

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
INSTITUTO DE QUÍMICA – ENGENHARIA QUÍMICA

GABRIEL DA SILVA DARCOLETO

**COMPARAÇÃO DA PERFORMANCE DE DIVERSOS ADSORVENTES NO
FRACIONAMENTO DE EXTRATO DE JATOBÁ (HYMENAEA COURBARIL),
POR EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA**

Araraquara, SP

2021

GABRIEL DA SILVA DARCOLETO

**COMPARAÇÃO DA PERFORMANCE DE DIVERSOS ADSORVENTES NO
FRACIONAMENTO DE EXTRATO DE JATOBÁ (*HYMENAEA COURBARIL*),
POR EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” como requisito parcial para obtenção do título de bacharel em Engenharia Química.

Orientador: Prof. Dr. Alberto José Cavalheiro

Araraquara, SP

2021


GABRIEL DA SILVA DARCOLETO

**COMPARAÇÃO DA PERFORMANCE DE DIVERSOS ADSORVENTES NO
FRACIONAMENTO DE EXTRATO DE JATOBÁ (*HYMENAEA COURBARIL*),
POR EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” como requisito parcial para obtenção do título de bacharel em Engenharia Química.

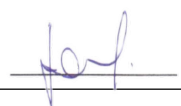
Aprovado em: 02/03/2021

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Alberto José Cavalheiro

Instituto de Química – UNESP, Araraquara



Profa. Dra. Lourdes Campaner dos Santos

Instituto de Química – UNESP, Araraquara



Prof. Dr. Nailton Monteiro do Nascimento Júnior

Instituto de Química – UNESP, Araraquara

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Marcos e Claudia (*in memoriam*), por todo o amor, respeito, alicerce e apoio dado ao longo de todas as etapas da minha vida.

Aos familiares, pelo apoio de sempre.

Aos meus amigos e amigas de faculdade, de escola e da vida, por todo o companheirismo e amizade, que me fortalecem.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Alberto José Cavalheiro, pela amizade e orientação, desde os tempos da minha Iniciação Científica.

Aos docentes do curso de Engenharia Química da Universidade Estadual Paulista, pelo ensino público, gratuito e de qualidade.

“... it ain’t about how hard you hit. It’s about how hard you can get hit and keep moving forward; how much you can take and keep moving forward”

(Rocky Balboa)

RESUMO

A preservação de áreas naturais carece de valoração. Quando espécies vegetais presentes nessas áreas são utilizadas, o são na forma de madeira ou extrativismo de frutos, dando-se pouco atenção aos fitoquímicos produzidos por essas plantas. Uma árvore de ocorrência frequente é o jabotá (*Hymenaea courbaril*), escolhido como exemplo dessa abordagem. Com distribuição geográfica do sul do México até grande parte da América do Sul, incluindo o Brasil, as plantas do gênero *Hymenaea* têm sido utilizadas na fitoterapia popular, auxiliando no tratamento de uma série de doenças, como diarreia, fraqueza pulmonar, cólica intestinal, dentre outras. Para diferentes espécies do gênero, foram reportados na literatura diversos metabólitos secundários biologicamente ativos, muitos dos quais correlacionados com os tratamentos utilizados na fitoterapia popular. Dessa forma, buscou-se encontrar uma maneira simples de fracionar, empregando-se adsorventes baratos e fases móveis o mais ambientalmente amigáveis possíveis, os extratos obtidos das folhas da espécie *H. courbaril*, a fim de se obter frações enriquecidas nas classes de metabólitos secundários. Para o fracionamento do extrato bruto de folhas por extração em fase sólida (EFS), foram testados 10 diferentes adsorventes e 6 eluentes. Subsequente à EFS, seguiu-se análise cromatográfica das frações, via HPLC. De posse dos dados referentes ao rendimento das frações, observou-se que o adsorvente C18 foi o de melhor resultado, seguido pelo celite, sílica, sílica + carvão 1:1 e carvão. Com base nos cromatogramas obtidos, observou-se, quanto à variedade química, que a fração de acetato de etila para os adsorventes carvão e sílica + carvão [1:1] é constituída principalmente por esteroides e terpenoides. Além disso, a fração de acetato de etila para a mistura sílica + carvão [1:1], a fração de hexano + acetato de etila [6:4] para os adsorventes celite e a fração de etanol para a sílica forneceram indícios sobre uma possível presença de flavonoides. Portanto, empregando-se adsorventes baratos e fases móveis o mais ambientalmente amigáveis, foi possível obter frações de metabólitos secundários que podem ser usados como insumos para diversas finalidades.

Palavras-chave: *Hymenaea courbaril*. Cromatografia líquida. Flavonoides.

Ambientalmente amigável.

ABSTRACT

The preservation of natural areas needs to be valued. When the plant species present in these areas are used, they are used in the form of wood or fruit extraction, with little attention paid to the phytochemicals needed by these plants. A tree of frequent occurrence is the jabotá (*Hymenaea courbaril*), chosen as an example of this approach. With geographical distribution from southern Mexico to much of South America, including Brazil, as plants of the genus *Hymenaea* have been used in popular herbal medicine, helping to treat a range of diseases, such as diarrhea, pulmonary weakness, colic intestinal, among others. For different species of the genus, several biologically active secondary metabolites have been reported in the literature, many of which are correlated with those used in popular herbal medicine. In this way, we sought to find a simple way to fractionate, using cheap adsorbents and mobile phases as environmentally friendly as possible, the extracts obtained from the leaves of the species *H. courbaril*, in order to obtain enriched fractions in the classes of secondary metabolites. For the fractionation of crude leaf extract by solid phase extraction (SPE), 10 different adsorbents and 6 eluents were tested. After the SPE, the chromatographic analysis of the fractions was followed by HPLC. With data on the yield of fractions, it was observed that the adsorbent C18 was the best, followed by celite, silica, silica + coal, result 1: 1 and coal. Based on the chromatograms observed, it was observed, regarding the chemical variety, that the fraction of ethyl acetate for the adsorbents coal and silica + coal [1: 1] is found mainly by steroids and terpenoids. In addition, the fraction of ethyl acetate for the mixture silica + coal [1: 1], the fraction of hexane + ethyl acetate [6: 4] for the adsorbents celite and the fraction of ethanol for a silica provided evidence of a possible presence of flavonoids. Therefore, using original adsorbents and mobile phases that are the most environmentally friendly, it was possible to obtain fractions of secondary metabolites that can be used as inputs for various purposes.

Keywords: *Hymenaea courbaril*. Liquid chromatography. Flavonoids. Environmentally friendly.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Visão da <i>Hymenaea courbaril</i> e das folhas e flores da espécie vegetal.....	11
Figura 2. Frutos e sementes da espécie vegetal <i>Hymenaea courbaril</i>	11
Figura 3. Distribuição geográfica do jatobá (<i>Hymenaea courbaril</i>)	12
Figura 4. Terpenoides e esteroides relatados para o gênero <i>Hymenaea</i>	17
Figura 5. Flavonoides relatados para o gênero <i>Hymenaea</i>	22
Figura 6. Flavonas relatadas para o gênero <i>Hymenaea</i>	24
Figura 7. Carotenoides relatados para o gênero <i>Hymenaea</i>	25
Figura 8. Ácido Orgânico relatado para o gênero <i>Hymenaea</i>	25
Figura 9. Coumarinas relatadas para o gênero <i>Hymenaea</i>	26
Figura 10. Procianidina relatada para o gênero <i>Hymenaea</i>	27
Figura 11. Ácido fenólico relatado para o gênero <i>Hymenaea</i>	27
Figura 12. Ftalida relatada para o gênero <i>Hymenaea</i>	28
Figura 13. Localização do Sítio Experimental da UNICEP.....	30
Figura 14. Principais características espectrais no UV dos compostos fenólicos e coumarinas já relatados em <i>H. courbaril</i>	35
Figura 15. Cromatograma em HPLC-C18 das frações obtidas por EFS-Carvão. Espectro UV. 254 nm. Fração AcOET – possível correspondência com a mustakona.	36
Figura 16. Cromatograma em HPLC-C18 das frações obtidas por EFS-Carvão. Espectro UV. 254 nm. Fração AcOET – possível correspondência com a mustakona.	37
Figura 17. Cromatograma em HPLC-C18 das frações obtidas por EFS-Carvão. Espectro UV. 254 nm. Fração AcOET – possível correspondência com o Ácido Zanzibárico, Germacreno D, Zanzibarato de metila, Ozato de metila e Crotomaclina	38
Figura 18. Cromatograma em HPLC-C18 das frações obtidas por EFS-Carvão Espectro UV. 254 nm. Fração AcOET- possível correspondência com a Ácido (13R)-2-Oxo-13-hidróxi-1(10), 14-ent-halimadien-18-oico:.....	38
Figura 19. Cromatograma em HPLC-C18 da fração AcOET obtida por EFS-Si+Carvão. Detecção no UV. 254 nm. Espectro UV 254 nm – possível correspondência com Trans-Muurola-4(14),5-dieno.	39
Figura 20. Cromatograma em HPLC-C18 da fração EtOH obtida por EFS-Si. Detecção no UV. 254 nm. Espectro UV 254 nm - possível correspondência com Trans-Muurola-4(14),5-dieno.	39
Figura 21. Espectro UV para a Astilbina	40
Figura 22. Espectro UV para a (-)-epicatequina e outros compostos químicos.....	40
Figura 23. Espectro UV para a Fisetina	41
Figura 24. Espectro UV para a Taxifolina, Quercetina e (+)-Catequina	41
Figura 25. Figura 28. Espectro UV para a Engelitina	42
Figura 26. Cromatograma em HPLC-C18 da fração AcOET obtida por EFS-Si+Carvão. Detecção no UV. 254 nm. Espectro UV 254 nm – possível correspondência com Engelitina	42
Figura 27. Espectro UV para a Eucrifina.....	43
Figura 28. Espectro UV para a Rutina	43

Figura 29. Cromatograma em HPLC-C18 da fração Hexano/AcOEt [6:4] obtida por EFS-Celite. Detecção no UV. 254 nm. Espectro UV 254 nm – possível correspondência com Rutina.....	44
Figura 30. Cromatograma em HPLC-C18 da fração EtOH obtida por EFS-Si. Detecção no UV. 254 nm. Espectro UV 254 nm - possível correspondência com Rutina	45
Figura 31. Espectro UV para a 4',5,7-triidróxi-3',5'-dimetoxflavona.....	45
Figura 32. Cromatograma em HPLC-C18 das frações obtidas por EFS-C18. Preto: Água – Azul escuro:Água/EtOH [8:2] –Rosa: [6:4] – Vinho: [4:6] – Verde: [2:8] – Azul claro: EtOH . Demais frações não apresentaram massa suficiente para análise. Detecção no UV a 254 nm.	46
Figura 33. Comparação do perfil cromatográfico (254 nm) das frações obtidas por EFS usando adsorvente apolares.....	55
Figura 34. Comparação do perfil cromatográfico (254 nm) das frações obtidas por EFS usando adsorvente polares, adsorvente misto e intermediário.	58
Figura 35. Rendimento em massa para cada adsorvente.....	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Terpenoides e esteroides relatados para o gênero <i>Hymenaea</i>	13
Tabela 2. Flavonoides relatados para o gênero <i>Hymenaea</i>	21
Tabela 3. Flavonas relatadas para o gênero <i>Hymenaea</i>	24
Tabela 4. Carotenoides relatados para o gênero <i>Hymenaea</i>	24
Tabela 5. Ácido Orgânico relatado para o gênero <i>Hymenaea</i>	25
Tabela 6. Coumarinas relatadas para o gênero <i>Hymenaea</i>	25
Tabela 7. Procianidina relatada para o gênero <i>Hymenaea</i>	27
Tabela 8. Ácido fenólico relatado para o gênero <i>Hymenaea</i>	27
Tabela 9. Ftalida relatada para o gênero <i>Hymenaea</i>	28
Tabela 10. Características dos adsorventes utilizados	31
Tabela 11. Protocolo para fracionamento do extrato vegetal.....	32
Tabela 12. Comparação de espectros no UV/Vis obtidos nas análises das frações de extratos de <i>H. courbaril</i> por HPLC-DAD	47

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
1.1. Motivação.	10
1.2. Morfologia, informações ecológicas e distribuição geográfica da <i>Hymenaea courbaril</i>	10
1.3. Usos e fitoterapia popular do gênero <i>Hymenaea</i>.....	12
1.4. Constituintes químicos das espécies do gênero <i>Hymenaea</i>.....	13
1.5. Farmacologia de constituintes químicos das espécies do gênero <i>Hymenaea</i>	28
2. OBJETIVOS	29
3. MATERIAIS E MÉTODOS	29
3.1. Equipamentos.....	29
3.2 Material vegetal.....	30
3.3. Solventes e adsorventes	30
3.4 Métodos.....	32
3.4.1. Preparo dos extratos brutos	32
3.4.2. Processo de extração em fase sólida.....	33
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
5. CONCLUSÃO.....	62
6. REFERÊNCIAS	63

1. INTRODUÇÃO

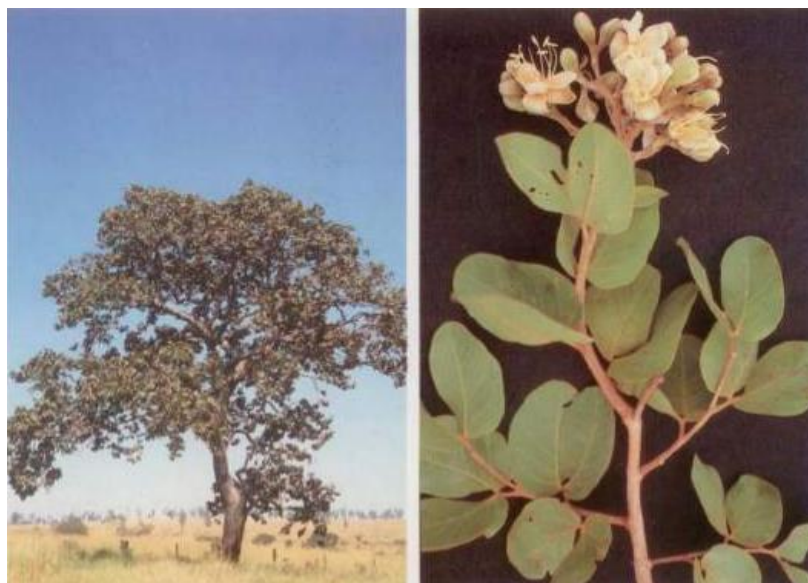
1.1. Motivação.

A preservação de áreas naturais, principalmente em áreas de reserva legal, carece de valorização, o que torna a manutenção e recuperação dessas áreas pouco atrativas nas propriedades rurais particulares. Quando espécies vegetais presentes nessas áreas são utilizadas, o são na forma de madeira ou extrativismo de frutos. Pouca atenção foi despertada até o momento para os fitoquímicos produzidos por essas plantas, seja para o uso como insumos ou princípios ativos em medicamentos, cosméticos, agroquímicos ou mesmo como aditivos alimentares. Por isso, consideramos que o desenvolvimento de um processo rápido e de baixo custo para produção de extratos e, principalmente, de suas frações enriquecidas em classes específicas de metabólitos poderia atrair maior interesse para espécies vegetais nativas comumente presentes nessas áreas de proteção. Entre essas espécies, uma árvore de ocorrência frequente é o jatobá, escolhido como exemplo dessa abordagem que aqui propomos. Nesse estudo avaliaremos a preparação de extratos de folhas de jatobá e seu fracionamento rápido por extração em fase sólida (EFS), testando vários adsorventes.

1.2. Morfologia, informações ecológicas e distribuição geográfica da *Hymenaea courbaril*

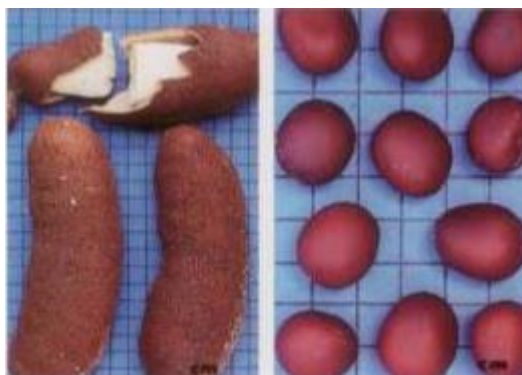
A espécie vegetal *Hymenaea courbaril* L., pertencente à família Leguminosae-Caesalpinoideae, é popularmente conhecida por diversos nomes, tais como jatobá, jataí e imbiúva. Morfologicamente, apresenta alturas de 15 a 20 metros, com tronco de até 1 m de diâmetro, folhas compostas de dois folíolos brilhantes, de 6 a 14 centímetros de comprimento. Em relação às informações ecológicas, consiste em uma planta semidecídua, heliófita ou esciófita, seletiva xerófita, característica de floresta latifoliada semidecídua, produzindo anualmente grande quantidade de sementes viáveis (LORENZI, 1992).

Figura 1. Visão da *Hymenaea courbaril* e das folhas e flores da espécie vegetal



Fonte: LORENZI, 1992.

Figura 2. Frutos e sementes da espécie vegetal *Hymenaea courbaril*



Fonte: LORENZI, 1992.

Quanto à distribuição geográfica, a *Hymenaea courbaril* ocorre desde o sul do México até grande parte da América do Sul, incluindo o Brasil, Guiana Francesa, Suriname, Guiana, Venezuela, Colômbia, Peru e Bolívia. Especificamente no Brasil, pode ser encontrada desde a floresta amazônica até as florestas sazonais do Sudeste, principalmente no cerrado e na caatinga, especialmente nos estados da Bahia, Minas Gerais, Piauí, Goiás, Mato Grosso do Sul e São Paulo. É encontrada em altitudes de até 900 metros acima do nível do mar, em solos arenosos e argilosos bem drenados de terra firme e em várzeas altas, mas raramente em campos abertos. Além disso, a espécie cresce bem em zonas úmidas com precipitação anual entre 1500 e 3000 milímetros (BANDEIRA et al., 2015) (BONIFACE; FERREIRA; KAISER; 2017) (MELO; MENDES; 2011).

estômago. A infusão das folhas é usada para o tratamento de bronquite, especialmente em crianças, enquanto na Venezuela e Suriname, as folhas são usadas para tratar fraturas, feridas e problemas pulmonares e, no Panamá, no tratamento de diabetes. A seiva é utilizada para tratar tosse e feridas crônicas, sendo que, quando misturada com mel de abelha, é utilizada no tratamento de doenças cardíacas (BONIFACE; FERREIRA; KAISER; 2017).

Outras espécies do gênero *Hymenaea* além da *H. courbaril* também apresentam aplicações na fitoterapia popular. O chá das cascas da *H. stignocarpa* é utilizado para aliviar cólicas, diarreia e no tratamento de fraqueza pulmonar. A *H. martiana* é utilizada na medicina popular para terapias gastrointestinais, urinárias e respiratórias. A casca do caule da *H. parvifolia* é administrada por via oral para o tratamento de anemia e tosse, enquanto a resina é usada para tratar sinusite e espasmos abdominais. A casca do caule, epicarpo e resina da *H. intermedia* são utilizados para tratamento de tosse, anemia e sinusite. O óleo da semente da *H. oblongifolia* é utilizado como laxante, enquanto a casca do caule é utilizada para tratar o reumatismo e a resina do tronco como fungicida (BONIFACE; FERREIRA; KAISER; 2017).

