C., SANTOS F. R., OLIVEIRA R. M., ESPINOSA M. M., MACEDO M., ALBUQUERQUE U. P., MARTINS D. T. O., “Ethnopharmacology of Medicinal Plants of the Pantanal Region (Mato Grosso, Brazil),” **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, no.2012, pp.1-36, 2012.
- BORGES, R., VINÍCIUS, M., NASCIMENTO, M., AUGUSTTO, A., CARVALHO, V. DE, VALADARES, M. C., CARLOS, L. (2013). Antinociceptive and Anti- Inflammatory Activities of the Ethanolic Extract from *Synadenium umbellatum* Pax . (Euphorbiaceae) Leaves and Its Fractions, **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, p 1-9, 2013.
- BRITO, A. R. M. S., BRITO, A. A. S. Forty year of brazilian medicinal plant research. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 39, n.1, p. 53-67, 1993.

BUKATSCH F. Bemerkungen zur doppelfarbung astrablau-safranin. **Mikrokosmos, Stuttgart**, v. 61, n.8, p.255, 1972.

CECHINEL FILHO, V. & YUNES, R.A. Estratégias para obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais: Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**. v. 21, n. 1, p. 99-105, 1998.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE; **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**; Twenty-Second Informational Supplement M100-S22, Vol.32 No. 3, Wayne, PA: CLSI, 2012.

COELHO DE SOUZA, G., HAAS, A. P. S., VON POSER, G. L., SCHAPOVAL, E. E. S., ELISABETSKY, E. Etnopharmacological studies of antimicrobial remedies in South of Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 90, p. 135-143, 2004.

COWAN, M. M. Plant products as antimicrobial agents. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 4, p. 564-582, 1999.

DIMECH, G. S., SOARES, L. A. L., FERREIRA, M. A., DE OLIVEIRA, A. G. V., CARVALHO, M. D. C., & XIMENES, E. A. 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. 1–8, 2013.

DOMÉNECH-CARBÓ, M. T., CRUZ-CAÑIZARES, J., OSETE-CORTINA, L., DOMÉNECH-CARBÓ, A., DAVID, H., Ageing behaviour and analytical characterization of the *Jatobá* resin collected from *Hymenaea stigonocarpa* Mart. **International Journal of Mass Spectrometry** v. 284, n.1, p. 81-92, 2009.

EUROPEAN PHARMACOPOEIA. Directorate for the quality of medicines of the Council of Europe (EDQM). 5.ed. **Strasbourg: Council of Europe**3000p., 2005.

FARIA, D. L. A., EDWARDS, H. G.M., AFONSO, M. C., BRODY, R. H., MORAIS J. L. Raman spectroscopic analysis of a *tembetá*: a resin archaeological artefact in need of conservation. **Spectrochimica Acta**, v.60, Part a, p.1505–1513, 2004.

FESSENDEN, R. J. **Organic chemistry**. Boston: Willard Grant Pres, 1982.

GABE, M. **Techniques histologiques**. Paris: Masson & Cie 1113p, 1968.

GEISSMAN, T. A. **Flavonoid compounds, tannins, lignins and related compounds**. New York: Elsevier, 265p, 1963.

GIACOMINI, R. A., LIGIÉRO, C. B. P., ANDREÃO, P. S. S., MIRANDA, P. C. M. L., BRAZ-FILHO, R., Estudo Fitoquímico do Extrato Hexânico do Epicarpo de *Hymenaea stigonocarpa* (Jatobá do Cerrado) Sociedade Brasileira de Química (SBQ) **29a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, 2006.

GIBBONS, S. Anti-staphylococcal plant natural products. **Natural products reports**. v. 21; p. 263-277, 2004

GIBBONS, S., OHLENDORF, B., JOHNSEN, I. The genus *Hypericum*-available resource of anti-Staphylococcal Leads. **Fitoterapia**, v.73, n.4, p.300-304, July 2002.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N.P. Plantas medicinais: fatores de influencia de metabolitos secundarios. **Química Nova**. v. 30; n. 2; p. 374-381. 2007

GOTLIEB, O. New and underutilized plants in the Americas: solution to problems of inventory through systematics. **Interciência**, v.6, n.1, p.22-29, 1981

GRANDI T. S. M., TRINDADE J. A, PINTO M. J. F., FERREIRA L. L., CATELLA A. C., "Plantas medicinais de Minas Gerais, Brasil," **Acta Botanica Brasilica** no. v3, p.185-224,1989.

GUNICS, G., FARKAS, S., MOTOHASHI, N., SHAH, A., HARSUKH, G., KAWASE, M., MOLNÁR, J. Interaction between 3,5-diacetyl-1,4-dihydropyridines and ampicillin, and erythromycin on different *E. coli* strains. **In Vivo**. v. 20; n. 3; p. 367-372. 2006.

HAGERMAN, A. E., ZHAO, Y., JOHNSON, S. E., SHAHADI, F. Methods for determination of condensed and hydrolyzable tannins. **Acs Symposium Series**, v. 662, p. 209-222, 1997.

HARBONE, J.B. **Phytochemical methods**, 3 ed., London: Chapman & Hall, p. 288, 1998

HEMAISWARYA, S., KRUTHIVENTI, A. K., DOBLE, M. Synergism between natural products and antibiotics against infectious diseases.(REVIEW). **Phytomedicine**. v. 15; p. 639 – 652. 2008

HIMEJIMA, M., KUBO, I. 1991. Antibacterial agents from the cashew *Anacardium occidentale* (Anacardiaceae) nut shell oil. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 39, n. 2, p. 418-421.

IKIGAI, H., NAKAE, T., HARA, Y. AND SHIMAMURA, T. (1993) Bactericidal catechins damage the lipid bilayer. **Biochimica et Biophysica Acta**1147 , 132 -136

ISHIBASHI, M., ODA, H., MITAMURA, M., OKUYAMA, E., KOMIYAMA, K., KAWAGUCHI, H., WATANABE, T., ALVES, S. M., MAEKAWA, T., OHTSUK, K. Casein Kinase II Inhibitors isolated from two Brazilian plants *Hymenaea parvifolia* and *Wulffia baccata*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.9, p. 2157-2160, 1999.

JOHANSEN D. A. 1940. **Plant Microtechnique** . McGraw-Hill, New York..523p.

KLEIN, T., LONGHINI, R., BRUSCHI, M. L., MELLO, J. C. P. Fitoterápicos: um mercado promissor. **Revista Ciência Farmacológica Básica Aplicada**. 2009, 30(3):241-248.

KUBO, I., MUROI, H., HIMEJIMA, M. Antibacterial Activity of Totarol and its Potentiation. **Journal of Natural Products**, v. 55 n.10, p. 1436-1440, 1992.

LANGENHEIM, J. H., HALL G. D., "Sesquiterpene deterrence of a leaf-tying lepidopteran, *Stenoma ferrocanella*, on *Hymenaea stigonocarpa* in Central Brazil," **Biochemical Systematics and Ecology**, n.11, p. 29–36, 1983.

LANGENHEIM, J. H., CONVIS, C. L., MACEDO, C. A. STUBBLEBINE, W. H., *Hymenaea* and *Copaifera* leaf sesquiterpenes in relation to lepidopteran herbivory in southeastern Brazil, **Biochemical Systematics and Ecology** v. 14, p.1Pages 41-49, 1986.

LANGENHEIM, J. H., LEE, Y., MARTIN, S. S. An evolutionary and ecological perspective of Amazonian Hylaea species of *Hymenaea* (Leguminosae: Caesalpinioideae). **Acta amazonica**, Manaus, v.3, n.1 p. 5-38, 1973.

LANGENHEIM, J. H. Leguminous resin-producing trees in Africa and South America. Pages 89-104 in: **Tropical Forest Ecosystems in Africa as South America: A comparative review** B.J.Meggers, E.S. Ayensu, and W.D. Duckworth, eds. Smithsonian Press, Washington DC. 1972

LEE, Y. T. & LANGENHEIM, J. H. **Systematics of genus *Hymenaea* L.** (Leguminosae, Caesalpinioideae, Detarieae). *University of California Publication in Botany*, 69: 98, 1975.

LIMA, C. R., VASCONCELOS, C. F. B., COSTA-SILVA, J. H., MARANHÃO, C. A, COSTA, J., BATISTA, T. M., WANDERLEY, A G. Anti-diabetic activity of extract from *Persea americana* Mill. leaf via the activation of protein kinase B (PKB/Akt) in streptozotocin-induced diabetic rats. **Journal of ethnopharmacology**, v.141, n.1, p.517–25, 2012.

LIMA, E. O. Plantas e suas propriedades antimicrobianas: uma breve análise histórica, In: **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**. Argos, Chapecó, p. 479-499, 2001.

LIMA, J. S., REZA, D. L.; TEIXEIRA, S., COSTA, C. Pesquisa clínica: fundamentos, aspectos éticos e perspectivas. **Revista da Sociedade de Cardiologia do Estado do Rio de Janeiro**. Rio de Janeiro, v.16, n.4, p.225-233, 2003.

LOURENÇO, M. V. Biotecnologia de plantas medicinais: produção de biomoléculas. **O biológico** v. 65; n. 1; p. 63-65. 2003

LOVATO, G. A. & NUNES, D. S.. Obtenção de astilbina de *hymenaea stigonocarpa* martius. In: **VII Encontro de Pesquisa da UEPG**, Ponta Grossa, 2007.

MABRY, T. J., MARKHAM, K. R., THOMAS, M. B., **The systematic identification of flavonoids**. Berlin: Springer-Verlag, pp. 151-154, 1970.

MARASCHIN, M., VERPOORTE, R. Engenharia do metabolismo secundário. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**. v. 23, p. 24-28, 1999.

MARINHO, V. M. C.; SEIDL, P. R.; LONGO, W. P. The biological diversity - a potential source of competitive advantage for brazilian pharmaceutical industry. **Espacios**, v. 29; n. 1; p. 49-67. 2008.

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

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

MARTIN, S. S., LANGENHEIM, J. H. & ZAVARIN, E. Sesquiterpenes in leaf pocket resin of *Hymenaea courbaril*. **Phytochemistry**, (11): 3049-3051, 1972.

MARTINS, E. R.; CASTRO, D. M.; CASTELLANI, D. C., DIAS; J. E. **Plantas medicinais** Viçosa: Editora UFV. p. 220, 1994

MATUDA, T. G., NETTO, F. M., Semente de jatobá-do-cerrado: caracterização química, **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.25, n.2, p.353-357, 2005.

MIGUEL, O. G., LIMA, E. O., MORAIS, V. M. F., GOMES, S. T. A., MONACHIE, F. D., BELLA CRUZ, A., BELLA CRUZ, R. C., CECHINEL FILHO, V. Antimicrobial activities constituents isolated from *Lychnophora salicifolia* (Asteraceae). **Phytotherapy Research**, v. 10, p. 694-696, 1996.

MISHRA, A., SHARMA, A. K., KUMAR, S., SAXENA, A. K., & PANDEY, A. K. Bauhinia variegata leaf extracts exhibit considerable antibacterial, antioxidant, and anticancer activities. **BioMed research International** v. 2013, p. 1-11, 2013.

MISHRA, B. B., & TIWARI, V. K. Natural products: an evolving role in future drug discovery. **European journal of medicinal chemistry**, v. 46, n.10, p. 4769-4807, 2011.

MOLNAR, J., MOLNAR, A., SPENGLER, G., MANDI, Y.: Infectious plasmid resistance and efflux pump mediated resistance. **Acta microbiology immunology hungarian journal**. v. 51; n. 3; p. 333-349. 2004

MONTARI, C. A.; BOLZANI, V. S. Planejamento racional de fármacos baseado em produtos naturais. **Química Nova**. v. 24, n. 1, p. 105-111, 2001.

NADINIC, E. L., PENNA, C., SAAVEDRA, C. L., COUSSIO, J. D., GUTKINS, G., DEBENEDETTI, S. L., Aislamiento de los compuestos con actividad antimicrobiana de extratos de *Gentianella achalensis* (Gilg) Ho & Liu (Gentianaceae). **Acta Farmaceutica. Bonaerense**, v. 21, n.2, p. 123-130, 2002.

NEU, R. A. New reagent for differentiating and determining flavones of paper chromatograms. **Naturwissenschaften** v.43 n.82. 1956.

NEWMANN, D. J., CRAGG, G. M., SNADER, K. M. Natural products as source of new drugs over the period 1981-2002. **Journal of Natural Products**, v. 66, p. 1022-1037, 2003.

NOGUEIRA, R. T., SHEPHERD, G. J., LAVERDE, A., MARSAIOLI, A. J., IMAMURA, P. M. Clerodane-type diterpenes from the seed pods of *Hymenaea courbaril* var. *stilbocarpa*. **Phytochemistry**, v.58 n.8, p. 1153–7, 2001.

O'KENNEDY, R. & THORNES, R.D. **Coumarins: biology, applications and mode of action**. New York: John Willey, 1997.

OLIVEIRA, A. B.; BRAGA, F. C. Produtos naturais bioativos de plantas brasileiras e sua contribuição para o desenvolvimento da química medicinal. **Arquivos Brasileiros de Fitomedicina Científica**. São Paulo, v.1, p. 49-58. 2003.

OLIVEIRA, L. S., SANTANA, A. L. B. D., MARANHÃO, C. A., CÁSSIA, R. DE, MIRANDA, M. DE, LÚCIA, V., BIEBER, L. Natural resistance of five woods to *Phanerochaete chrysosporium* degradation. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 64, n.8, p.711–715, 2010.

ORSI, P. R. , BONAMIN, F., SEVERI, J. A., SANTOS, R. C., VILEGAS, W., HIRUMA-LIMA, C. A., DI STASI, L. C., “*Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne: A Brazilian medicinal plant with gastric and duodenal anti-ulcer and antidiarrheal effects in experimental rodent models,” **Journal of Ethnopharmacology**, no.143, pp.81–90, 2012.

OTERO M. J.; HIDALGO L.G. Taninos condensados en especies forrajeras de clima templado: efectos sobre la productividad de rumiantes afectados por parasitosis gastrointestinales (una revisión). **Livestock Research for Rural Development**, v.16, n.2, p.1-9, 2004.

OURISSON, G., KHOO, S. F., OEHLISCHLAGER, A. C., Structure and stereochemistry of the diterpenes of *Hymenaea courbaril* (Caesalpinioideae) seed pod resin, **Tetrahedron**, 29(21), 3379-88, 1973.

PARK, C. H., TANAKA, T., KIM, H. Y., PARK, J. C., YOKOZAWA, T. , “Protective effects of *Corni Fructus* against advanced glycation endproducts and radical scavenging,” **Evidence Based Complementary Alternative medicine**, no. 2012, pp. 1-7, 2012.

PINTO, A. C.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; Lopes, N. P.; EPIFÂNIO, R. A. **Química Nova**, v. 25; 45. 2002

ROBERTSON, E. H.; CARTWRIGHT, R. A.; OLDSCHOOL, M. Phenolic substances of manufactured tea. I. Fractionation and paper chromatography of water-soluble substances. **Journal of Science of Food and Agriculture** v. 7, p. 637-640, 1955.

ROMANO, B., PAGANO, E., MONTANARO, V., FORTUNATO, A.L., MILIC, N., BORRELLI, F. Novel Insights into the Pharmacology of Flavonoids. **Phytotherapy Research**. 27, 11, p 1588–1596, 2013.

SANTHANA, R. L., HING, H. L., BAHARUDIN, O., TEH, H.Z., AIDA, S. R., NOR-ASIHA, C.P., VIMALA, B., PARAMSARVARAM, S., SUMARI, G., HANJEET, K. "Ultrastructural study on the effects of antibiotics on *Staphylococcus aureus* ATCC 25923," **Annals of Microscopy**, no. 7, 109-114. 2007.

SARTORATTO, A., MACHADO, A. L. M., DELARMELINA, C. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology** 35:275-280. 2004

SAVI, A. O., BREVIGLIERI, E., BELLA CRUZ, A., YUNES, R., CECHINEL FILHO, V., Antibacterial activity of *Bauhinia splendens* leaves (Leguminosae). **Revista Biologia Tropical**, v. 44 n.3/ v.45 n.1, p. 601-603, 1997.

SCALBERT, A. Quantitative methods for the estimation of tannins in plant tissues. In: HEMINGWAY, R. W.; LAKS, P. E. **Plant Polyphenols**. New York: Plenum Press, p. 259-280, 1992.

SCHITTO, G., "The importance of the development of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*," **Clinical Microbiology and Infection**, no. 12, pp.3-8. 2006.

SCHLEMPER, S. R., SCHLEMPER, V., SILVA, D., CORDEIRO, F., BELLA CRUZ, A., OLIVEIRA, A. E., CECHINEL FILHO, V., Antibacterial activity of *Persea cordata* steam barks. **Fitoterapia** v. 72, n.1, p. 73-75, 2001.

SHARMA, O. P., DAWRA, R. K., Thin-layer chromatographic separations of lantadens, the pentacyclic triterpenoids from (*Lantana camara*) Plant. **Journal of Chromatography A**, v. 587, p. 351-354, 1991.

SIMÕES, C. M. O., SCHENKEL, E. P., GOSMAN, G., MELLO, J. C. P., MENTZ, L. A., PETROVICK, P. R., **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed., Porto Alegre: Ed. Universitária, UFRGS/UFSC, p. 371-379, 2004.

SIMÕES, K. D. U. J., PESSONI R. A. B., CARDOSO-LOPES E. M., VIVANCO J. M., STERMITZ F. R., BRAGA, M. R., Ipomopsin and hymenain, two biscoumarins from seeds of *Hymenaea courbaril*, **Phytochemistry Letters**, v.2, p.59–62, 2009.

SINGH K. V., SHUKLA N. P. Activity on Multiple resistant bacteria of garlic (*Allium sativum*) extract. **Fitoterapia**. 55:313-315, 1984.

STERN, J. L.; HAGERMAN, A. E.; STEINBERG, P. D.; MASON, P. K. Phlorotannin-protein interactions. **Journal of Chemical Ecology**, v.22, p.1887-1899, 1996.

TERRAS, F. R. G., SCHOOF, H. M. E., THEVISSEN, H. M. E., BROEKAERT, W. F. Synergistic enhancement of the antifungal activity of wheat and barley thionins by radish and oilseed rape 2S albumins and by barley trypsin inhibitors. **Plant Physiology**, v.103, p.1311-1319, 1993.

TOMAZZONI, M. I., NEGRELLE, R. R. B., CENTA, M.L. **Fitoterapia popular: a busca instrumental enquanto prática terapêutica.** Texto & Contexto Enferm. Florianópolis, v.15, n.1, p.115-21, 2006.

TORSSEL, B. G. **Natural product chemistry. A mechanistic and biosynthetic approach to secondary metabolism.** New York: John Willey, p. 401, 1989.

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

VILA VERDE G. M., PAULA J. R., CARNEIRO D. M., "Levantamento etnobotânico das plantas medicinais do cerrado utilizadas pela população de Mossamedes (GO)," **Revista Brasileira de Farmacognosia**, n.13, p. 64-66, 2003.

VOLAK, J., STODOLA, J., **Plantas medicinais.** São Paulo: Ed. Inquérito, p. 319, 1990.

WAGNER, H., BLADT, S., Plant drug analysis. **A thin layer chromatography atlas.** 2ed. Berlin: Springer Verlag, p. 384, 1996.

WAGNER, H., ULRICH-MERZENICH, G. Synergy research: approaching a new generation of phytopharmaceuticals. **Phytomedicine.** v. 16; n. 2. p. 97-110. 2009.

WALLENFELS, K., Detection of reducing sugars in paper chromatogram and quantitative evaluation. **Naturwissenschaften** v. 37, p. 491-492, 1950.

WATSON, L., AND DALLWITZ, M.J. onwards. **The families of flowering plants: descriptions, illustrations, identification, and information retrieval,** 1992. Disponível em: <<http://delta-intkey.com/angio/>>. Acesso em: 10 fev. 2013, 19:53:50.

WILCOX, D., DOVE, B., MCDAVID, D., GREER, D. Image Tool. **University of Texas Health Science Center.** San Antonio. Texas, 2002.

ZACCHINO, S. A., YUNES, R. A., CECHINAL FILHO, V., ENRIZ, R. D., KOUZNETSOV, V., RIBAS, J. C., The need for new antifungal drugs: screening for antifungal compounds with a selective mode of action with emphasis on the inhibitors of the fungal cell wall. In: Rai, M., Mares, D. (Editors) **Plant-derived antimycotics current trends an future prospect.** The Haworth Press, p. 1-4, 2003.

ZHANG, Y. & LEWIS, K. Fabatins: new antimicrobial plant peptides. **FEMS Microbiological Letters**, v.149, p.59-64, 1997.

ZHAO, W., HU, Z., OKUBO, S., & HARA, Y. (2001). Mechanism of Synergy between Epigallocatechin Gallate and β -Lactams against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* **Antimicrobial Agents Chemotherapy.** v.45, n.6, p.1111-1115, 2001.

4 ASSOCIAÇÃO DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DA CASCA DO CAULE DE *Hymenaea stigonocarpa* MART EX HAYNE COM AGENTES ANTIMICROBIANOS FRENTE A CEPAS DE *Staphylococcus aureus* RESISTENTES A METICILINA (MRSA)

4.1 INTRODUÇÃO

Os antibióticos são uma das mais importantes armas no combate às infecções bacterianas. No entanto, ao longo das últimas décadas, seus benefícios à saúde estão sob ameaça, pois muitos antibióticos tornaram-se cada vez menos eficazes devido ao aparecimento de bactérias resistentes (RAKHOLIYA et al., 2012)

Staphylococcus aureus resistente à meticilina (MRSA) é um microrganismo patogênico nosocomial de ampla disseminação e a sua prevalência na comunidade tem sido também relatada. Existem publicações abordando o surgimento de cepas de MRSA mostrando resistência a vários outros agentes antimicrobianos. Desta forma o desenvolvimento de tal multirresistência resultou em uma limitação terapêutica e num prognóstico desfavorável para o paciente (CATÃO et al., 2013).

Considerando-se o fato da resistência de cepas MRSA à múltiplas drogas, estudos que buscam avaliar as propriedades antibacterianas de plantas superiores contra microrganismos resistentes são incentivados pelos órgãos públicos de todo mundo (MANDAL et al., 2010) .

O sinergismo entre agentes antimicrobianos convencionais e os compostos bioativos de plantas é uma metodologia que tem sido amplamente estudada para bloquear o desenvolvimento da multirresistência. A terapia com associação de drogas na maior parte das vezes é benéfica para o paciente portador de infecções de difícil tratamento. (OKOYE et al., 2013). Vários estudos têm relatado efeitos sinérgicos com redução significativa nas concentrações inibitórias mínimas (CIM) dos antibióticos, resultante da combinação de diferentes antibióticos com diferentes extratos brutos de plantas (ADWAN et al., 2010).

Diversos estudos têm investigado as interações entre antibióticos e extratos brutos contra *Staphylococcus aureus* multidroga resistente (GIBBONS, 2004; ROCCARO et al.; 2004; FUJITA et al.; 2005; HATANO et al.; 2005; KITAHARA et al., 2006; BETONI et al., 2006; ESIMONE et al., 2006; ADWAN et al., 2008; PESEWU et al., 2008).

A abordagem não é exclusiva para combinações de extratos, mas também combinações entre metabólitos secundários isolados e óleos essenciais com agentes antimicrobianos (HEMAISWARYA et al., 2008; WAGNER; MERZENICH, 2009). Além de atingir efeitos sinérgicos, associações de dois ou mais compostos são utilizados pelas seguintes razões: (1) para prevenir o surgimento de cepas resistentes, (2) para diminuir a dose-toxica relacionada, (3) para atingir o amplo espectro de atividade (TAMA et al., 2012).

No presente estudo foi avaliada a interação entre o extrato hidroalcoólico de *Hymenaea stigonocarpa* e antibióticos beta-lactâmicos e fluoroquinolonas frente a *S. aureus* multidroga resistentes.

4.1.1 A evolução da resistência de *Staphylococcus aureus* aos agentes antimicrobianos.

O gênero *Staphylococcus* pertencente à família Micrococcaceae, é composto de 33 espécies, 17 das quais podem ser isoladas de amostra biológica humana. Os estafilococos são geralmente encontrados na pele e em mucosas de humanos e de outros animais (MENEGOTTO; PICOLI, 2007).

A utilização indiscriminada de antimicrobianos provocou um aumento no aparecimento de cepas resistentes especialmente àquelas isoladas nos ambientes hospitalares (DAVIES; DAVIES, 2010).

Desde 1961, as cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (MRSA) vêm sendo associado às infecções relacionadas aos cuidados em saúde, e tem se tornado causa do aumento da relação morbidade/mortalidade em pacientes hospitalizados (MULLIGAN, 1993; LIVERMORE et al., 2003; SANTOS et al., 2007).

Wang e Barrett, (2007), relataram que os surtos de infecção por MRSA têm sido frequentes em unidades de terapia intensiva e apresenta uma ameaça à sobrevivência de pacientes imunocomprometidos.

Os primeiros relatos de surtos de infecção hospitalar provocadas por MRSA foram documentados no Reino Unido, que rapidamente emergiram em outros países da Europa, sendo na ocasião, isoladas no Japão, Estados Unidos e Austrália (TARAI et al., 2013).

Na década de 80, no Japão, os casos de infecção nosocomial decorrentes de MRSA tornaram-se um problema de saúde pública, sendo que 50 a 70% dos casos

de infecção nosocomial causados por cepas de *S. aureus*, apresentaram resistência à meticilina (ANDO et al., 2004), acarretando na extensa utilização de cefalosporinas de terceira geração (ITO; HIRAMATSU, 1998). No Reino Unido, MRSA é o agente etiológico mais frequentemente isolado de infecções nosocomiais, e é responsável por 1/5 das infecções hospitalares adquiridas, custando cerca de 1 bilhão de libras ao Serviço Nacional de Saúde, por ano (CEPEDA et al., 2005).

O programa de vigilância antimicrobiana SENTRY na América Latina vinculado ao laboratório Bristol-Myers Squibb revelou um aumento na prevalência de MRSA entre infecções estafilocócicas em centros médicos de 33,8% em 1997 para 40,2% em 2006, sendo esses dados fortemente influenciados por países específicos, com 41% das cepas de MRSA coletados provenientes do Brasil (MEJÍA, 2010)

A colonização por MRSA é comum tanto em pacientes hospitalizados quanto pacientes comunitários. Uma determinada população sã pode servir como reservatório para esse micro-organismo (DURAI et al., 2010). De acordo com Witte e MIELKE, (2007), cerca de 30% da população mundial pode estar hospedando cepas de MRSA. Morita et al, (2007), detectaram a presença de cepas de MRSA nas fossas nasais de 3% dos pacientes analisados.

As cepas de MRSA apresentam fenótipo de resistência não somente aos beta-lactâmicos, mas também a fluoroquinolonas, cloranfenicol, clindamicina, tetraciclina e aminoglicosídeos (CLSI, 2012). Os glicopeptídeos vancomicina e teicoplanina são utilizados para o tratamento de infecções causadas por MRSA, no entanto modificações na terapêutica mostram-se necessárias devido a intolerância por parte dos pacientes ou falha no tratamento por seleção de cepas resistentes. A resistência de MRSA aos glicopeptídeos pode estar relacionada ao espessamento da parede celular com redução da permeabilidade e da atividade autolítica (THATI et al., 2011).

