



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE
SANTANA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOTECNOLOGIA**



FERNANDA GRANJA DA SILVA OLIVEIRA

**ESTUDO FITOQUÍMICO E INCORPORAÇÃO DO EXTRATO
ETANÓLICO DE *Hymenaea martiana* HAYNE (FABACEAE) EM
UMA FORMULAÇÃO FITOCOSMÉTICA**

Feira de Santana, BA
2019

FERNANDA GRANJA DA SILVA OLIVEIRA


**ESTUDO FITOQUÍMICO E INCORPORAÇÃO DO EXTRATO
ETANÓLICO DE *Hymenaea martiana* HAYNE (FABACEAE) EM
UMA FORMULAÇÃO FITOCOSMÉTICA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, da Universidade Estadual de Feira de Santana como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

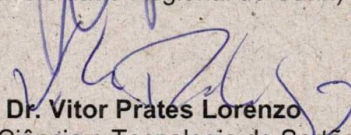
Orientador: Prof. Dr. Jackson Roberto Guedes da Silva Almeida

Feira de Santana, BA
2019

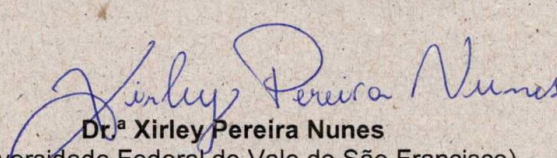
BANCA EXAMINADORA



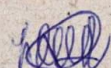
Dr. Irwin Rose Alencar de Menezes
(Universidade Regional do Cariri)



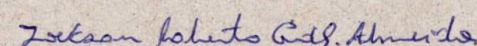
Dr. Vitor Prates Lorenzo
(Instituto Federal de Ciência e Tecnologia do Sertão Pernambucano)



Dr.ª Xirley Pereira Nunes
(Universidade Federal do Vale do São Francisco)



Dr.ª Livia Macedo Dutra
(Universidade Federal do Vale do São Francisco)



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

Petrolina – PE
2019

Ficha Catalográfica – Biblioteca Central Julieta Carteado

O47e Oliveira, Fernanda Granja da Silva
Estudo fitoquímico e incorporação do extrato etanólico de *Hymenaea martiana* Hayne (Fabaceae) em uma formulação fitocosmética. / Fernanda Granja da Silva Oliveira. – Feira de Santana, 2019.
190f.: il.

Orientador: Jackson Roberto Guedes da Silva Almeida

Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Feira de Santana. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2019.

1.Cosméticos naturais. 2.Flavonoides. 3.Filtro solar. 4.Produtos naturais. I.Almeida, Jackson Roberto Guedes da Silva, orient. II.Universidade Estadual Feira de Santana. III.Título.

CDU: 66.0

RESUMO

Hymenaea martiana, conhecida como “jatobá”, apresenta grande potencial fitoquímico, porém, ainda não foi relatado o desenvolvimento de produtos farmacêuticos ou cosméticos com esta espécie. Diante deste contexto, este trabalho teve como objetivo realizar um estudo fitoquímico do extrato das cascas de *Hymenaea martiana* e incorporá-lo em uma formulação fitocosmética com ação fotoprotetora. Para isso, as cascas foram submetidas à extração acelerada por solvente com etanol, sendo o extrato bruto (HM-EEB) concentrado e particionado. No estudo fitoquímico, foram determinados os compostos fenólicos e flavonoides totais, além das atividades fotoprotetora, antioxidante e antimicrobiana *in vitro*. Uma análise por CLAE-EM e um perfil cromatográfico em CLAE-DAD foi realizada com o extrato bruto e a fração Hm-Fr.AcOEt. Três flavonoides foram isolados por Sephadex[®] e identificados por RMN. Uma aplicação tecnológica foi demonstrada com a incorporação do extrato e um filtro químico em uma base cosmética. No estudo fitoquímico, o extrato bruto e a fração acetato apresentaram melhores resultados de doseamento, com atividade fotoprotetora, antimicrobiana e antioxidante significativas, com forte correlação entre as atividades e os compostos fenólicos. Por CLAE-DAD, 18 flavonoides bioativos foram identificados. O perfil cromatográfico apresentou quatro flavonoides majoritários com espectro DAD-UV sugestivo para astilbina e seus isômeros, e três desses foram identificados por RMN como neoastilbina, astilbina e isoastilbina. Na etapa de incorporação, foi observado um possível efeito sinérgico entre o extrato e o filtro químico, e a formulação F4 foi considerada um produto promissor. Os resultados evidenciam o potencial cosmético de *Hymenaea martiana*, uma planta nativa do nordeste brasileiro com um grande potencial biotecnológico e terapêutico.