1.4. Constituintes químicos das espécies do gênero *Hymenaea*

Quando tratamos das espécies do gênero *Hymenaea*, diversos são os constituintes químicos presentes e relatados na literatura. A seguir, expressam-se nas tabelas de Tabela 1 a Tabela 9 e nas Figura 4 a Figura 12 os constituintes químicos reportados.

Tabela 1. Terpenoides e esteroides relatados para o gênero *Hymenaea*

CONSTITUINTE	PARTE DA PLANTA	ESPÉCIE
(Z)-Cariofileno	Resina de bolso de folha	<i>H. courbaril</i>
(-)- α -Selineno	Resina de bolso de folha	<i>H. courbaril</i>
(\pm)- α -Humuleno	Resina de bolso de folha e resina de casca	<i>H. courbaril</i>
(\pm)- β -Humuleno	Resina de bolso de folha	<i>H. courbaril</i>
α -Copaeno	Resina de bolso de folha e frutos	<i>H. courbaril</i>
(+)- β -Selineno	Resina de bolso de folha	<i>H. courbaril</i>
(-)- α -Cubebeno	Resina de bolso de folha e frutos	<i>H. courbaril</i>
(+)- δ -Cadineno	Resina de bolso de folha	<i>H. courbaril</i>
β -Copaeno	Resina de bolso de folha	<i>H. courbaril</i>
γ -Muuroleno	Resina de bolso de folha	<i>H. courbaril</i>

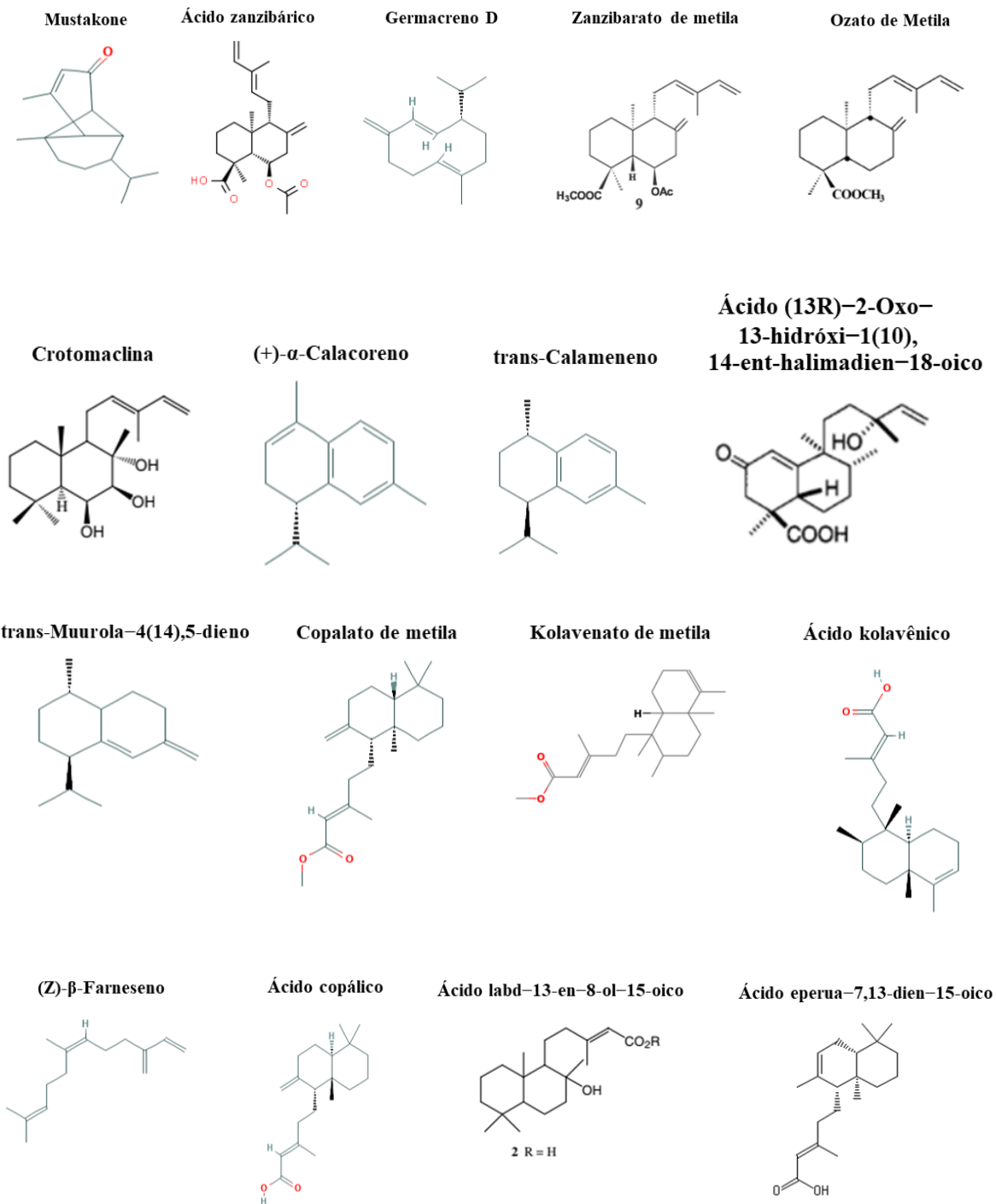
(-)- α -Himacaleno	Resina de vagem de sementes	<i>H. courbaril</i>
(-)- α -Muuroleno	Resina de vagem de sementes	<i>H. courbaril</i>
(-)- β -Bourboneno	Resina de vagem de sementes	<i>H. courbaril</i>
Selina-4(14),7-dieno	Resina de vagem de sementes	<i>H. courbaril</i>
(+)-Calareno	Resina de vagem de sementes	<i>H. courbaril</i>
Ciclosativeno	Resina de vagem de sementes	<i>H. courbaril</i>
(+)- α -Calacoreno	Resina de vagem de sementes e frutos	<i>H. courbaril</i>
Ácido labd-13-en-8-ol-15-oico	Resina de tronco, casca, frutas	<i>H. courbaril</i>
Ácido eperua-7,13-dien-15-oico	Casca	<i>H. courbaril</i>
Ácido labdan-8- β -ol-15-oico	Casca e frutos	<i>H. courbaril</i>
Ácido lab-13-en-8-beta-ol-15-oico	Casca e folhas	<i>H. courbaril</i>
Ácido ozico	Vagens de sementes	<i>H. courbaril</i>
Ácido isozoico	Vagens de sementes e frutos	<i>H. courbaril</i>
Ácido (-)-koyalênico	Vagens de sementes	<i>H. courbaril</i>
(-)-(5 <i>R</i> ,8 <i>S</i> ,9 <i>S</i> ,10 <i>R</i>)-clerod-3-en-15-oato de metila	Casca	<i>H. courbaril</i>
Copalato de metila	Casca, resina de tronco	<i>H. stigonocarpa</i> , <i>H. courbaril</i>
Ácido (5 <i>R</i> *,8 <i>S</i> *,9 <i>S</i> *,10 <i>R</i> *)-cleroda-3,13 <i>E</i> -dien-15-oico	Vagens de sementes	<i>H. courbaril</i>
Eperuato de metila	Casca, resina de tronco	<i>H. stigonocarpa</i> , <i>H. courbaril</i>
Isoozato de metila	Casca, resina de tronco	<i>H. stigonocarpa</i> , <i>H. courbaril</i>
Ozato de metila	Casca	<i>H. courbaril</i>
Kolavenato de metila	Casca, resina de tronco	<i>H. stigonocarpa</i> , <i>H. courbaril</i>
(5 <i>S</i> *,8 <i>S</i> *,9 <i>S</i> *,10 <i>R</i> *)-clero-3,13-dien-15-oato de metila	Vagens de sementes, casca	<i>H. courbaril</i>
(5 <i>R</i> *,8 <i>S</i> *,9 <i>S</i> *,10 <i>R</i> *)-clero-3,13-dien-15-oato de metila	Casca	<i>H. courbaril</i>
Zanzibarato de metila	Casca	<i>H. courbaril</i>

Ácido (13 <i>R</i>)-2-oxo-13-hidróxi-1(10), 14-ent-halimadien-18-oico	Folhas, caules e galhos	<i>H. courbaril</i>
Ácido (13 <i>R</i>)-13-hidróxi-1(10),14-ent-halimadien-18-oico	Folhas, caules e galhos	<i>H. courbaril</i>
Ácido (2 <i>S</i> ,13 <i>R</i>)-2,13-diidroxi-1(10), 14-ent-halimadien-18-óico	Folhas, caules e galhos	<i>H. courbaril</i>
Espatulanol	Sementes	<i>H. courbaril</i>
Crotomaclina	Sementes	<i>H. courbaril</i>
Ácido labd-13 <i>E</i> -en-8-ol-15-óico	Sementes	<i>H. courbaril</i>
Ácido (13 <i>E</i>)-labd-7,13-dien-15-óico	Sementes e folhas	<i>H. courbaril</i>
Ácido labd-8 (17), 13 <i>E</i> -dien-15-óico	Sementes	<i>H. courbaril</i>
(-)-(<i>E</i>)-Cariofileno	Resina	<i>H. courbaril</i>
Óxido de cariofileno	Resina	<i>H. courbaril</i>
Ácido zanzibárico	Frutos	<i>H. courbaril</i>
Cariolano-1,9β-diol	Frutos	<i>H. courbaril</i>
Germacreno D	Frutos	<i>H. courbaril</i>
(+)-Biciclogermacreno	Frutos	<i>H. courbaril</i>
cis-Muuroala-3,5-dieno	Frutos	<i>H. courbaril</i>
(+)-δ-Amorfenol	Frutos	<i>H. courbaril</i>
(+)-7-epi-Sesquitujeno	Frutos	<i>H. courbaril</i>
1-epi-Cubenol	Frutos	<i>H. courbaril</i>
trans-Cadina-1,4-dieno	Frutos	<i>H. courbaril</i>
Amorfa-4,7 (11)-dieno	Frutos	<i>H. courbaril</i>
trans-Muuroala-4(14),5-dieno	Frutos	<i>H. courbaril</i>
Ácido camfórico	Frutos	<i>H. courbaril</i>
Amorfa-4,9-dien-2-ol	Frutos	<i>H. courbaril</i>
(+)-α-Ylangeno	Frutos	<i>H. courbaril</i>
trans-Cadina-1(6),4-dieno	Frutos	<i>H. courbaril</i>
Germacreno B	Frutos	<i>H. courbaril</i>
Selin-11-en-4-α-ol	Frutos	<i>H. courbaril</i>
trans-Muurolol	Frutos	<i>H. courbaril</i>
Epóxido de (-)-Humuleno II	Frutos	<i>H. courbaril</i>
α-trans-Bergamoteno	Frutos	<i>H. courbaril</i>
δ-Elemeno	Frutos	<i>H. courbaril</i>
β-Elemeno	Frutos	<i>H. courbaril</i>
(<i>Z</i>)-β-Farneseno	Frutos	<i>H. courbaril</i>
α-Cadineno	Frutos	<i>H. courbaril</i>
(±)-γ-Cadineno	Frutos	<i>H. courbaril</i>
allo-Aromadendreno	Frutos	<i>H. courbaril</i>

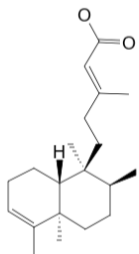
Salvial-4(14)-en-1-ona	Frutos	<i>H. courbaril</i>
trans-Calameneno	Frutos	<i>H. courbaril</i>
γ -Muuroleno	Frutos	<i>H. courbaril</i>
β -Copaen-4 α -ol	Frutos	<i>H. courbaril</i>
Mustakona	Frutos	<i>H. courbaril</i>
(+)-Aromadendreno	Frutos	<i>H. courbaril</i>
(-)-Globulol	Frutos	<i>H. courbaril</i>
(-)-Cypereno	Frutos	<i>H. courbaril</i>
Levomenol	Frutos	<i>H. courbaril</i>
Ácido (-)-copálico	Resina	<i>H. courbaril</i>
(5 <i>S</i> ,9 <i>S</i> ,10 <i>R</i>)-ent-labd-8(17)- en-15 acetato de etila	Resina	<i>H. courbaril</i>
Ácido 18-hidróxi-ent- halima-1(10),13- <i>E</i> -dien-15- oico	Flores	<i>H. stigonocarpa</i>
Ácido ent- Δ 13,14-Labd-8- β - ol-15-oico	Folhas	<i>H. stigonocarpa</i>
Ácido labd-7-en-15-oico	Folhas	<i>H. stigonocarpa</i>
Kaur-16-en-18-ol	Epicarpo de fruta	<i>H. stigonocarpa</i>
(-)-Kauran-16- α -ol	Epicarpo de fruta	<i>H. stigonocarpa</i>
Kaur-16-en-3- α -ol	Epicarpo da fruta	<i>H. stigonocarpa</i>
(-)-(1' <i>S</i> ,2 <i>S</i>)- α -Bisabolol	Resina da casca	<i>H. stigonocarpa</i>
Ácido 5 β -9 β -H-10 α - Labd-8(20)-en-15-oico	Resina da casca	<i>H. stigonocarpa</i>
Ácido Eperúico	Resina da casca	<i>H. stigonocarpa</i>
Cativato de metila	Resina da casca	<i>H. stigonocarpa</i>
Ácido labd-8-en-15-oico	Resina da casca	<i>H. stigonocarpa</i>
Ácido labda-8,13-dien-15- oico	Resina da casca	<i>H. stigonocarpa</i>
Ácido ent-pinifólico	Resina da casca	<i>H. oblongifolia</i>
Ácido guamaico	Resina da casca	<i>H. oblongifolia</i>
Quesnoina	Resina	<i>H. oblongifolia</i>
Ácido ent-8 (17), 13(16),14- Labda trien-18-oico	Resina da casca	<i>H. verrucosa</i>
γ -Sitosterol	Folhas	<i>H. stigonocarpa</i>
Campesterol	Folhas	<i>H. stigonocarpa</i>
Stigmasterol	Folhas	<i>H. stigonocarpa</i>
β -Sitosterol-3-O-glicosídeo	Casca	<i>H. martiana</i>

Fonte: BONIFACE; FERREIRA; KAISER; 2017.

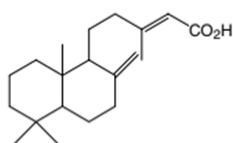
Figura 4. Terpenoides e esteroides relacionados para o gênero *Hymenaea*



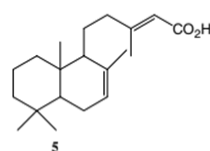
Ácido (5R*,8S*,9S*,10R*)-cleroda-3,13E-dien-15-oico



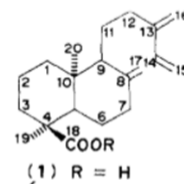
Ácido labd-8 (17), 13E-dien-15-oico



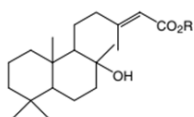
Ácido (13E)-labd-7,13-dien-15-oico



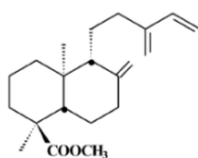
Ácido ent-8 (17), 13(16),14-labda trien-18-oico



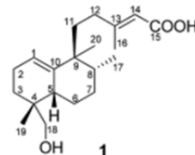
Ácido labd-13E-en-8-ol-15-oico



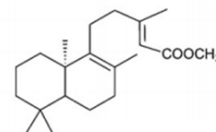
Isoozato de metila



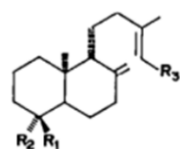
Ácido 18-Hidróxi-ent-halima-1(10),13-E-dien-15-oico



Ácido labda-8,13-dien-15-oico

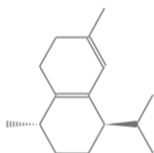


Ácido guamaico

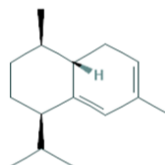


$R_1 = \text{COOH}$; $R_2 = \text{Me}$; $R_3 = \text{COOH}$

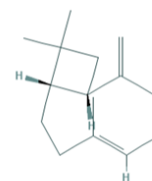
trans-Cadina-1(6),4-dieno



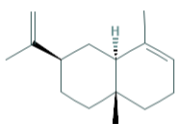
cis-Muurolo-3,5-dieno



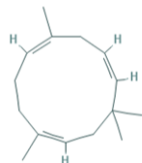
(Z)-Cariofileno



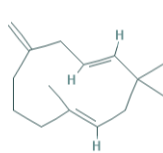
(-)- α -Selineno



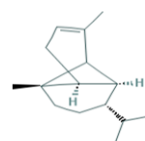
(\pm)- α -Humuleno



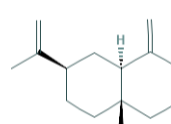
(\pm)- β -Humuleno



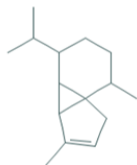
α -Copaeno



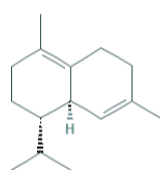
(+)- β -Selineno



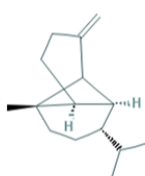
(-)- α -Cubebeno



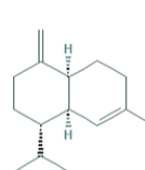
(+)- δ -Cadineno



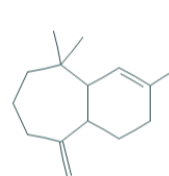
β -Copaeno

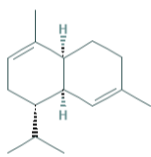
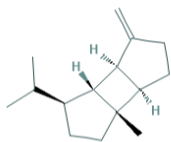


γ -Muuroloeno

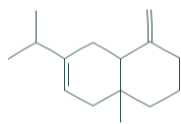


(-)- α -Himacaleno

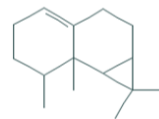


(-)- α -Muuroloeno(-)- β -Bourboneno

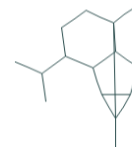
Selina-4(14),7-dieno



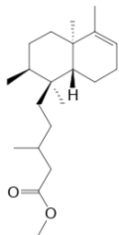
(+) -Calareno



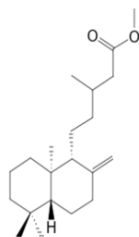
Ciclosativeno



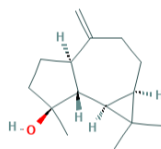
(-)-(5R,8S,9S,10R)-clerod-3-en-15-oato de metila