As cepas de MRSA estão se tornando resistentes a vancomicina, resultando em três cepas adicionais resistentes ao antimicrobiano: *S. aureus* vancomicina intermediário, *S. aureus* vancomicina intermediário heterogêneo (duas subpopulações, uma sensível e outra resistente a vancomicina coexistindo numa mesma cultura) *S. aureus* vancomicina resistente (DURAI et al., 2010). As cepas de MRSA com resistência intermediária e heterogênea a vancomicina podem se tornar totalmente resistentes durante infecções persistentes em que há falha na resposta

ao tratamento com glicopeptídeos, com significativas mudanças de fenótipo (MOORE et al., 2003; TENOVER et al., 2005).

A única forma de se detectar uma cepa de *Staphylococcus aureus* com resistência intermediária à vancomicina é por meio da análise de suas subpopulações, em que são inoculadas diferentes diluições de uma suspensão bacteriana em meio de cultura sólido, adicionado de concentrações crescentes de vancomicina (SANTOS et al. 2007)

Melo e colaboradores, (2005), relataram que na cidade de Uberlândia, Brasil, 9 de 41 pacientes portadores de cepas MRSA em tratamento com vancomicina desenvolveram resistência heterogênea e um dos isolados apresentou uma Concentração Inibitória Mínima (CIM) da ordem de 8µg/mL. A quantidade de cepas MRSA tem crescido, limitando as alternativas terapêuticas para seu controle. (PESAVENTO et al., 2007).

4.1.1.1 *Staphylococcus aureus* RESISTENTES A METICILINA.

Cepas de *S. aureus* podem se tornar MRSA a partir da aquisição do gene *mecA*, que codifica a proteína ligadora de penicilina (PBP2a), presente em sua parede celular, apresentando dessa forma baixa afinidade a meticilina, bem como aos antimicrobianos betalactâmicos (BANSAL et al., 2013). Esta resistência promovida por MRSA está na expressão do cassete gênico *SCCmec*. Esse gene é definido pela combinação do tipo de gene das *ccrs*, recombinases responsáveis pelo complemento e a classe do complexo *mecA* (MIMICA, 2011; UDO et al., 2013).

O cassete gênico *SCCmec* tipos I, II e III, associados a infecções nosocomiais, têm como característica a resistência a múltiplos antimicrobianos além dos betalactâmicos, como os macrolídeos, aminoglicosídeos, tetraciclina, rifampicina e quinolonas (NORIEGA; SEAS, 2010).

Uma estratégia empregada para vencer a resistência bacteriana é a combinação de agentes antimicrobianos, sendo os inibidores das beta-lactamases são administrados como co-droga. Quanto a esta estratégia, a mais bem sucedida que tem sido adotada para inibir as beta-lactamases é através da administração do com drogas associadas a substâncias tais como o ácido clavulânico, ao sulbactam e ao tazobactam, mas a frequente utilização do clavulanato tem favorecido ao surgimento de cepas bacterianas resistentes (WATKINS et al., 2013).

4.1.2 Associações entre metabólitos secundários e agentes antimicrobianos

Metabólitos secundários são considerados uma fonte promissora para a terapia antimicrobiana seja ela combinada ou não. Vários metabólitos secundários atuam como modificadores da resistência bacteriana, agindo em pontos específicos da célula procariótica, potencializando o efeito do antimicrobiano sintético (CHOVANOVÁ et al., 2013).

A modificação no perfil da resistência bacteriana após a associação dos metabólitos secundários aos agentes antibacterianos pode ocorrer a partir de diferentes mecanismos tais como a inibição das bombas de efluxo (HANDZLIK et al., 2013), de enzimas que degradam os antimicrobianos (SOLANKI; SELVANAYAGAM, 2013), da atividade ou da produção de receptores que sofreram mutações (HEMAISWARYA et al., 2008) e aumento da permeabilidade da parede celular permitindo que os antibióticos tenham acesso a alvos citoplasmáticos (OLAJUYIGBE & AFOLAYAN, 2013).

Vários estudos comprovam que uso combinado de antibióticos e polifenóis pode aumentar a atividade antimicrobiana através de interações sinérgicas (BANSAL et al., 2013).

Dentro deste contexto surge o extrato hidroalcoólico de *Hymenaea stigonocarpa*, espécie popularmente conhecido como jatobá-do-cerrado, que apresenta grande concentração de polifenóis e comprovada atividade frente a cepas de *Staphylococcus aureus* de diferentes perfis de resistência.

4.2 OBJETIVOS

O objetivo geral e os específicos deste estudo estão descritos a seguir

4.2.1 Objetivo geral

Avaliar a interação do extrato hidroalcoólico obtido a partir da casca do caule de *Hymenaea stigonocarpa* e agentes antimicrobianos frente a cepas de *Staphylococcus aureus* multidroga resistentes.

4.2.2 Objetivos específicos

- Determinar a concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) do extrato hidroalcoólico de *Hymenaea stigonocarpa*, bem como dos agentes antimicrobianos;
- Avaliar a interação entre o extrato hidroalcoólico de *Hymenaea stigonocarpa* e agentes antimicrobianos de diferentes classes frente a cepas de *Staphylococcus aureus* MRSA
- Observar as alterações ultraestruturais causadas pela associação extrato/agente antimicrobiano que apresentou maior efeito sinérgico frente às cepas de *Staphylococcus aureus* (extrato / Oxacilina).

4.3 MATERIAIS E MÉTODOS

A seguir estão descritos os materiais e métodos utilizados para a realização deste estudo.

4.3.1 Material vegetal

Cascas do caule de *Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex. Hayne. foram coletadas em outubro de 2009 na Fazenda Refúgio localizada na cidade de Camocim de São Félix, Pernambuco (de latitude 8°21'30.00"S e longitude 35°47'56.70"O)

A identificação foi realizada pela botânica do Instituto Agrônomo de Pernambuco Dra. A. Bocage, sendo a excisata depositada sob o número 53563 no Herbário Dárdano de Andrade Lima, pertencente ao mesmo instituto. As cascas do caule, foram submetidas à secagem em estufa, a uma temperatura de 40°C, durante 72h, em seguida pulverizadas em moinho de martelos (Tigre ASN5), e estocada em frascos a temperatura ambiente.

4.3.2 Procedimentos extrativos

Cerca de 20 g de amostra triturada da casca do caule de *Hymenaea stigonocarpa* foi submetida à uma extração por maceração em 200 mL da solução hidroalcoólica, por um período de 72h em frasco âmbar e em temperatura ambiente (23 ± 1 °C) com agitação manual e ocasional a cada 12h. Após este período a solução foi filtrada em papel de filtro (Whatmann nº. 2).

Posteriormente, o extrato foi concentrado em rota evaporador obtendo-se assim um extrato seco que foi utilizado para avaliação da atividade anti-estafilocócica.

4.3.3 Determinação da atividade anti- estafilocócica *in vitro*

Para determinação da atividade anti-estafilocócica *in vitro* frente foram realizadas os procedimentos descritos a seguir

4.3.3.1 Agentes antimicrobianos

Os agentes antimicrobianos foram selecionados com base na publicação do manual do ano de 2012 do instituto americano Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), que divide os agentes antimicrobianos em diferentes grupos de acordo com os ensaios frente às diferentes espécies de bactérias e os sítios corpóreos do isolamento.

Neste estudo foram utilizadas cepas de *Staphylococcus aureus* com diferentes perfis de resistência, previamente determinados por difusão em meio sólido, desta forma foram selecionados antimicrobianos de diferentes classes para realização desta avaliação.

Os agentes antimicrobianos, penicilina, oxacilina e claritromicina, presentes no grupo A, são indicados para os testes de rotina. Além desses foram avaliados vancomicina e linezolide, pertencentes ao grupo B, indicados quando os micro-organismos são resistentes aos antimicrobianos do grupo A. Também foram avaliados agentes antimicrobianos que devem ser testados frente a cepas endêmicas resistentes a drogas do grupo A (grupo C) sendo então utilizados ciprofloxacino e gentamicina.

Além seguir os critérios do CLSI, os agentes antimicrobianos foram selecionados de acordo com o seu mecanismo de ação microbiano.

Os agentes antimicrobianos selecionados foram: β -lactâmicos, glicopeptídeos, aminoglicosídeos, macrolídeos, fluoroquinolonas e oxazolidinonas. Os antibióticos β -lactâmicos e glicopeptídeos inibem a síntese da parede celular. Os aminoglicosídeos e macrolídeos e oxazolidinonas inibem a síntese proteica, sendo os aminoglicosídeos na porção 30S do ribossomo e os macrolídeos e oxazolidinonas na porção 50S. As fluoroquinolonas agem por inibição da atividade da enzima DNA-girase (Goodman; Gilman's, 2008).

Os agentes antimicrobianos foram adquiridos das seguintes empresas: Penicilina (Laboratório Teuto Brasileiro S/A), oxacilina e vancomicina (Novafarma Indústria Farmacêutica), linezolida (Laboratórios Pfizer LTDA), gentamicina (Hipolabor Farmacêutica LTDA) e claritromicina e ciprofloxacino (Eurofarma Laboratório do Brasil LTDA).

4.3.3.2 Preparação das soluções

O extrato hidroalcoólico (10 mg) foi pesado e solubilizado em sistema composto de etanol:água (1:1 v/v), obtendo-se assim solução estoque padronizadas em 1024 µg/mL. Os agentes antimicrobianos foram solubilizados em água destilada esterilizada de forma a obter uma solução estoque de 2048 µg/mL.

4.3.3.3 Micro-organismos

Os micro-organismos utilizados para a realização da avaliação antimicrobiana dos extratos de *Hymenaea stigonocarpa* foram mantidos no Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Micro-organismos do Departamento de Antibióticos da UFPE.

Foram utilizados neste estudo os seguintes micro-organismos *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923 e ATCC 33591, LFBM13, IC17, UFPEDA 01, AM 13, AM 18, AM 19, AM 20, AM 21 e AM 24).

4.3.3.4 Preparação do inóculo

As culturas de *S. aureus* foram preparadas em caldo Mueller Hinton e incubadas por 24 horas. Após o período de incubação estas culturas foram padronizadas em 10^8 UFC/mL, utilizando o tubo 0,5 da escala de Mac Farland, e em seguida diluídas em soro fisiológico a fim de obter um inóculo final de 10^7 UFC/mL.

4.3.3.5 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CMB)

A Concentração Inibitória Mínima (MIC) foi determinada pelo método de microdiluição em caldo, seguindo as recomendações estabelecidas pela Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI, 2012), com algumas modificações. Os ensaios foram realizados em microplacas estéreis de 96 poços com fundo em forma de “U”.

Inicialmente as soluções estoque dos extratos e dos agentes antimicrobianos foram esterilizadas por filtração através de membrana de porosidade de 0,22 µm Milipore®. Um volume de 200 µL foi adicionado nos poços de 1 a 12 referente a linha

A. Os demais poços foram preenchidos inicialmente apenas com 100 µL de caldo Mueller-Hinton.

Uma transferência de 100µL foi realizada do conteúdo dos poços da linha A para os da linha B e assim sucessivamente até a linha H, sendo desprezados os últimos 100 µL, obtendo-se desta forma concentrações decrescentes. Para o extrato foram avaliadas concentrações de 1024 a 8 µg/mL e para os agentes antimicrobianos de 2048 a 0,06 µg/mL em placas distintas.

Após a diluição dos agentes antimicrobianos, 5 µL das suspensões bacterianas foram inoculados obtendo-se em cada poço uma concentração final de 10^4 UFC/poço. As microplacas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37°C por 24 horas. A determinação da viabilidade dos micro-organismos foi verificada através da adição de uma solução aquosa a 0,5% de cloridrato de 2,3,5 trifeniltetrazólio (TTC). As microplacas foram novamente incubadas por mais três horas a 37°C. Após esse intervalo de tempo, a leitura da placa foi realizada: a presença de uma coloração vermelha nos poços foi interpretada como prova negativa do efeito inibitório dos agentes antimicrobianos, ou seja, houve crescimento bacteriano; enquanto que a ausência de cor foi considerada prova positiva da ação antimicrobiana dos extratos.

A menor concentração dos agentes antimicrobianos capaz de inibir o crescimento visível das cepas de *S. aureus* foi verificada e definida como Concentração Inibitória Mínima (CIM).

Para a Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM), as concentrações mais altas que a CIM foram semeadas em Mueller Hinton Agar e incubadas por 24 horas a 37°C.

A CMB foi definida como a menor concentração dos agentes antimicrobianos em que 99,9% da população foram inviabilizadas. Todos os experimentos foram realizados em duplicata em dias diferentes.

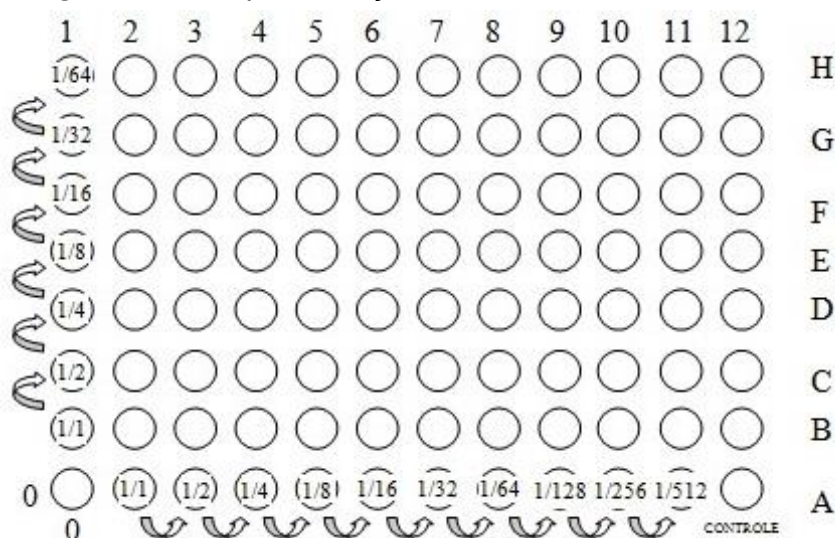
4.3.3.6 Avaliação *in vitro* da interação entre o extrato hidroalcoólico de *Hymenaea stigonocarpa* com agentes antimicrobianos

O estudo da interação entre o extrato hidroalcoólico de *Hymenaea stigonocarpa* e os agentes antimicrobianos foi realizado de acordo com o método do tabuleiro de xadrez (LORIAN, 1996). Para este estudos foram selecionadas as

cepas de *Staphylococcus aureus* que se apresentaram mais resistentes aos antimicrobianos avaliados (AM 13, AM 18, AM 24, ATCC 33591).

Com base nos valores da CIM foram preparadas soluções em caldo Mueller Hinton do extrato hidroalcoólico de *Hymenaea stigonocarpa* e dos agentes antimicrobianos de forma a obter concentrações de 0,5 até 0,016 da CIM e de 0,5 a 0,002da CIM respectivamente (Figura 1). Nos poços das placas de microdiluição, foram pipetados 100 µL do extrato e 100 µL do agente antimicrobiano.

Figura 46 – Representação do método do tabuleiro de xadrez



Cada poço foi inoculado com 5 µL da suspensão bacteriana padronizada em 10^7 UFC/mL.

A interação entre os agentes antimicrobianos e o extrato hidroalcoólico de *Hymenaea stigonocarpa* foi determinada pelo Índice da Concentração Inibitória Fracionada (FICI) a partir da seguinte equação $FICI = (CIM \text{ da associação do extrato hidroalcoólico de } H. \text{ stigonocarpa com agente antimicrobiano} / CIM \text{ do extrato hidroalcoólico de } H. \text{ stigonocarpa}) + (CIM \text{ da associação agente antimicrobiano com extrato hidroalcoólico de } H. \text{ stigonocarpa} / CIM \text{ do agente antimicrobiano})$.

Valores do FICI $\leq 0,5$ foram interpretados como uma interação sinérgica total; $0,5 < FICI \leq 0,75$ um sinergismo parcial. Uma interação indiferente quando os valores do FICI foram entre $0,75 < FICI \leq 2,0$ e um efeito antagônico quando FICI foi maior que 2,0 (FADLI et al., 2012).

A partir dos resultados dos Índices da Concentração Inibitória Fracionada individual foram construídos isobogramas (KROGSTAD; MOELLERING, 1991)

4.3.4. Determinação de alterações ultraestruturais por microscopia eletrônica de transmissão

Para esta avaliação foi selecionado *Staphylococcus aureus* cepa 24 por ser a mais sensível a ação das associações bem como a associação de maior efeito sinérgico.

Uma suspensão padronizada de *Staphylococcus aureus* AM 24 em 10^7 UFC/mL foi cultivadas em caldo Muller Hinton (grupo controle) e em caldo adicionado do extrato hidroalcoólico a 256 µg/mL (CIM), em caldo adicionado de oxacilina 256 µg/mL (CIM) e em caldo adicionado da associação extrato hidroalcoólico 32 µg/mL e oxacilina 64 µg/mL (concentrações sinérgicas).

As culturas foram incubadas a 37°C por 24 horas. Essas culturas foram centrifugadas e os precipitados fixados em paraformaldeído 4% e glutaraldeído 2,5% em 0,1 M de tampão cacodilato de sódio (pH 7,2) por 4 horas a temperatura de $23 \pm 1^\circ\text{C}$

Os precipitados foram lavados e centrifugados por 10 minutos no mesmo tampão e esse procedimento repetido por três vezes. Posteriormente os precipitados foram pós-fixados em tetroxido de ósmio 2%, ferrocianida de potássio 0,8% e cloreto de cálcio 5M em tampão cacodilato de sódio 0,1M por 1 hora e lavada em tampão cacodilato de sódio.

As amostras foram desidratadas utilizando gradiente de soluções de acetona que variou de 30 %, a 100 %, em seguida adicionadas à resina Epon 812 (Sigma, EUA). Em seguida, seções ultrafinas foram obtidas através de um ultramicrotomo (Leica UC6), coradas com uranil acetato e citrato de chumbo e examinado em microscópio eletrônico de transmissão marca Morgani-FEI® (Eindhoven, Holanda).

4.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Staphylococcus aureus é comumente associado a infecções hospitalares e comunitárias. Atualmente, medidas para controlar as infecções por *S. aureus* são desafiadas por um grande e continuando aumento na prevalência de *S. aureus* resistentes a meticilina em todo mundo (ASAAD; QURESHI, 2013).

A maior parte da literatura mundial mostra que *Staphylococcus aureus* é um dos principais patógenos responsáveis por uma série de infecções em ambientes hospitalares, com considerável morbidade e mortalidade (VALAPERTA et al., 2010).

Os valores da CIM e CBM do extrato hidroalcoólico de *Hymenaea stigonocarpa* e dos agentes antimicrobianos frente à onze cepas de *Staphylococcus aureus* estão apresentados na tabela 3. O extrato hidroalcoólico de *Hymenaea stigonocarpa* mostrou atividade frente a todas as cepas de *S. aureus* com valor de CIM de 256 µg/mL.

O extrato hidroalcoólico é considerado de uma forte atividade, pois, de acordo com Sartoratto e colaboradores (2004), um extrato tem uma atividade antimicrobiana forte quando os valores da CIM estão entre 50 e 500 µg/mL, moderada CIM entre 600 e 1500 µg/mL, e fraca, para valores acima de 1500 µg/mL.

A terapia anti-MRSA é limitada ao uso de glicopeptídeos (vancomicina, teicoplanina), oxazolidinas (linezolid) e estreptograminas (quinupristina-dalfopristina) (LIU et al., 2011). Contudo, a emergência de cepas de *S. aureus* com resistência intermediária (VISA) ou resistentes (VRSA) à vancomicina tem sido descritas em todo o mundo como também no Brasil (MIMICA et al., 2006). Sendo o primeiro caso de *Staphylococcus aureus* resistente à vancomicina descrito em junho de 2002 nos Estados Unidos (CHANG et al., 2003).

Nos últimos anos tem ocorrido um crescente interesse da comunidade científica pelas plantas medicinais por apresentarem potenciais terapêuticos e econômicos, visados especialmente pela indústria farmacêutica, que realiza a prospecção de novos produtos, com menos efeitos indesejáveis do que os fármacos já existentes (ROCHA et al., 2013)

Todas as cepas apresentaram-se resistentes à penicilina com valores de CIM variando entre 0,25 e 64 µg/mL.

As cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, AM 02, AM 05 e UFPEDA 01 mostraram-se sensíveis a oxacilina (MSSA) com valores de CIM iguais a 0,125

µg/mL. As cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 33591, AM 13, AM 18, AM 19, AM 20, AM 21 e AM 24 foram classificadas como MRSA, pois, os valores de CIM variaram de 8,0 e 256 µg/mL.

Todas as cepas de *Staphylococcus aureus* avaliadas neste estudo mostraram-se sensíveis à vancomicina, cujos valores de CIM variaram de 0,125 e 0,25 µg/mL. Todas as cepas apresentaram um perfil de sensibilidade a linezolida semelhante ao da vancomicina e a CIM variou de 0,25 e 2,0 µg/mL. Devido à sensibilidade das cepas de *Staphylococcus aureus* à vancomicina e a linezolida, estes antimicrobianos não foram selecionados para a segunda parte do nosso estudo.

De acordo com o que preconiza o CLSI 2012, antibióticos β-lactâmicos: inibidores de beta-lactamase, carbapenêmicos e cefalosporinas, exceto àquelas de última geração) poderão apresentar *in vitro* atividade frente a cepas MRSA, mas esta atividade não se confirma *in vivo*. Diante deste fato, outros beta-lactâmicos não foram incluídos neste estudo.

Plantas e seus metabólitos secundários são uma fonte promissora para fornecer compostos bioativos estruturalmente diversos com potencial ação terapêutica, incluindo antimicrobiana (COWAN et al. 1999; WINK et al. 2012).

Quanto à espécie *Hymenaea stigonocarpa*, os extratos com maiores teores de polifenóis, principalmente taninos condensados, foram os que apresentam maior atividade antibacteriana (DIMECH et al., 2013).

Quando foram avaliadas as Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) dos agentes antimicrobianos que inibem a síntese proteica, diferentes perfis de suscetibilidade das cepas de *Staphylococcus aureus* foram observados quando comparados a linezolida. Embora gentamicina e claritromicina inibam a síntese proteica em receptores nas porções 30S e 50S respectivamente, os sítios de ação dessas moléculas nessas subunidades são diferentes dos da linezolida, levando a diferentes respostas. (GOODMAN; GILMAN'S, 2008).

Gentamicina apresentou-se ativa frente às cepas de *S. aureus*, UFPEDA 01, AM 02, AM 20. Já as cepas de *S. aureus* AM 05, ATCC 33591, ATCC 25932, AM 13, AM 18 AM 19, AM 21e AM 24 mostraram-se resistentes a gentamicina cujos valores de CIM variaram de 0,25 a 256 µg/mL.

Tabela 3 – CIM e CBM do extrato hidroalcoólico da casca do caule de *Hymenaea stigonocarpa* e de agentes antimicrobianos frente cepas de *Staphylococcus aureus* com diferentes perfis de resistência.

<i>Staphylococcus aureus</i>	CIM / CBM (µg/ml)							
	EH	PEN	OXA	CIP	GEN	CLA	VAN	LIN
ATCC 25923	256 / 256	0,25 / 0,25	0,125 / 0,25	0,25 / 0,25	0,25 / 0,25	1,0 / 1,0	0,5 / 0,5	1,0 / 1,0
UFPEDA 01	256 / 256	0,5 / 1,0	0,125 / 0,25	0,25 / 0,25	0,125 / 0,25	0,5 / 0,5	0,25 / 0,25	0,25 / 0,25
AM 02	256 / 256	32 / 64	0,125 / 0,125	0,25 / 0,5	0,125 / 0,25	2,0 / 4,0	0,5 / 0,5	0,5 / 0,5
AM 05	256 / 256	0,25 / 0,5	1,0 / 0,25	0,25 / 0,5	0,25 / 0,25	2,0 / 2,0	0,5 / 0,5	1,0 / 1,0
ATCC 33591	256 / 256	64 / 64	64 / 128	0,125 / 0,125	2,0 / 2,0	2048 / 2048	0,125 / 0,25	1,0 / 1,0
AM 13	256 / 256	32 / 64	256 / 512	64 / 128	64 / 64	2048 / 2048	0,25 / 0,25	1,0 / 1,0
AM 18	256 / 256	64 / 64	128 / 256	64 / 128	128 / 256	2048 / 2048	0,25 / 0,5	1,0 / 1,0
AM 19	256 / 256	8 / 16	16 / 128	0,25 / 0,5	0,5 / 0,5	4,0 / 8,0	0,25 / 0,5	2,0 / 2,0
AM 20	256 / 256	8 / 16	8 / 16	4,0 / 8,0	0,125 / 0,25	2048 / 2048	0,125 / 0,25	1,0 / 1,0
AM 21	256 / 256	16 / 16	16 / 16	4,0 / 8,0	0,5 / 0,5	2048 / 2048	0,125 / 0,125	1,0 / 1,0
AM 24	256 / 256	32 / 32	256 / 256	64 / 128	256 / 512	2048 / 4096	0,125 / 0,125	1,0 / 2,0

Concentração inibitória mínima **CIM**; concentração bactericida mínima **CBM**; American Type Culture Collection **ATCC**; extrato Hidroalcoólico **EH**; oxacilina **OXA**; ciprofloxacino **CIP**; gentamicina **GET**; penicilina **PEN**; Claritromicina, **CLA**; vancomicina **VAN** e linezolida **LIN**; **Critério de interpretação CIM**: Penicilina ($\leq 0,12$ sensível / $\geq 0,25$ Resistente); Oxacilina ($\leq 2,0$ sensível / $\geq 4,0$ Resistente); Ciprofloxacino ($\leq 1,0$ sensível / $\geq 4,0$ Resistente); Gentamicina ($\leq 0,125$ sensível / $\geq 0,25$ Resistente); Claritromicina ($\leq 2,0$ sensível / $\geq 8,0$ Resistente); Vancomicina ($\leq 2,0$ sensível / $\geq 16,0$ Resistente) e Linezolide ($\leq 4,0$ sensível / $\geq 8,0$ Resistente) **Fonte**: (CLSI, 2012)

Todas as cepas de *S. aureus* apresentaram-se resistentes à claritromicina exceto *S. aureus* ATCC 25923, AM 02, AM 05, UFPEDA 01 e AM 19 que mostrou resistência intermediária.

Ciprofloxacino foi capaz de inibir o crescimento das cepas de *S. aureus* ATCC 25932, UFPEDA 01, AM 02, AM 05, ATCC 33591 e AM 19, mas mostrou-se ineficaz frente a *S. aureus* AM 13, AM 18, AM 20, AM 21 e AM 24.

Estes resultados serviram de base para selecionar as cepas de *S. aureus* ATCC 33591, AM 13, AM 18 E AM 24 para o próximo estudo.

Os valores das concentrações inibitórias mínimas e dos índices de concentração inibitória fracionada (FICI), obtidos após associação do extrato hidroalcoólico de *Hymenaea stigonocarpa* com penicilina, oxacilina, ciprofloxacino, claritromicina ou gentamicina frente a cepas de *S. aureus* ATCC 33591, AM 13, AM 18 e AM 24 estão apresentados na tabela 4.

Concentrações sub-inibitórias do extrato hidroalcoólico de *Hymenaea stigonocarpa* ($\leq 128\mu\text{g/mL}$) aumentaram a atividade de todos os agentes antimicrobianos frente a cepas de MRSA.

A atividade sinérgica foi observada pela redução dos valores da concentração inibitória mínima em todas as associações do extrato com os agentes antimicrobianos e pelo índice da Concentração Inibitória Fracionada $\leq 0,5$.