Palavras-chave: Cosméticos naturais. Fotoprotetores naturais. Flavonoides. Filtro Solar. Produtos naturais.

ABSTRACT

Hymenaea martiana, known as “jatobá”, has great phytochemical potential, but the development of pharmaceutical or cosmetic products with this species has not been reported yet. Given this context, this study aimed to develop a phytochemical study of extract of the barks of *Hymenaea martiana* and incorporate the extract in a phytocosmetic formulation with photoprotective action. For this, the barks were subjected to accelerated solvent extraction with ethanol, the crude extract (HM-BSE) being concentrated and partitioned. In the phytochemical study, total phenolic and flavonoid compounds were determined, in addition to photoprotective, antioxidant and antimicrobial activities *in vitro*. An analysis by HPLC-MS and a chromatographic profile in HPLC-DAD was performed with the Hm-Fr.AcOEt fraction. Three flavonoids were isolated by Sephadex® and identified by NMR. A technological application has been demonstrated with the incorporation of the extract and a chemical filter on a cosmetic basis. In the phytochemical study, Hm-EEB and the Hm-Fr.AcOEt fraction presented better dosing results with significant photoprotective, antimicrobial and antioxidant activity, with a strong correlation between activities and phenolic compounds. By CLAE-DAD, 18 bioactive flavonoids were identified. The chromatographic profile presented four major flavonoids with DAD-UV spectrum suggestive of astilbin and its isomers, and three of them were identified by NMR as neoastilbin, astilbina and isoastilbin. In the incorporation step, a synergistic effect was observed between the extract and the chemical filter, and the F4 formulation was considered a promising product. The results show the cosmetic potential of *Hymenaea martiana*, a native plant from the Brazilian northeast with great biotechnological and therapeutic potential.

Keywords: Natural cosmetics. Natural photoprotectives. Flavonoids. Sunscreen. Natural products.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Rotas biossintéticas do metabolismo primário e suas relações com o metabolismo secundário (ou especial).	14
Figura 2	Exemplos de ácidos fenólicos.	17
Figura 3	Estrutura básica dos flavonoides.	18
Figura 4	Estrutura básica das principais classes de flavonoides.	18
Figura 5	Componentes do espectrômetro de massas.	21
Figura 6	<i>Hymenaea martiana</i> .	34
Figura 7	Compostos fenólicos já identificados em <i>Hymenaea martiana</i> .	37
Figura 8	Identificação botânica de <i>Hymenaea martiana</i> . Exsicata n° 6444.	40
Figura 9	Equipamento de Extração Acelerada por Solventes (ASE) Thermo Scientific Dionex® ASE 350.	42
Figura 10	Evaporador Thermo Scientific Rocket Evaporator®.	43
Figura 11	Esquema representativo do processo de partição líquido-líquido do Hm-EEB.	43
Figura 12	Reação do ácido gálico com o reagente de Folin-Ciocalteu	44
Figura 13	Processo de fracionamento em cromatografia em coluna (Sephadex-LH20®) com a fração Hm-Fr.AcOEt do extrato das cascas de <i>Hymenaea martiana</i> .	50
Figura 14	Fracionamento cromatográfico da fração acetato de etila (Hm-Fr.AcOEt) do extrato das cascas de <i>Hymenaea martiana</i> .	51
Figura 15	Varreduras de 260 a 400 nm com o Hm-EEB, quercetina e filtro químico UVAB (FQ UVAB)	58
Figura 16	Cromatograma UV (190 – 700 nm) obtido com a análise em CLAE-EM da fração Hm-Fr.ActOEt.	61
Figura 17	Cromatograma obtido com a fração Hm-Fr.AcOEt	69
Figura 18	Espectro DAD-UV dos três compostos majoritários da fração Hm-Fr.AcOEt	70
Figura 19	Dihidroflavonoides majoritários identificados na fração Hm-Fr.AcOEt de <i>H. martiana</i> .	74
Figura 20	Número de dos pedidos de patentes depositados por base de dados com o gênero <i>Hymenaea</i> .	75
Figura 21	Distribuição de dos pedidos de patentes depositados nas bases de dados com o gênero <i>Hymenaea</i> .	76
Figura 22	Evolução anual dos pedidos de patentes depositados nos últimos 22 anos com o gênero <i>Hymenaea</i> .	77
Figura 23	Formulações preparadas em gel Carbopol® com ação fotoprotetora a partir do extrato das cascas de <i>H. martiana</i> .	79
Figura 24	Formulação F1 composta por base gel Carbopol® + Filtro UVAB 5% após 12 horas de manipulação	80
Figura 25	Espalhabilidade das formulações fotoprotetoras (F1-F4) antes (T0) e depois (T12) do estudo de estabilidade preliminar.	82
Figura 26	FPS das formulações de gel Carbopol®.	84