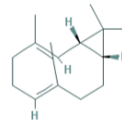
Eperuato de metila



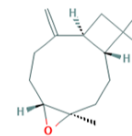
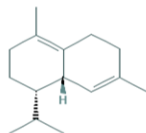
Espatuleno



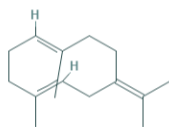
(+) -Biciclogermacreno



Óxido de cariofileno

(+) - δ -Amofeno

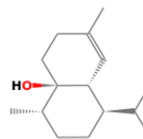
Germacreno B



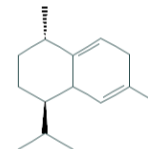
(+) -7-epi-Sesquitujeno



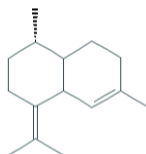
1-epi-Cubanol



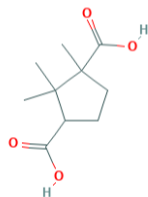
trans-Cadina-1,4-dieno



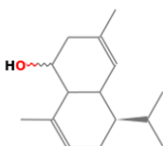
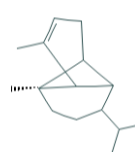
Amorfa-4,7 (11)-dieno



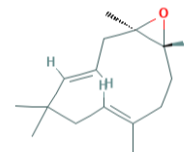
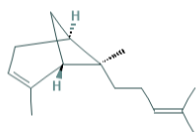
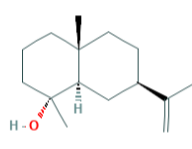
Ácido camfórico



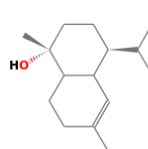
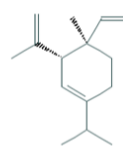
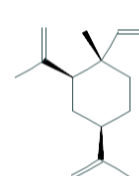
Amorfa-4,9-dien-2-ol

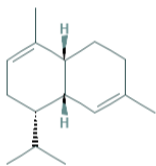
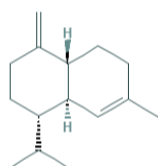
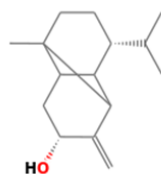
(+) - α -Ylangeno

Epóxido de Humuleno II

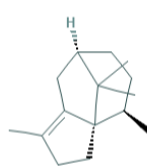
 α -trans-BergamotenoSelin-11-en-4- α -ol

trans-Muurolol

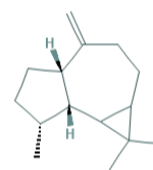
 δ -Elemeno β -Elemeno

α -Cadineno (\pm) - γ -Cadinene β -Copaen-4 α -ol

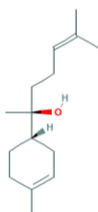
(-)-Cipereno



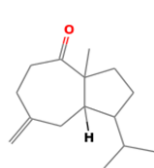
Allo-Aromadendreno



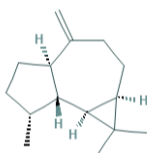
Levomenol



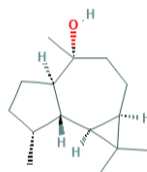
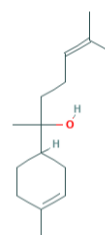
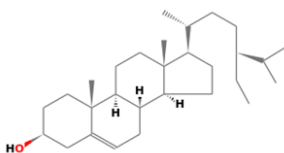
Salvia-4(14)-en-1-ono



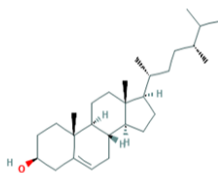
(+)-Aromadendreno



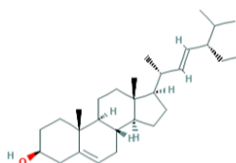
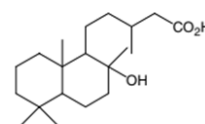
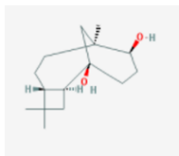
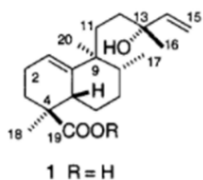
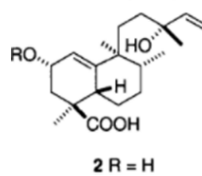
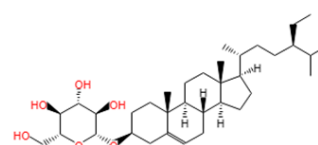
(-)-Globulol

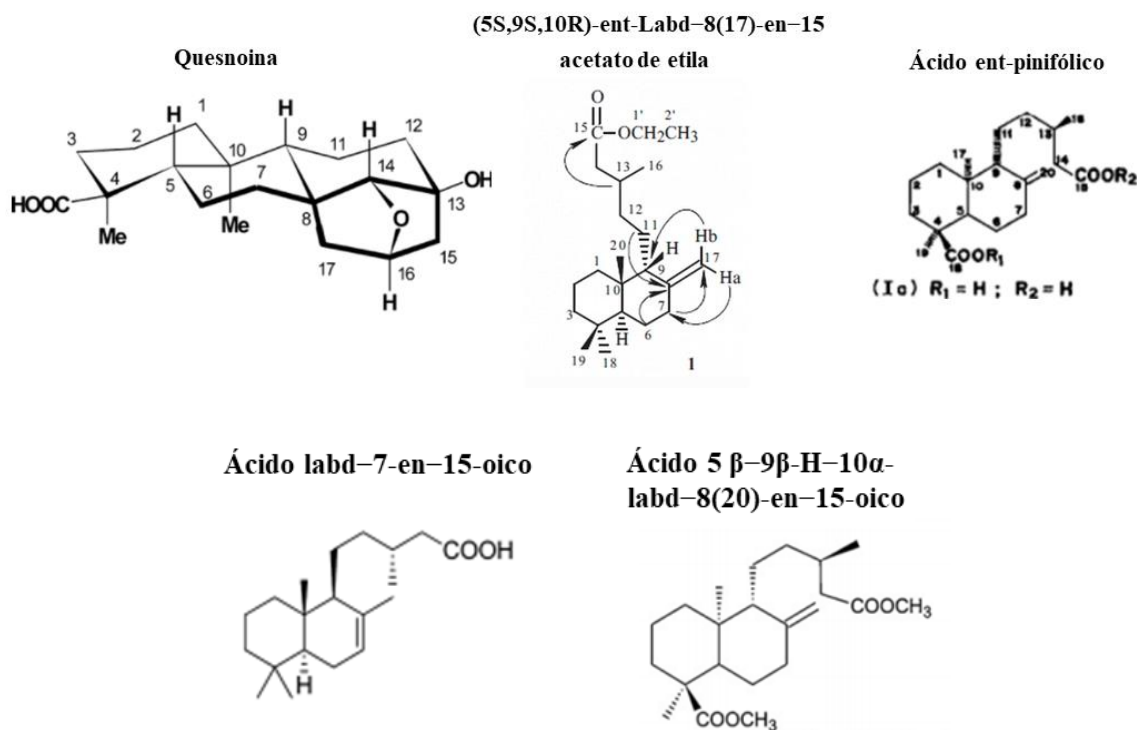
(-)-(1'S,2S)- α -Bisabolol γ -Sitosterol

Campesterol



Estigmasterol

Ácido labdan-8- β -ol-15-oicoCariolano-1,9 β -diolÁcido (13R)-13-Hidróxi-1(10),
14-ent-halimadien-18-oicoÁcido (2S,13R)-2,13-Diidróxi-1(10),
14-ent-halimadien-18-oico β -Sitosterol-3-O-glicosideo



Fonte: BONIFACE; FERREIRA; KAISER; 2017.

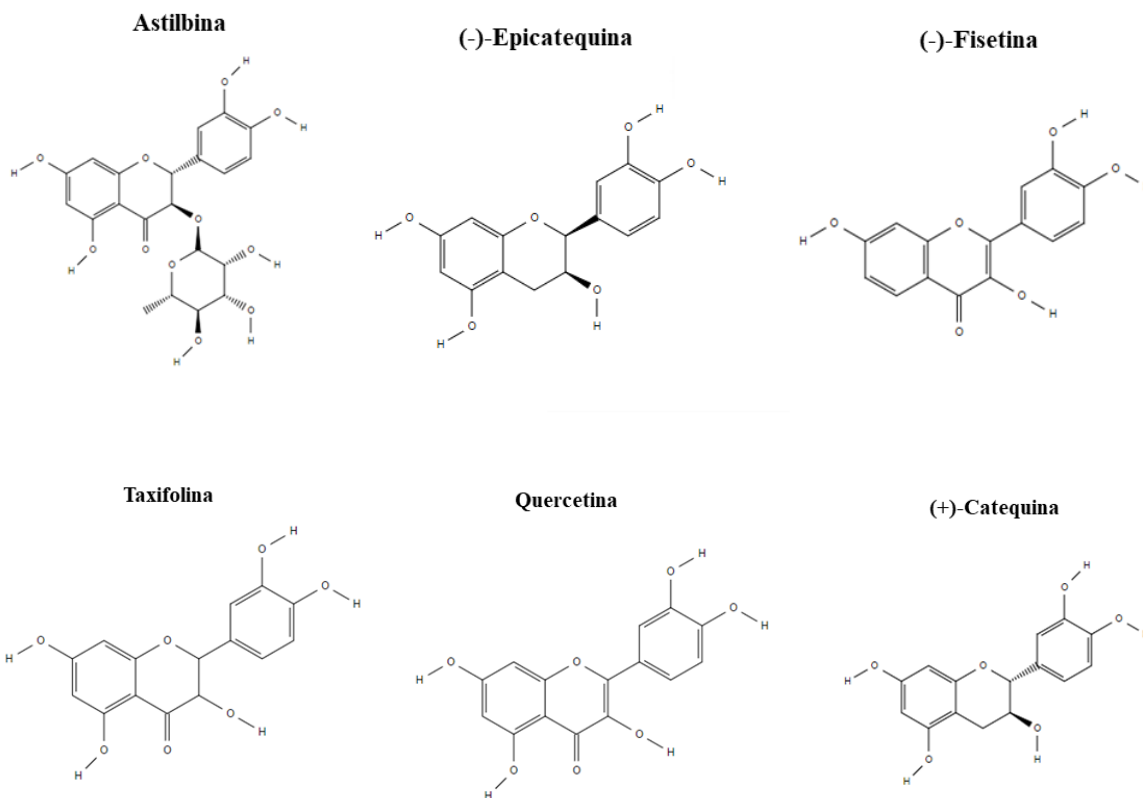
Tabela 2. Flavonoides relatados para o gênero *Hymenaea*

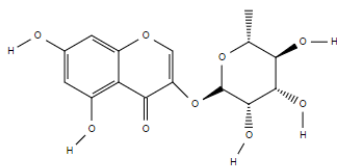
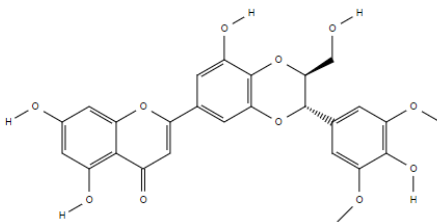
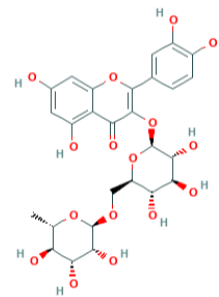
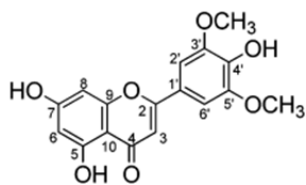
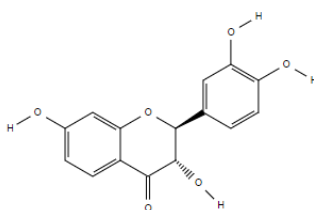
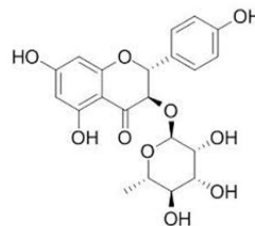
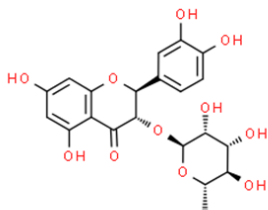
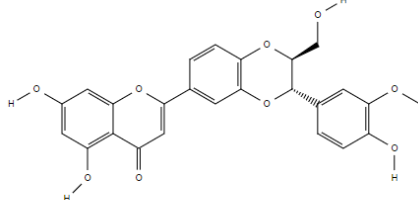
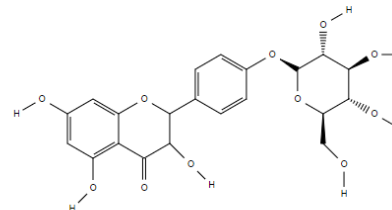
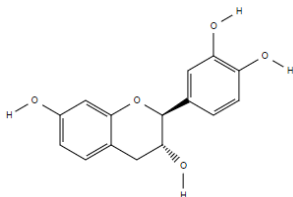
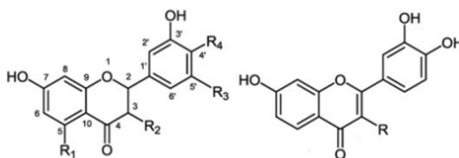
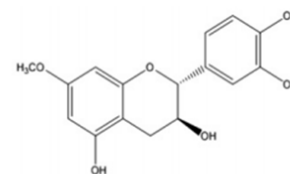
CONSTITUINTE	PARTE DA PLANTA	ESPÉCIE
Astilbina	Casca, folhas e casca do caule	<i>H. martiana</i> and <i>H. parvifolia</i> , <i>H. courbaril</i>
(-)-Epicatequina	Folhas	<i>H. courbaril</i>
Fisetina	Seiva do xilema	<i>H. courbaril</i>
Fisetinediol	Seiva do xilema	<i>H. courbaril</i>
Taxifolina	Seiva do xilema e cerne	<i>H. courbaril</i> , <i>H. stigonocarpa</i>
Fustina	Seiva do xilema	<i>H. courbaril</i>
3-O-Metil-2,3-trans-fustina	Seiva do xilema	<i>H. courbaril</i>
Hultenina	Cerne	<i>H. stigonocarpa</i>
7-Metóxi catequina	Cerne	<i>H. stigonocarpa</i>
Quercetina	Cerne	<i>H. stigonocarpa</i>
Flavona 4',5,7-triidróxi-3',5'-dimetóxi	Flores	<i>H. stigonocarpa</i>

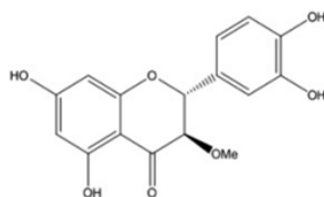
Eucrifina	Casca	<i>H. martiana</i>
Engelitina	Casca	<i>H. martiana</i>
Neoastilbina	Casca	<i>H. parvifolia</i>
(+)-Catequina	Casca	<i>H. courbaril</i> var. <i>stilbocarpa</i>
(-)-Hydnocarpina D	Folhas secas	<i>H. palustres</i>
50-Metóxi- hydnocarpina D	Folhas secas	<i>H. palustres</i>
Palstatina	Folhas secas	<i>H. palustres</i>
Diidrokaempferol- glucosídeo	Casca	<i>H. courbaril</i> var. <i>stilbocarpa</i>
Rutina	Frutos	<i>H. stigonocarpa</i>

Fonte: BONIFACE; FERREIRA; KAISER; 2017.

Figura 5. Flavonoides relacionados para o gênero *Hymenaea*



Eucrifina**Palstatina****Rutina****4',5,7-trihidróxi-3',5'-dimetóxi-flavona****Fustina****Engelitina****Neoastilbina****O-Hydrocarpin D****Diidrokempferol-glicosido****Fisetinediol****3-O-Metil-2,3-trans-fustina****(3)** $R_1=R_3=H$, $R_2=OCH_3$; $R_4=OH$ **7-Metóxi catequina**

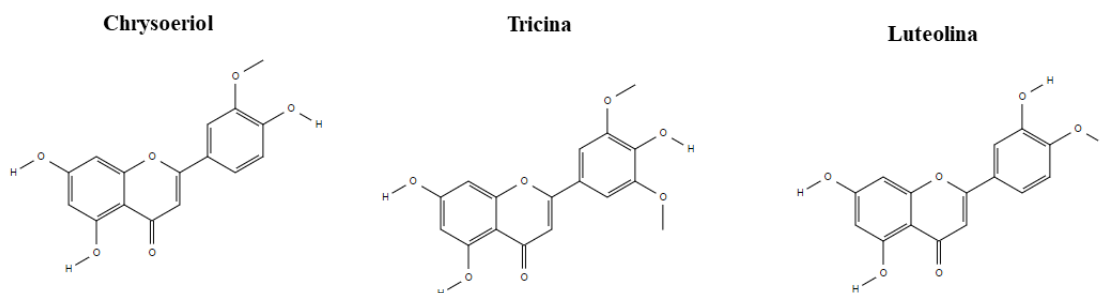
Hultenina

Fonte: BONIFACE; FERREIRA; KAISER; 2017.

Tabela 3. Flavonas relatadas para o gênero *Hymenaea*

CONSTITUINTE	PARTE DA PLANTA	ESPÉCIE
Chrysoeriol	Folhas	<i>H. palustres</i>
Luteolina	Folhas	<i>H. palustres</i>
Tricina	Folhas	<i>H. palustres</i>
Hultenina	Casca	<i>H. stigonocarpa</i>

Fonte: BONIFACE; FERREIRA; KAISER; 2017.

Figura 6. Flavonas relatadas para o gênero *Hymenaea*

Fonte: BONIFACE; FERREIRA; KAISER; 2017.