Vários estudos *in vitro* têm relatado efeitos sinérgicos com reduções significativas nas concentrações inibitórias mínimas (CIM) dos antimicrobianos, após associação com diversos extratos de plantas sobre cepas de *Staphylococcus aureus* MRSA (ADWAN, 2010; CHUNG et al., 2011; AN et al., 2011; CELENZA et al., 2012; MACEDO, 2013).

Pesquisas demonstraram a ação de polifenóis na potencialização dos efeitos de agentes antimicrobianos. O polifenol epigallocatequina (EGCg) um tanino condensado isolado do chá verde, apresentou um efeito sinérgico quando associados à antibióticos beta-lactâmicos (ZHAO et al., 2001). Em outro estudo Hu e colaboradores (2002) observaram que EGCg foi capaz de inibir a penicilinase produzida por *S. aureus*, restaurando assim a atividade antimicrobiana da penicilina e que associação de EGCg com ampicilina/sulbactam foi capaz de reduzir os valores da CIM de $16\mu\text{g/mL}$ para $4\mu\text{g/mL}$.

Tabela 4 - Avaliação da associação do extrato hidroalcoólico de *Hymenaeae stigonocarpa* com agentes antimicrobianos frente a cepas de *Staphylococcus aureus* multidroga resistentes.

<i>Staphylococcus Aureus</i>	Associação	CIM Individual (µg/mL)	Associação CIM (µg/mL)	FIC Individual	FICI	Efeito	Redução da CIM (%)
AM 13	EH/PEN	256 / 32	128 / 0,06	0,50 / 0,0020	0,50	Sinérgico	50,0 / 99,81
	EH/OXA	256 / 256	64 / 64	0,25 / 0,2500	0,50	Sinérgico	75,0 / 75,00
	EH/CIP	256 / 64	64 / 16	0,25 / 0,2500	0,50	Sinérgico	75,0 / 75,00
	EH/GEN	256 / 64	128 / 0,03	0,50 / 0,0005	0,50	Sinérgico	50,0 / 99,95
	EH/CLA	256 / 2048	128 / 1	0,50 / 0,0005	0,50	Sinérgico	50,0 / 99,95
AM 18	EH/PEN	256 / 64	128 / 0,06	0,50 / 0,0010	0,50	Sinérgico	50,0 / 99,90
	EH/OXA	256 / 128	128 / 0,5	0,50 / 0,0039	0,50	Sinérgico	50,0 / 99,61
	EH/CIP	256 / 64	2,0 / 32	0,0078 / 0,50	0,51	S. parcial	99,2 / 50,00
	EH/GEN	256 / 128	128 / 1,0	0,50 / 0,0078	0,51	S. parcial	50,0 / 99,22
	EH/CLA	256 / 2048	128 / 2,0	0,50 / 0,0010	0,50	Sinérgico	50,0 / 99,90
AM 24	EH/PEN	256 / 32	128 / 0,06	0,50 / 0,0019	0,50	Sinérgico	50,0 / 99,81
	EH/OXA	256 / 256	32 / 64	0,125 / 0,250	0,38	Sinérgico	87,5 / 75,00
	EH/CIP	256 / 64	2 / 32	0,008 / 0,500	0,51	S. parcial	99,22 / 50,0
	EH/GEN	256 / 256	128 / 0,125	0,50 / 0,0005	0,50	Sinérgico	50,0 / 99,95
	EH/CLA	256 / 2048	128 / 256	0,50 / 0,1250	0,63	S. parcial	50,0 / 87,50
ATCC 33591	EH/PEN	256 / 64	128 / 0,06	0,50 / 0,0010	0,50	Sinérgico	50,0 / 99,90
	EH/OXA	256 / 64	64 / 16	0,25 / 0,2500	0,50	Sinérgico	75,0 / 75,00
	EH/CIP	256 / 0,125	2,0 / 0,06	0,008 / 0,500	0,51	S. parcial	99,2 / 50,00
	EH/GEN	256 / 2	64 / 0,5	0,25 / 0,2500	0,50	Sinérgico	75,0 / 75,00
	EH/CLA	256 / 2048	128 / 1,0	0,50 / 0,0005	0,50	Sinérgico	50,0 / 99,95

Concentração Fracionária Mínima **FIC**; Concentração inibitória mínima **CIM**; concentração bactericida mínima **CBM**; American Type Culture Collection **ATCC**; extrato Hidroalcoólico **EH**; oxacilina **OXA**; ciprofloxacino **CIP**; gentamicina **GET**; penicilina **PEN**; Claritromicina **CLA**; vancomicina **VAN** e linezolid **LIN**. Redução da CIM (%) = 100 – (CIM combinado × 100 / CIM).

Um mecanismo da ação proposto para explicar a interação sinérgica entre polifenóis e antibióticos β -lactâmicos frente à MRSA sugere que existe uma diminuição na expressão de PBP2a, resultando na inibição da síntese da parede celular bacteriana (HUA et al., 2010).

Em várias associações, foram identificadas ações sinérgicas, exceto quando foi avaliada a interação do extrato com ciprofloxacino frente às cepas AM 18, AM 24 e ATCC 33591 e com gentamicina frente à cepa AM 18 que apresentaram valores de FICI de 0,51, caracterizando um sinergismo parcial. Também foi observado esse mesmo padrão de interação com a associação do extrato com claritromicina frente a cepa AM 24, que apresentou valor de FICI de 0,63.

Além de uma ação sinérgica, a associação do extrato com os agentes antimicrobianos provocou à reversão total da resistência bacteriana frente a todas as cepas resistentes a penicilina, a três cepas resistentes a claritromicina (AM 13, AM 18 e ATCC 33591), a duas cepas (AM 13 e AM 14) resistentes a gentamicina e as cepas AM 18 e ATCC 33591 resistentes a oxacilina e ciprofloxacino respectivamente.

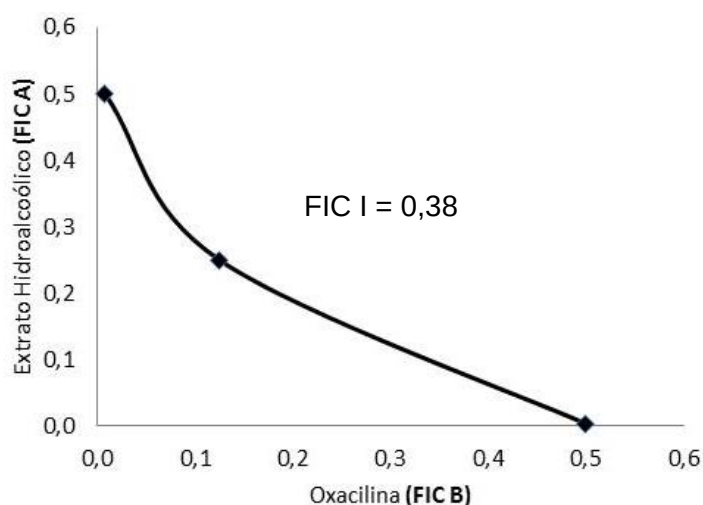
A associação que se mostrou mais sinérgica aquela entre o extrato e a oxacilina frente à cepa de *Staphylococcus aureus* AM 24, com FICI de 0,38 (figura 47). Nesta associação ocorreu uma redução da CIM do extrato e do agente antimicrobiano, ambos de 256 $\mu\text{g/mL}$ para 32 e 64 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente.

Hatano e colaboradores, (2005), investigando a associação do polifenol theasinensina A, um isolado de frutos do gênero *Zizyphus*, com a oxacilina, demonstraram que embora a CIM desses polifenóis tenha sido de 256 $\mu\text{g/mL}$, estes fito-compostos foram capazes de reduzir os valores da oxacilina para 4 $\mu\text{g/mL}$.

A ação sinérgica entre o extrato hidroalcoólico e os antibióticos beta-lactâmicos pode ocorrer devido à característica polifenólica deste extrato, pois segundo Zhao et al., (2001), existe uma ação conjunta dos polifenóis e agentes β -lactâmicos, na síntese de peptidoglicano da parede celular.

Além disso, a ligação direta de polifenóis com a penicilinase, enzima que inativa as penicilinas, inibe a atividade enzimática da bactéria e protege a penicilina da ação antibacteriana (ROCCARO et al., 2004).

Figura 47 - Isobolograma revelando o efeito sinérgico do extrato hidroalcoólico de *Hymenaea stigonocarpa* quando associado à oxacilina frente à *Staphylococcus aureus* AM 24.



Para esta avaliação das alterações ultraestruturais por microscopia eletrônica de transmissão foi selecionada a cepa que apresentou o melhor FICI. A cepa foi cultivada de diferentes formas, sem tratamento (grupo controle), após tratamento com o extrato na CIM (256 µg/ml), após tratamento com oxacilina na CIM (256 µg/ml) e nas doses sub-inibitórias associadas de acordo com os resultados obtidos na avaliação do sinergismo 32 µg/ml para o extrato hidroalcoólico de *Hymenaea stigonocarpa* e 64 µg/ml para a oxacilina.

Na Figura 48 (A-D) no grupo controle pode ser observada claramente a parede celular bem definida (PM), ribossomos (R) e os septos da bactéria em divisão (S).

A concentração inibitória mínima o extrato hidroalcoólico (256 µg/ml) provocou alterações em várias estruturas celulares. Em relação à parede celular foram visualizados três distintos fases quanto à ação do extrato hidroalcoólico.

Primeiro o espessamento da parede celular e do septo (Figuras 48 E e F), e divisão aberrante do septo, devido ao aumento da produção de mais peptidoglicano. Isso indica a presença de mecanismos de defesa para manter a pressão osmótica devido à ação do extrato hidroalcoólico.

Num segundo momento a formação de rupturas na parede celular (Figuras 48 F e G), que ocorre devido à falha na ação de enzimas bacterianas chamadas autolisinas presentes entre os peptidoglicanos, a fim de permitir a inserção de novas

moléculas (SANTHANA, 2007). Por fim é visualizado o desligamento da parede celular (Figuras 48 G e H), a condensação do ribossomo (Figuras 48 F - H) e o rompimento da parede celular com liberação de materiais celulares do citoplasma (Figura 48 H).

Quanto à ação da oxacilina (figuras 48 I - M) foi observado o espessamento e divisão anormal do septo (figuras 48 I - L) e visualizadas formação de rupturas (figura 48 I) e destacamento da parede celular (figura 48 M), porém, não foi observado espessamento da parede celular, assim como a coagulação do DNA como no tratamento com o extrato.

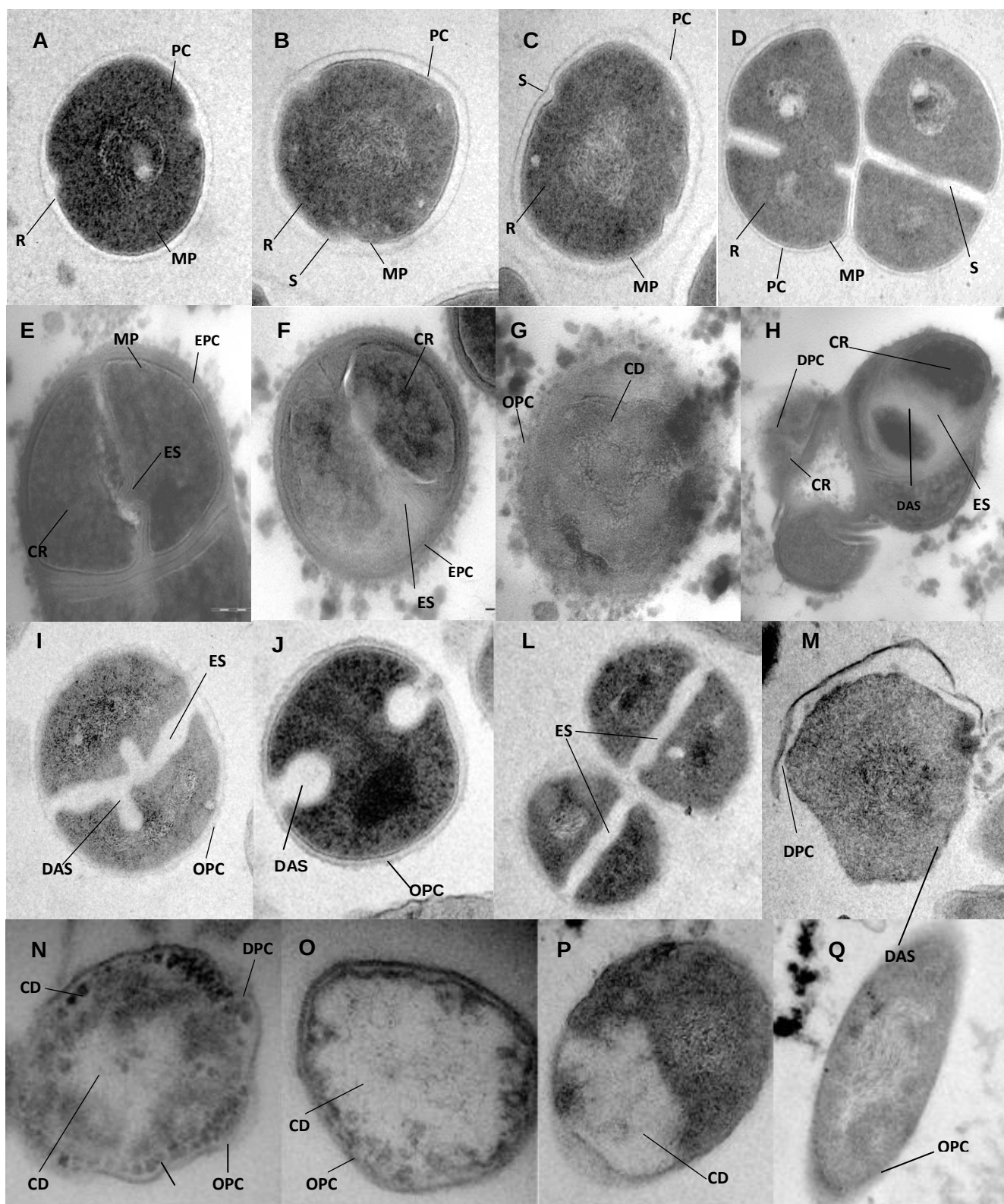
Esses resultados são compatíveis com os observados por Santhana e colaboradores (2007) que descrevem o destacamento da parede celular com ausência de coagulação de DNA após tratamento com oxacilina.

Essa ausência de alterações no interior da célula pode ser explicada pelo modo de ação da oxacilina que inibe a enzima transpeptidase (também chamadas proteínas de ligação à penicilina PBP) (SCHITO, 2006), fazendo com que a parede celular das bactérias torne-se mais fraca e a pressão osmótica subsequentemente lise as bactérias, não ocorrendo desta forma alterações estruturais no interior das bactérias.

Quando analisamos os efeitos ultraestruturais da associação de doses sub-inibitórias de oxacilina e o extrato hidroalcoólico de *Hymenaea stigonocarpa*, podemos sugerir que o efeito sinérgico ocorre tanto pela ação das duas substâncias na parede celular (figuras 48 A - M), como o extrato apresenta ação na coagulação do DNA em uma fase secundária à lise da parede celular. O que não ocorre quando administramos apenas a oxacilina, o que pode ser observado na figura 3M, onde visualizamos que mesmo após o destacamento da parede celular pela ação da oxacilina, não ocorre coagulação no DNA da célula, diferente ao que ocorreu nas figuras 48 N a P, onde pode ser visualizada a coagulação após a ação do extrato.

Desta forma podemos sugerir que a associação do extrato com os agentes antimicrobianos apresenta efeitos sinérgicos e em alguns casos aditivos, por diferentes motivos dependendo do mecanismo de ação dos antimicrobianos.

Figura 48 - Microscopia eletrônica de transmissão da cepa de *S. aureus* AM 24, submetida tratamento com oxacilina e o extrato hidroalcoólico de *Hymenaea stigonocarpa*.



Células não tratadas (A-D) mostram parede celular (PC), ribossomo (R) e septo (S) da bactéria bem distintos; Tratadas com extrato hidroalcoólico de *Hymenaea stigonocarpa* na concentração inibitória mínima (E-H) mostram formação de orifícios na parede celular (OPC), espessamento da parede celular (EPC) assim como espessamento do septo (ES), condensação do ribossomo (CR), desprendimento da parede celular (DPC), espessamento (ES) e divisão aberrante do septo (DAS); Tratadas com oxacilina na concentração inibitória mínima (I-M) mostram espessamento (ES) e divisão aberrante do septo (DAS) aparecimento de orifícios (OPC) assim como destacamento da parede celular (DPC); Tratadas com oxacilina associada ao extrato (N – Q) mostram Coagulação do DNA (CD) orifícios (OPC) e destacamento da parede celular (DPC) Aumento de 30000X.

4.5 CONCLUSÕES

No caso dos inibidores das subunidades 50S E 30S nos ribossomos (Linezolid, gentamicina e claritromicina) o sinergismo ocorreria pela lise da parede celular provocada pelo extrato o que facilitaria esses agentes alcançar seus sítios de ação. Quanto ao ciprofloxacino além da facilitação da entrada, ocorreria ação sinérgica na potencialização da coagulação do DNA.

Para os inibidores da síntese de parede celular, o sinergismo como discutido anteriormente ocorreria pela ação no peptidoglicano. Diferenças nas respostas dos dois agentes, porém, podem ser explicadas pelas alterações no sítio de ação, pois a bactéria avaliada é uma cepa MRSA, que apresenta modificações na proteína ligadora de penicilina.

Essa resistência a oxacilina é associada à aquisição de um elemento genético móvel chamado SCCmec, que contém o gene de resistência mecA (OKUMA et al., 2002). O determinante mecA codifica PBP2a, uma nova proteína de ligação à penicilina com a afinidade diminuída para a oxacilina e a maioria das outras drogas beta-lactâmicas (TENOVER et al., 2006) deste modo o sítio de ação dos dois agentes avaliados estaria modificado, alterando a resposta de ambos.

REFERÊNCIAS

- ADWAN, M. G., ABU-SHANAB A. B and ADWAN, M. K. *In vitro* activity of certain drugs in combination with plant extracts against *Staphylococcus aureus* infections. **Pakistan Journal of Medical Science**. V.24, p.541-544, 2008.
- ADWAN, M. G., ABU-SHANAB, B., & ADWAN, M. K. Antibacterial activities of some plant extracts alone and in combination with different antimicrobials against multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v.3, n.4, p.266–269, 2010.
- AN, J., ZUO, G. Y., HAO, X. Y., WANG, G.C., LI, Z. S., Antibacterial and synergy of a flavanone rhamnoside with antibiotics against clinical isolates of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **Phytomedicine** 18, 990–993, 2011.
- ANDO, E., K. MONDEN, R. MITSUHATA, R. KARIYAMA, AND H. KUMON. Biofilm formation among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from patients with urinary tract infection. **Acta Medica Okayama** v.58, p. 207-214. 2004
- BANSAL, S., CHOUDHARY, S., SHARMA, M., KUMAR, S. S., LOHAN, S., BHARDWAJ, V., JYOTI, S. Tea: A native source of antimicrobial agents. **Food Research International**, v.53, n.2, p.568–584, 2013.
- BETONI, J. E. C., MANTOVANI, R. P., BARBOSA, L. N., DI STASI, L. C., FERNANDES JUNIOR, A.. Synergism between plant extract and antimicrobial drugs used on *Staphylococcus aureus* diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, p. 387-390, 2006.
- CATÃO, R. M. R., SILVA, P M. F., FEITOSA, R. J. P., PIMENTEL, M. C., PEREIRA H. S. Prevalence of hospital-acquired infections caused by *Staphylococcus aureus* and antimicrobial susceptibility profile, **Revista enfermagem UFPE on line**.v.7, n.8, p.5257-64, 2013.
- CELENZA, G., SEGATORE, B., SETACCI, D., BELLIO, P., BRISDELLI, F., PIOVANO, M., GARBARINO, J.A., NICOLETTI, M., PERILLI, M., AMICOSANTE, G. S., *In vitro* antimicrobial activity of pannarin alone and in combination with antibiotics against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates. **Phytomedicine**, v.19, p. 596–602, 2012.
- CEPEDA, J.A., WHITEHOUSE, T., COOPER, B., et al. Isolation of patients in single rooms or cohorts to reduce spread of MRSA in intensive-care units: prospective two-centre study. **The Lancet**. v. 365, p. 295-304. 2005
- CHANG S., SIEVERT D. M., HAGEMAN J. C., BOULTON M. L., TENOVER FC, DOWNES FP. Infection with vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* containing the vanA resistance gene. **New England Journal of Medicine**, v. 348, p. 1342-7, 2003.

CHOVANOVÁ, R., MIKULÁŠOVÁ, M., VAVERKOVÁ, S. In Vitro Antibacterial and Antibiotic Resistance Modifying Effect of Bioactive Plant Extracts on Methicillin-Resistant *Staphylococcus epidermidis*. **International journal of microbiology**, v. 2013, p. 1-9, 2013.

CHUNG, P. Y., NAVARATNAM, P., CHUNG, L. Y., . Synergistic antimicrobial activity between pentacyclic triterpenoids and antibiotics against *Staphylococcus aureus* strains. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**. v.10, p.1–6, 2011.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE, **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**, Twenty-Second Informational Supplement M100-S22, Vol.32 No. 3, Wayne, PA: CLSI, 2012.

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

DAVIES, J., DAVIES, D. (2010). Origins and evolution of antibiotic resistance. **Microbiology and molecular biology reviews: MMBR**, v. 74, n. 3, 417–33.

DIMECH, G. S., SOARES, L. A. L., FERREIRA, M. A., DE OLIVEIRA, A. G. V., CARVALHO, M. D. C., & XIMENES, E. A. 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. 1–8, 2013.

DURAI, R., PHILIP, C. H., HOQUE, H., Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an update, **journal of Association of periOperative Registered Nurses**, v. 91, p. 599 – 606. 2010.

ELIOPOULOS, G. M. & MOELLERING, R. C., Jr. Laboratory methods used to assess the activity of antimicrobial combinations. In: **Antibiotics in Laboratory Medicine**, 3rd edn, pp. 432–492. Edited by V. Lorian. Baltimore, MD: Williams & Wilkins, 1991.

ESIMONE, C.O., ROHA I.R., IBEZIM E.C., et al. In vitro evaluation of the, interaction between tea extracts and penicillin G against *Staphylococcus aureus*. **African Journal of Biotechnology**, v. 5, p. 1082-1086. 2006.

FUJITA, M., SHIOTA, S., KURODA, T., et al. Remarkable synergies between baicalein and tetracycline, and baicalein and beta-lactams against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Microbiology and Immunology**, v. 49, p. 391-396. 2005.

GIBBONS, S. Anti-staphylococcal plant natural products. **Natural products reports**. v. 21, p. 263-277, 2004

GOODMAN & GILMAN'S. (2008). **Manual of Pharmacology and Therapeutics**. Nova Iorque: McGraw Hill.

HANDZLIK, J., MATYS, A., KIEĆ-KONONOWICZ, K. Recent Advances in Multi-Drug Resistance (MDR) Efflux Pump Inhibitors of Gram-Positive Bacteria *S. aureus*. **Antibiotics**, v.2, n.1, 28–45, 2013.

HATANO, T., KUSUDA, M., INADA, K. Effect of tannins and related polyphenols on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Phytochemistry**. v. 66, p. 2047–2055. 2005.

HEMAISWARYA, S., KRUTHIVENTI, A. K., DOBLE, M. Synergism between natural products and antibiotics against infectious diseases. **Phytomedicine**. v. 15, p. 639 – 652. 2008

HU, Z.Q., ZHAO, W.H., ASANO, N. Epigallocatechin gallate synergistically enhances the activity of carbapenems against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial agents chemotherapy**. v. 46, p. 558–560. 2002

HUA, D., PENG, Q., HUANG, Y., YAO, F., & QIAN, Y. The mechanism of synergistic antibacterial action between ECG/EGCG and β -lactam antibiotics against MRSA. Zhongguo Ganran Yu Hualiao Zazhi, **Chinese Journal of Infection and Chemotherapy**, v.10, p.123–126, 2010.

ITO, T. & HIRAMATSU, K. Acquisition of methicillin resistance and progression of multiantibiotic resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* **Yonsei medical journal**. v. 39, p. 526-533, 1998.

KITAHARA, T., AOYAMA Y., HIRAKATA, Y. et al. In vitro activity of lauric acid or myristylamine in combination with six antimicrobial agents against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **International journal of antimicrobial agents**. v. 27, n. 1, p. 51-57, 2006.

KONEMAN, E. W., et al. **Diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido**. 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1565 p. 2008.

LIVERMORE D.M., MUSHTAQ S., JAMES, D. et al. *In vitro* activity of piperacillin/tazobactam and other broad-spectrum antibiotics against bacteria from hospitalised patients in the British Isles. **International journal of antimicrobial agents** v. 22, p. 14–27. 2003

LIU, C., BAYER, A., COSGROVE, S. E., DAUM, R. S., FRIDKIN, S.K., GORWITZ, R. J., KAPLAN, S. L., KARCHMER, A. W., LEVINE, D. P., MURRAY, B. E., RYBAK, M.J., TALAN, D.A., CHAMBERS H. F., Clinical Practice Guidelines by the Infectious Diseases Society of America for the Treatment of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infections in Adults and Children. **Clinical Infectious Diseases**, v. 52, n.3, p 18-55, 2011.

LORIAN V., **Antibiotics in Laboratory Medicine**, 2005, 4th ed, pp. 52–111. Williams & Wilkins Co., Baltimore, MD, USA.

MANDAL, S., DEBMANDAL, M., PAL, N. K., & SAHA, K. Synergistic anti-*Staphylococcus aureus* activity of amoxicillin in combination with *Embllica officinalis* and *Nymphae odorata* extracts. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 3, n.9, p.711–714, 2010.

MENEGOTTO, F.R. & PICOLI, S.U. *Staphylococcus aureus* oxacilina resistente (MRSA): incidência de cepas adquiridas na comunidade (CA-MRSA) e importância da pesquisa e descolonização em hospital. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 39, n. 2, p. 147-50, 2007.

MEJÍA, C., ZURITA, J., GUZMÁN-BLANCO, M., Epidemiology and surveillance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Latin America. **The Brazilian journal of infectious diseases**, v.14, n.2, p.79-86, 2010.

MELO, G.B., MELO, M.C., GAMA, A.P., et al. Analysis of the genetic diversity of vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Brazilian journal of microbiology**. v. 36, p. 126-130. 2005.

MIMICA, M. J. Ceftobiprole: uma nova cefalosporina com ação contra *Staphylococcus aureus* resistentes à oxacilina, **Arquivos Médicos dos Hospitais e da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa São Paulo**, v.56, n.2, p.107–111, 2011.

MOORE, M.R., PERDREAU-REMGTON, F., CHAMBERS, H.F. Vancomycin treatment failure associated with heterogeneous vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* in a patient with endocarditis and in the rabbit model of endocarditis. **Antimicrobial agents chemotherapy**. v. 47, p. 1262-1266. 2003.

MORITA, J.E., FUJIOKA, R.S., TICE, A.D., et al. Survey of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) carriage in healthy college students, Hawai'i. **Hawaii medical journal**. v. 66, n. 8, p. 213-215. 2007.

MULLIGAN, M.E. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a consensus review of microbiology, pathogenesis, and epidemiology with implications for prevention and management. **American journal of medicine**. v. 94, p. 313-328. 1993

OKOYE C.O.B., ASOGWA F.C., AGBO M.O. synergistic effect of *Jatropha curcas* root extract and ampicillin on *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* isolated from clinical specimens. **International Journal of Biological & Pharmaceutical Research**, v.4, n.11, p.816-820, 2013.