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Metabólitos secundários com interesse terapêutico e sua origem biossintética.	15
Tabela 2	Classes de compostos fenólicos encontrados em plantas	16
Tabela 3	Exemplos de técnicas hifenadas e suas características.	22
Tabela 4	Alguns flavonoides e ácidos fenólicos com atividade fotoprotetora.	32
Tabela 5	Distribuição por CIP dos pedidos de patentes depositados com o gênero <i>Hymenaea</i> .	
Tabela 6	Formulação da base gel de Carbopol®.	53
Tabela 7	Composição das formulações fotoprotetoras.	53
Tabela 8	Teor de compostos fenólicos totais e flavonoides totais do Hm-EEB e frações.	56
Tabela 9	Atividade antioxidante e fotoprotetora do Hm-EEB e Hm-Fr.AcOEt.	57
Tabela 10	Correlação entre o teor de compostos fenólicos totais, atividade antioxidante (sequestro do radical DPPH) e FPS.	59
Tabela 11	CIMs e CBMs do Hm-EEB e Hm-Fr.AcOEt.	59
Tabela 12	CIMs e CFMs do Hm-EEB e Hm-Fr.AcOEt.	60
Tabela 13	Flavonoides detectados por desreplicação (CLAE-EM) a partir da fração Hm-Fr.AcOEt, obtida a partir do extrato bruto das cascas de <i>Hymenaea martiana</i> .	62
Tabela 14	Atividade antioxidante e FPS das frações obtidas a partir do fracionamento em coluna Sephadex-LH20® da Fração Hm-Fr.AcOEt.	71
Tabela 15	Dados espectrais obtidos por RMN (400 e 100 MHz para ¹ H e ¹³ C, respectivamente) para os compostos majoritários das cascas de <i>Hymenaea martiana</i> .	72
Tabela 16	Distribuição por CIP dos pedidos de patentes depositados com o gênero <i>Hymenaea</i> .	78
Tabela 17	Controle de qualidade físico-químico das formulações-teste com o extrato das cascas de <i>H. martiana</i> antes e depois do ciclo de gelo/degelo.	80
Tabela 18	Atividade antioxidante e fotoprotetora das formulações preparadas com extrato das cascas de <i>H. martiana</i> .	83

ABREVIATURAS

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AS – Atividade Sequestrante
ASE – Extração Acelerada por Solvente
CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CBM – Concentração Bactericida Mínima
CC – Cromatografia em Coluna
CCD – Cromatografia em Camada Delgada
CFM – Concentração Fungicida Mínima
CG – Cromatografia Gasosa
CIM – Concentração Inibitória Mínima
CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLAE-DAD - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detector de arranjo diodo
CLAE-EM - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada ao espectrômetro de massas
CP – Cromatografia Planar
EC – Equivalentes de Catequina
EE – Efeito Eritematogênico
EI – Ionização por Elétrons
EM – Espectrometria de Massas
EPO – European Patent Office
EqAG – Equivalentes de Ácido Gálico
ERN – Espécie Reativa de Nitrogênio
ERO – Espécie Reativa de Oxigênio
FPS – Fator de Proteção Solar
GNPS – Global Natural Products Social Molecular Network
HM-EEB – Extrato Etanólico Bruto
Hm-Fr.AcOEt – Fração Acetato de Etila
Hm-Fr.CHCl₃ – Fração Clorofórmio
Hm-Fr.Hx – Fração Hexano
HVASF – Herbário da Universidade Federal do Vale do São Francisco
ESI – Ionização por Eletrospray
INPI – Instituto Nacional da Propriedade Industrial
INSA – Instituto Nacional do Semiárido
MALDI - Ionização e Dessorção a Laser Assistida por Matriz
m/z – Relação massa / carga
RMN – Ressonância Magnética Nuclear
TAA – Atividade Antioxidante Total
TEAC – Atividade Antioxidante Equivalente ao Trolox
TOF – *Time of Flight*
USPTO - United States Patent and Trademark Office
UV – Radiação Ultravioleta
UVAB – Radiação Ultravioleta nas faixas A e B.
WIPO - World Intellectual Property Organization