Tabela 4. Carotenoides relatados para o gênero *Hymenaea*

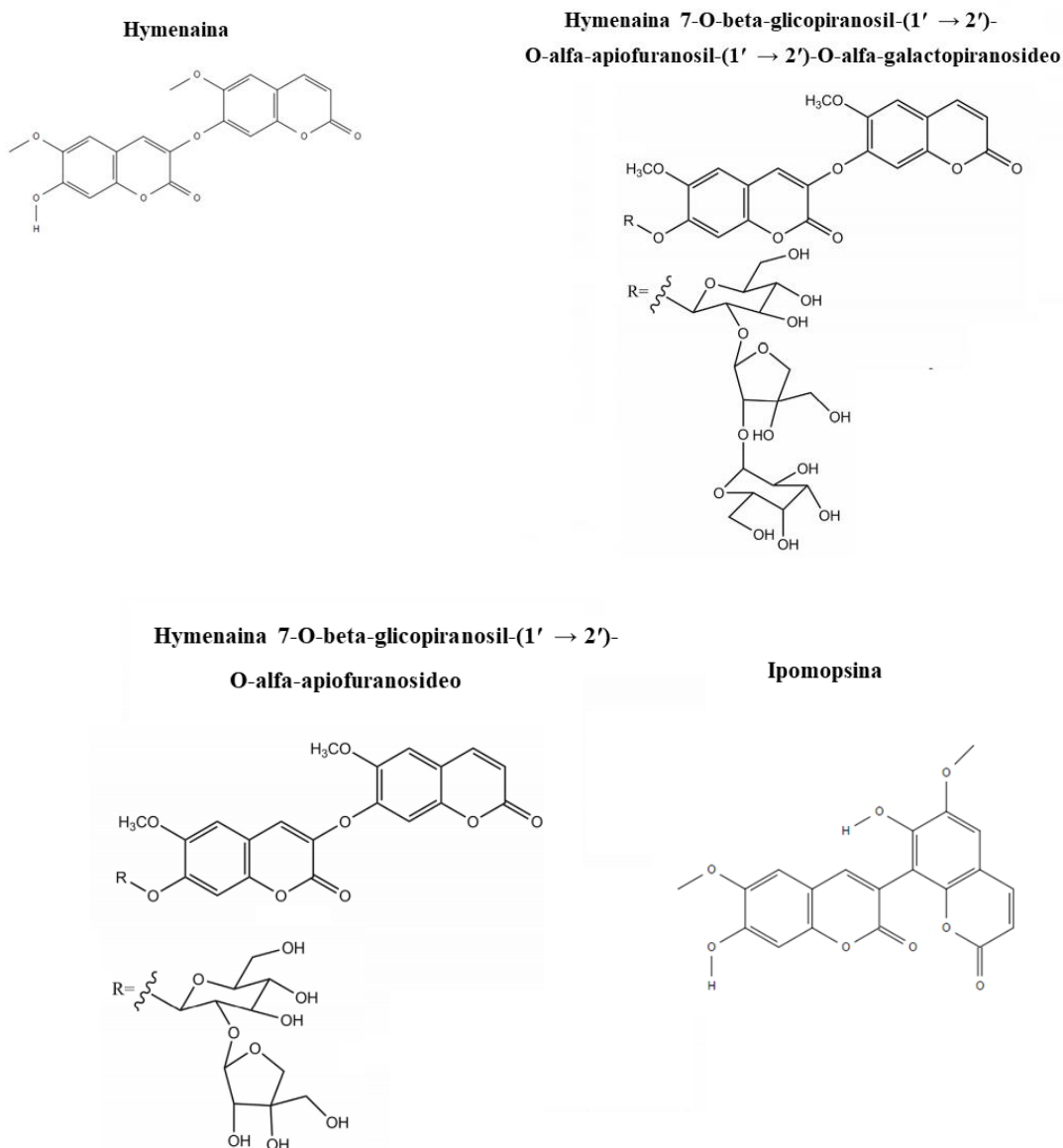
CONSTITUINTE	PARTE DA PLANTA	ESPÉCIE
a-Tocoferol	Polpa e óleo de semente	<i>H. courbaril</i>
b-Tocoferol	Polpa e óleo de semente	<i>H. courbaril</i>

Fonte: BONIFACE; FERREIRA; KAISER; 2017.

$\rightarrow 2'$)-O-		
alfagalactopiranosídeo		
Hymenaina 7-O-beta-	Sementes	<i>H. courbaril</i>
gliopiranosil-(1' \rightarrow 2')-		
O-alfa-apiofuranosídeo		

Fonte: BONIFACE; FERREIRA; KAISER; 2017.

Figura 9. Coumarinas relacionadas para o gênero *Hymenaea*

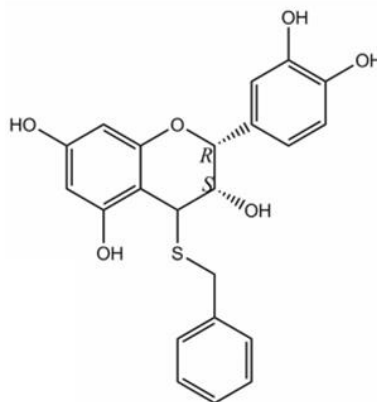


Fonte: BONIFACE; FERREIRA; KAISER; 2017.

Tabela 7. Procianidina relatada para o gênero *Hymenaea*

CONSTITUINTE	PARTE DA PLANTA	ESPÉCIE
4-(Benziltio)-epicatequina	Casca	<i>H. courbaril</i>

Fonte: BONIFACE; FERREIRA; KAISER; 2017.

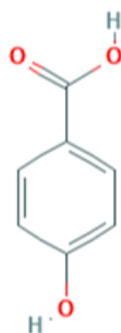
Figura 10. Procianidina relatada para o gênero *Hymenaea***4-(Benziltio)-epicatequina**

Fonte: BONIFACE; FERREIRA; KAISER; 2017.

Tabela 8. Ácido fenólico relatado para o gênero *Hymenaea*

CONSTITUINTE	PARTE DA PLANTA	ESPÉCIE
Ácido 4-Hidroxibenzóico	Folhas	<i>H. stigonocarpa</i>

Fonte: BONIFACE; FERREIRA; KAISER; 2017.

Figura 11. Ácido fenólico relatado para o gênero *Hymenaea***Ácido 4-Hidroxibenzóico**

Fonte: BONIFACE; FERREIRA; KAISER; 2017.

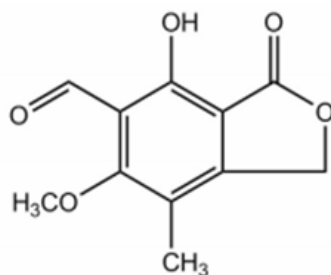
Tabela 9. Ftalida relatada para o gênero *Hymenaea*

CONSTITUINTE	PARTE DA PLANTA	ESPÉCIE
6-Formil-7-hidróxi-5-metóx-4-metilftalida	Tronco de madeira	<i>H. oblongifolia</i>

Fonte: BONIFACE; FERREIRA; KAISER; 2017.

Figura 12. Ftalida relatada para o gênero *Hymenaea*

6-Formil-7-hidróxi-5-metóxi-4-metilftalida



Fonte: BONIFACE; FERREIRA; KAISER; 2017.

1.5. Farmacologia de constituintes químicos das espécies do gênero *Hymenaea*

Para as bicoumarinas Ipomopsina e Hymenaina, isoladas de sementes germinadas da *H. courbaril*, reportou-se na literatura o efeito antioxidante (BONIFACE; FERREIRA; KAISER; 2017).

Quanto à classe dos flavonoides, para a Neoastilbina e a Astilbina, dois diidroflavonoides isolados da casca da *H. parvifolia*, foi relatado efeito inibitório de protease (caseína quinase II), sendo que, especificamente para a Astilbina, em outro estudo, isolada do extrato bruto de *H. martiana*, relatou-se o efeito hepatoprotetor. Para a Fisetina, mostrou-se, *in vitro*, atividade antifúngica, baixa toxicidade em células animais e inibição da proliferação de células cancerosas (BONIFACE; FERREIRA; KAISER; 2017) (COSTA et al, 2014) (LEE et al, 2020).

Ainda em relação aos flavonoides, para a Taxifolina e para o Fisetinediol, isolados do extrato de EtOAc do cerne da *H. courbaril*, relatou-se na literatura atividade antioxidante.

Também foi relatada a atividade antitermítica e antioxidante do extrato de EtOAc do cerne da *H. stignocarpa* e seus constituintes (Hultenina, Taxifolina, Quercetina e 7-Metoxicatequina). Para a Palstatina, relatou-se a inibição do crescimento do patógeno gram-positivo *Neiseria gonorrhoeae*. Por fim, para a Rutina, estudos da literatura demonstram diversas atividades farmacológicas, incluindo antioxidante, citoprotetora, vasoprotetora, neuroprotetora, cardioprotetora e anticarcinogênica, sendo que a combinação com a cisplatina (droga utilizada no tratamento de vários tipos de câncer, mas limitada pelos vários efeitos colaterais aos hospedeiros) proporcionou melhor atividade contra as células do linfoma de Dalton (BONIFACE; FERREIRA; KAISER; 2017) (CHAMBERS; VALENTOVA; KREN; 2015) (PRASAD; PRASAD; 2021) (PAWAR, 2009).

2. OBJETIVOS

Encontrar uma maneira simples de fracionar os extratos obtidos das folhas da *Hymenaea courbaril*, usando adsorventes baratos, fases móveis o mais ambientalmente amigáveis possível (hexano, água e etanol) para conseguir frações enriquecidas em classes de metabólitos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Equipamentos

A seguir, expressam-se os equipamentos utilizados:

- Balança analítica Gehaka, modelo BG2000 (máx. 2020 g; d = 0,1 g);
- Balança analítica MettlerToledo, modelo AG204 (máx. 210 g; d = 0,1 mg);
- Balança analítica MettlerToledo, modelo AG245 (máx. 41/210 g; d = 0,01/0,1 mg);
- Banho de aquecimento Buchi, modelo B-480;
- Banho de ultrassom Elmasonic, modelo S 60 H;
- Banho refrigerador Huber Unichiller;
- Bomba de vácuo Buchi, modelo V-700;
- Bomba de vácuo Primatec, modelo 121;
- Capela de fluxo laminar;
- Coluna cromatográfica NST 18 100A, de dimensões 250 mm x 4,6 mm x 5 µm;

- Estufa de secagem de material de laboratório Marconi, modelo MA 033/3;
- Estufa;
- UHPLC+ Focused, Dionex;
- Mini folder VacMaster;
- Moinho analítico IKA, modelo A11 Basic;
- Moinho de facas para triturar as folhas;
- Pipetas automáticas de 200, 1000 μ L, Gilson;
- Purificador de água MilliQ, da Millipore.

Rotaevaporador Buchi, modelo R 114.

3.2 Material vegetal

Foram coletadas folhas da espécie *Hymenaea courbaril* (jatobá) no Sítio Experimental da UNICEP, coordenadas 22°2,058' S e 47°46,159' W, localizado em São Carlos, São Paulo (figura 13).

Figura 13. Localização do Sítio Experimental da UNICEP



Fonte: O autor, 2021.

3.3. Solventes e adsorventes

Inicialmente, para o preparo do extrato bruto, foram utilizados solventes de grau PA (etanol e hexano). Para o processo de extração em fase sólida, foram utilizados 11 adsorventes e 6 eluentes. Na análise por cromatografia líquida, foi utilizada como solvente água ultra-pura, obtida em sistema Milli-Q, e, para solubilização, etanol grau HPLC. No

equipamento HPLC, foram utilizados: água ultra-pura e acetronitrila grau HPLC, com 0,1% de ácido fórmico como solvente. A coluna cromatográfica NST 18 100A, de dimensões 250 mm x 4,6 mm x 5µm, era composta de C18.

A seguir, expressam-se na Tabela 10 as características dos adsorventes utilizados e na Tabela 11 o protocolo para fracionamento do extrato vegetal, contendo os 9 adsorventes avaliados, juntamente com os respectivos eluentes utilizados.

Tabela 10. Características dos adsorventes utilizados

Adsorventes	Fabricante	Diâmetro médio de partícula (µm)	Grupo Funcional	Preço (US\$/Kg)
Alumina neutra em pó	J. T. Baker	50-200	Al ₂ O ₃	419,66
Carvão ativado P.A. em pó	Labsynth	15-30	C ₆	18,41
Celite® 545 P.A.	Labsynth	20-100	Silicato	24,98
Celulose microgranular	Sigma-Aldrich	25-60	Carboidrato	977,00
Poliamida em pó	Merck	5-50	Amida	1278,19
Sílica Polygoprep® 60-50 C18	Macherey-Nagel	50	C ₁₈	8424,23
Sílica	Sigma-Aldrich	40-63	Silicato	109,85
Amberlite ® XAD-4	Sigma-Aldrich	250-841	Polímero apolar	326,21
Diaion® HP-20	Sigma-Aldrich	250-850	Polímero apolar	339,90

Fonte: O autor, 2021.

Tabela 11. Protocolo para fracionamento do extrato vegetal

Adsorvente	Eluentes
XAD-4	Água / Água:Etanol 1:1 / Etanol / Acetona
Poliamida	Água / Água:Etanol 1: / Etanol / Etanol + Hidróxido de Amônio (2 mL)
Sílica	Hexano / Hexano:Acetato de Etila 9:1 / 8:2 / 6:4 / Acetato de Etila / Etanol
Carvão Ativado	Hexano / Hexano:Acetato de Etila 9:1 / 8:2 / 6:4 / Acetato de Etila / Etanol / Acetona
Sílica + Carvão Ativado 1:1	Hexano / Hexano:Acetato de Etila 9:1 / 8:2 / 6:4 / Acetato de Etila / Etanol
C18	Água / Água:Etanol 8:2 / 6:4 / 4:6 / 2:8 / Etanol
Celite	Hexano / Hexano:Acetato de Etila 9:1 / 8:2 / 6:4 / Acetato de Etila / Etanol
Alumina	Hexano / Hexano:Acetato de Etila 9:1 / 8:2 / 6:4 / Acetato de Etila / Etanol
Celulose	Hexano / Hexano:Acetato de Etila 9:1 / 8:2 / 6:4 / Acetato de Etila / Etanol
Diaion HP20	Água / Água:Etanol 8:2 / 6:4 / 4:6 / 2:8 / Etanol / Acetona

Fonte: O autor, 2021.

3.4 Métodos

3.4.1. Preparo dos extratos brutos

3.4.1.1. Coleta e trituração

As folhas da *Hymenaea courbaril* foram coletadas no Sítio Experimental da UNICEP, secas na estufa de secagem de laboratório (Marconi modelo MA 033/3), secas em estufa a

40° C e trituradas no moinho de facas. Em sequência, a massa de folhas trituradas foi obtida com o auxílio da balança analítica (Gehaka, modelo BG2000).

3.4.1.2. Extração

Com as folhas trituradas, foram obtidos 2 diferentes extratos, um hidroalcólico (70% etanol, 30% água) e outro hexânico. Para a obtenção dos extratos, pesou-se 100 g de material vegetal para 1L de cada composição de solvente previamente preparado. A massa pesada foi colocada em um Erlenmeyer, adicionando-se em sequência o solvente para cada extrato, deixando-se por 20 minutos no banho de ultrassom (Elmasonic, modelo S 60 H), a fim de se obter uma melhor homogeneização da mistura e acelerar o processo de extração. Em seguida, transferiu-se o conteúdo para um funil Buchner com papel filtro, realizando-se a filtração com o auxílio de um kitasato acoplado à uma bomba de vácuo. O filtrado, a fim de se evaporar parte do solvente ainda restante, foi deixado em uma capela de fluxo laminar.

Após a retirada de parte do solvente via capela de fluxo laminar, para a retirada total do solvente presente no filtrado, utilizou-se o rotaevaporador (Buchi, modelo R 114). Por fim, o filtrado foi solubilizado em uma pequena quantidade do solvente original, transferido para tubos de penicilina e placas de Petri previamente tarados, e levado novamente à capela para total secagem.

3.4.2. Processo de extração em fase sólida

3.4.2.1 Preparo dos cartuchos

Inicialmente, foram confeccionados os cartuchos com a série de adsorventes expressa na Tabela 11, pesando-se 1 g de cada adsorvente nos respectivos cartuchos. O empacotamento dos cartuchos foi feito a seco.

3.4.2.2. Preparo das amostras

Aos extratos secos, adicionou-se uma quantidade do eluente intermediário (para os hidroalcolícos, adicionou-se uma solução acetato de etila + etanol; para os hexânicos, hexano + acetato de etila) para total solubilização. Utilizou-se cerca de 100 mg do extrato hidroalcólico e 10 mg do hexânico. Os dois extratos solubilizados foram reunidos, de forma a obter-se uma mistura de todos os extraíveis presentes nas folhas, e colocados em tubos de penicilina. A seguir, adicionou-se 500 mg de adsorvente para dispersão da amostra. Após

eliminação dos solventes, a amostra dispersa no adsorvente foi aplicada no cartucho de extração.

3.4.2.3. Fracionamento e pesagem

O conteúdo dos tubos foi transferido para os cartuchos, sendo utilizado 1 mL de eluente para cada 1 cm do espaço ocupado pelo conteúdo, respeitando-se o volume morto de cada um deles. Realizada a filtração em fase sólida, o conteúdo obtido foi colocado em frascos de penicilina previamente tarados e etiquetados, sendo levado à capela para secagem.

3.4.3. Cromatografia líquida

3.4.3.1. Preparo das frações

Inicialmente, foram montadas seringas com filtros de celulose acoplados. Em seguida, novamente, solubilizaram-se os extratos, utilizando-se para tanto etanol grau HPLC como solvente. Nos casos em que o eluente usado na filtração em fase sólida foi água ou etanol + água 1:1, utilizou-se como eluente uma mistura etanol grau HPLC + água 1:1. Feita a solubilização, realizou-se a filtração dos extratos.

3.4.3.2. Análise cromatográfica

Submeteu-se a alíquota obtida ao HPLC, fazendo-se a leitura cromatográfica.

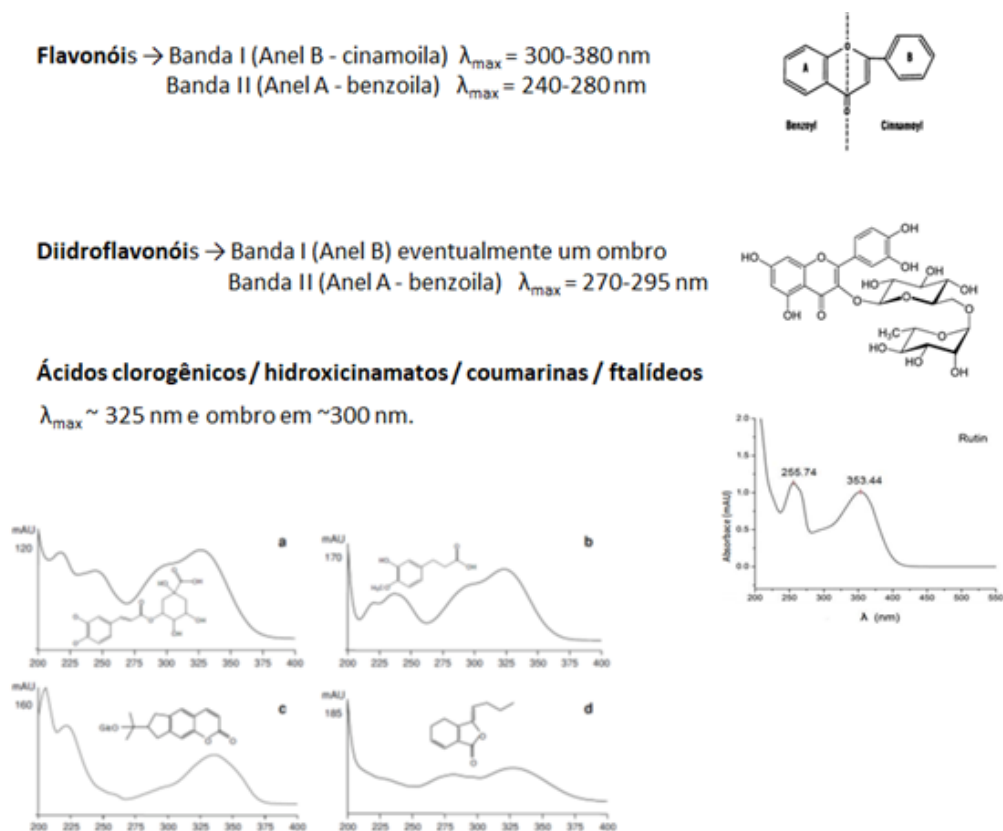
No equipamento de cromatografia líquida, padronizou-se o método em 70 minutos totais para cada amostra: 5 a 100% B em 45 min, seguida de 15 minutos isocrático com 100% B. Para recondicionar a coluna após cada análise foi usado um gradiente reverso rápido (100 – 5% B em 2 min), seguido de 13 minutos de tempo de equilíbrio. Solvente A foi água ultra-pura e solvente B foi acetronitrila grau HPLC, com 0,1% de ácido fórmico. A temperatura foi de 30° C. A vazão correspondeu a 1mL/min com injeção de 10 µl de fração e a análise se deu nos comprimentos de onda de 254 nm, 280 nm, 300 nm, 350 nm, 400 nm, 500 nm, 600 nm e 700 nm.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A revisão dos estudos fitoquímicos relatados na literatura científica indicou que a *H. courbaril* é rica em ácidos graxos, mono e sesquiterpenos, flavonóis e diidroflavonóides, catequinas e coumarinas. Neste estudo a atenção foi voltada para os compostos fenólicos e

coumarinas, visto que são os metabólitos possíveis de monitorar usando detecção no UV/Vis (Figura 14).