OKUMA K, IWAKAWA K, TURNIDGE JD, et al. Dissemination of new methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in the community. **Journal of Clinical Microbiology**, v.40, p. 4289-94, 2002.

OLAJUYIGBE, O. O., & AFOLAYAN, A. J. (2013). Evaluation of combination effects of ethanolic extract of *Ziziphus mucronata* Willd. subsp. *mucronata* Willd. and antibiotics against clinically important bacteria. **The Scientific World Journal**, v. 2013, p.1-9, 2013.

PESAVENTO, G., DUCCI, B., COMODO, N., NOSTRO, A.L. Antimicrobial resistance profile of *Staphylococcus aureus* isolated from raw meat: a research for methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **Food Control** v. 18, p. 196–200, 2007.

PESEWU, G.A., CUTLER, R.R., HUMBER, D.P. Antibacterial activity of plants used in traditional medicines of Ghana with particular reference to MRSA. **Journal of Ethnopharmacology** v. 16, n. 1, p. 102-111, 2008.

RAKHOLIYA, K., & CHANDA, S. In vitro interaction of certain antimicrobial agents in combination with plant extracts against some pathogenic bacterial strains. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v.2, n.3, p.1466–1470, 2012.

ROCCARO, A. S., BLANCO, A. R., GIULIANO, F., RUSCIANO, D., & ENEA, V. Epigallocatechin-gallate enhances the activity of tetracycline in staphylococci by inhibiting its efflux from bacterial cells. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.48, 1968–1973, 2004.

RODRÍGUEZ-NORIEGA, E., & SEAS, C. The changing pattern of methicillin-resistant staphylococcus aureus clones in Latin America: implications for clinical practice in the region. **The Brazilian journal of infectious diseases**, v.14 n. 2, p 87–96, 2010.

SANTHANA R. L., HING H. L., BAHARUDIN O., TEH H.Z., AIDA S. R., NOR ASIHA C.P., VIMALA B., PARAMSARVARAM S., SUMARI G., HANJEET K., “Ultrastructural study on the effects of antibiotics on *Staphylococcus aureus* ATCC 25923,” **Annals of Microscopy**, no. 7, p.109-114. 2007.

SANTOS, A.L., SANTOS, D.O., FREITAS, C.C. *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. **Jornal Brasileiro de patologia e medicina laboratorial** v. 43, n. 6, p. 413-23. 2007.

SARTORATTO A, MACHADO, ALM, DELARMELENA, C. ET AL. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology** V. 35, p.275-280, 2004.

SCHITTO G., “The importance of the development of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*,” **Clinical Microbiology and Infection**, n. 12, p. 3-8, 2006.

SOLANKI S. S. & SELVANAYAGAM M. Beta-Lactamase Inhibitory Potential and Antibacterial Potentiation of Certain Medicinal Plants and Extracts against Extended Spectrum Beta-Lactamase Producers. **Advanced BioTech**, v.12, n.7, p. 06-10, 2013.

TAMMA, P. D., COSGROVE, S. E., & MARAGAKIS, L. L. Combination therapy for treatment of infections with gram-negative bacteria. **Clinical microbiology reviews**, v.25, n.3, p.450–70, 2012.

TARAI, B., DAS, P., & KUMAR, D. Recurrent challenges for clinicians: emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, vancomycin resistance, and current treatment options. **Journal of Laboratory Physicians**, v.5, n.2, p.71, 2013.

TENOVER, F. C. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. **American journal of infection control**, v.34 n. 5 Suppl. 1, p. 3–10, 2006.

TENOVER, F.C., McDONALD, L.C. Vancomycin-resistant staphylococci and enterococci: Epidemiology and control. **Current opinion in infection disease**. v. 18, p. 300–305, 2005.

THATI, V., SHIVANNAVAR, C. T., & GADDAD, S. M. Vancomycin resistance among methicillin resistant *Staphylococcus aureus* isolates from intensive care units of tertiary care hospitals in Hyderabad. **The Indian journal of medical research**, v. 134, n.5, p.704–8, 2011.

VALAPERTA, R., TEJADA M. R., FRIGERIO, M, MORONI, A., CIULLA, E., CIOFFI, S., CAPELLI, P., COSTA, E. *Staphylococcus aureus* nosocomial infections: the role of a rapid and low-cost characterization for the establishment of a surveillance system. **New Microbiologica**, v.33, n.3, p.223-32, 2010.

WAGNER, H., ULRICH-MERZENICH, G. Synergy research: approaching a new generation of phytopharmaceuticals. **Phytomedicine**. v. 16, n. 2-3, p. 97-110. 2009

WANG, L., BARRETT J.F. Control and prevention of MRSA infections. **Methods in Molecular Biology**. v. 391, p. 209-225. 2007.

WATKINS, R. R., PAPP-WALLACE, K. M., DRAWZ, S. M., & BONOMO, R. A. (2013). Novel β -lactamase inhibitors: a therapeutic hope against the scourge of multidrug resistance. *Frontiers in microbiology*, 4(December), 392.

WINK, M., ASHOUR, M. L., EL-READI, M. Z. (2012). Secondary Metabolites from Plants Inhibiting ABC Transporters and Reversing Resistance of Cancer Cells and Microbes to Cytotoxic and Antimicrobial Agents. **Frontiers in microbiology**, v. 3, n.130, p. 1-15, 2012.

WITTE, W., MIELKE, M. Community MRSA, **Zentralbl Chirurgie**. v. 132, n. 2, p. 124-129. 2007.

ZHAO, W.H., HU, Z.Q., OKUBA, S., HARA, Y., SHIMAMURA, T. Mechanism of synergy between epigallocatechingallate and b-lactams against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial agents chemotherapy**. v. 45, p. 1737–1742. 2001.

5 O EFEITO DE DIFERENTES MÉTODOS DE EXTRAÇÃO SOBRE O RENDIMENTO, CONCENTRAÇÕES DE FENÓIS TOTAIS E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DA CASCA DO CAULE DE *Hymenaea stigonocarpa*

5.1 INTRODUÇÃO

Os fitoterápicos sempre representaram uma parcela significativa no mercado de medicamentos. Dados mais recentes estimam o mercado mundial de fitoterápicos em cerca de US\$ 44 bilhões anuais, segundo a consultoria Análise and Realize, que atende algumas das maiores indústrias farmacêuticas do mundo, estando este ainda em expansão (DIAS et al., 2013).

Apesar do Brasil apresentar um papel privilegiado no mercado mundial de fitoterápicos, devido a sua extensa e diversificada flora, ele não tem se destacado neste setor, entre outros fatores devido a carência de estudos tecnológicos capazes de transformar plantas medicinais, com potencial terapêutico, em um produto que possa ser utilizado com exatidão de dosagem, garantia de eficácia e segurança clínica (RODRIGUES et al., 2009).

A qualidade da matéria-prima vegetal, bem como alterações provenientes no seu beneficiamento e processo extrativo, têm grande influência na composição química das preparações extrativas, podendo interferir na qualidade e reprodutibilidade do produto final. A padronização durante o desenvolvimento do extrato é fundamental para determinar a sua utilização como matéria prima para preparações fitoterápicas (VALANDRO et al., 2007)

Para muitas espécies vegetais os metabólitos bioativos são desconhecidos, o que não se aplica à casca do caule de *Hymenaea stigonocarpa*. Estudos previamente descritos neste trabalho de tese apontam para presença de compostos fenólicos, principalmente taninos e flavonoides com atividade antibacteriana principal frente a cocos Gram positivos. Cepas de *Staphylococcus aureus* MRSA mostraram serem sensíveis aos extratos etanólico, hidroalcoólico e sua fração aquosa e acetato de etila (DIMECH et al., 2013).

A extração de compostos fenólicos em plantas é influenciada por sua natureza química, pelo método de extração empregado, pelo tamanho de partícula da amostra, pelo tempo e condições de armazenamento, assim como pela presença de substâncias interferentes (SOUZA, 2013).

Não existe processo preconizado ou completamente satisfatório que seja adequado para a extração de todos os compostos fenólicos ou de uma classe específica de substâncias fenólicas em materiais de plantas. Metanol, etanol, acetona, água, acetato de etila e suas combinações são frequentemente utilizadas para a extração de compostos fenólicos (NACZKA; SHAHIDI, 2004).

Estudos visando o estabelecimento de parâmetros para identificação, determinação das propriedades físico-químicas da matéria prima vegetal, assim como, o desenvolvimento de uma solução extrativa padronizada são escassos (RODRIGUES et al., 2009).

O objetivo de extrair compostos fenólicos a partir da planta fonte é a libertação destes compostos a partir das estruturas vacuolares onde eles se encontram, quer pela ruptura do tecido da planta ou por um processo de difusão (ASPÉ; FERNÁNDEZ 2011).

Quanto aos métodos de extração, técnicas como maceração, aquecimento sob refluxo, infusão, turbo-extração e sonicação são comumente utilizados para extrair os metabolitos bioativos da droga vegetal (ASPÉ; FERNÁNDEZ 2011; TIWARI et al., 2011).

Além da padronização das técnicas extrativas, detalhes técnicos a respeito do controle desses extratos também devem ser determinados para que exista suporte para análises de controle de qualidade dos insumos (BORELLA, et al., 2012). A padronização de fitoterápicos compreende também informação e controle para garantir a composição consistente de todas os materiais vegetais, incluindo operações analíticas para identificação, marcadores e doseamento de princípios ativos (CHOUDHARY; SEKHON, 2011)

Neste contexto, os taninos têm sido amplamente empregados como substâncias marcadoras para a avaliação da qualidade de diversas matérias-primas vegetais utilizadas em medicamentos (SANTOS; MELLO, 2003).

Os principais métodos para determinação a concentração de taninos em matérias vegetais incluem a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e a espectrofotometria (VERZA et al., 2007). As análises por CLAE podem ser empregadas tanto para detecção e quantificação de taninos hidrolisáveis como para taninos condensados. Para os taninos condensados esta determinação é limitada a de polímeros de taninos condensados de 7 a 8 unidades (SCHOFIELD et al., 2001).

Um dos métodos mais utilizados para o doseamento de polifenóis é a espectrofotometria na qual se faz uso do reagente de Folin-Ciocalteu. Neste método a reação é inespecífica para polifenóis, pois várias são as substâncias com possibilidade de reação (MAGALHÃES et al., 2008). Uma forma de contornar essa questão é a adsorção dos taninos do meio com substratos protéicos. Assim, o teor de taninos (fração adsorvida ao substrato) é calculado pela diferença entre o teor de polifenóis totais e o da fração polifenólica não-adsorvida (VERZA et al., 2007).

Para otimização deste método de doseamento a influência de parâmetros reacionais, como o volume do reagente de Folin-Ciocalteu, concentração da solução de carbonato de sódio e tempo de reação devem ser determinados. Estes parâmetros são capazes de comprometer significativamente a reação por exercerem influência sobre a resposta e a presença de deslocamentos batô ou hipsocrômicos (FERREIRA, 2012).

Desta forma, o presente estudo compara a capacidade de diferentes métodos para extração de polifenóis das cascas do caule de *Hymenaea stigonocarpa*, avaliando o desempenho de cada técnica pela quantificação do resíduo seco, da concentração de fenóis totais e de taninos (metabólitos ativos) e a capacidade antibacteriana dos extratos. Determinando assim a técnica extrativa de melhor desempenho e estabelecendo parâmetros de análise que podem auxiliar na avaliação da qualidade dessa droga vegetal

5.2 OBJETIVOS

O objetivo geral e os específicos deste estudo estão descritos a seguir

5.2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a Influência do métodos de extração sobre a atividade antibacteriana, rendimento e teor dos compostos majoritários do extrato hidroalcoólico da casca do caule de *Hymenaea stigonocarpa*.

5.2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar a caracterização físico-química do material vegetal;
- Utilizar diferentes métodos de extração e avaliar a presença de variações qualitativas dos metabólitos secundários presentes nos diferentes extratos através de análise por cromatografia de camada delgada.
- Analisar o método espectrofotométrico para doseamento de polifenóis presentes no extrato hidroalcoólico de *Hymenaea stigonocarpa* realizando a otimização do método;
- Determinar o rendimento e as concentrações de polifenóis, taninos e flavonóides totais em cada método utilizado;
- Avaliar a influência dos diferentes métodos de extração sobre a atividade antimicrobiana frente a diferentes cepas de *Staphylococcus aureus*;
- Avaliar a atividade fúngica do extrato de melhor rendimento frente a diferentes espécies de *Candida* sp.

5.3 MATERIAIS E MÉTODOS

A seguir estão descritos os materiais e métodos utilizados para a realização deste estudo.

5.3.1 Coleta

Cascas do caule de *Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex. Hayne. foram coletadas em outubro de 2009 na Fa

zenda Refúgio localizada na cidade de Camocim de São Félix, Pernambuco (de latitude 8°21'30.00"S e longitude 35°47'56.70"O)

A identificação foi realizada pela botânica do Instituto Agrônomo de Pernambuco Dra. A. Bocage, sendo a excicata depositada sob o número 53563 no Herbário Dárdano de Andrade Lima, pertencente ao mesmo instituto.

Na preparação da matéria-prima vegetal, as cascas do caule, foram submetidas à secagem em estufa, a uma temperatura de 40°C, durante 72 horas, em seguida pulverizadas em moinho de martelos (Tigre ASN5), e estocada em frascos a temperatura ambiente.

5.3.2 Caracterização físico-química do material vegetal

O material vegetal foi caracterizado através da análise granulométrica, perda por dessecação, teor de extrativos e pela determinação das cinzas totais para estabelecer as características do indivíduo e do preparo do material vegetal que possam influenciar avaliações posteriores.

5.3.2.1 Análise granulométrica por tamisação

Amostras do material vegetal triturado (100g) foram submetidas à passagem através de tamises, previamente tarados, com abertura de malha de 1000, 850; 600; 425; 250 e 150µm, além do coletor. A tamisação foi realizada durante 15 minutos em aparelho tamisador Bertel® calibrado para 60 vibrações por segundo.

A determinação do diâmetro médio das partículas foi obtida pela curva de distribuição de retenção e passagem. Os resultados foram expressos pela média de

três determinações de acordo com o que preconiza a Farmacopéia Brasileira IV, 1988.

5.3.2.2 Determinação da perda por dessecação

Em pesa-filtros previamente tarados foram adicionados 2,0 g do material vegetal triturado e colocados em estufa (Quimis[®]), por 2 h, à temperatura de $105 \pm 2^\circ \text{C}$. As amostras foram colocadas em dessecador. Os pesa-filtros foram novamente pesados em balança analítica (Shimadzu[®]) e colocados em estufa por mais 30 min. Esta operação foi repetida em ciclos de uma hora até peso constante. Os resultados foram expressos em percentual de perda de massa, pela média de três determinações (Farmacopeia Brasileira, 2010).

5.3.2.3 Determinação do teor de extrativos

Amostras contendo 1,0g do material vegetal triturado foram submetidas à decocção com 100 mL de água destilada, durante 10 minutos. Após resfriamento, os volumes foram reconstituídos e as soluções filtradas. Cerca de 20,0 g das soluções filtradas foram colocadas em pesa-filtros, previamente tarados, e evaporadas à secura em banho-maria, com agitação periódica para homogeneização da amostra. As amostras foram levadas a estufa por 2 h à $105^\circ\text{C} \pm 2^\circ \text{C}$, resfriadas e pesadas. Em seguida, estas amostras foram colocadas em estufa por 30 min e este procedimento repetido até peso constante. O teor de extrativos foi calculado pela formula descrita abaixo :

$$\text{TE} = \frac{g \cdot \text{FD}}{m - (m \cdot \frac{\text{ppd}}{100})} \cdot 100$$

Onde: TE = teor de extrativos solúveis em água (%); g = resíduo seco (g); FD = fator de diluição = 5 (pesados 20 dos 100 mL totais); m = planta seca e moída (em gramas); ppd = perda por dessecação da planta seca e moída (SOUZA et al., 2010).

5.3.2.4 Determinação de cinzas totais

Amostras do material vegetal triturado (3g) pesadas analiticamente foram transferidas para cadinhos de porcelana previamente calcinados, arrefecidos e pesados.

Cada uma das amostras foi distribuída uniformemente nos cadinhos, e incineradas aumentando gradativamente para 200°C por 30min, 400°C por 60 minutos e 600°C por 90 minutos. Após este período os cadinhos foram transferidos, resfriados, colocados em dessecador e posteriormente pesados. As percentagens de cinzas em relação ao material vegetal que foi submetido ao processo de secagem foram calculadas. Os resultados foram expressos em perda de massa percentual, pela média de três determinações (Farmacopéia Brasileira V, 2010).

5.3.3 Procedimentos extrativos

Seis procedimentos extrativos (infusão, maceração, maceração dinâmica, refluxo, turboextração e ultrassom) foram realizados a partir de 20g da casca do caule trituradas extraídas com 200 mL de uma solução de etanol : água (1:1, v/v). A escolha deste sistema de solventes foi baseada em relatos etnofarmacológicos.

Após a extração as soluções foram filtradas em papel de filtro (Whatmann nº. 2) e concentrado em rota evaporador obtendo-se assim seis extratos hidroalcoólicos secos: Infusão (EI), maceração (EM), maceração dinâmica (EMD), refluxo (ER), turboextração (ET) e ultrassom (EU), cujo rendimento foi calculado para cada caso. A técnica extrativa mais eficiente foi determinada através da avaliação do rendimento de resíduo seco, determinação de taninos totais e da avaliação da atividade antibacteriana frente a cepas de *Staphylococcus aureus*.

5.3.4. Descrição das técnicas extrativas

5.3.4.1 Maceração

A solução extrativa foi obtida por maceração durante 72h. Esta solução foi preparada em frasco âmbar a temperatura $23 \pm 1^\circ\text{C}$ com agitação ocasional, a cada 12h.

5.3.4.2 Maceração dinâmica

A solução extrativa foi obtida utilizando agitador magnético (marca Fisatom, modelo 754A). A solução foi preparada em frasco âmbar contendo barra magnética tipo liso com anel central (14 x 76 mm) e a extração se deu à temperatura $23 \pm 1^\circ\text{C}$. Durante o processo extrativo foi aplicada uma velocidade de 300 RPM que perdurou 2 horas.

5.3.4.3 Ultrassom

O triturado da casca e a solução extrativa foram adicionados a frasco âmbar a adicionados a banho de ultrassom a temperatura $23 \pm 1^\circ\text{C}$, sendo utilizado o equipamento de marca Unique, modelo maxiclean 1600.

Não foi aplicado aquecimento e o processo durou 45 minutos em frequência de 40 kHz.

5.3.4.4 Refluxo

O triturado da casca e a solução etanol : água (1:1, v/v), foram adicionados a um balão de vidro. Estes foram aquecidos em sistema de refluxo composto por uma manta elétrica (Marca Fisaton, Classe 300 - Modelo 102E) como fonte de aquecimento e balão de vidro acoplado a um condensador. O processo foi iniciado após a temperatura interna de 80°C e encerrado após um período de 45 minutos.

5.3.4.5 Turbo-extração

A solução extrativa foi obtida em turbo-extrator de alta rotação (marca metvisa modelo LAR 2), consistindo de três ciclos de processamento de 15 min, seguidos por uma pausa de 5 minutos para evitar aquecimento.

5.3.4.6 Infusão

A solução extrativa foi obtida após adição da solução etanol : água (1:1, v/v), a temperatura de ebulição, ao material vegetal triturado em frasco âmbar fechado por um período de 1 hora.

5.3.5 Prospecção fitoquímica

Um volume de 15 µL de cada extrato (EM, EU, EMD, ET, ER e EI) de concentrações padronizadas em 0,5% foi utilizado para a realização de Cromatografia em Camada Delgada, utilizando-se placas de gel de sílica (Macherey-Nagel®, Ref. 818 133).

Os sistemas de eluição e reveladores apropriados para polifenóis foram os descritos por WAGNER & BLADT 1996.

5.3.6 Análises quantitativas de polifenóis

A seguir estão descritos os diferentes métodos realizados.

5.3.6.1 Determinação de polifenóis totais

A determinação de polifenóis totais foi realizada após idealização do desenho fatorial 3^2 a partir do método estabelecido pela European Pharmacopoeia (2005).

5.3.6.1.1 Desenho fatorial de 3^2

A fim de avaliar a influência do reagente Folin-Ciocalteu, da concentração de carbonato de sódio e do tempo de reação sobre a concentração de polifenóis presentes nos extratos obtidos por diferentes técnicas, foi idealizado um desenho fatorial de 3^2 (Folin = 1 e 3 mL; Carbonato = 10 e 20%; Tempo = 10 e 20 min.), sendo adicionado 3 pontos centrais (Folin = 2 mL; Carbonato = 15%; Tempo = 15 min.).

Cada ponto foi realizado em triplicata. A variável dependente estudada foi à absorbância após reação com o reagente de Folin-Ciocalteu que diretamente refere-se à concentração dos polifenóis presentes na amostra. A análise estatística foi realizada por gráficos de paretos com auxílio dos programas Microsoft Excel e Statistica 6.0.

O volume de reagente de Folin-Ciocalteu a concentração da solução carbonato de cálcio e o tempo de reação foram os obtidos após o estudo de fatorial 3^2 , sendo 3 ml e 10% e 25 minutos respectivamente.

5.3.6.1.2 Preparação da Solução Padrão

Foram pesados 25mg de ácido gálico e estes solubilizados com 10 mL de água destilada. Esta solução permaneceu sob agitação durante 15 minutos, para completa solubilização. Em seguida, foi transferida para um balão volumétrico de 25 mL e o volume completado com água destilada. Desta forma foi obtida uma solução padrão de concentração 1000 µg/mL.

As condições experimentais para determinação da concentração de ácido gálico (tempo de reação, volume do reagente de Folin-Ciocalteu e Concentração de carbonato de sódio) que foram utilizadas, foram otimizadas por Ferreira (2012).

Desta solução, foram retiradas uma alíquota de 50 µL e transferida para uma balão volumétrico (2 µg/mL) ao qual foi adicionado 2 mL do reagente Folin Ciocalteu, 10 mL de água destilada e o volume completado para 25 mL com solução de carbonato de sódio a 10%.

A varredura em espectrofotômetro foi realizada após 15 minutos da adição do carbonato de sódio. O comprimento de onda de 780 nm foi selecionado para leitura, após avaliação da similaridade do espectro de UV entre a amostra e a substância de referência.

Previamente à determinação da quantificação de polifenóis totais, taninos e flavonoides totais presentes nos extratos foram preparadas soluções de concentração 2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0; 7,0 e 8,0 µg/mL de ácido gálico (99% de pureza, Sigma Chemical Co., St. Louis, USA) em água a fim de obter uma curva de calibração. A absorbância foi medida a 780nm. Com os resultados da absorbância foi construída uma curva de calibração.

A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro (marca Thermo Scientific, modelo Evolution 60S) em comprimento de onda de 780 nm. A leitura foi realizada após 30 min da adição do reagente de oxirredução (Folin-Ciocalteu).

O teor de polifenóis foi determinado pela extrapolação da curva de calibração ($y = 0.1037 x + 0.0024$, $R^2 = 0.9992$) de ácido gálico.

5.3.6.2 Determinação de taninos totais

Foi realizada após avaliação da fração residual de polifenóis na solução extrativa de *Hymenaea stigonocarpa* em função da quantidade de caseína, utilizando caseína (Merck) como agente complexante.

Alíquotas de 10 mL das soluções extrativas foram misturadas separadamente com quantidades crescentes de caseína (50, 150, 250, 350, 450 e 500 mg). Esta mistura foi submetida à agitação durante 1 hora e em seguida filtrada. A partir dos filtrados, alíquotas de 5,0 mL foram diluídas para o volume de 25 mL com água. Dessas soluções, 2,0 mL foram adicionados a um balão volumétrico e adicionados 10,0 mL de água. O volume de reagente de Folin-Ciocalteu a concentração da solução carbonato de cálcio e o tempo de reação foram os mesmos descritos para a determinação de polifenóis totais após estudo fatorial 3^2 (seção 3.5.1.1).

A concentração de taninos totais foi obtida a partir da seguinte equação:

$$TT = PT - FNT$$

Onde: TT = Concentração de taninos Totais; PT = concentração de polifenóis totais e FNT = concentração de polifenóis na fração não tanante.

5.3.6.3 Determinação de flavonóides

Foram obtidos cinco níveis diferentes de concentrações (8,0 a 12,0 µg/mL) a partir do padrão de astilbina de pureza de 99% adquirido da indústria Aktin Chemicals, Inc (China). Cada nível de concentração foi injetado no sistema cromatográfico (n=3) e os valores de área máxima foram traçados contra as concentrações. A curva foi ajustada pela regressão linear através da média das três leituras (corridas cromatográficas). O teor de flavonóides foi determinado então pela extrapolação da curva de calibração ($y = 0.6014 x - 0.5251$, $R^2 = 0.9932$) obtida.

5.3.6.3.1 Análise por cromatografia líquida e alta eficiência acoplada a detector de arranjo de Diodos (CLAE-DAD)

Os extratos foram solubilizados em metanol para a obtenção de soluções de concentração de 400 µg/mL. Esta concentração foi selecionada após triagem previa, por gerar picos de áreas de valores similares as áreas obtidas pelas diferentes doses de astilbina que produziram a curva de calibração.

Os extratos foram filtrados em membrana de politetrafluoretileno de 0,20 µm (Chromafil®) e depois adicionados frascos âmbar. As análises foram realizadas em

cromatógrafo equipamento CLAE-DAD (Ultimate[®] 3000, Thermo Scientific[®]) equipado com bomba binária HPG-3x00RS, 3000 (RS) detector de arranjo de diodo e coletor de amostra automático ACC-3000.

As separações foram realizadas em uma coluna (C18), 256 x 4.6 mm d.i., 5 µm (Acclaim 120, Dionex[®]) equipada com (C18, 4 x 3 mm d.i. Phenomenex[®]).

A fase móvel foi composta por água MiliQ[®] (eluente A), e acetonitrila (eluente B, Tedia[®]), ambos acidificados com 0,1 % de solução de ácido trifluoroacético variando de 10-23 % em 35 min para 23–90 % em 50 min do eluente B a um fluxo de 1mL/min.

O software Chromeleon 6.0 (Dionex[®]) foi utilizado para processamento e aquisição dos dados. O teor de flavonoides em cada extrato foi determinado utilizando a área dos picos com espectros de UV característicos de flavonoides (MABRY et al., 1970) obtidos no cromatograma, pela extrapolação da curva de calibração ($y = 0,6014 x - 0,525$, $R^2 = 0,9932$) obtida a partir da astilbina

5.3.7 Determinação da atividade antimicrobiana de diferentes extratos hidroalcóolicos de *H. stigonocarpa* Mart. ex. Hayne.

A seguir são descritos os métodos realizados para determinação da atividade antimicrobiana

5.3.7.1 Determinação da atividade antibacteriana

A etapa experimental foi realizada no Laboratório de Bioquímica e Fisiologia dos Micro-organismos do Departamento de Antibióticos da UFPE.

5.3.7.1.1 Preparação das soluções de *H. stigonocarpa*

Os extratos secos obtidos pelas diferentes técnicas de extração foram analiticamente pesados (10 mg) e solubilizados em etanol:água (1:9 p/v), obtendo assim soluções estoque padronizadas de concentração igual a 1000 µg/mL.

5.3.7.1.2 Micro-organismos

Os micro-organismos utilizados para a realização da avaliação antimicrobiana dos extratos de *H. stigonocarpa* foram obtidos a partir da coleção de cultura do

Laboratório Fisiologia e Bioquímica de Micro-organismos do Departamento de Antibióticos da UFPE.