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	REVISÃO DA LITERATURA	13
2.1	METABOLISMO VEGETAL	13
2.1.1	Compostos fenólicos	15
2.1.2	Flavonoides	17
2.1.3	Fracionamento, isolamento, purificação e identificação / elucidação estrutural de metabólitos secundários	19
2.1.4	Técnicas hifenadas para a análise fitoquímica	22
2.2	FORMULAÇÕES COSMÉTICAS COM AÇÃO FOTOPROTETORA	23
2.2.1	A pele e a radiação solar	23
2.2.2	Fotoproteção	25
2.2.3	Formulações cosméticas com ação fotoprotetora	25
2.2.4	O papel dos antioxidantes	28
2.2.5	Atividade antimicrobiana	30
2.2.6	Fotoprotetores naturais	31
2.3	O GÊNERO <i>Hymenaea</i>	32
2.4	A ESPÉCIE <i>Hymenaea martiana</i>	33
3	OBJETIVOS	39
3.1	OBJETIVO GERAL	39
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	39
4	MATERIAIS E MÉTODOS	40
4.1	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	40
4.2	COLETA E PROCESSAMENTO DO MATERIAL VEGETAL	40
4.3	OBTENÇÃO DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO E FRAÇÕES	41
4.4	ESTUDO FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES	44
4.4.1	Determinação do teor de compostos fenólicos totais	44
4.4.2	Determinação do teor de flavonoides totais	45
4.4.3	Determinação do fator de proteção solar (FPS)	45
4.4.4	Determinação da atividade antioxidante	46
4.4.4.1	Sequestro do radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH)	46
4.4.4.2	Sequestro do radical ABTS ⁺	47
4.4.4.3	Determinação da capacidade antioxidante total – método do fosfomolibdênio	47
4.4.5	Avaliação da atividade antimicrobiana	48
4.4.5.1	Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)	48
4.4.5.2	Determinação da concentração bactericida mínima (CBM)	48
4.4.5.3	Determinação da concentração fungicida mínima (CFM)	48

4.4.6	Desreplicação e detecção de flavonoides em Hm-Fr.AcOEt, através de análise por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (CLAE-EM)	49
4.4.7	Perfil cromatográfico por HPLC-DAD da fração Hm-Fr.AcOEt	49
4.4.8	Fracionamento, isolamento, purificação e identificação estrutural de flavonoides da fração Hm-Fr.AcOEt	50
4.5	INCORPORAÇÃO DO EXTRATO ETANÓLICO DE <i>Hymenaea martiana</i> EM UMA FORMULAÇÃO FITOCOSMÉTICA	52
4.5.1	Prospecção tecnológica do gênero <i>Hymenaea</i>	52
4.5.2	Preparo da base em gel Carbopol®	52
4.5.3	Incorporação do extrato etanólico de <i>Hymenaea martiana</i> na base de gel Carbopol®	53
4.5.4	Controle de qualidade e estudo de estabilidade preliminar das formulações	53
4.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA	55
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	56
5.1	ESTUDO FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES <i>IN VITRO</i> DO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES	56
5.1.1	Determinação de compostos fenólicos totais, flavonoides totais, atividade fotoprotetora, antioxidante e antimicrobiana do extrato bruto e frações	56
5.1.2	Desreplicação e detecção de flavonoides em Hm-Fr.AcOEt, através de análise por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (CLAE-EM)	60
5.1.3	Fracionamento, isolamento, purificação e identificação estrutural de flavonoides da fração Hm-Fr.AcOEt	71
5.2	INCORPORAÇÃO DO EXTRATO ETANÓLICO DE <i>Hymenaea martiana</i> EM UMA FORMULAÇÃO FITOCOSMÉTICA COM AÇÃO FOTOPROTETORA	75
5.2.1	Prospecção tecnológica do gênero <i>Hymenaea</i>	75
5.2.2	Incorporação do extrato etanólico de <i>Hymenaea martiana</i> em uma formulação fitocosmética	78
6	CONCLUSÃO	85
	REFERÊNCIAS	86
	ANEXOS	105

1 INTRODUÇÃO

As plantas medicinais têm tido papel importante na terapêutica desde a antiguidade, e o seu valor como alternativa clínica vem ganhando destaque em políticas públicas de vários países ao redor do mundo. O Brasil vem acompanhando esta tendência, com a atualização de suas normas e legislações sanitárias, especialmente em relação a alguns critérios, como segurança, eficácia e qualidade de produtos farmacêuticos e cosméticos com matérias-primas ativas vegetais (BRASIL, 2014).