Figura 14. Principais características espectrais no UV dos compostos fenólicos e coumarinas já relatados em *H. courbaril*.



Fonte: Adaptado de MABRY; MARKHAM; THOMAS; 1970.

Em relação à Figura 14, quanto às características espectrais dos flavonóis, é importante destacar que as bandas IIa e IIb indicam anel B di ou trioxigenado, e que a ausência de grupo 5-OH indica banda I 3-10 nm menor e banda II 6-17 nm menor. Quanto aos ácidos clorogênicos / hidroxicinamatos / coumarinas / ftalídeos, todos possuem como cromóforo principal a unidade cinamoila, resultando em espectros no UV semelhante, conforme mostra a figura (MABRY; MARKHAM; THOMAS; 1970).

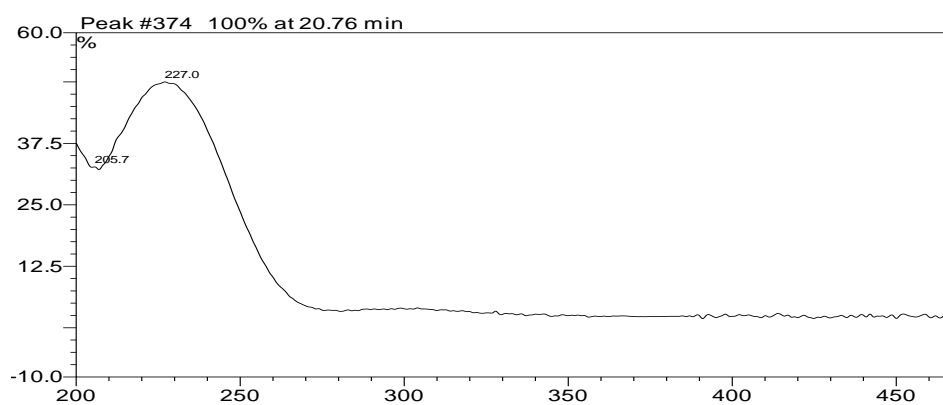
A análise dos espectros no UV obtidos nas análises por HPLC resultou na atribuição da classe do metabólito quando se tratava de flavonol ou diidroflavonol. Ácidos clorogênicos, ácidos hidroxicinâmicos livres, coumarinas e ftalídeos apresentam praticamente o mesmo cromóforo no UV, isto é, uma unidade cinamoila com máximo de absorção em cerca de 325

nm e um ombro em cerca de 300 nm. Por isso às bandas cromatográficas com espectros no UV com estas características foram consideradas representar derivados cinamoilicos.

Com base nos constituintes químicos relatados para as espécies do gênero *Hymenaea*, foram calculados, para o caso dos terpenoides com carbonilas α , β -insaturadas ou ligações duplas conjugadas, o lambda máximo de absorção (λ_{\max}), empregando-se para tanto a regra de Woodward-Fieser. Em sequência, compararam-se os valores calculados com os espectros UV de algumas bandas, para as frações com maior variedades de picos na análise cromatográfica.

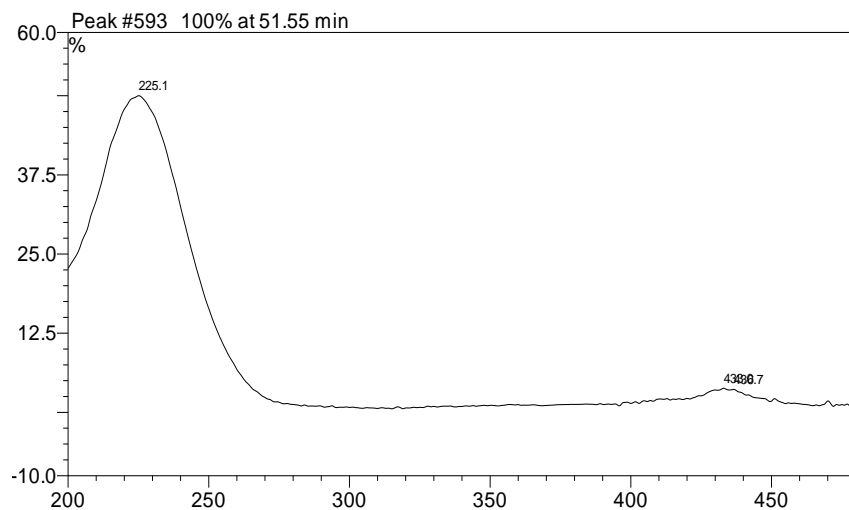
Mustakona: $\lambda_{\max} = 226$ nm (Enona = 202 nm; Beta alquila = $2 \times 12 = 24$ nm);

Figura 15. Cromatograma em HPLC-C18 das frações obtidas por EFS-Carvão. Espectro UV. 254 nm. Fração AcOET – possível correspondência com a mustakona.



Fonte: O autor, 2021.

Figura 16. Cromatograma em HPLC-C18 das frações obtidas por EFS-Carvão. Espectro UV. 254 nm. Fração AcOET – possível correspondência com a mustakona.



Fonte: O autor, 2021.

Ácido Zanzibárico: $\lambda_{\max} = 224 \text{ nm}$ (Acíclico = 214 nm; Alquila = $2 \times 5 = 10 \text{ nm}$);

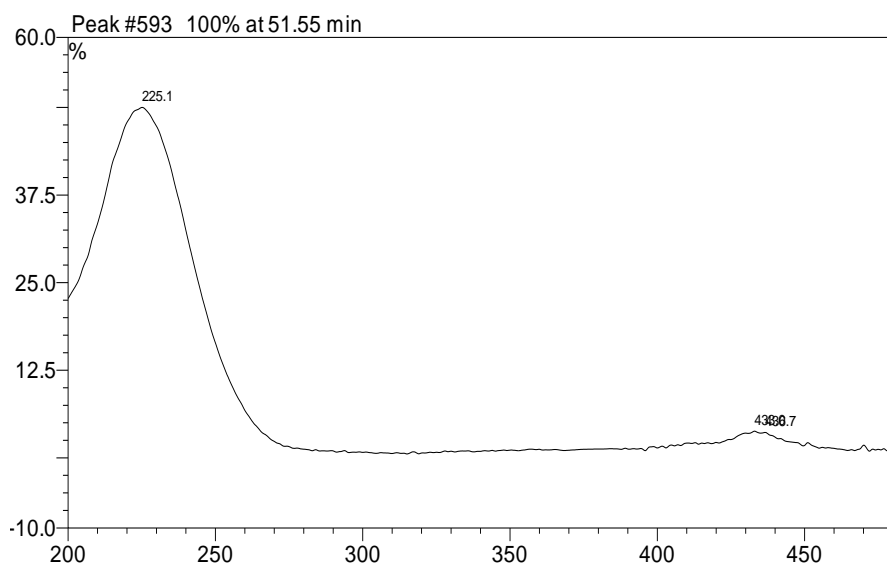
Germacreno D: $\lambda_{\max} = 224 \text{ nm}$ (Acíclico = 214 nm; Alquila = $2 \times 5 = 10 \text{ nm}$);

Zanzibarato de metila: $\lambda_{\max} = 224 \text{ nm}$ (Acíclico = 214 nm; Alquila = $2 \times 5 = 10 \text{ nm}$);

Ozato de metila: $\lambda_{\max} = 224 \text{ nm}$ (Acíclico = 214 nm; Alquila = $2 \times 5 = 10 \text{ nm}$);

Crotomaclina: $\lambda_{\max} = 224 \text{ nm}$ (Acíclico = 214 nm; Alquila = $2 \times 5 = 10 \text{ nm}$);

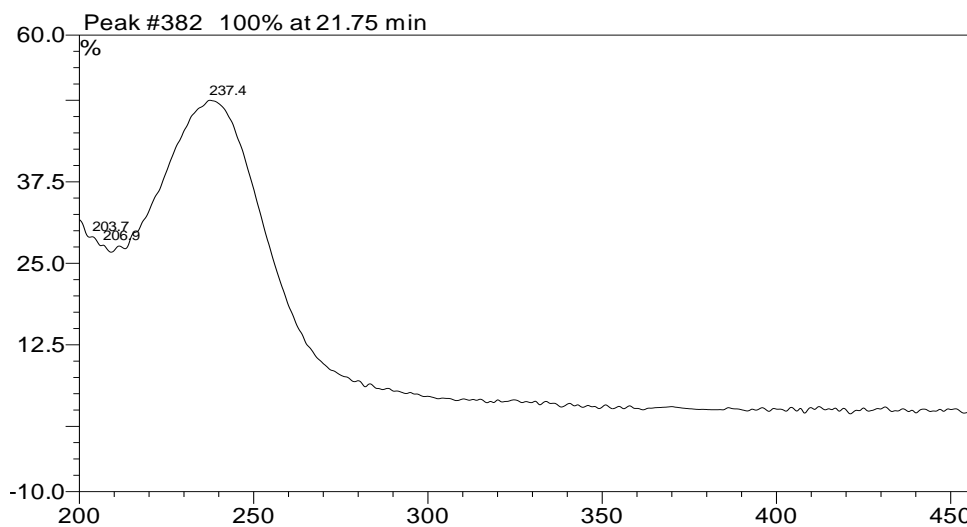
Figura 17. Cromatograma em HPLC-C18 das frações obtidas por EFS-Carvão. Espectro UV. 254 nm. Fração AcOET – possível correspondência com o Ácido Zanzibárico, Germacreno D, Zanzibarato de metila, Ozato de metila e Crotomaclina



Fonte: O autor, 2021.

Ácido (13R)-2-Oxo-13-hidróxi-1(10), 14-ent-halimadien-18-oico: $\lambda_{\text{max}} = 239 \text{ nm}$
(Enona = 215 nm; Beta-Alquila = $2 \times 12 = 24 \text{ nm}$);

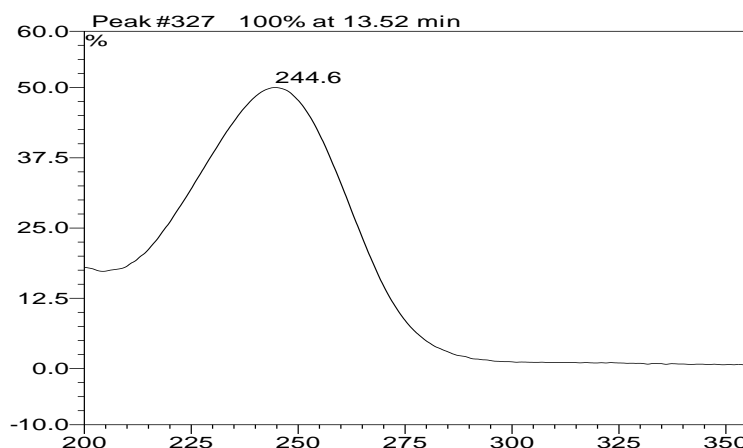
Figura 18. Cromatograma em HPLC-C18 das frações obtidas por EFS-Carvão Espectro UV. 254 nm. Fração AcOET- possível correspondência com a Ácido (13R)-2-Oxo-13-hidróxi-1(10), 14-ent-halimadien-18-oico:



Fonte: O autor, 2021.

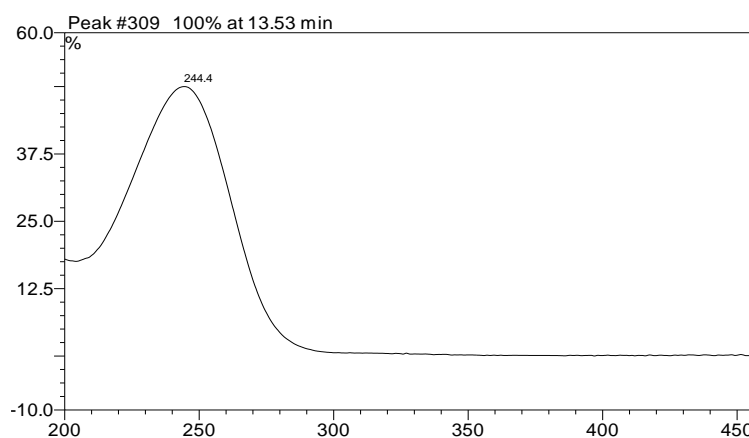
Trans-Muurolo-4(14),5-dieno: $\lambda_{\max} = 244 \text{ nm}$ (Transóide = 214 nm; Subst. Alquila = $3 \times 5 = 15 \text{ nm}$; dupla exocíclica = $1 \times 5 = 5 \text{ nm}$);

Figura 19. Cromatograma em HPLC-C18 da fração AcOET obtida por EFS-Si+Carvão. Detecção no UV. 254 nm. Espectro UV 254 nm – possível correspondência com Trans-Muurolo-4(14),5-dieno.



Fonte: O autor, 2021.

Figura 20. Cromatograma em HPLC-C18 da fração EtOH obtida por EFS-Si. Detecção no UV. 254 nm. Espectro UV 254 nm - possível correspondência com Trans-Muurolo-4(14),5-dieno.

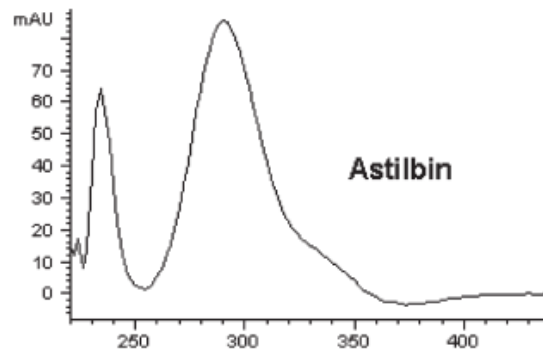


Fonte: O autor, 2021

Para os flavonoides relatados na literatura para as espécies do gênero *Hymenaea*, buscou-se espectros UV correspondentes, para comparar com os espectros UV obtidos laboratorialmente.

Para a Astilbina, encontrou-se o valor de como sendo $\lambda_{\max} = 292 \text{ nm}$ e espectro UV em sequência (FANZONE et al, 2010).

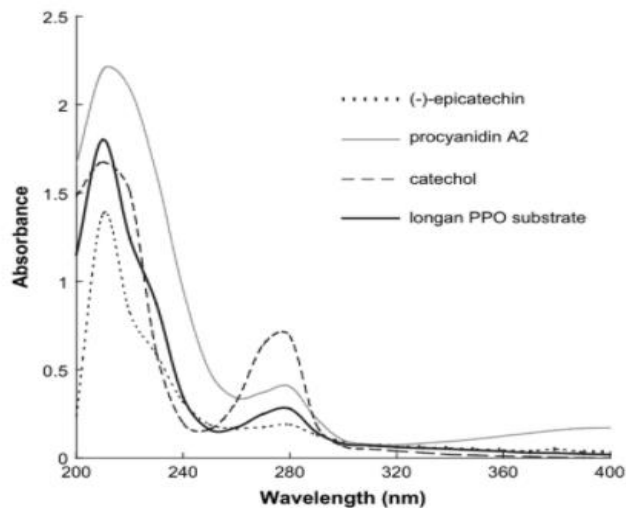
Figura 21. Espectro UV para a Astilbina



Fonte: FANZONE et al, 2010.

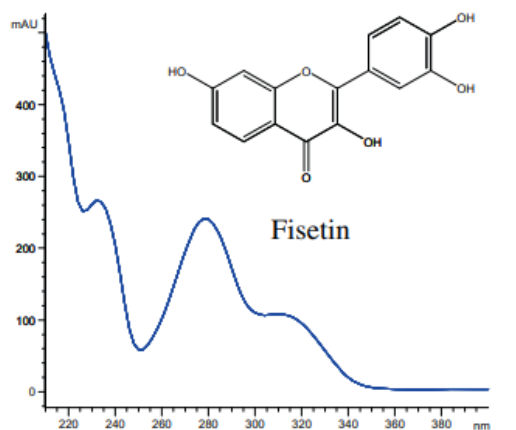
Para a (-)-Epicatequina, encontrou-se o espectro UV em sequência:

Figura 22. Espectro UV para a (-)-epicatequina e outros compostos químicos



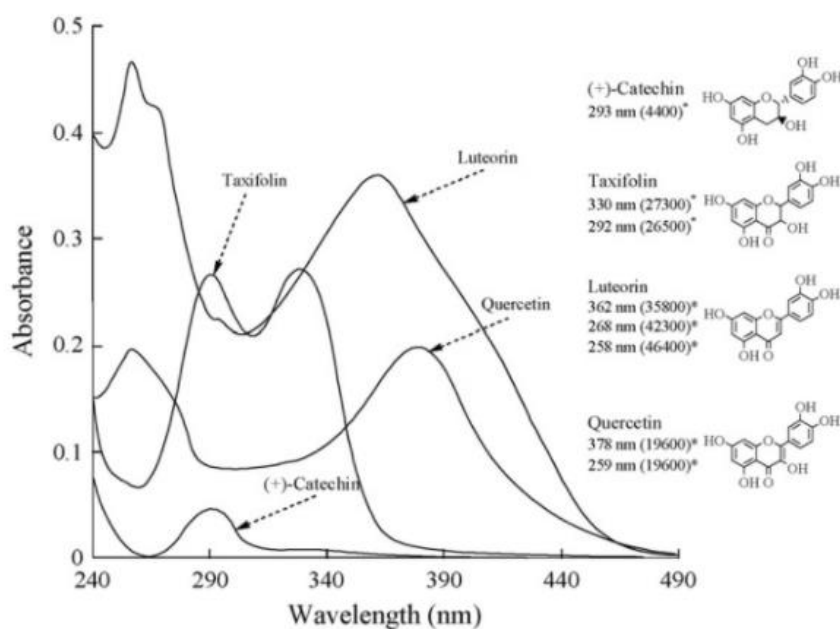
Fonte: SHI et al, 2008.