Foram utilizados neste estudo os seguintes micro-organismos *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, LFBM 13, LFBM 15, LFBM 16, LFBM 11, LFBM 26, LFBM 05, LFBM 28, LFBM 29, LFBM 31 e LFBM 30.

5.3.7.1.3 - Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CMB)

A concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CMB) foi realizada pela mesma metodologia descrita no capítulo 2 .

5.3.7.2 Determinação da atividade antifúngica

Os métodos para determinação da atividade antifúngica frente a diferentes espécies de *Candida* estão descritos a seguir.

5.3.7.2.1 Candidas e condições de cultivo

Quatro cepas de *Candida albicans* (6257, 4986, 4606 e 4990), três de *Candida krusei* (5712, 4263 e 934), três de *Candida parapsilosis* (ATCC 22019, CP 4608 e 4889) duas de *Candida tropicalis* (4790 e ATCC 750) e uma de *Candida glabrata* (Y 6094), foram oriundas da URM coleção do Departamento de Micologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco.

As cepas foram estocadas em óleo mineral a 18°C. Com o objetivo de obter um inóculo contendo de $1-5 \times 10^6$ UFC/mL, cada cepa foi cultivada em um tubo contendo 20 mL de Agar Sabouraud Dextrose, sendo incubada a 35° C por dois dias. Após este período, as suspensões de leveduras foram preparadas em solução fisiológica esterilizada e depois ajustadas a 90% de transmitância a 530 nm. Diluições seriadas de 1:100 e 1:20 foram realizadas para obter um inóculo final contendo $1-5 \times 10^3$ UFC/mL (LIMA-NETO et al., 2012)

Testes de viabilidade e subsequente confirmação taxonômica das características morfológicas, bioquímicas e fisiológicas foram realizados.

5.3.7.2.2 Susceptibilidade antifúngica *in vitro*.

Placas de microdiluição contendo diluições seriadas de droga foram preparadas seguindo o que determina o protocolo CLSI M27-A3 (2008). Os extratos foram solubilizados em dimetilsulfoxido (10%) as concentrações avaliadas variaram de 1000 a 0,487µg/mL. Fluconazol foi usado como droga de referência nas concentrações entre 0.125 a 64 µg/mL.

Os 12 primeiros poços (linha vertical) das placas de microdiluição receberam 100 µL das soluções duas vezes mais concentradas dos extratos e das drogas de referência. Nos outros meio padrão RPMI 1640 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA), tamponadas a pH 7,0 com 0,165 mol/L de ácido morfolinopropanosulfônico (MOPS, Sigma). Os extratos e o padrão foram diluídos geometricamente seguindo uma razão 2. Em seguida todos os tubos foram inoculados com 100 µL do inóculo final contendo $1-5 \times 10^3$ UFC/mL e as microplacas incubadas a 35°C em uma incubadora de CO₂.

Após 48h de incubação a CIM foi lida. Os valores de CIM correspondem a mais baixa concentração da droga que apresentou inibição do crescimento das leveduras. Todos os testes foram realizados em triplicata.

5.3.8 Análises estatísticas

A análise estatística foi realizada utilizando Anova one-way e teste de comparação múltiplas Newman-Keuls usando o software GraphPad Prism versão 5.0 para Windows, GraphPad Software (San Diego, CA) e $p < 0.05$ foi usado como nível de significância.

5.4- RESULTADOS E DISCUSSÃO

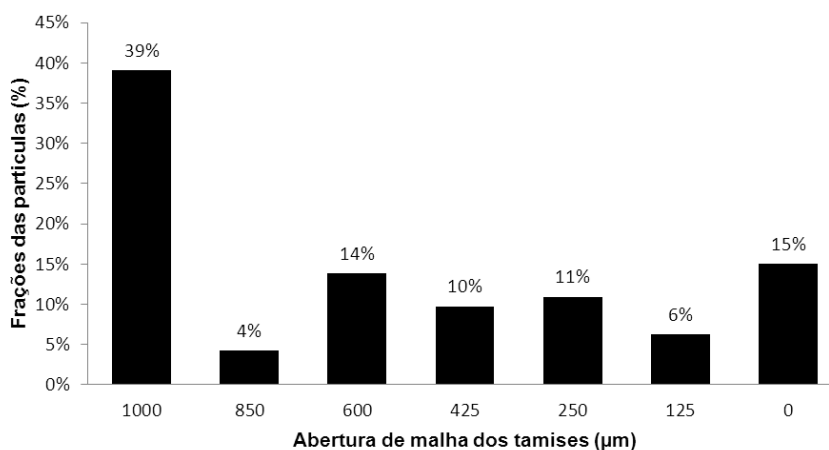
Os resultados obtidos neste estudo estão descritos a seguir.

5.4.1 Caracterização físico-química do material vegetal

A granulometria do material triturado é um parâmetro importante a ser estabelecido, pois influencia diretamente a eficiência e reprodutibilidade do processo extrativo (MIGLIATO et al., 2007). É um parâmetro com o qual se pode determinar a superfície de contato da partícula disponível para interagir com o solvente o que é muito utilizado na obtenção de preparações farmacêuticas líquidas como, tinturas e extratos (SILVA JÚNIOR, 2006).

A Farmacopéia Brasileira V (2010) classifica os pós pela distribuição granulométrica. De acordo com os parâmetros desta publicação, a distribuição granulométrica da casca do caule de *H. stigonocarpa* após trituração analisada no presente trabalho pode ser classificada como pó grosso, visto que as partículas na sua totalidade apresentaram uma granulometria superior a 1700 μ m e uma quantidade inferior a 40% foram superiores a 355 μ m (figura 1).

Figura 49 - Histograma de distribuição granulométrica da casca do caule de *Hymenaea stigonocarpa* após trituração

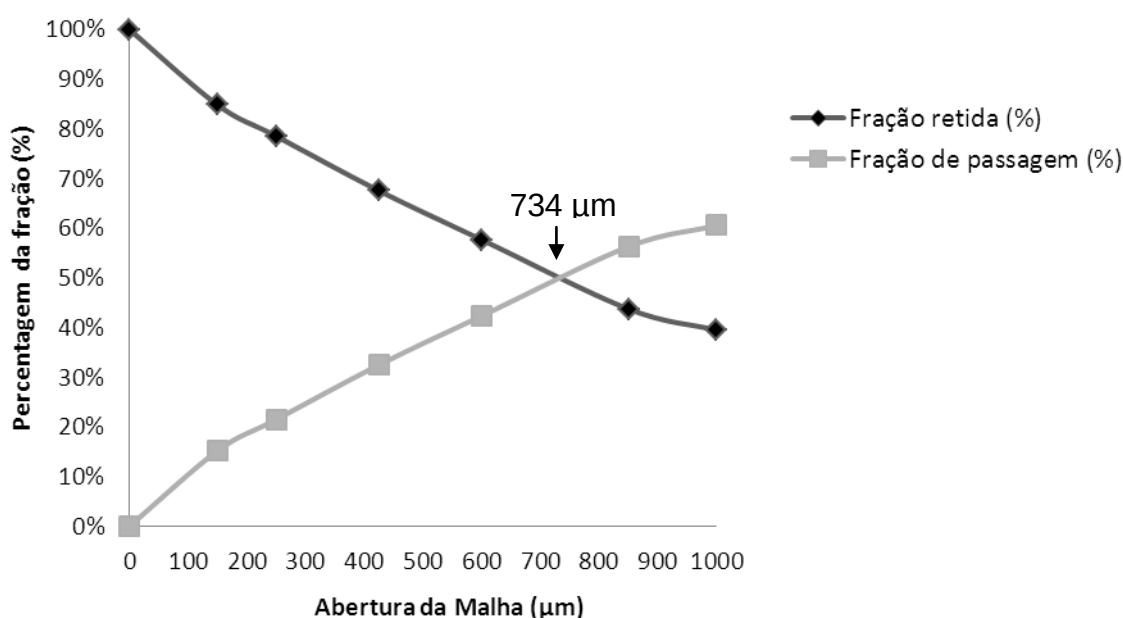


Neste estudo, o material mostrou distribuição granulométrica bastante variada. Os pesos obtidos das partículas após tamisação em malhas de 1000, 850;

600; 425; 250 e 150 μm foram $39,07 \pm 3,23\text{g}$; $4,21 \pm 0,22\text{g}$; $13,80 \pm 0,23\text{g}$; $9,77 \pm 0,32\text{g}$; $10,88 \pm 0,94\text{g}$; $6,25 \pm 0,73\text{g}$ e $15,01 \pm 1,51\text{g}$ respectivamente.

O ponto interseção das curvas de retenção e passagem partículas passa pelo tamanho de 734 μm (tamanho médio) e a sua representação gráfica está apresentada na figura 2.

Figura 50 - Curvas de retenção e passagem das partículas de casca do caule de *Hymenaea stigonocarpa* após trituração.



Além do método de trituração do material vegetal, outros aspectos têm influência direta na distribuição granulométrica final, principalmente o teor de lignina e de extrativos no material vegetal. Madeiras com grandes quantidades de extrativos tendem a ser mais densas, assim a quantidade de extrativos costumam variar em torno de 3 a mais de 30% do peso seco. (BOWYER et al., 2003)

A redução do tamanho de partícula leva a um aumento da superfície de contato entre a matéria-prima e o meio de extração (NORIEGA et al., 2005). Porém em alguns casos pós de tamanho maior, podem favorecer as extrações. Partículas muito finas podem aderir às partículas maiores, aumentando a viscosidade do meio e criando uma barreira que impede a penetração de solventes (VOIGT & BORNSCHEIN, 1982).

É importante que a matéria prima vegetal esteja suficientemente triturada para que se consiga um rendimento ótimo no processo de extração dos constituintes químicos de interesse farmacêutico.

A composição química da madeira no que se refere ao teor de extrativos e suas interrelações como a adsorção/dessorção de umidade e como a retração volumétrica têm sido objeto de estudo por parte de diversos autores. O termo extrativo se refere a substâncias de baixa ou média massa molecular, que podem ser extraídas em água ou solventes orgânicos (SILVERIO et al., 2006)

Buchanan (1963) afirmou que há uma considerável variação na distribuição dos extrativos através da madeira de uma árvore, existindo uma variação na quantidade de material depositado através da altura da árvore e entre o tronco e os galhos.

Nearn (1955) verificou que devido à ação de enchimento dos extrativos solúveis em água, espécies com alto teor de extrativos apresentam maior estabilidade dimensional, menor umidade no ponto de saturação das fibras e umidades de equilíbrio mais baixas, do que espécies que possuam pequenas quantidades de extrativos em sua composição química.

A determinação do teor de extrativos é um método utilizado para quantificar constituintes extratíveis da droga vegetal, que pode ser considerado como uma característica própria de cada amostra vegetal e pode auxiliar na avaliação da qualidade dessa droga vegetal. (ANTONELLI-USHIROBIRA et al., 2004), assim o valor obtido para a amostra vegetal avaliada foi de $14,29\% \pm 1,67$.

O teor de extrativos determinado neste trabalho indica a presença de compostos hidrossolúveis a quente presentes no material vegetal. Muito embora não seja indicativo dos constituintes ativos, o teor de extrativos representa uma técnica de fácil execução e economicamente viável, relevante por estabelecer condições adicionais para controle de qualidade.

A determinação do teor de água residual presente nas drogas vegetais constitui um índice da qualidade de sua preparação e da garantia de sua conservação (COSTA, 1982; SILVA JÚNIOR, 2006). A perda por dessecação do triturado da planta, indicativo do teor de material volátil do vegetal e, indiretamente da umidade residual, apresentou um valor obtido na análise da casca do caule de *Hymenaea stigonocarpa* de 10,24%. O valor encontrado nesse estudo apresenta-se

dentro do intervalo estabelecido pela Farmacopéia Brasileira V (2010) de 8% a 14%, indicando uma boa conservação e uma secagem eficiente da matéria prima vegetal.

Esta determinação é importante para o controle de qualidade microbiológico, pois um excesso de água na droga vegetal favorece o crescimento de fungos e bactérias, podendo também levar à hidrólise de seus constituintes bioativos (SHARAPIN, 2000).

A determinação de cinzas totais do triturado da casca permite a quantificação do resíduo não volátil inorgânico presente nas drogas vegetais como integrante natural destas. As cinzas totais constituídas, principalmente por carbonatos, cloretos e diversos tipos de óxidos pode servir como método para avaliar a pureza do material, detectando possíveis impurezas e adulterações do material com compostos inorgânicos (COSTA, 1982, SILVA JÚNIOR, 2006). O resultado encontrado na determinação do teor de cinzas totais nas cascas do caule de *H. stigonocarpa* foi de $8,28\% \pm 0,27$. Considerando que não existem na Farmacopéia Brasileira limites preconizados em monografia para esta espécie, e que em várias delas são apresentados em ensaios de pureza valores de até 10% como dentro do limite, consideramos os resultados obtidos aceitáveis.

Os resultados obtidos para os ensaios de perda por dessecação, teor de extrativos estão apresentados na tabela 5:

Tabela 5 - Resultados dos ensaios de perda por dessecação, teor de extrativos e cinzas totais das amostras de cascas do caule de *Hymenaea stigonocarpa* após trituração.

Amostra	PD $\pm$ dp	TE $\pm$ dp	CT $\pm$ dp
Triturado da casca de <i>Hymenaea stigonocarpa</i>	$10,24\% \pm 0,17$	$14,29\% \pm 1,67$	$8,28\% \pm 0,27$

PD – Perda por dessecação; TE – Teor de extrativos; CT – Cinzas Totais; dp – desvio padrão.

5.4.2 Determinação do rendimento

Um problema para a seleção dos métodos de extração é a possibilidade de compostos de interesse apresentarem uma interação significativa com a matriz, sendo necessário nestes casos um método com elevada recuperação.

Determinadas matrizes podem reter analitos dentro de poros ou outras estruturas (SOUZA, 2013).

Uma das técnicas para aumentar a recuperação dos compostos de interesse seria aumentar a temperatura do solvente, pois a energia térmica adicionada pode auxiliar na quebra das ligações da matriz e facilitar a difusão do analito à superfície. O aumento do tempo de contato também poderia ser outra saída para o aumento da recuperação, devido a sua influência na difusão. Deve-se avaliar porém que tempos muito longos podem promover a perda de compostos por oxidação (SOUZA, 2013).

A escolha de um método em detrimento de outro é um ponto que deve ser bem estudado, pois uma seleção incorreta pode levar ao aumento do tempo de execução, necessidade do uso de grande quantidade de solvente, além de poder apresentar baixa eficiência na extração. Exemplos disso são os métodos que utilizam elevação da temperatura onde substâncias de interesse caso sejam termicamente lábeis podem ser degradadas. Assim deve-se considerar a adequação dos métodos de extração (ONG, 2004). Desta forma alguns métodos utilizados neste estudo são descritos a seguir.

O método de extração assistido por ultrassom envolve a força de corte criada pela implosão de bolhas de cavitação sobre a propagação das ondas acústicas no intervalo kHz. O colapso de bolhas pode produzir efeitos físicos, químicos e mecânicos, o que resulta na ruptura das membranas biológicas para facilitar a liberação de compostos extratíveis e melhorar a penetração do solvente em materiais celulares e transferência de massa (DAÍ; MUMPER, 2010).

Uma das vantagens da extração assistida por ultrassom (HSU) é que ela é uma tecnologia potencialmente útil, pois não necessita de instrumentos complexos e é relativamente de baixo custo, podendo ser usada tanto em pequena quanto em grande escala (VINATORU, 2001).

Após a obtenção da solução extrativa e concentração em rotaevaporador, o valor de rendimento obtido para o método do ultrassom foi de 11,22% (2,245g). Esta foi a técnica que apresentou menor rendimento. Aspectos como a natureza do material e distribuição da onda ultrassônica no líquido extrator podem justificar esse menor rendimento.

Amostras com grandes teores de extrativos apresentam maior estabilidade dimensional e conseqüentemente maior resistência a sonicação. Quanto à potência ultrassônica, sabe-se que o máximo poder é observado próximo a superfície da

fonte radiante ultrassônica (WANG; WELLER 2006), porém ele diminui proporcionalmente com aumento da distância. Assim os aspectos físico-químicos da amostra estudada bem como a metodologia empregada podem ter influenciado no reduzido rendimento desta técnica.

Outra técnica avaliada, a turbo-extração, apresentou um rendimento de 12,96% (2,593g). Esta técnica é baseada na extração com simultânea redução do tamanho de partícula, que é resultado da aplicação de elevadas forças de cisalhamento. Essa redução drástica do tamanho de partícula e consequente rompimento das células favorece a rápida dissolução das substâncias ativas no líquido extrativo (VOIGT, 1993; SONAGLIO et al., 2007).

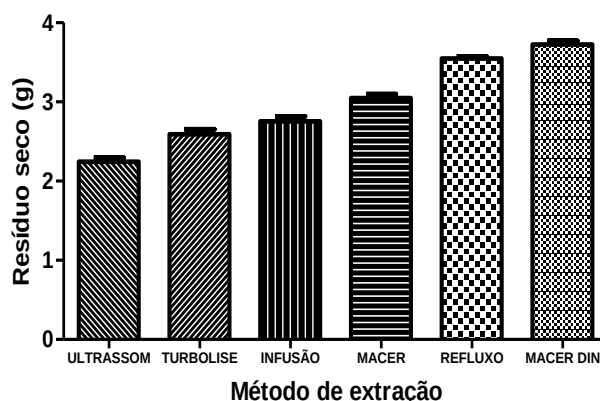
Nessas circunstâncias, a difusão das substâncias dissolvidas através da membrana celular fica relegada a um plano secundário, resultando em extração de até quase o esgotamento da droga. A esse incremento da eficiência somam-se a simplicidade, rapidez e versatilidade da técnica, que permitem a fácil utilização da turboextração em processamentos em pequena e média escala (HUBINGER et al., 2009).

Em nosso estudo observamos que o tamanho reduzido da partícula, aspecto característico deste método, proporciona dificuldades no processo de separação da solução extrativa por filtração e consequentemente perda de material. Isso pode justificar o porquê de um método que leva a quase esgotamento da droga não produzir um bom rendimento.

Aspectos como o aumento na temperatura podem promover uma maior extração, tanto pelo aumento da solubilidade como pela taxa de transferência de massa. Além disso, a viscosidade e a tensão superficial dos solventes são diminuídas em temperaturas altas, o que ajuda os solventes a atingir as matrizes de amostras e melhora a taxa de extração (DAÍ; MUMPER, 2010).

Assim a técnica de infusão levou a um rendimento de 13,77% (2,755g), não apresentando diferença significativa no rendimento ($P < 0,05$) quando comparado ao método de ultrassom.

Figura 51 – Rendimentos obtidos através dos diferentes métodos de extração



O método de maceração por sua natureza não conduz ao esgotamento da matéria prima vegetal, seja devido à saturação do líquido extrator ou ao estabelecimento de um equilíbrio difusional entre o meio extrator e o interior da célula (VOIGT, 2000). Desta forma para o método de maceração o rendimento foi de 15,25% (3,050g). Comparando este método, com os métodos anteriormente descritos, o melhor rendimento da maceração pode ser sugerido pela maior influência do tempo de interação e difusão droga/solvente, o que não foi observado em métodos que apenas utilizam o aumento da temperatura do solvente e ultrassom.

Métodos extrativos dependem em grande parte dos fenômenos de difusão, sendo que a agitação pode influenciar na duração do processo (MIGLIATO et al., 2011). Baseados nesta ideia outros dois métodos que empregam a agitação também foram avaliados. Um deles foi o refluxo, onde ocorre o aquecimento da solução até à ebulição e o retorno dos vapores condensados para o balão antes de serem perdidas por evaporação. Este método se mostrou mais eficiente com rendimento de 17,75% (3,550g), se comparado com as técnicas anteriores. Porém foi observado que o aquecimento até a ebulição e o refluxo do triturado durante 45min levaram a redução do tamanho das partículas, que influenciou no processo de separação da solução extrativa por filtração. Não diferindo significativamente do método de refluxo ($P < 0,05$), a de maceração dinâmica foi o método que apresentou o maior rendimento, 18,62% (3,725g).

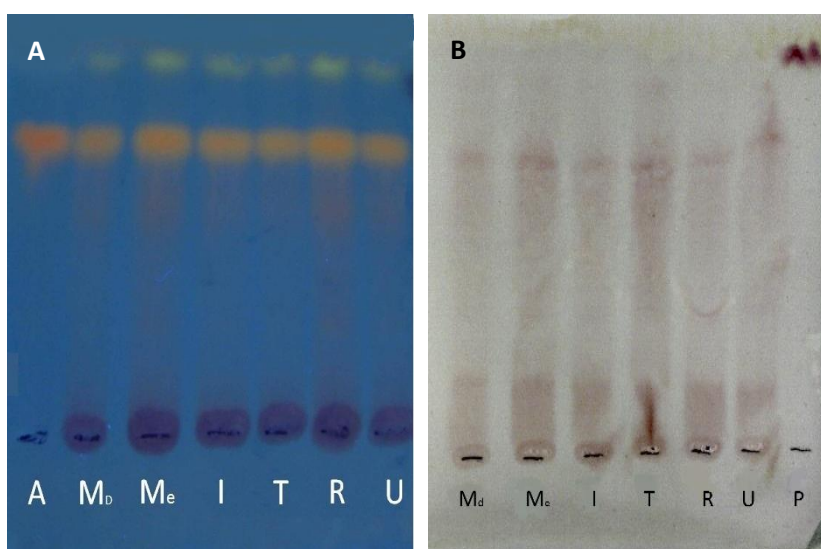
Comparado com os outros métodos podemos sugerir que sua vantagem ocorreu pela influência do agitador magnético no equilíbrio difusional entre o meio

extrator e o interior da célula, assim como ruptura das membranas que aumentaram a penetração do solvente nos materiais celulares e consequentemente levaram o um maior rendimento.

5.4.3 Prospecção fitoquímica por cromatografia de camada delgada.

A prospecção fitoquímica, através de cromatografia de camada delgada (figura 52), demonstrou a presença de flavonoides e taninos condensados em todos os extratos avaliados.

Figura 52 – Cromatogramas demonstrando a presença de flavonoides e taninos nos extratos hidroalcoólicos da casca do caule *Hymenaea stiginocarpa* obtidos a partir dos diferentes métodos de extração



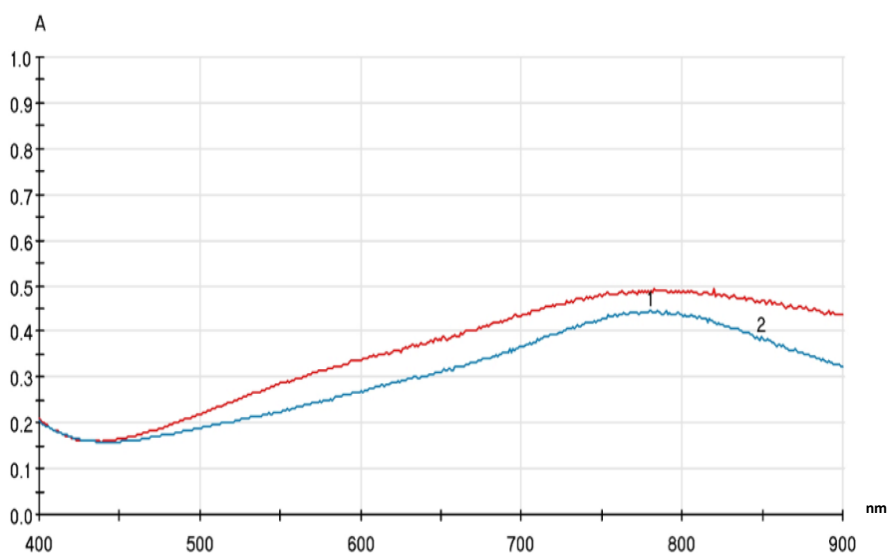
Placa A e B: fase móvel EtOAc – HCOOH – ACOH – H₂O (100:11:11:26 v/v); revelador da placa A - Reagente de NEU; revelador da placa B – Vanilina clorídrica; Amostras adicionadas: A – astilbina (Padrão), Md – Extrato maceração dinâmica, Me – Extrato maceração estática (Maceração), I – Extrato infusão, T – Extrato turbolise, R – Extrato refluxo, U – Extrato ultrassom e P – Padrão de epicatequina.

5.4.4 Análise quantitativa dos compostos majoritários

Antes de considerar o emprego da metodologia para taninos totais, os perfis de absorção no UV-VIS para o padrão de ácido gálico e as amostras, foram estabelecidos em espectrofotômetro na faixa de 400 a 900 nm, após reação com o

reagente de Folin-Ciocalteu. Os espectros estão apresentados na figura 53 e revelam grande similaridade entre a amostra e a substância de referência, confirmando a compatibilidade e permitindo eleger o comprimento de onda de 780 nm para leitura.

Figura 53 - Espectro de varredura de ultravioleta do ácido gálico e do extrato hidroalcoólico de *Hymenaea stigonocarpa* após reação com Folin-Ciocalteu.



Linhas: azul - ácido gálico; vermelha - Extrato hidroalcoólico.

Um desenho fatorial do tipo 3^2 foi conduzido para determinação da influência de parâmetros reacionais mais importantes, tal como o volume do reagente de Folin-Ciocalteu, a concentração da solução de carbonato e o tempo de reação, sobre a resposta do método de doseamento (intensidade de absorção de 780 nm) e a presença de deslocamentos batô ou hipsocrômicos, capazes de comprometer significativamente o desempenho do procedimento.

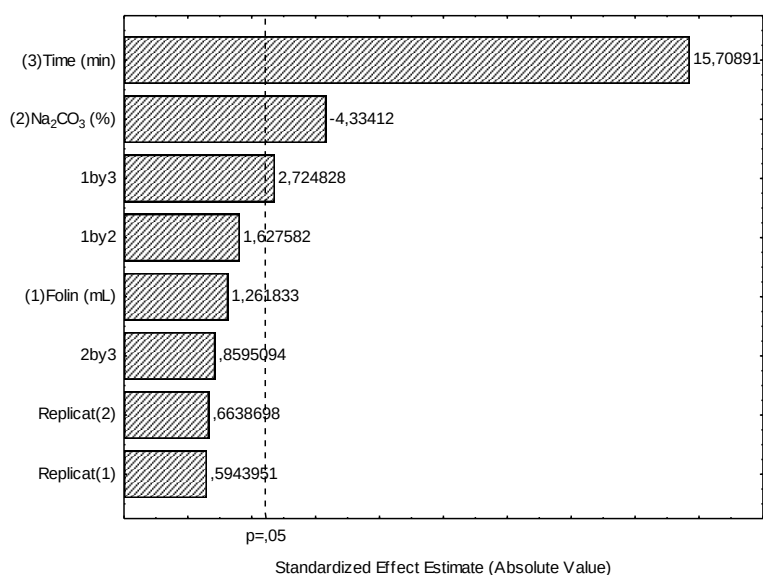
Os resultados demonstraram interferência das variáveis sobre a absorbância observada. Para a resposta do método de doseamento espectrofotométrico (intensidade de absorvância), os dados obtidos e apresentados na tabela 6 foram analisados através do gráfico de paretos (figura 54).

Tabela 6 - Matriz do experimental do desenho aplicado para avaliar a influência da quantidade de Folin-Ciocalteu, concentração de carbonato de sódio e tempo de reação sobre a absorbância.