Para a (-)-Fisetina, encontrou-se o espectro UV em sequência:

Figura 23. Espectro UV para a Fisetina

Fonte: KIM et al, 2013.

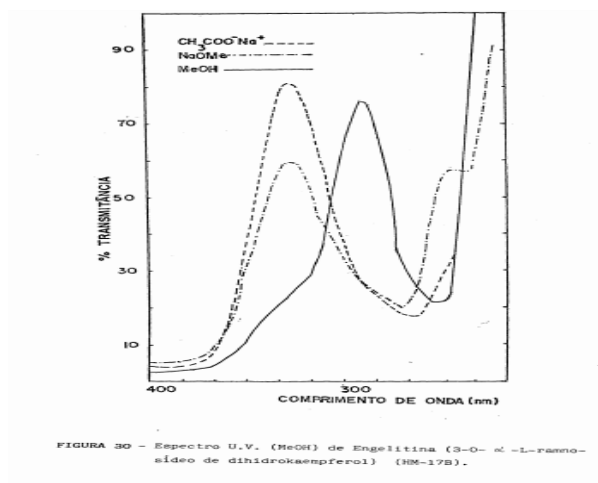
Para os flavonoides Taxifolina, Quercetina, (+)-Catequina, foram obtidos os espectros UV correspondentes na literatura:

Figura 24. Espectro UV para a Taxifolina, Quercetina e (+)-Catequina

Fonte: DOBASHI et al, 2008.

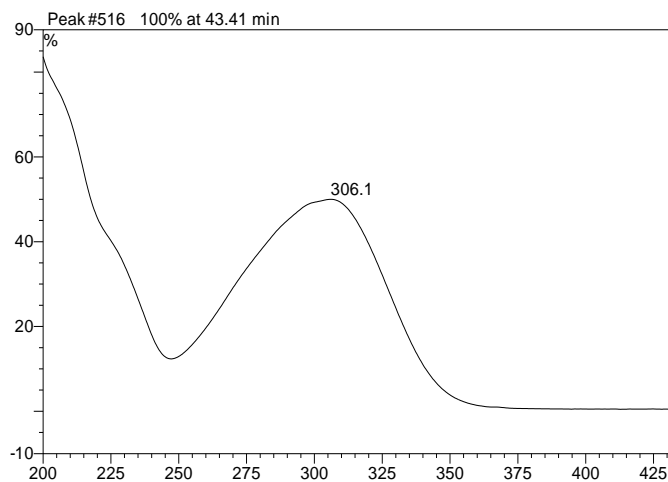
Para o flavonoide Engelitina, foi obtido o espectro UV correspondente na literatura, havendo uma possível correspondência com os dados experimentais:

Figura 25. Figura 28. Espectro UV para a Engelitina



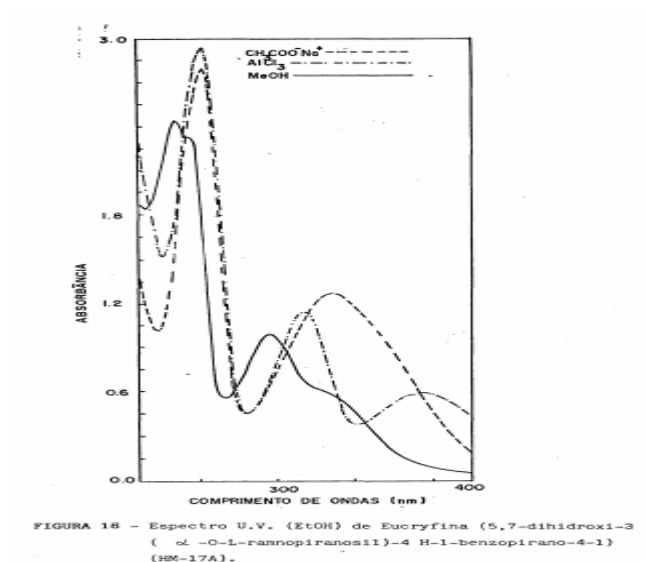
Fonte: CARNEIRO et al, 1993.

Figura 26. Cromatograma em HPLC-C18 da fração AcOET obtida por EFS-Si+Carvão. Detecção no UV. 254 nm. Espectro UV 254 nm – possível correspondência com Engelitina



Fonte: O autor, 2021.

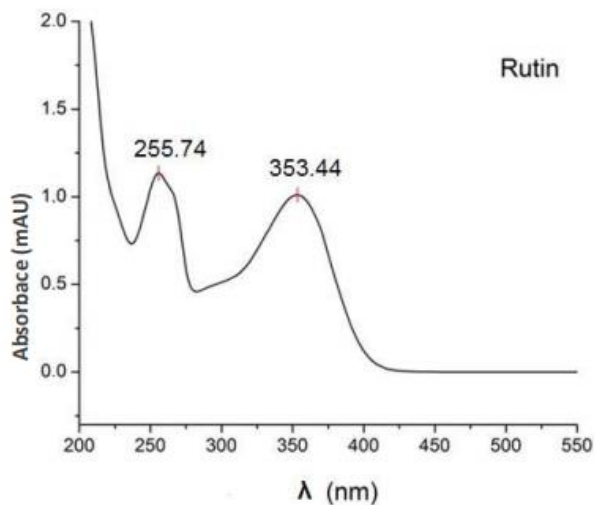
Para o flavonoide Eucrifina, encontraram-se os valores de λ_{\max} como 290 nm e 330 nm. O espectro UV está representado abaixo:

Figura 27. Espectro UV para a Eucryfina

Fonte: CARNEIRO, 1989.

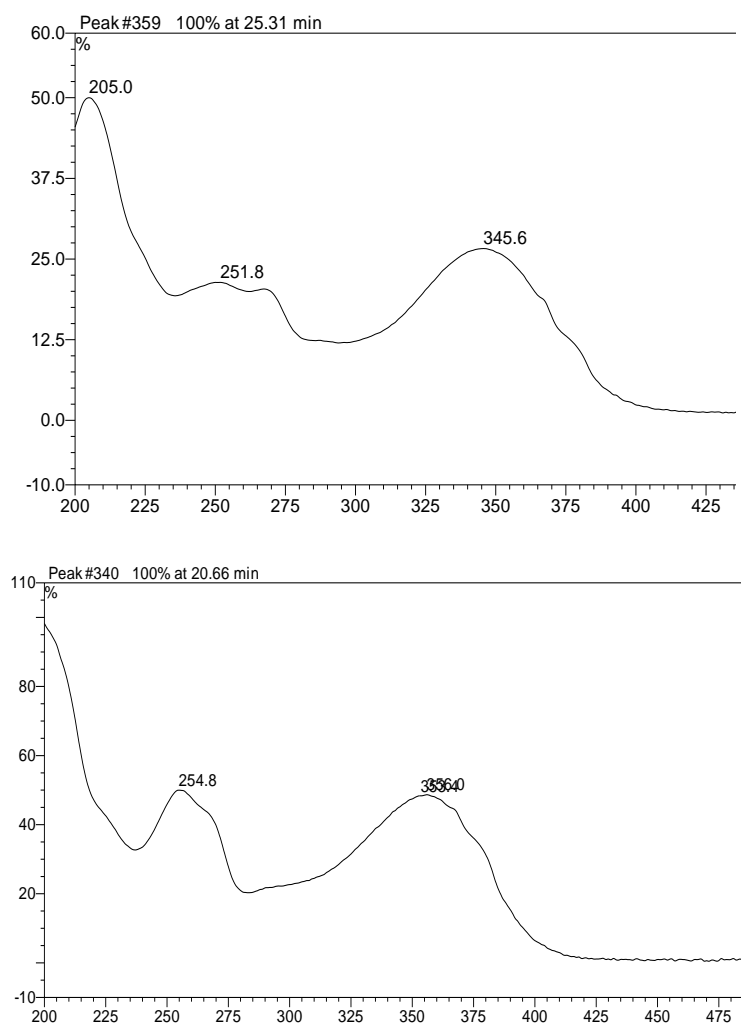
Para o flavonoide Palstatina, encontraram-se os valores de λ_{\max} como 269 nm e 341 nm (PETTIT et al, 2003).

Para o flavonoide Rutina, encontrou-se na literatura o espectro UV correspondente, e conseguiu-se associá-lo com alguns picos obtidos experimentalmente:

Figura 28. Espectro UV para a Rutina

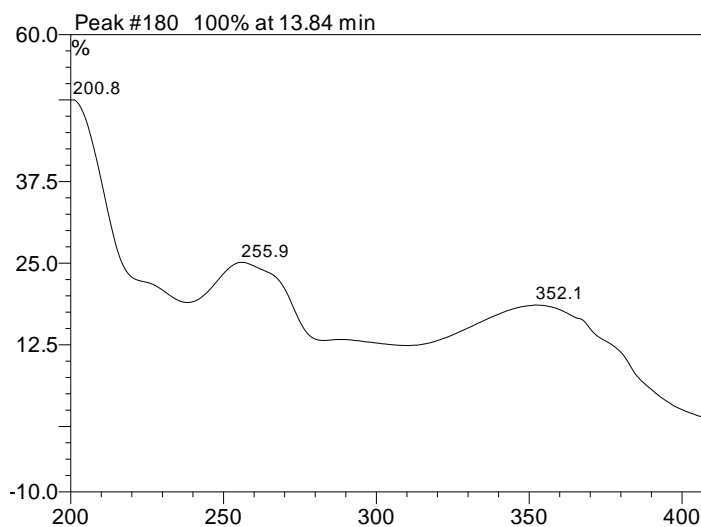
Fonte: SAMPAIO et al, 2018.

Figura 29. Cromatograma em HPLC-C18 da fração Hexano/AcOEt [6:4] obtida por EFS-Celite. Detecção no UV. 254 nm. Espectro UV 254 nm – possível correspondência com Rutina



Fonte: O autor, 2021.

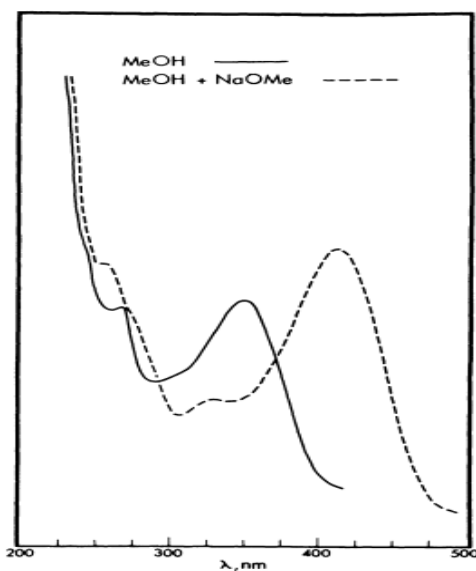
Figura 30. Cromatograma em HPLC-C18 da fração EtOH obtida por EFS-Si. Detecção no UV. 254 nm. Espectro UV 254 nm - possível correspondência com Rutina



Fonte: O autor, 2021.

Para o flavonoide 4',5,7-triidróxi-3',5'-dimetoxiflavona, foi obtido na literatura o espectro UV correspondente:

Figura 31. Espectro UV para a 4',5,7-triidróxi-3',5'-dimetoxiflavona



Fonte: MABRY; MARKHAM; THOMAS; 1970.

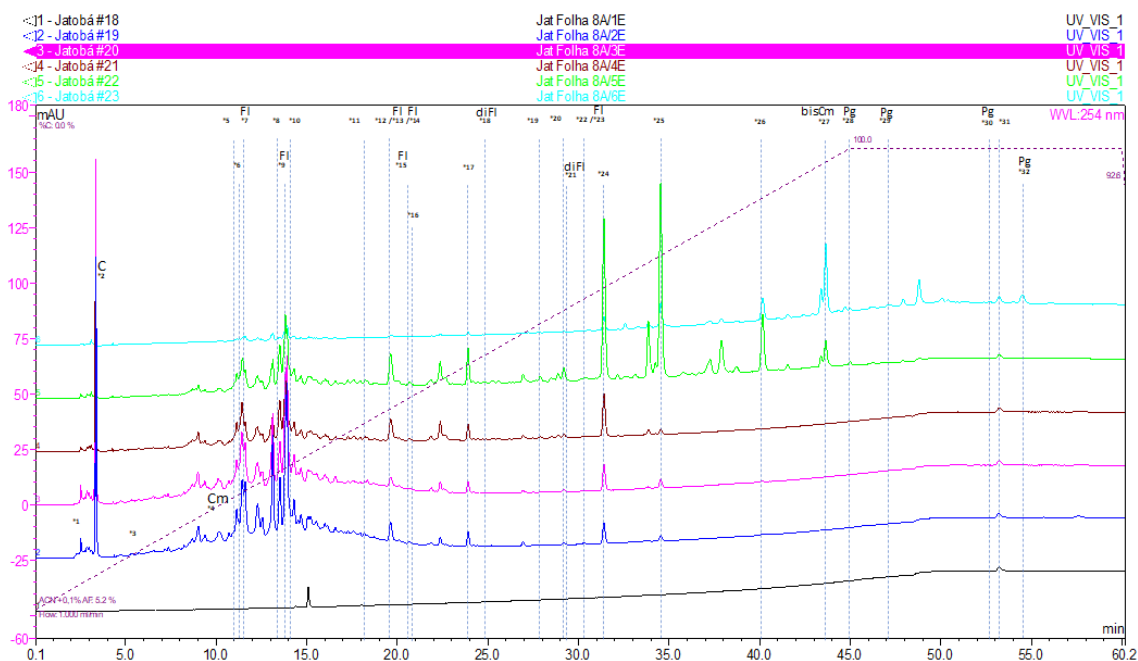
Para os demais flavonoides, não foi possível encontrar os espectros UV correspondentes na literatura.

Quanto às flavonas reportadas na literatura para o gênero *Hymenaea*, foram obtidos os valores de λ_{\max} . Para o Chrysoeriol, encontrou-se os valores de 254 e 354 nm. Para a Tricina, 269, 346 e 349 nm. Por fim, quanto à Luteolina, encontraram-se os valores de 254, 268 e 348 nm (UMBETOVA et al, 2004) (JUNG et al, 2004) (LI et al, 2016).

Os cromatogramas das frações obtidos nos vários experimentos de EFS foram registradas em diversos comprimentos de onda, mas para a discussão que segue considerou-se que os cromatogramas registrados em 254 nm são suficientemente representativos.

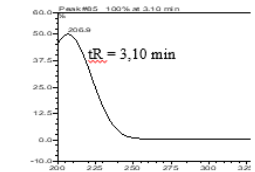
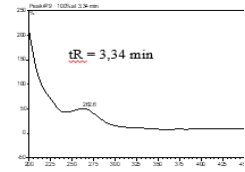
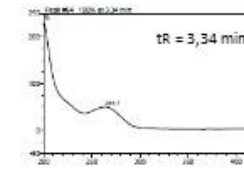
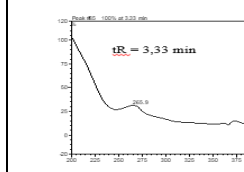
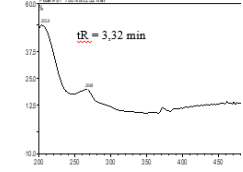
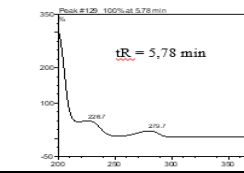
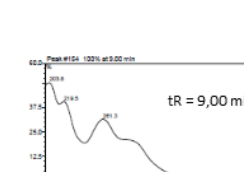
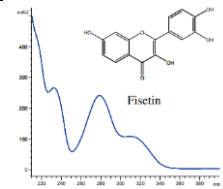
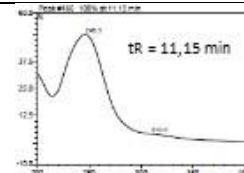
Inicialmente deve-se destacar que apenas na EFS-C18 obteve-se recuperação quase completa (97,3%) da amostra aplicada, e por isso foi usada como referência para análise tentativa das classes de substâncias presentes. Note-se que além dos flavonoides e derivados cinamofílicos, várias bandas cujos espectros no UV apresentaram máximos de absorção na região de 235-250 nm e a estas não foi possível ainda atribuir que classe de metabólicos representam (Figura 32 e Figura 12)

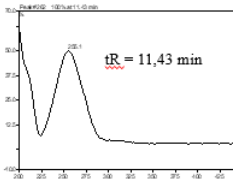
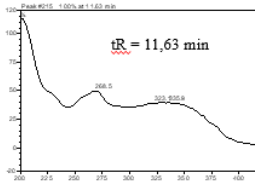
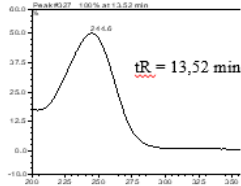
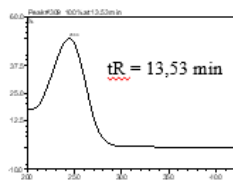
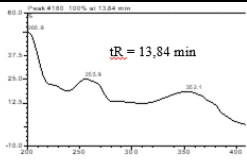
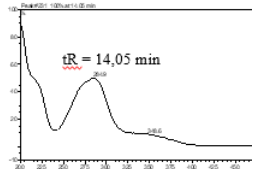
Figura 32. Cromatograma em HPLC-C18 das frações obtidas por EFS-C18. Preto: Água – Azul escuro:Água/EtOH [8:2] – Rosa: [6:4] – Vinho: [4:6] – Verde: [2:8] – Azul claro: EtOH . Demais frações não apresentaram massa suficiente para análise. Detecção no UV a 254 nm.

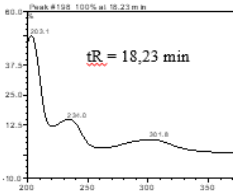
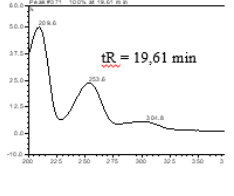
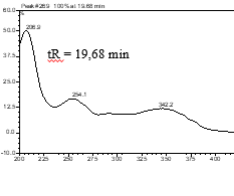
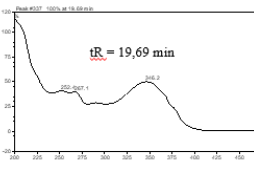
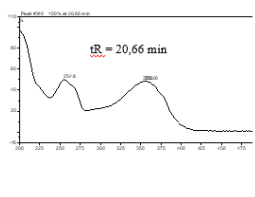


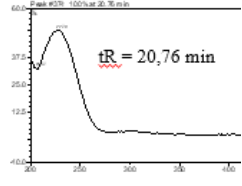
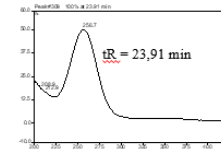
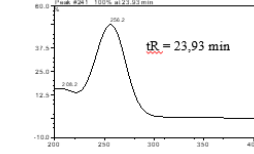
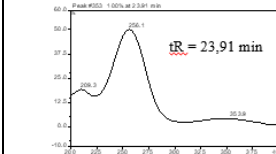
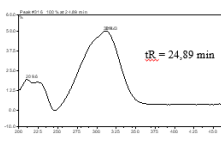
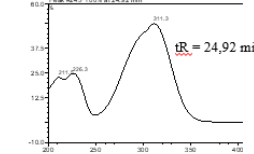
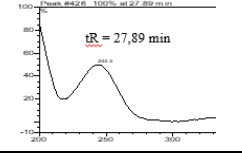
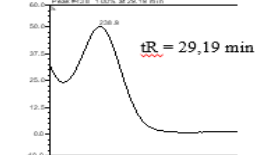
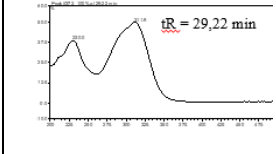
Fonte: O autor, 2021.