Variável natural			Variável codificada			Resultados		
Folin (mL)	Na ₂ CO ₃ (%)	Tempo (min)	Fator A	Fator B	Fator C	Média	DP	CV%
1	10	5	-1	-1	-1	0,453	0,0040	0,01
3	10	5	1	-1	-1	0,431	0,0060	0,01
1	20	5	-1	1	-1	0,414	0,0055	0,01
3	20	5	1	1	-1	0,422	0,0180	0,04
1	10	25	-1	-1	1	0,501	0,0261	0,05
3	10	25	1	-1	1	0,519	0,0031	0,01
1	20	25	-1	1	1	0,485	0,0083	0,02
3	20	25	1	1	1	0,503	0,0066	0,01
2	15	15	0	0	0	0,487	0,0154	0,03
2	15	15	0	0	0	0,475	0,0026	0,01
2	15	15	0	0	0	0,488	0,0089	0,02

Variáveis codificadas: Fator A - Volume do reagente de Folin-Ciocalteu, Fator B - Concentração de Na₂CO₃, Fator C - Tempo de reação; DP – desvio padrão; cv% - Coeficiente de variação.

Figura 54 - Gráfico de pareto para efeitos padronizados do fatorial 3².



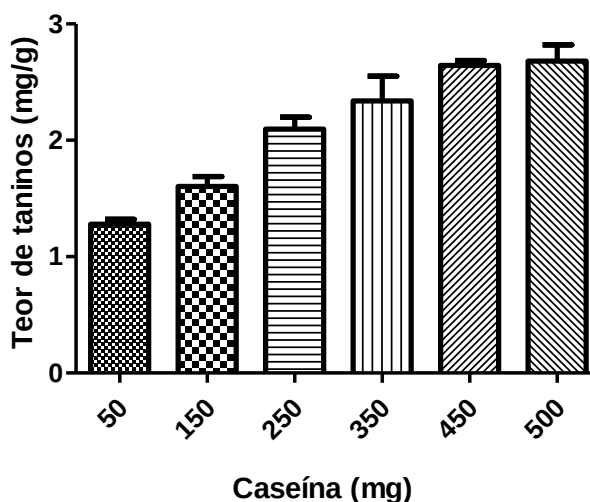
O cálculo dos efeitos para fatores pelo gráfico de Pareto (Figura 54) possibilitou a observação dos efeitos significativos e o seu tipo de influência sobre a resposta intensidade de absorvância. Considerando os termos significativos, apenas os fatores: tempo e concentração de carbonato de sódio foram significativos. Não foi observada influência importante para o volume do reagente de Folin-Ciocalteu, quando analisada isoladamente, porém houve interação entre os fatores tempo e volume de Folin-Ciocalteu.

Ainda a respeito aos efeitos significativos, o tempo apresentou contribuição positiva (+15,70), ou seja, a mudança de nível favorece a resposta estudada. Portanto, o aumento do tempo incrementa a absorvância lida. Por outro lado, a concentração da solução de carbonato de sódio exerceu influência negativa. Assim, o aumento da concentração de carbonato reduz a resposta do procedimento.

Com os parâmetros determinados, foi então avaliada a quantidade de agente precipitante sobre o doseamento de taninos totais nas cascas do caule de *Hymenaea stigonocarpa*.

Foi avaliado o agente precipitante caseína, adicionado nas seguintes quantidades 50, 150, 250, 350, 450 e 500 mg. Os resultados foram expressos com a média e desvio padrão. A figura 55 mostra o efeito das quantidades de caseína, sobre o teor de taninos totais.

Figura 55 - Valores de absorvância da fração residual do extrato de *Hymenaea stigonocarpa* em função da quantidade de caseína.



Em termos de precisão intermediária, os melhores resultados foram obtidos para uma quantidade de, no máximo, 450,0 mg de caseína (Tabela 7). Para quantidades acima desse valor, foram observados ausência de variação significativa dos valores da absorvância.

Tabela 7 - Valores médios da absorvância (UA) obtidos para a fração não tanante após adição de diferentes quantidades de caseína durante análise (triplicata).

Quantidade de caseína	1	2	3	MÉDIA	DP	CV%
Sem caseína	0,559	0,535	0,538	0,544	0,013	0,024
50mg	0,424	0,410	0,399	0,411	0,013	0,030
150mg	0,376	0,371	0,385	0,377	0,007	0,019
250mg	0,320	0,328	0,330	0,326	0,005	0,016
350mg	0,272	0,313	0,318	0,301	0,025	0,084
450mg	0,275	0,264	0,269	0,269	0,006	0,020
500mg	0,254	0,280	0,264	0,266	0,013	0,049

Repetições das avaliações das absorvâncias: 1, 2 e 3; DP – desvio padrão; cv% - Coeficiente de variação.

5.4.4.1 Determinação do método de doseamento de polifenóis totais por espectrofotometria após avaliação das variáveis analíticas

Após a análise dos dados obtidos pelo estudo da otimização do método de doseamento de polifenóis por espectrofotometria, as variáveis do método empregado foram: volume de reagente de Folin-Ciocalteu 3 ml, concentração de Carbonato de Sódio 10,% (v/v) e o tempo de reação 25 minutos.

Para obtenção da fração não tanante a quantidade do agente precipitante utilizada foi de 450 mg, sendo utilizada caseína Merck® purificada.

5.4.4.2 Determinação da concentração de polifenóis totais, taninos e flavonoides.

Após a avaliação das variáveis analíticas e da determinação da fração residual da solução extrativa das cascas do caule de *Hymenaea stigonocarpa* em função da quantidade de caseína, os teores de polifenóis e taninos totais obtidos a

partir da diferentes métodos de preparação foram determinados e descritos na tabela 8.

Tabela 8 - Teor de polifenóis, taninos e flavonoides totais nos extratos hidroalcoólicos de *Hymenaea stigonocarpa* obtidos a partir de diferentes métodos.

Extratos	Polifenóis totais	Taninos	Flavonóides
Ultrassom (EU)	4,76 ± 0,08	1,40 ± 0,23	0,56 ± 0,05
Turbolise (ET)	6,86 ± 0,09	1,64 ± 0,27	0,58 ± 0,07
Infusão (EI)	6,72 ± 0,14	1,75 ± 0,10	0,62 ± 0,03
Maceração (EM)	5,43 ± 0,11	1,79 ± 0,14	0,60 ± 0,04
Refluxo (ER)	4,56 ± 0,41	1,64 ± 0,28	0,66 ± 0,06
Maceração dinâmica (EMD)	6,60 ± 0,24	1,76 ± 0,31	0,59 ± 0,03

Além de polifenóis e taninos totais, o teor de flavonoides nos diferentes extratos foi estimado a partir de CLAE-DAD. Após a obtenção dos cromatogramas dos diferentes extratos observou-se em todos eles a presença de cinco picos, que foram chamados de A, B, C, D e E (figura 56).

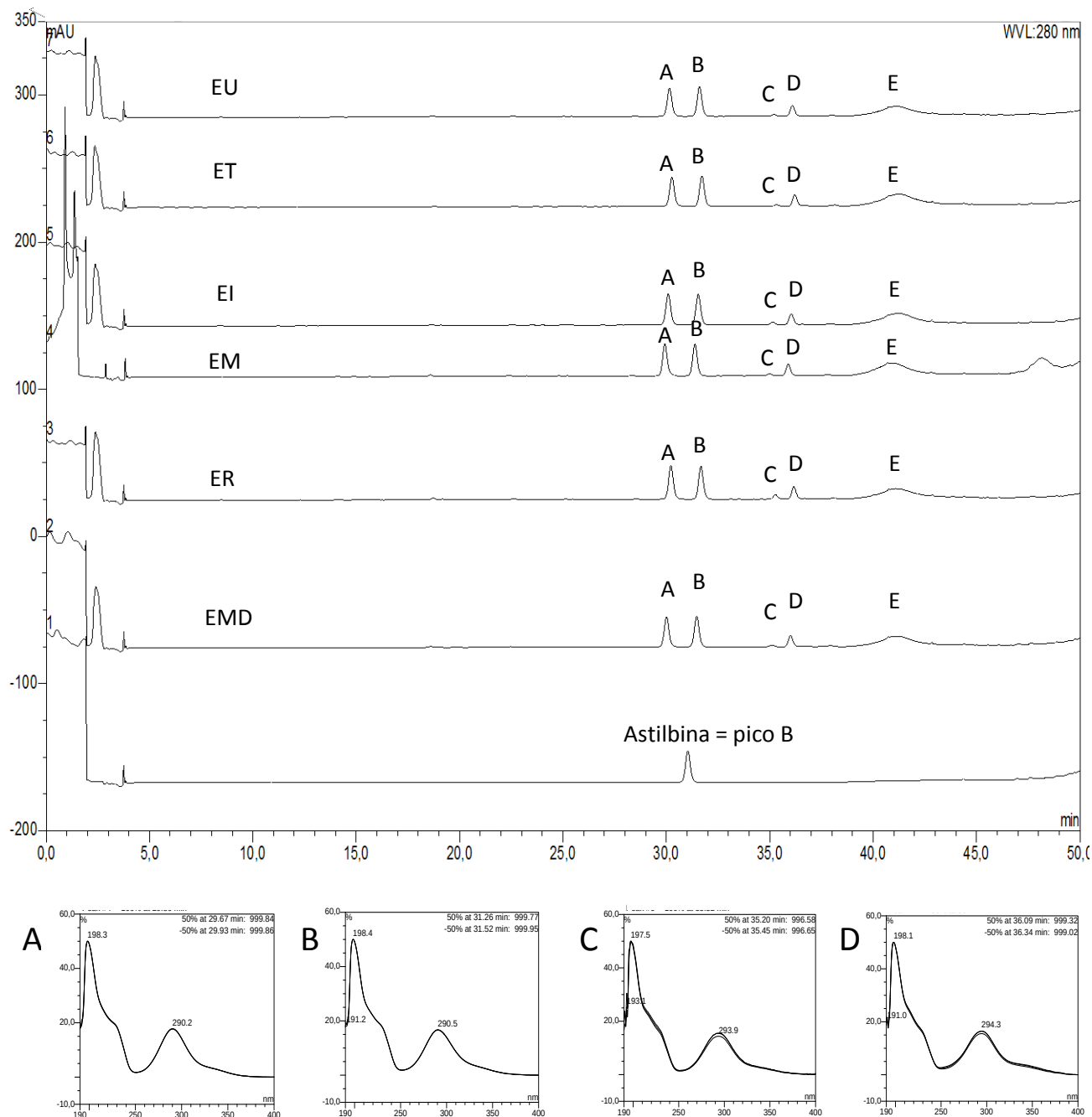
Os picos de A até D foram identificados através do espectro de UV com dados da literatura (MABRY, 1970) como flavonoides e assim o teor de flavonoides totais em cada extrato foi obtido pela soma das áreas dos picos A, B, C e D através da equação da reta.

A área da banda E (T_R 39-43) não foi adicionada ao cálculo, pois esta banda está relacionada à presença de taninos condensados já observados na análise por CCD. Esses taninos são possivelmente catequinas poliméricas, o que pode ser sugerido devido ao aparecimento de deriva na linha de base e da formação de bandas características no cromatograma. Apenas monômeros e oligômeros até o tetrâmero de catequinas e proantocianidinas pode ser separado e detectado como um pico definido (ANDERSEN; MARKHAM 2006; PARK et al., 2012).

Quanto ao teor de polifenóis (figura 57) os extratos com maior concentração foram os obtidos por turbolise, infusão e maceração dinâmica com 6,86±0,9, 6,17±0,15 e 6,60±0,24 mg GAE/g respectivamente, não havendo diferença significativa eles ($P < 0,05$). Um menor teor 5,43 ± 0,11 mg GAE/g foi observado no extrato obtido por maceração, o qual mostrou um rendimento significativo se

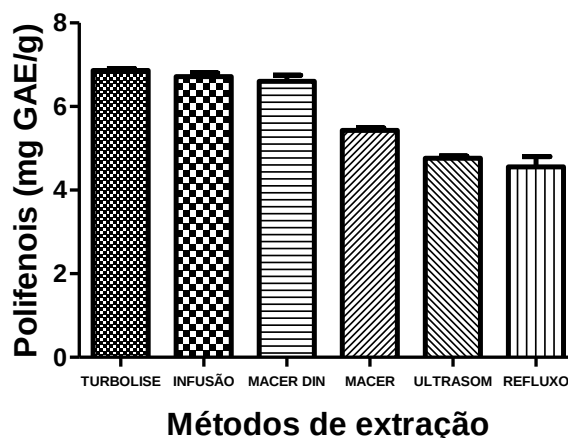
comparado aos extratos obtidos por ultrassom e refluxo com $4,76 \pm 0,09$ e $4,56 \pm 0,41$ mg GAE/g respectivamente, que não diferiram entre si ($P < 0,05$).

Figura 56 - Cromatograma obtido por CLAE-DAD dos diferentes extratos hidroalcoólicos da casca do caule de *Hymenaea stigonocarpa*.



Extrato obtido por ultrassom (EU); Extrato obtido por turbolise (ET); Extrato obtido por infusão (EI); Extrato obtido por maceração (EM); Extrato obtido por refluxo (ER) e Extrato obtido por Maceração dinâmica (EMD). Espectro obtido por UV com padrão sugestivo de flavonóides (A, C and D), identificado como astilbina (B) e relacionado à catequinas poliméricas (E).

Figura 57 - Teor de polifenóis totais dos extratos hidroalcoólicos da casca do caule de *Hymenaea stigonocarpa* obtidos através dos diferentes métodos de extração



Tempos de extração prolongados e temperatura elevada levam ao aumento da possibilidade de oxidação dos compostos fenólicos, o que diminuem o rendimento de destes compostos nos extratos (DAÍ; MUMPER 2010).

A redução do rendimento de polifenóis no método de refluxo empregado em nosso estudo, onde o material vegetal tem contato com o solvente em temperatura de ebulição, e na maceração, onde o contato material vegetal e solvente ocorre por um período de tempo estendido, podem ser sugeridos pela ocorrência de possível oxidação dos compostos fenólicos.

Uma das desvantagens do método de extração assistida por ultrassom é o efeito deletério ocasional de energia de ultrassom (mais de 20 kHz) sobre os constituintes ativos de plantas medicinais que pode levar a formação de radicais livres e, conseqüentemente, alterações indesejáveis (TIWARI et al., 2011). Além disso, um tempo de sonicação prolongado (mais de 40 minutos) pode levar a degradação dos componentes ativos (ANNEGOWDA et al., 2010). Desta forma a ocorrência destes efeitos pode ser sugerida para explicar o teor reduzido de polifenóis na extração assistida por ultrassom.

Os métodos que obtiveram concentrações estatisticamente semelhantes de polifenóis (turbólise, infusão e maceração dinâmica) parecem não terem sofrido degradação de seus constituintes em decorrência do tempo de extração ou temperatura de extração. Nessas amostras o processo ocorreu em no máximo 60 minutos.

Quanto à temperatura podemos sugerir que, a ocorrência de temperatura de ebulição durante um período prolongado, é que parece induzir a degradação de polifenóis dos extratos de *Hymenaea stigonocarpa*, o que não acontece no método de infusão, onde a temperatura de ebulição só é alcançada no início do processo.

Diferente do que ocorreu na determinação do teor de polifenóis, não foram observadas diferenças significativas tanto em relação ao teor de taninos, quanto ao de flavonoides. Isso sugere que apesar da degradação de alguns polifenóis em decorrência do método extrativo, há uma “compensação” entre a degradação e capacidade extrativa.

Isso é evidenciado quando observamos alguns métodos, refluxo, por exemplo, a pesar de degradação motivada pelo aumento da temperatura, esta também leva a uma maior capacidade extrativa. Outro exemplo é a extração assistida por ultrassom, que mesmo apresentando teores semelhantes aos outros é o método que apresenta o menor teor de absoluto de taninos e flavonoides. Neste caso o baixo rendimento de resíduo seco, motivado pela ineficiência do ultrassom na lise da parede celular é associado ao efeito da degradação dos polifenóis, não levando a uma compensação e consequentemente redução do teor absoluto de taninos e flavonoides.

5.4.5 Determinação da atividade antibacteriana de *H. stigonocarpa* Mart. ex. Hayne.

Com o objetivo de avaliar a influência do método de extração sobre a atividade antibacteriana do extrato hidroalcoólico da casca do caule de *Hymenaea stigonocarpa*, frente a diferentes cepas de *Staphylococcus aureus*, foram determinadas a concentração inibitória mínima e bactericida mínima dos extratos obtidos.

Staphylococcus aureus foi selecionado por ser o micro-organismo mais susceptível ao extrato hidroalcoólico de acordo com estudos anteriores (DIMECH et al., 2013). Os valores das concentrações inibitórias e bactericidas mínimas, não variaram quando correlacionadas as técnicas de extração utilizadas tabela 9.

Tabela 9 - Valores da Concentração Bactericida Mínima e Concentração Inibitória Mínima dos extratos de *Hymenaea stigonocarpa* frente a cepas de bactérias Gram positivas.

Concentração Inibitória Mínima / Concentração bactericida mínima (µg/mL)							
Cepas de <i>Staphylococcus aureus</i>	Refluxo	Infusão	Ultrassom	Turbolise	Maceração (estática)	Maceração dinâmica	Oxacilina (padrão)
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	250/500	250/250	250/250	250/250	250/250	250/500	0,125/0,250
<i>Staphylococcus aureus</i> AM 02	62,5/125	62,5/125	62,5/125	62,5/62,5	62,5/62,5	62,5/62,5	0,125/0,125
<i>Staphylococcus aureus</i> AM 04	500/500	250/500	500/500	500/500	500/500	500/500	0,125/0,250
<i>Staphylococcus aureus</i> AM 05	125/250	250/250	250/250	250/250	250/500	250/500	0,125/0,250
<i>Staphylococcus aureus</i> UFPEDA 01	500/500	250/500	250/500	250/500	250/500	250/500	0,125/0,250
<i>Staphylococcus aureus</i> AM 13	500/500	500/500	250/250	250/250	250/500	250/500	256/512
<i>Staphylococcus aureus</i> IC 17	500/500	500/500	250/500	250/250	250/500	250/500	32/64
<i>Staphylococcus aureus</i> AM 18	250/250	250/500	250/500	250/250	250/500	500/500	128/256
<i>Staphylococcus aureus</i> AM 19	500/500	250/500	500/500	500/500	500/500	250/500	16/32
<i>Staphylococcus aureus</i> AM 20	250/250	250/250	125/250	250/250	250/500	250/500	8/16
<i>Staphylococcus aureus</i> AM 21	250/250	250/250	125/250	250/250	250/500	250/500	16/16

CBM: Concentração bactericida mínima, CIM concentração inibitória mínima; OXA^R: Oxacilina com CIM ≥ 4,0µg/mL; OXA^S: Oxacilina com CIM ≤ 2,0µg/mL

Estudos anteriores indicaram que os taninos são os metabólitos secundários de *Hymenaea stigonocarpa* responsáveis pela atividade antibacteriana (DIMECH et al., 2013). A seleção do método extrativo mais eficiente foi baseada nos critérios, atividade biológica frente à *Staphylococcus aureus*, teor de taninos totais (metabólito secundário responsável pela ação antibacteriana) e teor de resíduo seco.

Devido a não terem ocorrido diferenças significativas na atividade biológica e no teor de taninos quando comparamos todos os extratos obtidos a partir dos diferentes métodos, o teor de resíduo seco foi o critério utilizado para determinar o método de maceração dinâmica como o melhor.

5.4.6 Determinação da atividade antifúngica de *H. stigonocarpa* Mart. ex. Hayne.

Além da ação antibacteriana dos taninos observada em nosso estudo, sabe-se que eles podem apresentar atividade frente fungos. Vasconcelos *et al.* (2003) descreve que os taninos apresentam a capacidade de inibir o crescimento de espécies de *Candida* devido a sua ação na célula, especialmente na membrana celular, precipitando proteínas.

Os dois principais agentes utilizados na terapia antifúngica são a anfotericina B, um antibiótico polienico, e o fluconazol, agente antifúngico pertencente a classe dos azóis. Eles têm atividade especialmente contra *C. albicans*. No entanto já existem relatos de surgimento de algumas cepas de *Candida albicans* resistentes a estes antifúngicos, além disso, estes apresentaram efeitos colaterais (HIRASAWA; TAKADA, 2004)

Os principais mecanismos de desenvolvimento de resistência das cepas em relação aos azóis: alterações no sítio alvo da droga (14 α -demetilase) impedindo a sua inibição, que levaria a depleção do ergosterol e consequente formação da membrana plasmática com alterações na função e estrutura; alteração na biossíntese de esteróis, resultando na acumulação de 14 α -metil fecosterol ao invés de ergosterol; presença de bombas de efluxo e Superexpressão do sítio alvo (14 α -demetilase) impedindo a redução da síntese de ergosterol pela inibição provocada pelos azóis. (GHANNOUM; RICE, 1999).

Desta forma, a descoberta de um agente antibiótico que seja eficaz e seguro podem ser importantes para a erradicação de ambas as cepas de *Candida* sensíveis e resistentes. Existem vários relatos que mostram atividade antifúngica de produtos

naturais (RUKAYADI et al., 2013; ADEME et al., 2013; ALRAJHI et al., 2013, SENHAJI et al., 2013)

Alguns estudos realizados em espécies do gênero *Hymenaea* relatam a presença de atividade antifúngica em diferentes extratos.

Quanto à espécie *Hymenaea martiana* os extratos: aquoso, etanólico, butanólico e hidroalcoólico da casca, apresentam atividade frente à *Cryptococcus neoformans* e *C. gatii* com CIM entre 2 a 64 µg/mL, sendo as frações etanólica e hidroalcoólica as mais ativas. Também foi demonstrada a atividade da *H. martiana* frente à dermatófitos (*T. rubrum*, *T. mentagrophytes*, *M. canis*), sendo os menores valores de CIM obtidos a partir das frações aquosa e butanólica nas três espécies estudadas Souza e colaboradores (2010).

Os valores das Concentrações inibitórias mínimas para o extrato Hidroalcoólico e o fluconazol frente a diferentes cepas de *Candida* estão sumarizados na tabela 10.

Tabela 10 - Concentração Inibitória Mínima do extrato hidroalcoólico de *Hymenaea stigonocarpa* obtido por maceração dinâmica frente a diferentes espécies de *Candida*.

Micro-organismos / Cepa	Extrato hidroalcoólico* CIM (µg/ml)	FLU CIM (µg/ml)	Perfil sensibilidade
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019	250	8,0	S
<i>Candida parapsilosis</i> CP 4608	250	16	SD-D
<i>Candida parapsilosis</i> 4889	125	2,0	S
<i>Candida glabrata</i> 6094	7,81	>64	R
<i>Candida krusei</i> 5712	1,95	32	SD-D
<i>Candida krusei</i> 4263	1,95	64	R
<i>Candida krusei</i> 934	62,5	64	R
<i>Candida tropicalis</i> 4790	125	32	SD-D
<i>Candida tropicalis</i> ATCC 750	250	4,0	S
<i>Candida albicans</i> 6257	3,90	ND	-
<i>Candida albicans</i> 4986	250	16	SD-D
<i>Candida albicans</i> 4606	250	2,0	S
<i>Candida albicans</i> 4990	250	>64	R

CIM concentração inibitória mínima; FLU – Fluconazol; ND: Não Determinado; Perfil: Sensível CIM ≤ 8,0µg/mL; Sensibilidade dose-dependente 16 – 32; resistente CIM ≥ 64,0µg/mL

*Extrato Hidroalcoólico obtido por maceração dinâmica.

Quanto à atividade antifúngica, foram empregadas cepas de diferentes perfis de resistência frente ao fluconazol.

As espécies que apresentaram as maiores sensibilidades de acordo com os valores da CIM foram *Candida krusei* e *Candida glabrata*. Segundo o CLSI M27-A3 (2008) os isolados de *C. krusei* são intrinsecamente resistentes ao fluconazol, porém essas espécies foram susceptíveis ao extrato em valores até cinco diluições menores quando comparados às substâncias de referência.

Além destas cepas, o extrato mostrou atividade frente à cepa de *Candida albicans* 6257, com CIM de 3,9 µg/ml como também a *Candida glabrata* 6094 com CIM de 7,81 µg/ml. Com valores mais elevados da CIM, mas ainda apresentando uma considerável atividade, foi observada a ação do extrato frente às espécies *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*, com valores variando entre 125 e 250 µg/ml.

A presente investigação, porém representa um estudo preliminar para atividade antifúngica e aponta para a necessidade de uma maior investigação biológica, uma vez que *Hymenaea stigonocarpa* apresenta um grande potencial farmacológico.

5.5 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos nos permitem concluir que a secagem do material vegetal em estufa, a 40°C, durante 72h foi suficiente para obtenção de um triturado com valor de perda por dissecação (teor de umidade) dentro das especificações, o material vegetal obtido após a trituração pôde ser classificado como pó grosso.

Quanto ao rendimento de extrativos, a técnica que levou a obtenção do melhor teor de resíduo seco foi a de maceração dinâmica, seguido por refluxo, maceração, infusão, turbolise e por fim extração ultrassônica, não havendo diferenças quanto às classes de metabólitos secundários identificados em função do método de extração empregado.

A otimização do método de doseamento por Folin Ciocalteu para a determinação do teor de polifenóis em *Hymenaea stigonocarpa* demonstrou que o aumento do tempo de reação, da quantidade do reagente de Folin-Ciocalteu e a adição de 450mg de caseína na complexação com os polifenóis são as variáveis da metodologia de doseamento de polifenóis que apresentaram contribuição positiva para o estudo.

Quanto a atividade antimicrobiana, não houve diferenças significativas nos teores de taninos e flavonoides totais e na atividade frente a diferentes cepas de *Staphylococcus aureus* em função do método de extração utilizado. O método de extração mais eficiente, de acordo com as variáveis avaliadas foi a maceração dinâmica, devido ao maior teor de resíduo seco obtido.

A triagem do extrato hidroalcoólico obtido por maceração para atividade antifúngica demonstra que este extrato apresenta forte atividade frente a cepas de *Candida krusei* e *Candida glabrata*;

REFERÊNCIAS

- ADEME A., AYALEW A., WOLDETSADIK K. Evaluation of Antifungal Activity of Plant Extracts against Papaya Anthracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*), **Journal of Plant Pathology and Microbiology**, v. 4, n.10, p. 4-10, 2013
- ALRAJHI, A. M. H. Antifungal activity of plant extracts against fungal pathogens of *Piper Nigrum*. **International Journal of Traditional and Herbal Medicine**, v.1, n.4, p.116-123, 2013.
- ANDERSEN O. M., MARKHAM K. R. **Flavonoids: chemistry, biochemistry and applications**. Flórida: Taylor & Francis, 1212 p., 2006.
- ANNEGOWDA, H. V, ANWAR, L. N., MORDI, M. N., RAMANATHAN, S., & MANSOR, S. M. Influence of sonication on the phenolic content and antioxidant activity of Terminalia catappa L. leaves. **Pharmacognosy research**, 2(6), 368–73, 2010.
- ANTONELLI-USHIROBIRA, T. M. , YAMAGUTI, E, UHEMURA, L M e PALAZZO DE MELLO, J C Controle de Qualidade de Amostras de *Paullinia cupana* H.B.K. var. *sorbilis* (Mart.) Ducke, **Acta Farmaceutica Bonaerense** v.23, n.3, p.383-386, 2004.
- ASPÉ, E., & FERNÁNDEZ, K. The effect of different extraction techniques on extraction yield, total phenolic, and anti-radical capacity of extracts from Pinus radiata Bark. **Industrial Crops and Products**, v. 34, n.1, p. 838–844, 2011.
- BORELLA, J. C., CARVALHO, D. M. A., TEIXEIRA, J. C. L., RIBEIRO, N. S., Influência do processo extrativo nas propriedades físico-químicas dos extratos de *Calendula officinalis* L. (ASTERACEAE). **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 9, n.2, p.25 - 36, 2012.
- BOWYER, J. L., SHMULSKY, R., HAYGREEN, J. G. **Forest products and wood** Blackwell Publishing. New York, 2003.
- BROWNING, B.L. - **Methods of wood chemistry**. New York, John Wiley, 1967. 384p.
- BUCHANAN, M.A. - Extraneous components of wood. In: BROWNING, B.L., ed. **The chemistry of wood**. New York, John Wiley, 1963. p.313-68.
- BUNDESVEREINIGUNG, Deutscher Apothekerverbände (Hgrs). **Deutscher Arzneimittel-Codex 2**. Frankfurt, Stuttgart. p.1-3, 1986,
- CHOUDHARY, N. & SEKHON, B. S. An overview of advances in the standardization of herbal drugs. **Journal of Pharmaceutical Education and Research** v.2, n. 2, p. 55-70, 2011.
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE **Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts**, approved standard-third edition, CLSI document M27-A3 .Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, 2008.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**, Twenty-Second Informational Supplement M100-S22, Vol.32 No. 3, Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, 2012.