Tabela 12. Comparação de espectros no UV/Vis obtidos nas análises das frações de extratos de *H. courbaril* por HPLC-DAD

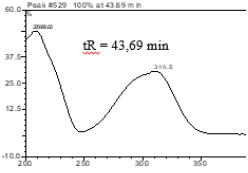
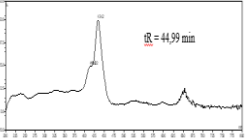
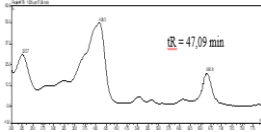
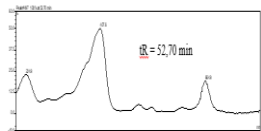
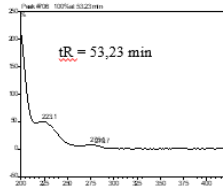
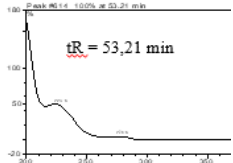
Pico #	tR (min)	C18	Sílica	Celite	Sí + Carvão	Carvão	Classe PN
1	3,10						
2	3,32-3,34						Catequina
3	5,78						
4	9,00						 Fisetina (provavelmente glicosilada)
5	11,15						

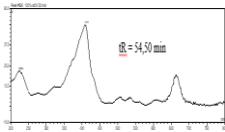
6	11,43						
7	11,63						Flavonol (Quercetina deriv.)
8	13,52						
9	13,84						Flavonol (Quercetina deriv.)
10	14,05						

11	18,23		 <p>Peak #158 100% at 18.23 min tR = 18,23 min</p>			
12	19,61			 <p>Peak #171 100% at 19.61 min tR = 19,61 min</p>		
13	19,68	 <p>Peak #210 100% at 19.68 min tR = 19,68 min</p>				Flavonol (Campferol deriv.)
14	19,69		 <p>Peak #137 100% at 19.69 min tR = 19,69 min</p>			Flavonol (Quercetina deriv.)
15	20,66		 <p>Peak #161 100% at 20.66 min tR = 20,66 min</p>			Rutina ou Flavonol (Quercetina deriv.)

16	20,76						
17	23,91						
18	24,89						Cinamoil deriv.
19	27,89						
20	29,19						
21	29,22						Astilbina ou (dihydroflavonol deriv.)

22	31,41						
23	31,44						Flavonol (Campferol deriv.)
24	31,45						
25	34,54						
26	40,14						
26a	43,41						

27	43,69						Biscoumarina
28	44,99						Pigmento
29	47,09						Pigmento
30	52,70						Pigmento
31	53,21						

32	54,50					 A chromatogram plot with a y-axis labeled 'Absorbance' ranging from 0 to 1.0 and an x-axis labeled 'Time (min)' ranging from 0 to 60. A prominent peak is observed at 54.50 minutes, reaching an absorbance of approximately 0.8. A smaller peak is visible at approximately 10 minutes. The text '54.50 min' is printed in red above the main peak.	Pigmento
----	-------	--	--	--	--	--	----------

Fonte: O autor, 2021.

Conforme demonstram os dados expressos na Tabela 12, com base nos espectros no UV, foi possível obter indícios sobre a possível presença de classes de substâncias, comparando-se com os espectros da literatura:

- Catequina: C18, Sílica, Celite e Carvão (retenção entre 3,32 - 3,34 min);
- Fisetina: Sílica (retenção em 9 min);
- Flavonol (quercetina deriv.): C18 (retenção em 11,63 min), Sílica (retenção em 13,84 min) e Celite (retenção em 19,69 min);
- Flavonol (campferol deriv.): C18 (retenção em 19,68 e 31,44 min);
- Rutina ou Flavonol (quercetina deriv.): Celite (retenção em 20,66 min);
- Cinamoil deriv.: C18 e Sílica (retenção em 24,89 min);
- Astilbina ou diidroflavonol deriv.: Celite (retenção em 29,22 min);
- Angelitina: Sílica + Carvão (retenção em 43,41 min);
- Biscoumarina: Sílica (retenção em 43,69 min);
- Pigmento: C18 (retenção em 44,99 min), Celite (retenção 47,09 e 52,70 min) e Carvão (retenção em 54,50 min).

Nos testes de fracionamento os extratos hidro-alcoólico e hexânico foram misturados na proporção em que foram obtidos das folhas (100:1 m/m) para se obter uma mistura mais representativa dos metabólicos da planta.

Foram avaliados 11 adsorventes, sendo quatro apolares (C18, XAD-4, Diaion HP20 e carvão ativado), quatro polares (celite, celulose, alumina, sílica), dois intermediários (poliamida e polivinilpirrolidona-PVPP) e um adsorvente misto (Sílica + carvão ativado 1:1 m/m). Os experimentos com alumina e PVPP apresentaram problemas experimentais e não serão apresentados neste relatório.

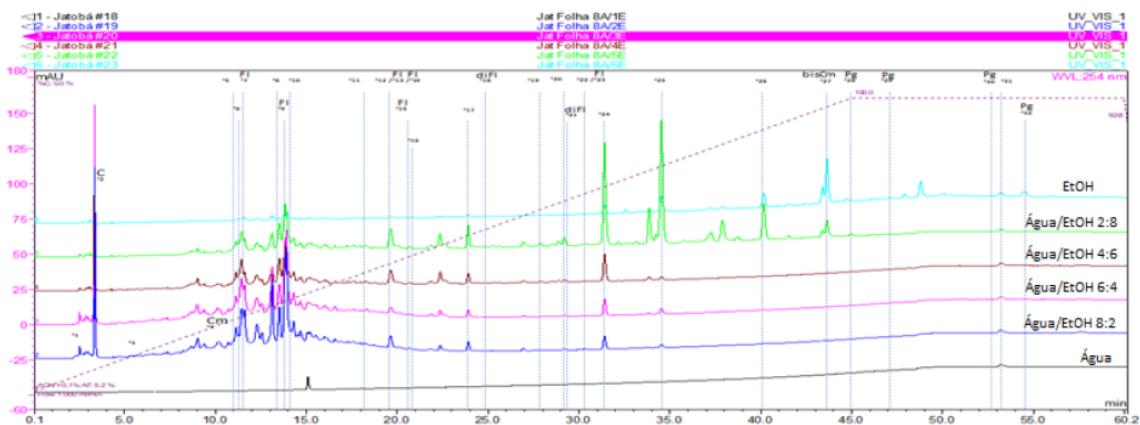
Na comparação dos perfis cromatográficos e rendimentos obtidos para com os fracionamentos usando adsorventes apolares (

Figura 33) destaca-se a baixa recuperação obtida com as resinas de poliestireno-divinilbenzeno (XAD-4 e Diaion HP20). O mesmo ocorreu com carvão ativado, mas nesse caso obteve-se uma fração, eluída com AcOEt, onde predominam as bandas com retenção entre 30 – 40 min. O baixo rendimento obtido para esses três adsorventes pode ser explicado

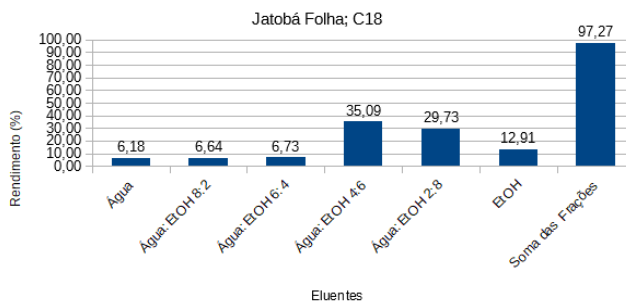
pela grande afinidade que possuem por compostos aromáticos e pigmentos. Uma fração similar também foi obtida com EFS-C18 (Água-EtOH 2:8), mas nesse caso há ainda com presença significativa das bandas com retenção entre 10-25 min.

Figura 33. Comparação do perfil cromatográfico (254 nm) das frações obtidas por EFS usando adsorvente apolares.

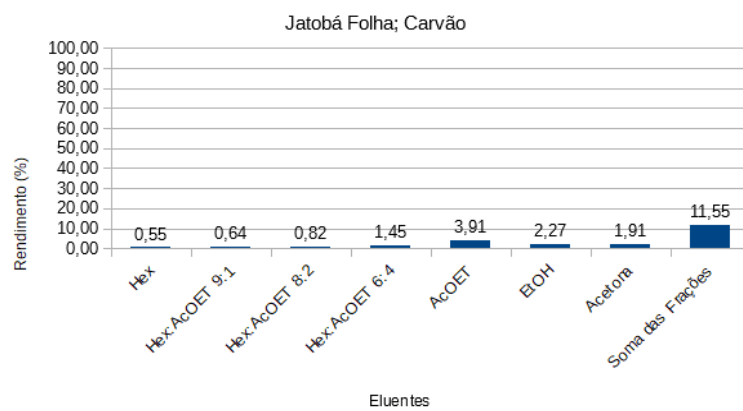
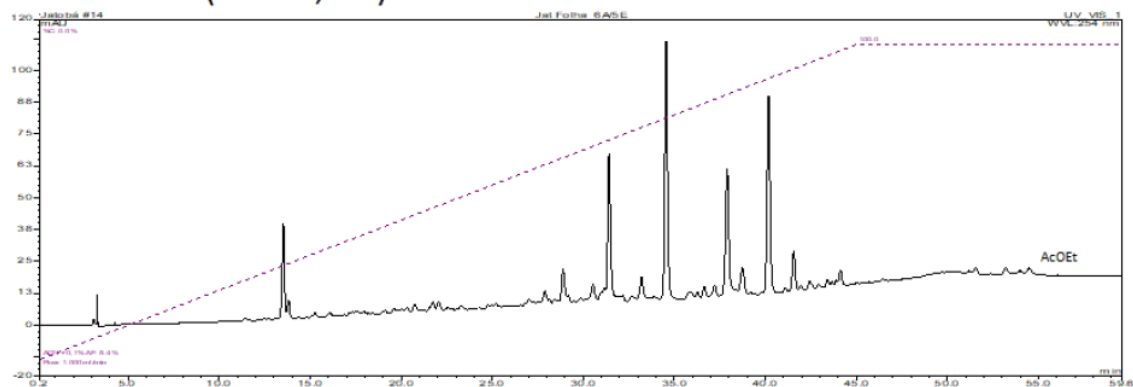
EFS-C18 (Rec 97,3%)



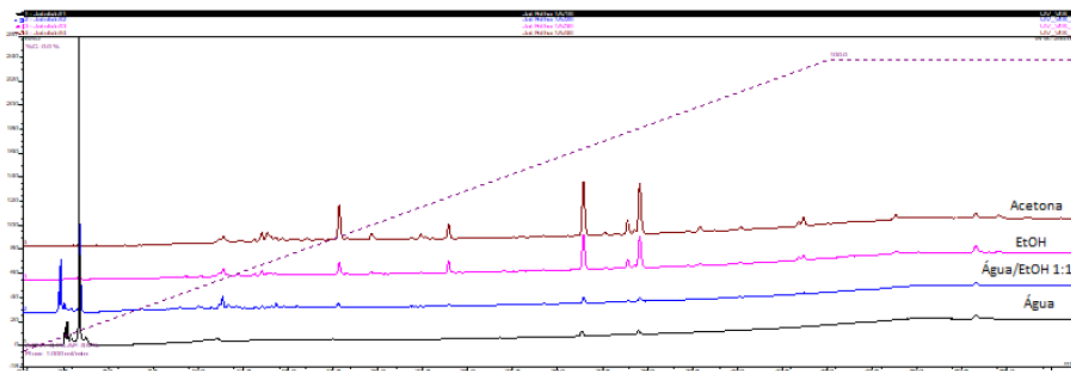
Rendimento em Massa

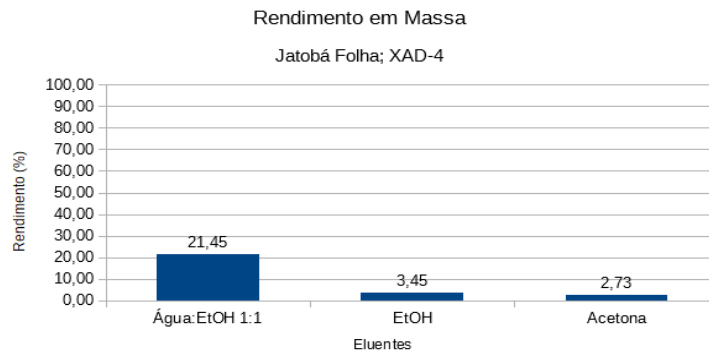


EFS-Carvão (Rec 11,6 %)

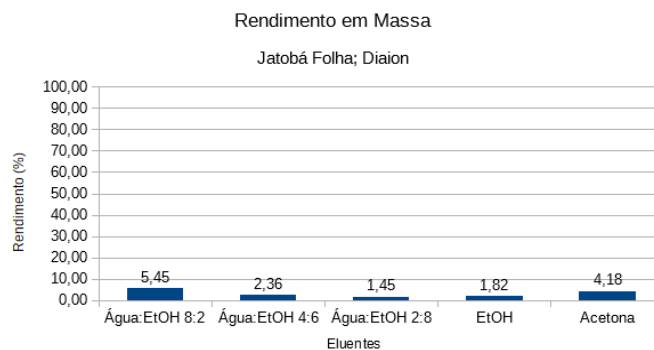
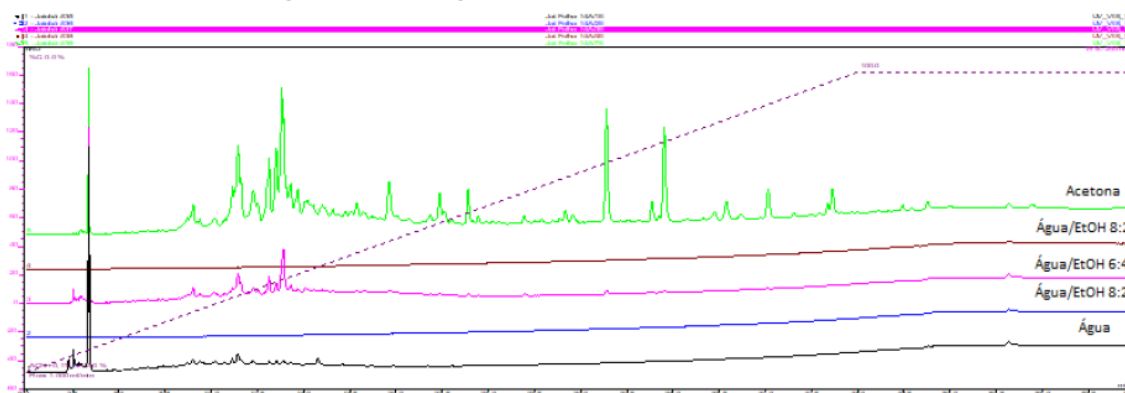


EFS-XAD4 (Rec 27,2%)





EFS-Diaion HP20 (Rec 15,3 %)

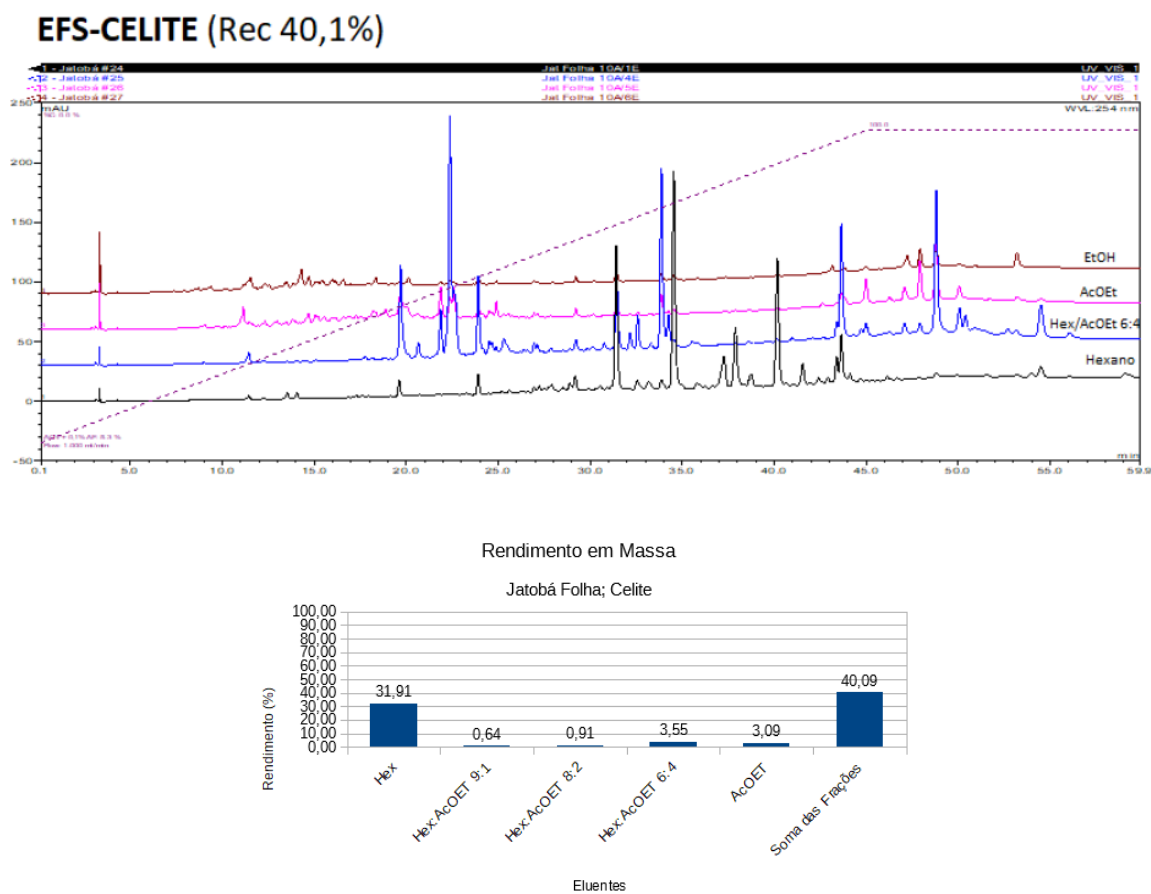


Fonte: O autor, 2021.

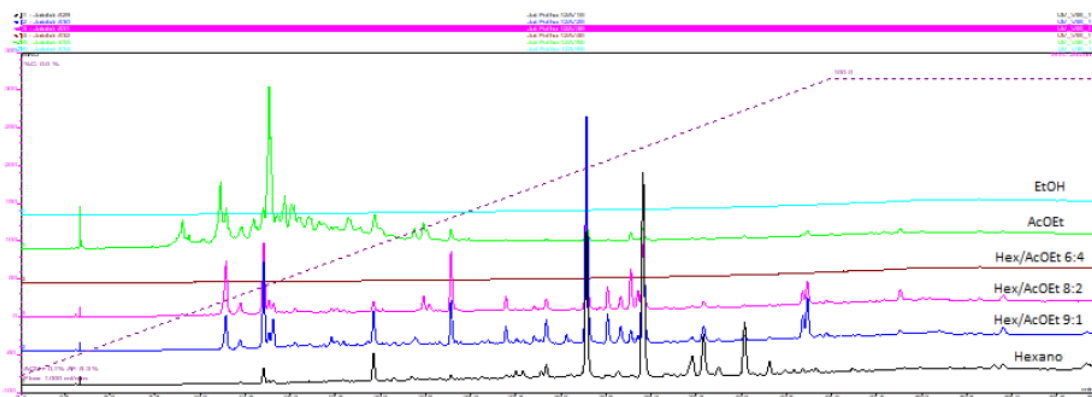
No caso dos adsorventes polares, os melhores rendimentos foram obtidos com EFS-Celite e EFS-Celulose. As frações eluidas com hexano desses dois adsorventes apresentam composições similares. As frações seguintes EFS-Celite (Hex/AcOEt 6:4) e EFS-Celulose (Hex/AcOEt 9:1 e 8:2) estão com predomínio dos compostos intermediário, com retenção entre 10-40 min, sem contaminação com as bandas com retenção entre 10-25 min que

provavelmente se referem a taninos. Sílica e Sílica + Carvão também apresentaram boa seletividade para obtenção de frações simplificadas, mas com rendimentos menores. Poliamida não apresentou boa seletividade no fracionamento, além da baixa recuperação da amostra aplicada (Figura 34).

Figura 34. Comparação do perfil cromatográfico (254 nm) das frações obtidas por EFS usando adsorvente polares, adsorvente misto e intermediário.

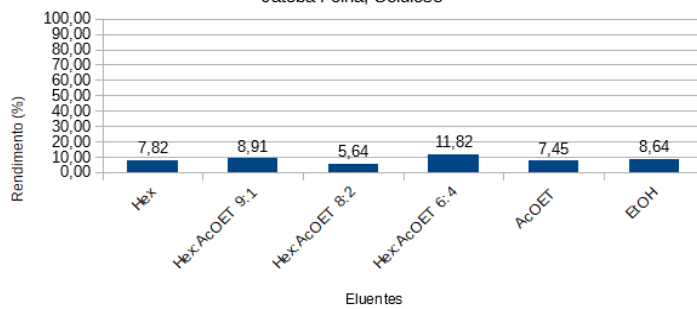


EFS-Celulose (Rec 50,3 %)

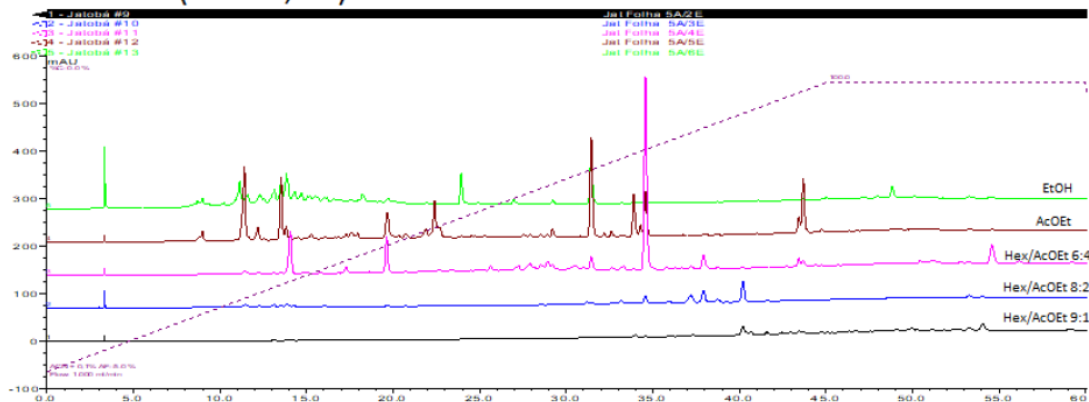


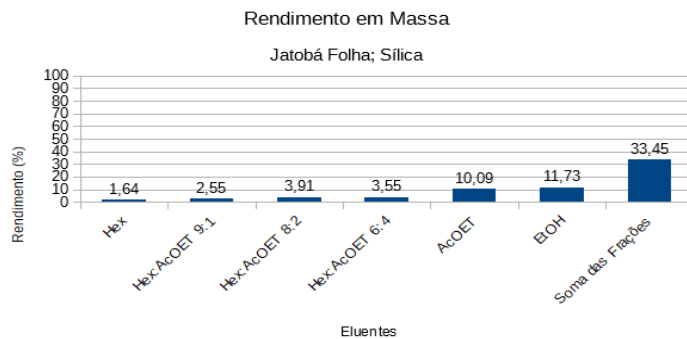
Rendimento em Massa

Jatobá Folha; Celulose

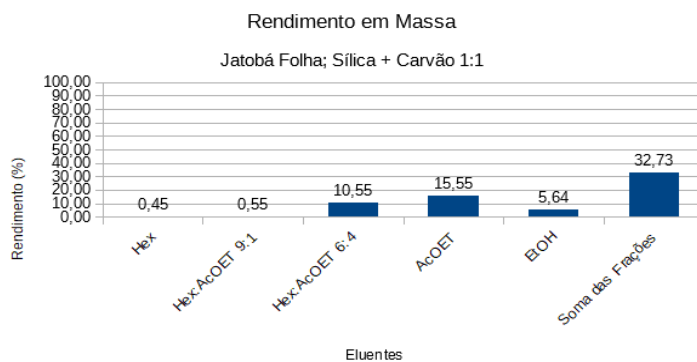
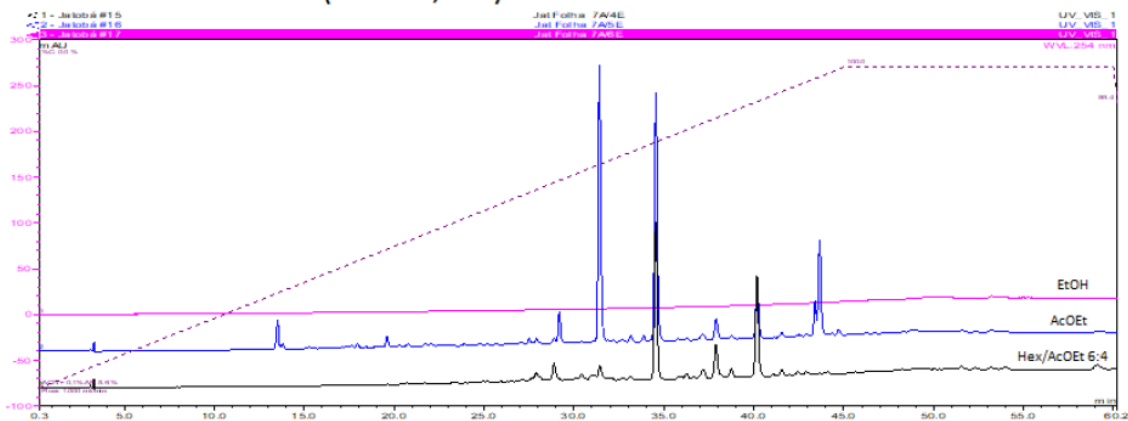


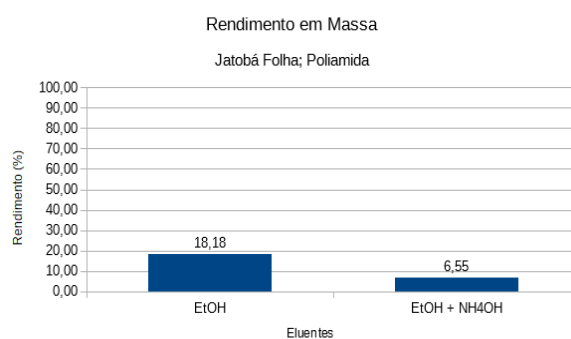
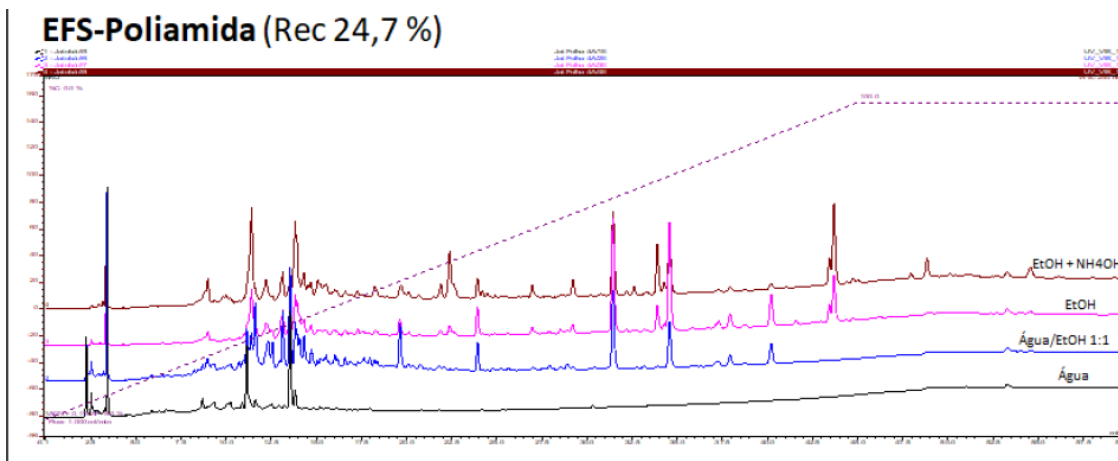
EFS-Silica (Rec 33,5%)





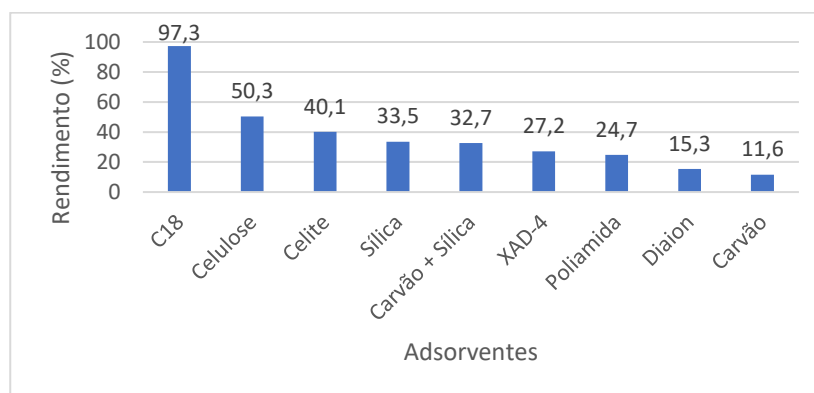
EFS-Silica + Carvão (Rec 32,7 %)





Fonte: O autor, 2021.

Figura 35. Rendimento em massa para cada adsorvente



Fonte: O autor, 2021.

Por fim, a última classe de compostos sobre a qual foi possível obter informações sobre o espectro UV foi das Cumarinas. Para a Hymenaina, conforme a literatura, os valores de λ_{max} reportados são 351, 303, 257 e 215 nm. Para a Ipomopsina, são 350, 303, 257, 203 e 21 nm (SIMÕES et al, 2009) (ARISAWA et al, 1984).

5. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos indicaram baixa recuperação da amostra para a maioria dos adsorventes avaliados, tanto polares quanto apolares. Avaliações mais detalhadas, que incluem testes em replicata e usando outros eluentes mais fortes são necessárias para se certificar quais tipos de constituintes ficam mais fortemente retidos em cada adsorvente.

Apesar dessa questão da recuperação, foi possível verificar que é possível realizar fracionamento rápido do extrato de folhas de *H. courbaril* usando adsorventes baratos e eluentes mais amigáveis tanto do ponto de vista ambiental quanto ocupacional. Como exemplo podem ser citados: EFS-Celite eluida com Hex/ACOEt; Silica+carvão eluida também com Hex/AcOEt e carvão eluido com AcOEt.

Experimentos qualitativos adicionais, envolvendo análises por LC-MS, podem proporcionar identificação mais robusta dos constituintes do extrato e frações obtidos.

6. REFERÊNCIAS

- ARISAWA, M.; KINGHORN, A. D.; CORDELL, G. A.; FANSWORTH, N. R. **Ipomopsin, a New Biscoumarin from Ipomopsis aggregata**. Journal of Natural Products. Vol 41. Pages 106-11. 1984
- BANDEIRA, P. N.; SANTOS, H. S.; ALBUQUERQUE, M. R. J. R.; LEMOS, T. L. G.; BRAZ-FILHO, R. **A new diterpene isolated from the resin of Hymenaea courbaril**. Chemistry of Natural Compounds. Vol 51. Page 693. 2015.
- BONIFACE, P. K.; FERREIRA, S. B.; KAISER, C. R. **Current state of knowledge on the traditional uses, phytochemistry, and pharmacology of the genus Hymenaea. J Ethnopharmacol**. Pages 193-223. Jul 12. 2017.
- CARNEIRO, E. **Identificação de glicosídeos na Hymenaea Martiana Hayne, Arzeik: estruturas e atividades farmacológicas**. Tese (Mestrado em Ciências) – Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, p. 239. 1989.
- 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**. International Journal of Pharmacognosy. Vol 31, Issue 1. Pages 38-46. 1993.
- CHAMBERS, C. S.; VALENTOVA, K.; KREN, V. **"Non-Taxifolin" Derived Flavonolignans: Phytochemistry and Biology**. Current Pharmaceutical Design. Vol 21, Issue 38. Pages 5489-5500. 2015.
- COSTA, M. P.; BOZINIS, M. C.; ANDRADE, W. M.; COSTA, C. R.; SILVA, A. L.; ALVES, C. M. O.; FERNANDES, O.; SOUZA, L. K.; SILVA, M. **Antifungal and cytotoxicity activities of the fresh xylem sap of Hymenaea courbaril L. and its major constituent fisetin**. BMC complementary and alternative medicine. Vol. 14. 2014.
- DOBASHI, Y.; HIRANO, T.; HIRANO, M.; OHKATSU, Y. **Antioxidant and photo-antioxidant abilities of catechins**. Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry. Volume 197, Issues 2–3. Pages 141-148. 2008.

FANZONE, M.; NEIRA, A.P.; ASSOFF, V. J. M.; ZAMORA, F. **Phenolic Characterization of Malbec Wines from Mendoza Province (Argentina)**. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 58 (4), 2388-2397. 2010.

FARAMAWY, S. M.; RIZK, A. R. **Spectrophotometric Studies on Antioxidants-Doped Liposomes**. J Am Sci. 7. 2011.

JUNG, M. J.; KANG, S. S.; JUNG, H. A.; KIM, G. J.; CHOI, J. S. **Isolation of flavonoids and a cerebroside from the stem bark of Albizzia julibrissin**. Arch Pharm Res. Jun;27(6):593-9. 2004.

KIM, S.; KIM, S. H.; KIM, I. S.; LEE, D.; DONG, M. S.; NA, C. S.; NHIEM, N. X.; YOO, H. H. **Simultaneous determination of bioactive phenolic compounds in the stem extract of Rhus verniciflua stokes by high performance liquid chromatography**. Food Chemistry, Volume 141. Issue 4. Pages 3813-3819. 2013.

LEE, H. S.; JUNG, J. I.; KIM, K. H.; PARK, S. J.; KIM, E. J. **Toxicodendron vernicifluum Stokes extract inhibits solid tumor growth and lung metastasis of 4T1 murine mammary carcinoma cells in BALB/c mice**. PLoS One. Nov 5;15(11). 2020.

LEE, Y.; LANGENHEIM, J. H. **Systematics of the genus Hymanaea L. (Leguminosae, Caesalpinioideae, Detarieae)**. Berkeley: University of California publications in Botany, 1975.

Li, M.; PU, Y.; YOO, C. G.; RAGAUSKAS, A. J. **The occurrence of tricetin and its derivatives in plants**. Green Chemistry. Issue 6. 2016.

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

MABRY, T.J.; MARKHAM, K. R.; THOMAS, M. B. **The Ultraviolet Spectra of Flavones and Flavonols**. In: **The Systematic Identification of Flavonoids**. Springer, Berlin, Heidelberg. 1970.

MELO, M. G. G.; MENDES, A. M. S. **Jatobá**. Informativo Técnico Rede de Sementes da Amazônia, Manaus, n. 9, 2011. Disponível em:

<http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-19652011000100007>.

Acesso em: 02 fev. 2021.

PAWAR, H. A. **A review on extraction, analysis and biopotential of rutin.** International journal of chemical and pharmaceutical analysis. Volume 6, Issue 3. Pages 1-5. 2009.

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*.** J. Nat. Prod., 66, 259-262. 2003.

PONRASU, T.; CHARLES, R. E.; SIVAKUMAR, R.; DIVAKAR, S. **Syntheses of α -tocopheryl glycosides by glucosidases.** Biotechnology letters. 30. 2008.

PRASAD, R.; PRASAD, S. B. **Histoprotective effect of rutin against cisplatin-induced toxicities in tumor-bearing mice: Rutin lessens cisplatin-induced toxicities.** Hum Exp Toxicol. Feb;40(2):245-258. 2021.

SAMPAIO, P.; SÁ, G. R.; ANDREZZA, N.; FILHO, A. J.; ROLIM, L. **Development and validation of a high-performance liquid chromatography-diode array detection (HPLC-DAD) method for the quantification of rutin and isoquercetin in *Morus nigra* L. (Moraceae).** African Journal of Biotechnology. 17. 1048-1056. 2018.

SHI, J.; XIAOYI, J. S.; GUIPING, J. S.; CHENG, M. Z.; WANG, J.; YANG, B.; JIANG, Y. **Identification of (-)-epicatechin as the direct substrate for polyphenol oxidase from longan fruit pericarp.** LWT - Food Science and Technology, Volume 41. Issue 10. Pages 1742-1747. 2008.

SIMÕES, K.; DU, J.; PESSONI, R. A. B.; LOPES, E. M. C.; VIVANCO, J. M.; STERMITZ, F. R.; BRAGA, M. R. **Ipomopsin and hymenain, two biscoumarins from seeds of *Hymenaea courbaril*.** Phytochemistry Letters, Volume 2, Issue 2. Pages 59-62. 2009.

UMBETOVA, A. K., ESIRKEGENOVA, S. Z., CHAUDRI, I.M. et al. **Flavonoids of Plants from the Genus *Tamarix*.** Chemistry of Natural Compounds 40, 297–298. 2004.