COSTA, A. F. 1982. **Farmacognosia**. Lisboa: Calouste Gulbenkian.

DAI, J., & MUMPER, R. J. Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties, **Molecules**, v.15, n. 10, p. 7313–7352, 2010.

DIAS, E.G.E., VALENZUELA, V.C.T., ALVES, M.R., DUARTE, M.G.R., GARCIA, E.F. Qualidade e autenticidade de folhas de chapéu-de-couro (*Echinodorus grandiflorus*) oriundas de fornecedores de São Paulo. **Brazilian Journal of Medicinal Plants**. v.15, n.2, p.250-256, 2013.

DIMECH, G. S., SOARES, L. A. L., FERREIRA, M. A., DE OLIVEIRA, A. G. V., CARVALHO, M. D. C., & XIMENES, E. A. (2013). 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**, 2013, 1–8.

EUROPEAN PHARMACOPOEIA. Directorate for the quality of medicines of the Council of Europe (EDQM). 5.ed. **Strasbourg: Council of Europe**, 2005. 3000p.

FARMACOPÉIA Brasileira. 4. ed., São Paulo: **Atheneu**, 1988.

FARMACOPÉIA Brasileira. 5. ed., ANVISA, 2010. Disponível em: 06 de fevereiro de 2011. http://www.anvisa.gov.br/hotsite/cd_farmacopeia/index.htm

FERREIRA M. R. A. Triagem antifúngica de extratos obtidos de espécies vegetais do nordeste brasileiro. 2012. Dissertação (**Mestrado em Ciências Farmacêuticas**) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2012.

GHANNOUM, M. A, & RICE, L. B. Antifungal agents: mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, v.12, n.4, p.501–17, 1999.

GOSMANN, G., PALAZZO de MELLO, J. C., MENTZ, L. A., ROS PETROVICK, P. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 6 ed. Porto Alegre, Florianópolis: Ed. Universidade UFRGS, ed. Universidade UFSC, p. 577-611, 2007.

HARBONE, J.B. **Phytochemical methods**, 3 ed., London: Chapman & Hall, p. 288, 1998

HIRASAWA M, TAKADA K. 2004 Multiple effects of green tea catechin on the antifungal activity of antimycotics against *Candida albicans*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v.53, n.2, p.225-229, 2004.

HUBINGER, S. Z., SALGADO, H. R. N., & MOREIRA, R. R. D. Controles físico, físico-químico, químico e microbiológico dos frutos de *Dimorphandra mollis* Benth Fabaceae, **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.19, p. 690–696, 2009.

LIMA-NETO, R. G.; CAVALCANTE, N. N. M.; SRIVASTAVA, R. M.; et al. Synthesis of 1,2,3-triazole derivatives and in vitro antifungal evaluation on *Candida* strains. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 17, n. 5, p. 5882–92, 2012.

MAGALHÃES, L. M., SEGUNDO, M. A., REIS, S., LIMA, J. L. F. C. Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties, **Analytica Chimica Acta**, v. 613, p.1-19, 2008.

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

MIGLIATO, K. F., MOREIRA, R. R. D., MELLO, J. C. P., SACRAMENTO, L. V. S., CORREA, M. A., SALGADO, H. R. N. Controle de Qualidade do Fruto de *Syzygium cumini* (L.) Skeels, **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 1, 2007.

MIGLIATO, K.F, CORRÊA, M.A., SALGADO, H.R.N., TOGNOLLI, J.O., SACRAMENTO, L.V.S., MELLO, J.C.P., MENDES GIANNINI, M.J.S, ALMEIDA, S.M.F, PIZZOLITTO, A.C. 2011, Planejamento experimental na otimização da extração dos frutos de *Syzygium cumini* (L.) SKEELS. **Química Nova**, v. 34, n. 4, p. 695-699, 2011.

NACZK M. & SHAHIDI F. Extraction and analysis of phenolics in food. **Journal of Chromatography A**, v.1054 n.1-2, p.95-111, 2004.

NORIEGA P, RÖPKE C D, CAMILO C M, FREITAS P C D, BARROS SB M, Avaliação por análise fatorial das condições da extração do 4-nerolidilcatecol de *Pothomorphe umbellata* (L). Miq. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences** v. 41, n. 2, p. 261-269, 2005.

ONG, E. S. Extraction methods and chemical standardization of botanicals and herbal preparations. **Journal of chromatography B Analytical technologies in the biomedical and life sciences**, v. 812, v.1-2, p.23–33, 2004.

PARK C. H., TANAKA T., KIM H. Y., PARK J. C., YOKOZAWA T. , “Protective effects of *Corni Fructus* against advanced glycation endproducts and radical scavenging,” **Evidence Based Complementary Alternative medicine**, n. 2012, p. 1-7, 2012.

ROBERTSON, E. H.; CARTWRIGHT, R. A.; WOOD, J., **J. Sci. Food Agr.** v. 7, p. 637-640, 1955.

RODRIGUES, I. C., FERNANDES, J. S., SOUZA, L. A. G., VASCONCELLOS, M. C., LIMA, E. S., SOUZA, T. P., Influência de fatores tecnológicos sobre OS CONSTITUINTES QUÍMICOS PRESENTES EM soluções de *Caesalpinia ferrea* Martius. In: **61ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira Para o Progresso da Ciência**, Manaus, 2009.

SANTOS, S. C. & MELLO, J. C. P. Taninos. In: 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**. 5. Ed., Porto Alegre: UFRGS, Florianópolis, UFSC, 2003. Cap. 24, p. 615-656, 2010.

SENHAJI, B., HMAMOU, D. BEN, SALGHI, R., ZARROUK, A., CHEBLI, B., ZARROK, H., WARAD, I., HAMMOUTI, B., AL-DEYAB, S. S., *Asteriscus Imbricatus* Extracts: Antifungal Activity and Anticorrosion Inhibition. **International Journal of Electrochemical Science**, v. 8 p. 6033-6046, 2013.

SCHOFIELD, P., MBUGUA, D. M., PELL, A. N. Analysis of condensed tannins: a review. **Animal Feed Science and Technology**, v. 91, p. 21-40, 2001.

SHARAPIN, N. **Fundamentos de tecnologia de produtos fitoterápicos**. Santafé de Bogotá: Convenio Andrés Bello, 2000.

SHARMA, O. P., DAWRA, R. K., Thin-layer chromatographic separations of lantadens, the pentacyclic triterpenoids from (*Lantana camara*) Plant. **Journal of Chromatography A**, v. 587, p. 351-354, 1991.

SILVA JÚNIOR J. O. C. Obtenção e avaliação de forma farmacêutica semi-sólida fitoterápica contendo extrato seco por nebulização de *Simphytum officinale* L.(*confrei*). São Paulo, **Tese de doutorado**, Programa de Pós graduação em Fármacos e Medicamentos, Universidade de São Paulo, 2006

SILVÉRIO, F. O., BARBOSA, L. C. A., GOMIDE, J. L., REIS, F. P., PILÓ-VELOSO, D. Metodologia de extração e determinação do teor de extrativos em madeiras de eucalipto. **Revista Árvore**, v. 30, n. 6, p. 1009-1016, 2006.

SONAGLIO, D., ORTEGA, G.G., PETROVICK, P.R., BASSANI, V.L. Desenvolvimento tecnológico e produção de fitoterápicos In: 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**. 5. ed. rev. ampl., Porto Alegre: UFRGS, Florianópolis, UFSC, 2003. Cap. 24, p. 615-656, 2010

SOUZA ACM, KATO L, SILVA C, CIDADE A, OLIVEIRA CMA, SILVA MRR Antimicrobial activity of *Hymenaea martiana* towards dermatophytes and *Cryptococcus neoformans*. **Mycoses**. v. 53, n. 6, p. 500-503. 2010

SOUZA, A. P. T. B., BARNI, S. T., FERREIRA, R. A., COUTO, A. G. Desenvolvimento Tecnológico de Soluções Extrativas Hidroetanólicas das Flores de *Calendula officinalis* L. Empregando Planejamento Fatorial. **Latin America Journal of Pharmacy**. v.29, n.1, p. 13-21, 2010.

SOUZA, A. D. Otimização da extração de taninos da casca do cajueiro, 2013. Dissertação (**Mestrado em Engenharia Química**) - Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2013.

TIWARI, P., KUMAR, B., KAUR, M., KAUR, G., & KAUR, H. Phytochemical screening and Extraction: A Review. **Internationale Pharmaceutica Scientia** v.1, n.1, p.98-106, 2011.

VALANDRO, J., BASSO, G., RODRIGUES, P. O., BUDAL, R., SONAGLIO, D., Padronização do processo extrativo de soluções hidroalcoólicas de *Passiflora edulis* Sims in: **6ª Semana de Ensino, Pesquisa e Extensão**, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2007.

VASCONCELOS L. C., SAMPAIO M. C., SAMPAIO F. C., HIGINO J. S. Use of *Punica granatum* Linn as an antifungal agent against Antifungal activity of *P. granatum* candidosis associated with denture stomatitis. **Mycoses** v. 46, p.192-196, 2003.

VERZA, S. G., PAVEI, C., & ORTEGA, G. G. Study of the Specificity of Cross-Povidone (PVPP) as binding agent in the quantification of polyphenolic compounds. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.19, n.8, p.1627–1633, 2008.

VERZA, S. G., KREINECKER, M. T., REIS, V., HENRIQUES, A. T., ORTEGA, G. G. Avaliação das variáveis analíticas do método de Folin-Ciocalteu para determinação do teor de taninos totais utilizando como modelo o extrato aquoso de folhas de *Psidium guajava* L. **Química Nova**, v.30, n. 4, p. 815-820, 2007.

VINATORU, M. (2001). An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. **Ultrasonics sonochemistry**, 8(3), 303–13.

VOIGT R., BORNSCHEIN M. **Tratado de tecnologia farmacêutica**. 3º. ed. Zaragoza: Editorial Acribia, 1982.

VOIGT, R. "**Pharmazeutische Technologie**". 7 überarb. Aufl., Ullstein Mosby, Berlin, 1993.

VOIGT, R. **Pharmazeutische Technologie**. 9. Ausgabe, Stuttgart: Deutscher Apotheker, 2000.

WAGNER, H., BLADT, S., Plant drug analysis. **A thin layer chromatography atlas**. 2ed. Berlin: Springer Verlag, 1996, p. 384.

WALLENFELS, K., Detection of reducing sugars in paper chromatogram and quantitative evaluation. **Naturwissenschaften** v. 37, p. 491-492, 1950.

WANG, L., & WELLER, C. L. (2006). Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. **Trends in Food Science & Technology**, v.17, n.6, p.300–312, 2006.

XAVIER H. S. *Lavandula stoechas* L. (Lamiaceae): Etude Botanique, Chimique et Pharmacodynamique. **(Tese de doutorado)**. Montpellier : Université de Montpellier-I, 1988.

RUKEYADI, Y., LAU, K. Y., ZAININ, N. S., ZAKARIA, M., ABAS, F. Screening antimicrobial activity of tropical edible medicinal plant extracts against five standard microorganisms for natural food preservative. **International Food Research Journal** v. 20 n. 5 p. 2905-2910, 2013.

6 IDENTIFICAÇÃO DO FLAVONÓIDES PRESENTES NA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DA CASCA DO CAULE DE *Hymenaea stigonocarpa*.

6.1 INTRODUÇÃO

Hymenaea stigonocarpa Mart. ex Hayne, o jatobá-do-cerrado, apresenta distribuição homogênea e ocorre, predominantemente, em áreas de cerrado sendo uma espécie lenhosa típica deste bioma (PAIVA & MACHADO, 2006)

As suas cascas do caule são amplamente utilizadas na medicina popular em infusão ou decocção para tratar a dor de estômago, asma, bronquite, úlceras, diarreia, gripe e tosse (GRANDI et al., 1989, VILA-VERDE et al., 2003; BIESKI et al., 2012).

Estudos farmacológicos tem revelado que os extratos de *Hymenaea stigonocarpa* apresentam várias atividades biológicas, tais como antiulcerogênica (GUIMARÃES 2009), inibitória sobre o crescimento das linhagens de células tumorais H460, Colo 205 e U937 (BRASIL et al., 2009), inibitória sobre a liberação induzida de histamina a partir de mastócitos (FERREIRA, 2011), antidiarreica, gastroprotetor e cicatrizante (ORSI, 2012), antioxidante (MARANHÃO et al., 2013) e antibacteriana (DIMECH et al., 2013).

Avaliações fitoquímicas de *Hymenaea stigonocarpa*, demonstram a presença de terpenos, sesquiterpenos, ácidos graxos, flavonóides e taninos, metabólitos secundários reconhecidos por suas atividades biológicas (LANGENHEIM et al., 1983; MATUDA & NETTO, 2005; ORSI et al., 2012).

Quanto aos metabólitos *Hymenaea stigonocarpa*, mais ativos, Dimech e colaboradores (2013) descrevem que aqueles extratos e frações ricos em taninos são os mais ativos quanto à atividade antibacteriana. Apesar destes apresentarem em sua composição taninos, os flavonoides também estão presentes e apesar de aparentemente não influenciarem a na ação antimicrobiana, tem um grande potencial farmacológico.

Vários estudos demonstram as atividades farmacológicas já atribuídas aos flavonóides tais como: antitrombótica (MILLS & BONE 2000) anti-hipertensiva (BLUMENTHAL 2003) antiespasmódica (ROBBERS & TYLER, 2000) e antialérgica (MILLS & BONE 2000).

Esses efeitos estão ligados à sua capacidade de atuar como antioxidantes e sequestrantes de radicais livres, quelando metais, e interagindo com enzimas, receptores e membranas (BEHLING, et al. 2004)

Alguns flavonóides já identificados nas diferentes espécies do gênero *Hymenaea*. A astilbina foi identificada na resina do tronco de *Hymenaea parvifolia*, (ISHIBASHI et al., 1999). Pettit et al., (2003) isolaram os flavonóides luteolina, crisoeriol, palstatina, entre outros das folhas de *Hymenaea palustre*, Lovato e Nunes (2007) sugeriu que o extrato de acetato de etila da casca de *Hymenaea stigonocarpa* contém o flavonóide astilbina, Suzuki et al., (2008) isolaram dois flavonóides do alburno de *H. courbaril*, a taxifolina e o fisetinidol e foram isolados no alburno de *Hymenaea stigonocarpa* quatro flavonoides, identificados como hultenina, taxifolina, quercetina e 7-methoxcatequina (MARANHÃO et al., 2013)

A análise da impressão digital cromatográfica pode refletir o perfil químico e tem sido amplamente aceita para avaliação da qualidade e espécies diferenciação (ZHANG, 2012). Desta forma cromatogramas de extratos hidroalcoólicos da casca do caule de *Hymenaea stigonocarpa* obtidos através de CLAE-DAD por Dimech et al., (2013) sugerem a natureza polifenólica desta parte da planta, sugerindo a presença de catequinas poliméricas e relatando a partir da avaliação por CCD associada análise dos espectros de UV, a presença de substâncias sugestivas de flavonóides.

Com o desenvolvimento das técnicas de analíticas, as impressões digitais cromatográficas, que fornecem caracterização sistêmica de produtos à base de plantas têm sido aceitas por muitos países e organizações (LONG et al., 2012).

Vários métodos cromatográficos têm sido amplamente utilizados para a obtenção dessas impressões digitais, tais como cromatografia em camada delgada (CCD), cromatografia gasosa (CG), cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e eletroforese capilar (EC) (ZHONG et al., 2009; PENG et al., 2011).

No entanto, estes métodos geralmente demandam períodos de análises longos. Nos últimos anos, a cromatografia líquida de ultrarrápida (UFLC), que emprega partículas porosas submicrométricas como fase estacionária, tem sido aplicada com êxito na rápida obtenção de perfis de produtos à base de plantas (OZ, 2011). UFLC DAD demonstrou ser uma potente técnica de impressão digital

cromatográfica, com as vantagens de tempo curto de análise, de alta resolução e um bom desempenho de separação (LONG et al., 2012).

6.2 OBJETIVOS

O objetivo geral e os específicos deste estudo estão descritos a seguir

6.2.1 OBJETIVO GERAL

Identificar os flavonoides presentes na fração acetato de etila da casca do caule de *Hymenaea stigonocarpa* através de cromatografia líquida ultrarrápida associada a espectrômetria de massas.

6.2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar através de Análise por cromatografia líquida ultrarrápida acoplada a detector de arranjo de Diodos e espectrômetro de massas o perfil cromatográfico e espectros de Ultravioleta (UV) do extrato acetato de etila.
- Sugerir através das análises dos cromatogramas de UV, dos espectros de massas, dados da literatura e/ou comparação com o padrão astilbina os flavonoides presentes na fração acetato de etila.

6.3 MATERIAIS E MÉTODOS

A seguir estão descritos os materiais e métodos utilizados para a realização deste estudo.

6.3.1 AMOSTRAS

Fração acetato de etila da casca do caule de *Hymenaea stigonocarpa*, obtida através do resíduo seco do extrato hidroalcoólico (5g), particionada em água e acetato de etila (1:1) e padrão de astilbina (98% de pureza, Aktin Chemicals Inc. China).

6.3.2 SOLVENTES EMPREGADOS

Metanol (MeOH) grau HPLC (marca J.T. Baker), H₂O deionizada (18mΩ; Milli-Q, Millipore), foram utilizados como solventes. Esses foram filtrados e posteriormente desgaseificados em banho de ultrassom.

6.3.3. SISTEMA CROMATOGRAFIA LIQUIDA ULTRARRÁPIDA ACOPLADA A DETECTOR DE ARRANJO DE DIODOS E ESPECTRÔMETRO DE MASSAS (UFLC-DAD-EM).

A análise cromatográfica foi realizada em UFLC Shimadzu® Proeminence equipado com bombas LC-20AD, injetor automático modelo Sil-20A HT, detector de DAD SPD-M20A, controlador CBM-20A, forno para coluna CTO-20A.

Alíquotas de 20µL das amostras (1mg/ml) foram injetadas, via um auto injetor, com um fluxo de 1,0mL / min em coluna analítica CLC-ODS (C-18) Shimadzu® de 250 x 4,6 mm, 5µ. Os cromatogramas na região de UV gerados pelo DAD foram registrados em 200 a 700nm.

Para a análise de massas, o cromatógrafo foi acoplado espectrômetro de massas UltrOTOF (Bruker-daltonics, Billerica, USA) com ionização por IES, com monitoramento de íons negativos e positivos.

6.3.4 ANÁLISE POR UFLC-DAD-EM

As condições para UFLC-DAD foram obtidas usando um gradiente de eluição composto por água (bomba A) e MeOH (bomba B) (7:3), que variou de 0 min, 30% B; 15 min, 30% B; 30 min, 40% B; 40 min, 60% B; 45 min, 100% B; 50 min, 100% B; 51 min, 30% B; 65 min, 30% B.

Os cromatogramas gerados por espectro de massas foram registrados na região entre m/z 50 e m/z 1200 e os parâmetros do espectrômetro de massas listados a seguir foram mantidos os mesmos em todas as análises: 1000 scans por segundo; intervalo entre espectros: 2 segundos; fluxo do gás de secagem: 8,0L/min; temperatura do gás de secagem: 220°C; pressão do gás de nebulização: 4 bar.

6.3.4.1 Identificação dos flavonóides

Os picos cromatográficos foram identificados com base em seus espectros no UV, massa acurada obtida para os íons moleculares (molécula protonada $[M+H]^+$ e/ou molécula desprotonada $[M-H]^-$) em alta resolução e tempos de retenção no sistema utilizado.

A utilização de cada tipo de dados obtidos e o procedimento para a identificação dos picos ocorreu conforme a necessidade. As informações disponíveis na literatura e a obtenção de padrões no laboratório foram conduzidos principalmente com base nos resultados de estudos fitoquímicos anteriores de *Hymenaea stigonocarpa*.

Em estudo anterior, após avaliação através de CLAE-DAD, Dimech et al., (2013), sugeriu após a contaminação do extrato avaliado com o padrão de Astilbina, onde um dos picos apresentou mesmo tempo de retenção, além de aumento de sua área e semelhança quanto ao espectro de UV, que um dos flavonóides tratava-se da astilbina.

Deste modo, alguns picos foram identificados por comparação de tempos de retenção e espectros de UV com os de padrões, no caso a astilbina, além de posterior confirmação pelas massas moleculares acuradas obtidas.

Porém outros só puderam ter sua identidade definida após análise e comparação pelas massas moleculares acuradas obtidas e espectro de UV com aqueles já relatados na literatura.

No caso dos flavonóides, em que os espectros podem revelar o tipo de flavonóide (por exemplo: flavona, flavonol, flavanona, diidroflavonol, chalcona) e às vezes até dar indícios sobre o padrão de substituição, também foram utilizados os dados e discussões publicados por Gattuso et al. (2006), Markham (1982) e Mabry et al. (1970).

6.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados que estão apresentados na tabela 11 são baseados nos parâmetros: tempo de retenção, espectro de UV, espectro de massas dos íons moleculares desprotonados $[M-H]^-$, em dados da literatura e no tempo de retenção do padrão astilbina. Os picos A, B, C e D são sugestivos de serem taxifolina (285 nm), astilbina (290 nm), engeletina (289 nm) e um estereoisômero da astilbina (290nm) respectivamente.

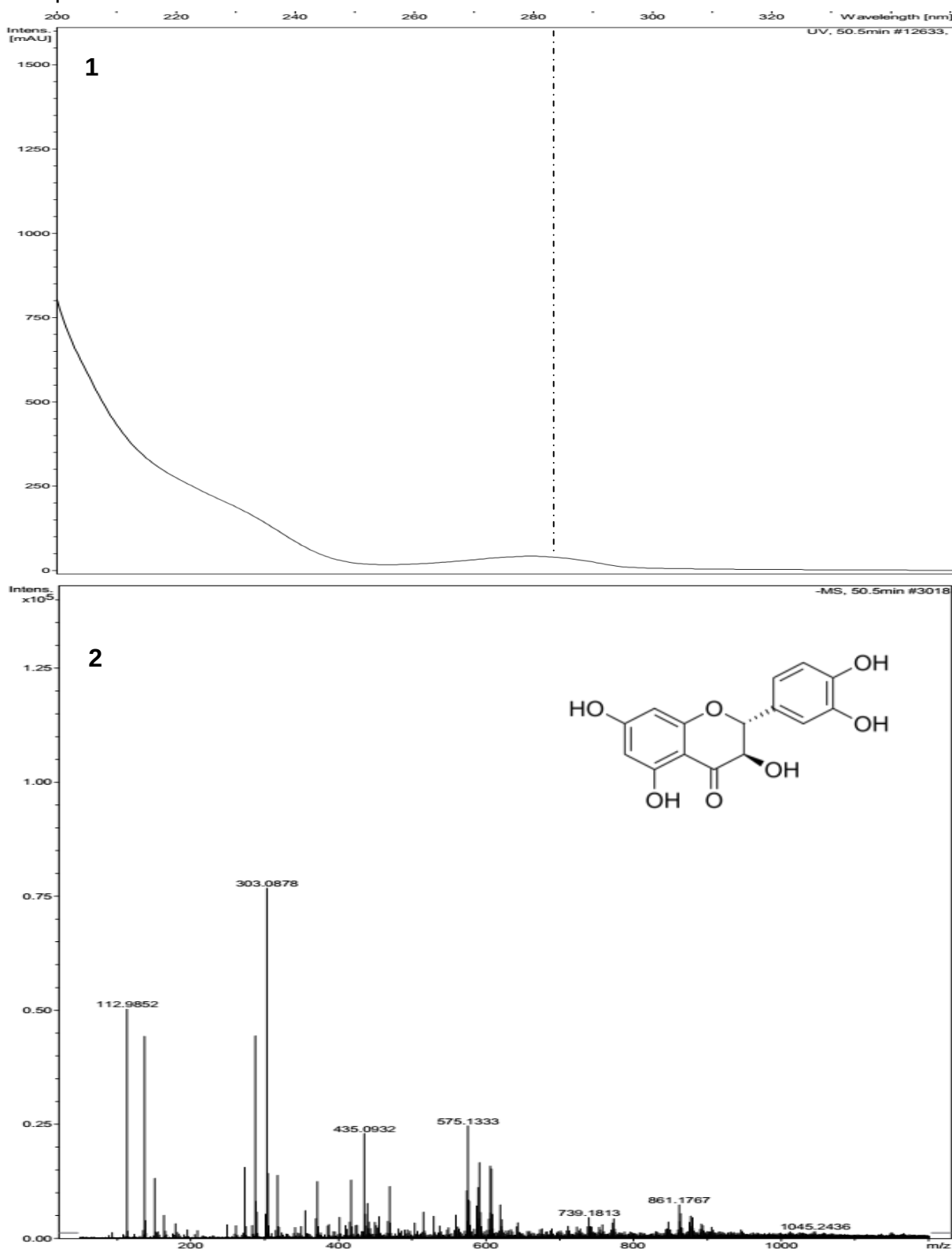
Tabela 11 - Dados cromatográficos e espectrofotométricos dos componentes identificados no cromatograma da fração acetato de etila de *Hymenaea stigonocarpa*.

Pico	Tempo de retenção	$\lambda_{\max}$ (nm)	$[M-H]^-$ (m/z)	Fórmula	Estrutura proposta
A	50,5 min	285 nm	303,0878	$C_{15}H_{12}O_7$	Taxifolina
B	50,7 min	290 nm	449,1106.	$C_{21}H_{22}O_{11}$	Astilbina
C	51,0 min	289 nm	433,1154,	$C_{21}H_{22}O_{10}$	Engeletina
D	51,6 min	290 nm	449,1132	$C_{21}H_{22}O_{11}$	Estereoisômero de astilbina

Todos os picos apresentaram nos espectros de UV uma banda com absorção máxima em torno de 198nm (capítulo II) e um ombro com máximo próximo a 290nm, sinais característicos de flavanonois (MARKHAM, 1982).

A massa molecular obtida para o composto representado pelo pico A de tempo de retenção 50,5 min é similar com a massa no modo de ionização negativa $[M-H]^-$ calculada para a taxifolina de formula molecular $C_{15}H_{12}O_7$ de 303,0878 m/z (figura 1) compatíveis com valores descritos na literatura para taxifolina (Zhang et al., 2013).

Figura 58 - Espectro de Ultravioleta e espectro de massa do pico A obtido compatível com taxifolina.



(1) Espectro de UV com um ombro com absorção máxima próxima a 280nm, espectro compatível com flavononóis (MARKHAM, 1982); (2) Massa do pico A no modo de ionização negativa, sugestivo de taxifolina $[M-H]^-$ 303,0878.

Dados obtidos anteriormente (capítulo II) sugerem ser astilbina um dos flavonóides presentes na casca do caule de *Hymenaea stigonocarpa*, após avaliação por CCD e HPLC-DAD, onde os tempos de retenção e o espectro de UV foram idênticos após contaminação da amostra com o padrão astilbina.

A comparação dos cromatogramas obtidos após análise com UFLC-DAD a partir da fração acetato de etila e do padrão astilbina confirmam esses resultados, sugerindo fortemente a presença de astilbina desta fração.

Para a atribuição da astilbina como sendo a substância representada pelo pico B (figura 3) foram comparados tempo de retenção (50,9 min), espectro de UV ($\lambda_{\max}$ 290 nm) e espectro de massas deste pico aos do padrão de astilbina ($C_{21}H_{22}O_{11}$), um flavanonol de massa molecular obtida no modo de ionização negativa $[M-H]^-$ de valor 449,1132 (figura 2).

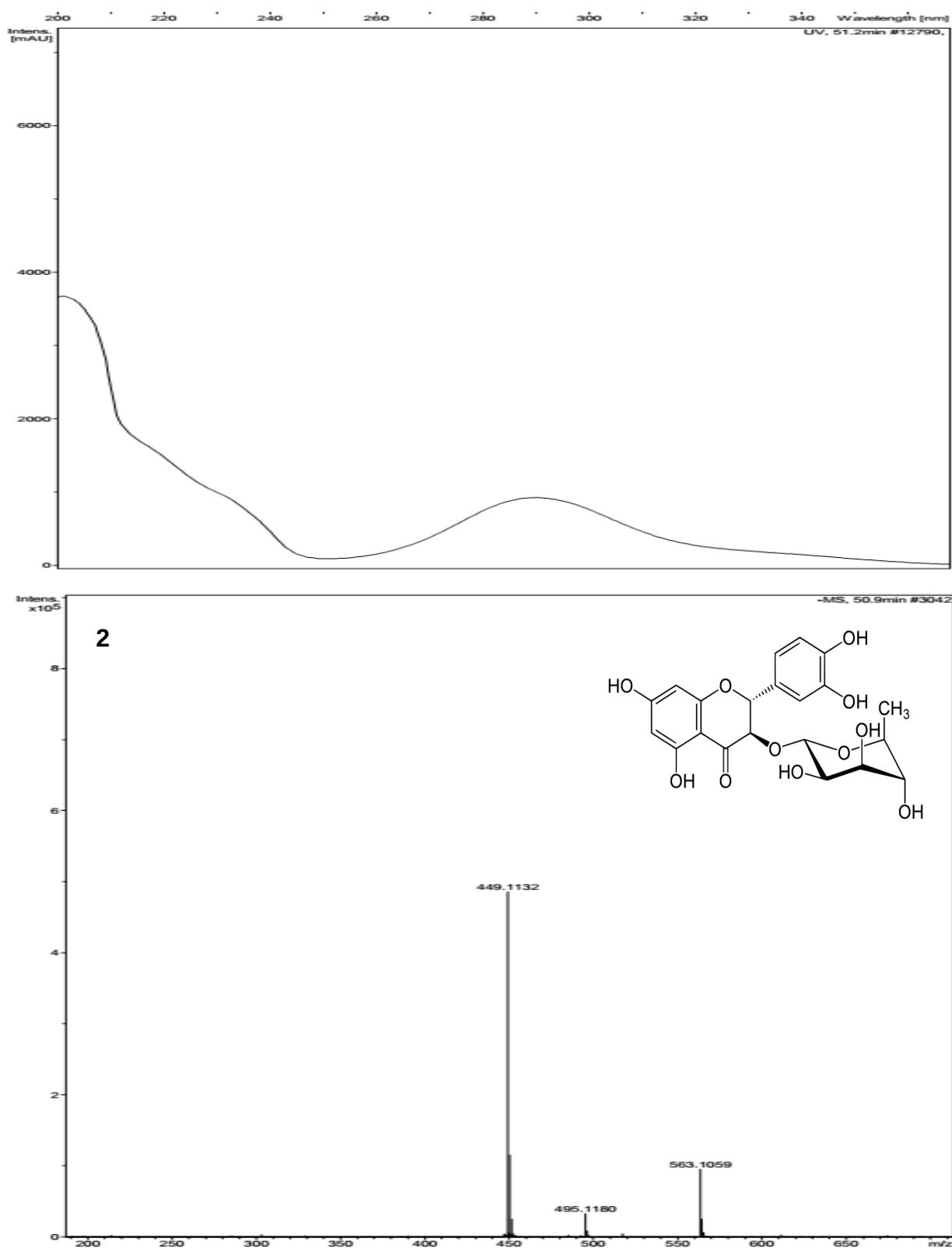
Além da semelhança entre as variáveis tempo de retenção (50,7 min) e espectro de UV ($\lambda_{\max}$ 290 nm), o valor da massa molecular obtida no modo de ionização negativa $[M-H]^-$ para o pico B da fração acetato de etila foi de valor 449,1106, valor compatível com a astilbina.

Os $\lambda_{\max}$ do espectro de UV e massa no modo de ionização negativa, para o pico D também são similares aos apresentados pelo padrão astilbina e pico B (figura 5), todos apresentam um ombro com $\lambda_{\max}$ próximo a 290nm e massa molecular compatível com o padrão astilbina $C_{21}H_{22}O_{11}$ $[M-H]^-$ 449,1125. Devido a diferenças no tempo de retenção deste pico D em relação ao pico B e ao padrão de astilbina utilizado sugerimos ser este um estereoisômero da astilbina.

Quanto ao pico C (figura 4), a massa molecular obtida está em conformidade com a massa exata calculada para engeletina ($C_{21}H_{22}O_{10}$) no modo de ionização negativa, $[M-H]^-$ 433,1154, sendo também o espectro de UV apresentando ombro com $\lambda_{\max}$ próximo a 290nm compatível com valores descritos na literatura para engeletina (ZHANG et al., 2013 ; MABRY et al., 1970)

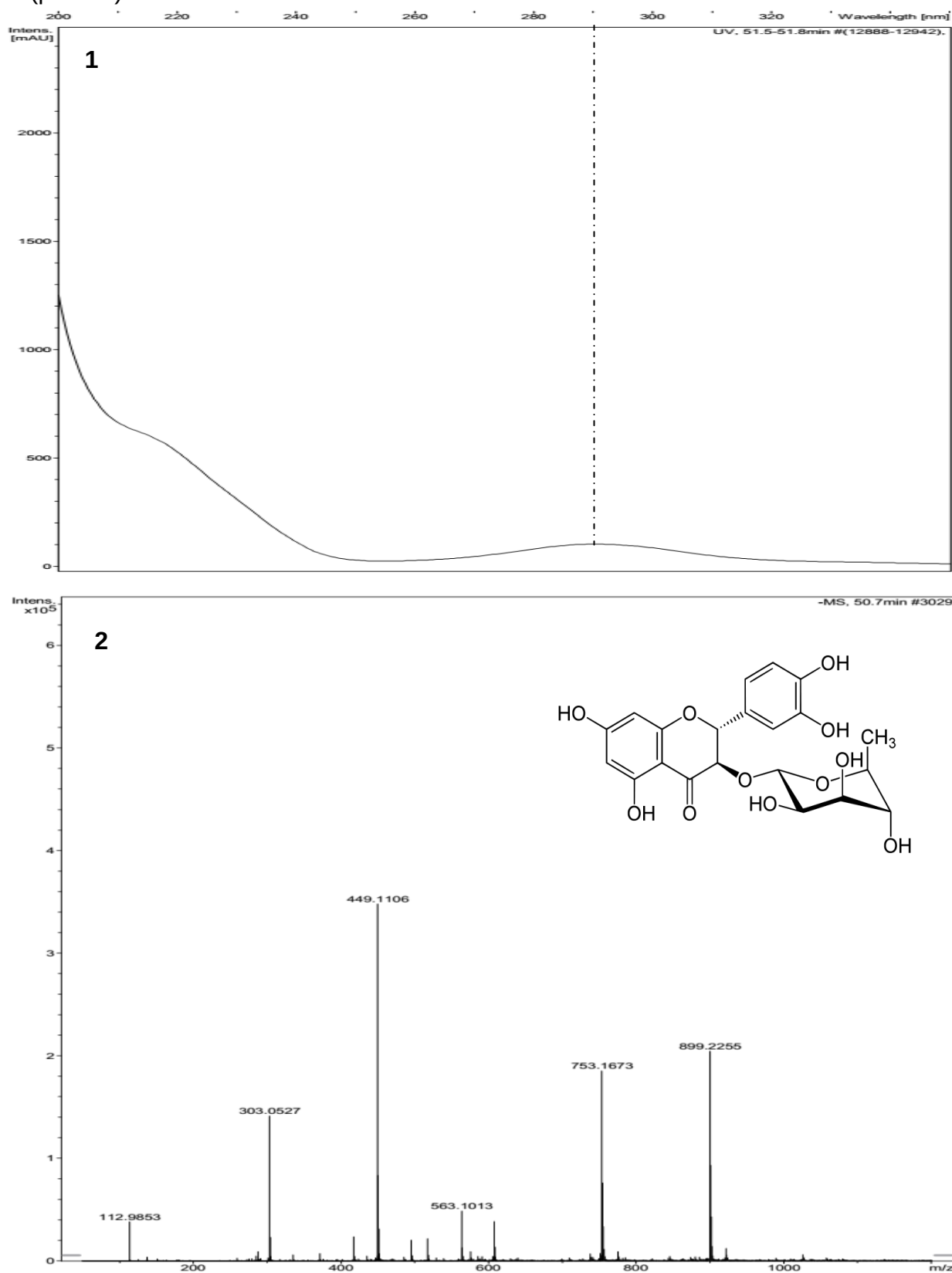
Os flavonóides relatados neste trabalho já foram descritos em espécies do gênero *Hymenaea*, e em todos os casos são atribuídas atividades biológicas a estas substâncias. A taxifolina foi identificada no alburno de *Hymenaea courbaril* (SUZUKI et al., 2008) sendo descrita por apresentar atividade antioxidante. Além disso, também foi identificada no alburno de *Hymenaea stigonocarpa* (MARANHÃO et al., 2013) apresentando atividade antitermitica frente à *Nasutitermes corniger*.

Figura 59 - Espectro de UV e de massas dos íons moleculares desprotonados do padrão astilbina.



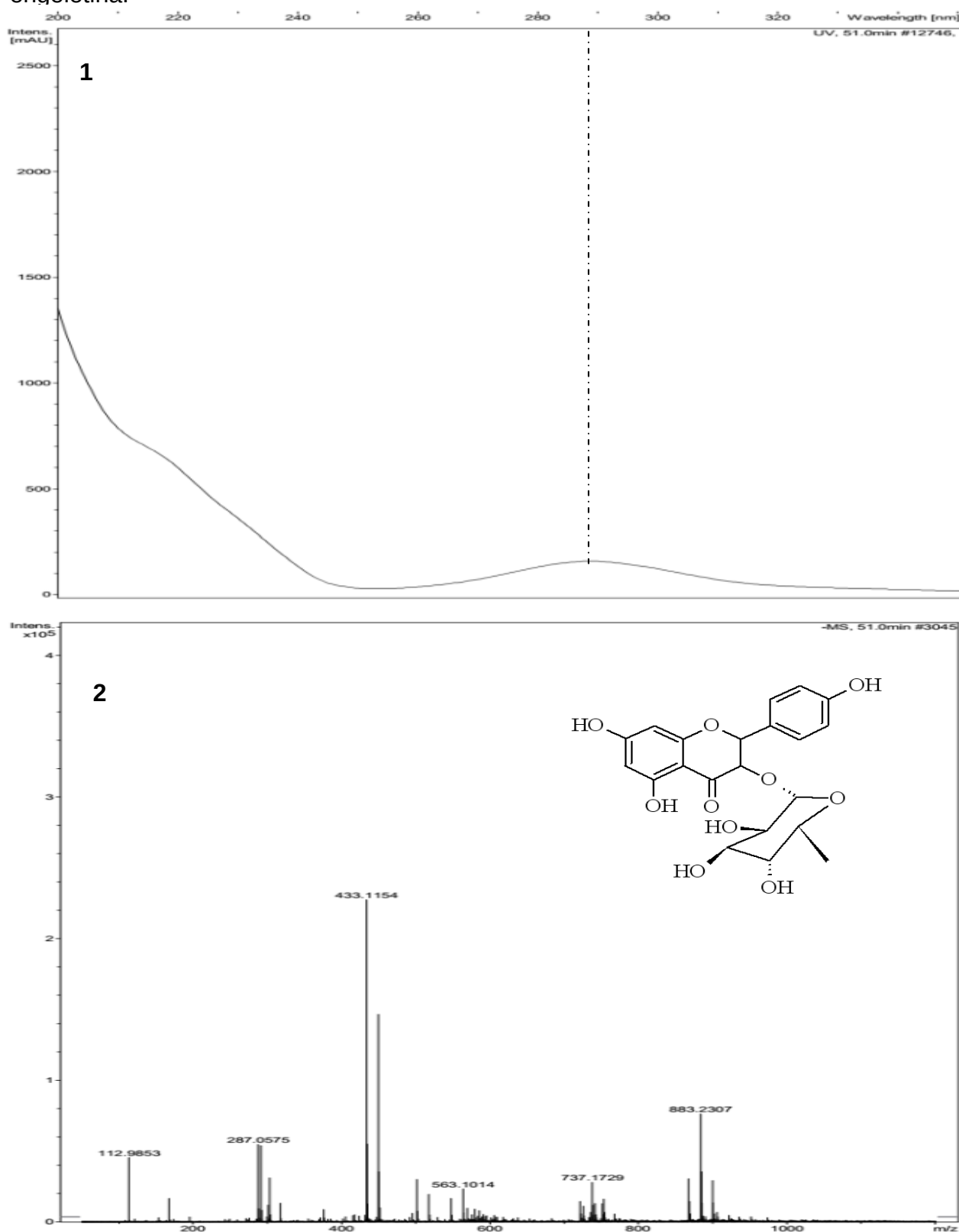
(1) Espectro de UV com ombro de absorção máxima próxima a 290nm e espectro de massas do no modo de ionização negativa $[M-H]^-$ m/z 449,1132.

Figura 60 - Espectro de UV e de massas do pico B compatível com a astilbina (padrão).



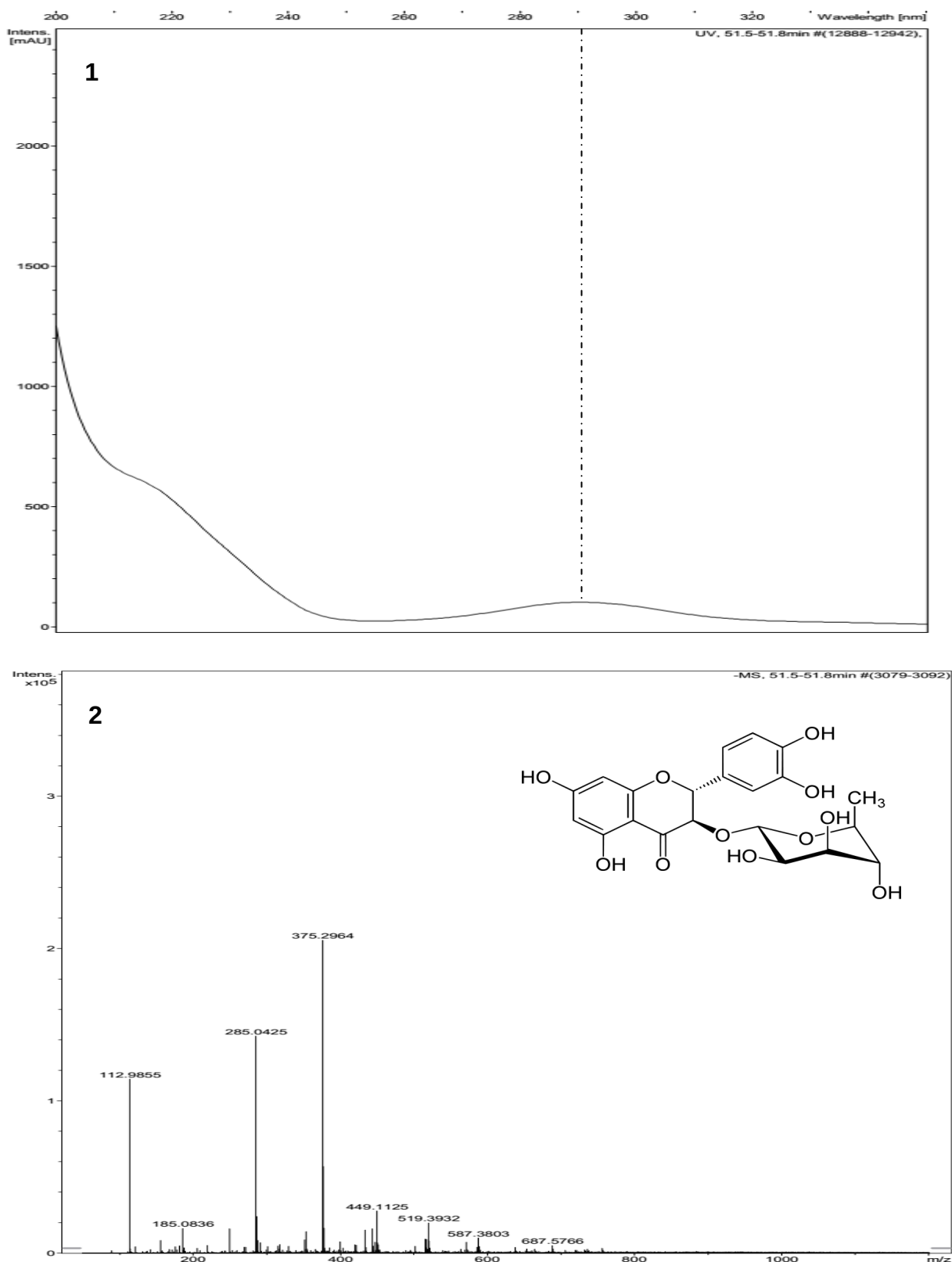
(1) Espectro de UV com um ombro com absorção máxima próxima a 290nm (2) Massa do pico B no modo de ionização negativa, com o padrão de astilbina, $[M-H]^-$ 449,1132.

Figura 61 - Espectro de UV e de massas do pico C compatível com o flavanonol engeletina.



(1) Espectro de UV com um ombro com absorção máxima próxima a 293 nm, compatível com flavononóis (MABRY et al., 1970); (2) Massa do pico C no modo de ionização negativa, sugestivo de engeletina $[M-H]^-$ 433,1154.

Figura 62 - Espectro de UV e de massas do pico D compatível com estereoisômero da astilbina.



(1) Espectro de UV com um ombro com absorção máxima próxima a 290nm (2) Massa do pico D no modo de ionização negativa, com o padrão de astilbina, $[M-H]^-$ 449,1132 e pico A $[M-H]^-$ 449,1106.

A engeletina assim como a astilbina, foram identificada no extrato etanólico da casca de *Hymenaea martiana* (CARNEIRO et al., 1993) apresentando resposta antagônica a ação de bradicinina (BK) no músculo liso uterino de ratas, inibindo assim as contrações.

A presença do flavononol astilbina, além de ser observada na casca de *H. martiana* (CARNEIRO et al., 1993), como descrito anteriormente, também foi relatada na resina do tronco da espécie *H. parvifolia* (ISHIBASHI et al., 1999) onde foi descrita a ocorrência de um estereoisômero da astilbina, a neoastilbina, que juntos apresentaram efeitos inibitórios sobre a caseína quinase II (CK-II) de forma dose-dependente.

A presença de astilbina foi também relatada em *Hymenaea stigonocarpa*, onde Lovato e Nunes (2007) isolaram este flavonóide e o sugeriram por comparação do espectro de infravermelho com amostra autêntica a sua presença.

Os dados obtidos por cromatografia líquida ultrarrápida, espectros de massas e a utilização do padrão astilbina associados aos relatos da ocorrência desses flavonóides em diversas espécies do gênero *Hymenaea* sugerem fortemente a presença de astilbina e um estereoisômero, taxifolina e engeletina na fração acetato de etila da casca do caule de *Hymenaea stigonocarpa*, sendo este o primeiro relato da ocorrência de taxifolina, engeletina e de um estereoisômero de astilbina.

6.5 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos permitem constatar que o cromatograma obtido por UFLC-DAD-EM no modo de ionização negativa apresenta valores de espectro de massas e UV característicos de quatro flavonóides com diferentes tempos de retenção (Picos A, B, C e D). Uma dessas substâncias (pico A) apresenta massa molecular obtida em conformidade com a massa no modo de ionização negativa calculada para a taxifolina e com dados da literatura.

Já o pico B apresenta tempo de retenção, dados de espectro de UV e de massas similares ao padrão astilbina utilizado, dados que sugerem fortemente ser este o flavonoide astilbina.

O pico C apresenta massa molecular obtida em conformidade com a massa no modo de ionização negativa calculada para a engeletina e com dados da literatura. Como também o pico D, apresenta as mesmas características do espectro de UV e de massas que o pico B e do padrão, apresentando, porém tempo de retenção diferente, dados que sugerem ser este um estereoisômero da astilbina.

REFERÊNCIAS

- BATISTA A. G., ESTEVES E. A., DESSIMONI-PINTO N. A. V., OLIVEIRA L. G., PIRES S. T., SANTANA R. C., "Chemical composition of jatobá-do-cerrado (*Hymenaea stigonocarpa* Mart.) flour and its effect on growth of rats," **Alimentos e Nutrição Araraquara**, n. 2, p.173-180, 2011.
- BEHLING, E. V., SENDÃO, M. C., FRANCESCATO, H. D. C., ANTUNES, L. M. G., BIANCHI, M. L. P. Flavonóide quercetina: aspectos gerais e ações biológicas **Alimentos e Nutrição Araraquara**, Vol. 15, No 3, 2004.
- BIESKI G. C., SANTOS F. R., OLIVEIRA R. M., ESPINOSA M. M., MACEDO M., ALBUQUERQUE U. P., MARTINS D. T. O., "Ethnopharmacology of Medicinal Plants of the Pantanal Region (Mato Grosso, Brazil)," **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, n. 2012, p.1-36, 2012.
- BLUMENTHAL M. **The ABC Clinical Guide to Herbs**. Austin: American Botanical Council. p.239, 2003.
- BRASIL, T. R., ANDREÃO, P. S. S., MIRANDA, P. C. M. L, GIACOMINI R. A, BORGES, F. V, KANASHIRO, M. M. avaliação in vitro da atividade citotóxica frente a células tumorais humanas decompostos isolados do epicarpo de *Hymenaea stigonocarpa*. In: CONFICT - **Congresso Fluminense de Iniciação Científica e Tecnológica**, UENF, Rio de Janeiro, 2009.
- CARNEIRO E, CALIXTO J B., MONACHE F D, YUNES R A 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
- DIMECH, G. S., SOARES, L. A. L., FERREIRA, M. A., DE OLIVEIRA, A. G. V., CARVALHO, M. D. C., & XIMENES, E. A. 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**, p.1–8, 2013.
- FERREIRA, T. L., 2011 Prospecção de inibidores da secreção de histamina a partir de espécies vegetais do Cerrado e da Mata Atlântica.81p. (**Dissertação de Mestrado**) - Curso de Pós-Graduação Ciências Biológicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.
- GRANDI T. S. M., TRINDADE J. A, PINTO M. J. F., FERREIRA L. L., CATELLA A. C., "Plantas medicinais de Minas Gerais, Brasil," **Acta Botanica Brasilica**. n.3, p.185-224,1989.
- GUIMARÃES M. A. F., PIRES R. A., LIMA J. C. S., MARTINS D. T. O., Avaliação da atividade antiulcerogênica de *Hymenaea stigonocarpa* (Mart.) Hayne (Caesalpinaceae), In: **IV simpósio ibero-americano de plantas medicinais**, Cuiabá, 2009.

ISHIBASHI, M., ODA, H., MITAMURA, M. OKUYAMA, E., KOMIYAMA, K., KAWAGUCHI, H., WATANABE, T., ALVES, S.M., MAEKAWA, T., OHTSUK, K. Casein Kinase II Inhibitors isolated from two Brazilian plants *Hymenaea parvifolia* and *Wulffia baccata*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.9, p. 2157-2160, 1999.

LANGENHEIM J. H., HALL G. D., "Sesquiterpene deterrence of a leaf-tying lepidopteran, *Stenoma ferrocaneella*, on *Hymenaea stigonocarpa* in Central Brazil," **Biochemical Systematics and Ecology**, n.11, p. 29–36, 1983.

LONG T., YU J., HUANG Y., SHI Z., XU L. Rapid fingerprint analysis of Radix Scutellariae by UFLC-DAD. **Journal of Chromatographic Science**. v.51, n.10, p. 939-42, 2013.

LOVATO, G. A. & NUNES, D. S.. Obtenção de astilbina de *Hymenaea stigonocarpa* martius. In: **VII Encontro de Pesquisa da UEPG**, Ponta Grossa, 2007.

MABRY, T. J., MARKHAM, K. R., THOMAS, M. B., **The systematic identification of flavonoids**. Berlin: Springer-Verlag, p.151-154, 1970.

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

MATUDA T. G., NETTO, F. M., Semente de jatobá-do-cerrado: caracterização química, **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v.25, n.2, p.353-357, 2005.

MILLS S, BONE K. **Principles and Practice of Phytotherapy Modern Herbal Medicine**. New York: Churchill Livingstone, 2000:31-34

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

OZ, F. Quantitation of heterocyclic aromatic amines in ready to eat meatballs by ultra fast liquid chromatography, **Food Chemistry**, v.126, p. 2010–2016, 2011.

PAIVA, E. A. S. & MACHADO, S. R. Ontogênese, anatomia e ultraestrutura dos nectários extraflorais de *Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne (Fabaceae - Caesalpinioideae). **Acta Botânica Brasilica**, vol.20, n.2, pp. 471-482, 2006.

PENG, L., WANG, Y. Z., ZHU, H. B., CHEN, Q. M., Fingerprint profile of active components for *Artemisia selengensis* Turcz by HPLC–PAD combined with chemometrics, **Food Chemistry**, v. 125, p.1064–1071, 2011.

ROBBERS J. E., TYLER V. E. Tyler's Herbs of Choice – **The Therapeutic Use of Phytomedicinals**. Binghamton, New York: Haworth Herbal Press, v.69, n.89. 2000.

SUZUKI, R., MATSUSHITA, Y., IMAI, T., SAKURAI, M., DE JESUS, SALETE J. M. H., OZAKI, K., FUKUSHIMA, Z. F. K., Characterization and antioxidant activity of Amazonian Woods, **Journal of Wood Science** v.54 p.174–178, 2008.

VILA VERDE G. M., PAULA J. R., CARNEIRO D. M., “Levantamento etnobotânico das plantas medicinais do cerrado utilizadas pela população de Mossâmedes (GO),” **Revista Brasileira de Farmacognosia**, n.13, p. 64-66, 2003.

ZHANG, Q. F., CHEUNG, H. Y., & ZENG, L. B. Development of HPLC fingerprint for species differentiation and quality assessment of Rhizoma Smilacis Glabrae. **Journal of natural medicines**, v.67, n.1, p.207–11, 2013.

ZHONG, X. K., LI, D. C., JIANG, J. G., Identification and quality control of Chinese medicine based on the fingerprint techniques, **Current Medicinal Chemistry**, v.16, p. 3064–307, 2009.