O desenvolvimento e produção de cosméticos tem apresentado grande direcionamento aos cosméticos naturais, e os consumidores têm demonstrado preferência na utilização de produtos que utilizem matérias-primas naturais, principalmente os derivados vegetais (IHA et al., 2008). Os produtos naturais com atividade antioxidante têm ganhado destaque, devido à diminuição dos efeitos indesejáveis em relação aos antioxidantes sintéticos, substâncias que estão sendo relacionadas à carcinogênese, reações alérgicas, hepatotoxicidade e aumento significativo da proliferação do retículo endoplasmático em nível celular (MELO; GUERRA, 2002; KRISHNAIAH et al., 2011).

Seguindo esta tendência no setor cosmético mundial, o desenvolvimento de fotoprotetores atualmente visa à inclusão de produtos naturais e extratos vegetais nas formulações (OLIVEIRA-JÚNIOR; ALMEIDA, 2012), principalmente matérias-primas com atividade antioxidante (POLONINI et al., 2011).

A radiação ultravioleta (UV) é uma faixa do espectro eletromagnético que se encontra entre 100-400 nm e está dividida em radiação UVA (320-400 nm), UVB (290-320 nm) e UVC (100-290 nm) (NASCIMENTO et al., 2009). Além das queimaduras solares e câncer de pele, a exposição às radiações UV também está relacionada ao envelhecimento cutâneo precoce, que pode ser explicado pela ação da redução das espécies reativas de oxigênio (EROs), extremamente danosas aos tecidos (VELASCO et al., 2008).

Por conta disso, compostos químicos naturais com atividades antioxidante e fotoprotetora, como por exemplo os flavonoides, têm demonstrado importante potencial farmacêutico e cosmético, devido às suas ações biológicas já relatadas. Os flavonoides destacam-se dentre as principais classes de produtos naturais, sendo caracterizados como polifenóis, e são compostos formados por um núcleo benzopirano ou cromano, ligado a um anel aromático, formando o núcleo fundamental “fenil-benzopirano”. Dentre as principais atividades farmacológicas associadas aos flavonoides, podem ser citadas atividade antioxidante (ALMEIDA et al., 2012), imunomoduladora, anti-inflamatória, bactericida, antiviral, hepatoprotetora e gastroprotetora (GUARDIA et al., 2001). Outra atividade que tem sido estudada é a atividade antimicrobiana (OLIVEIRA-JÚNIOR et al, 2012) e fotoprotetora (ALENCAR-FILHO et al., 2016) dos flavonoides.

Dentre as plantas medicinais encontradas no bioma Caatinga com sua composição rica em compostos fenólicos, destaca-se a *H. martiana* Hayne, conhecida popularmente no Nordeste brasileiro como “jatobá”. O jatobá tem sido tradicionalmente utilizado na forma de alimento, material para construção e na medicina tradicional, sendo utilizado na forma de extrato alcoólico e chás para o tratamento de anemia, gastrite, inflamações, reumatismo, e ainda como antinociceptiva e analgésica (NEVES et al., 1993; ANSELMO et al, 2012; GAZZANEO et al, 2005). Algumas substâncias que têm sido relacionadas às atividades farmacológicas são compostos fenólicos da classe dos flavonoides, sendo a astilbina o componente majoritário do extrato das cascas (CARNEIRO et al., 1993; CALIXTO et al, 1992a; CALIXTO et al, 1992b; NEVES et al, 1993, CLOSA et al., 1997; ALMEIDA et al., 2012).

Devido à presença destes compostos químicos, cujo espectro de absorção se apresenta com dois picos máximos entre 240-280 nm e outro a 300-550 nm fotoprotetoras (BOBIN et al., 1995), *H. martiana* poderia, então, apresentar um grande potencial ao desenvolvimento preparações. Diante deste contexto, este trabalho tem como objetivo realizar um estudo fitoquímico do extrato das cascas de *H. martiana*, e incorporar o extrato etanólico em uma formulação fitocosmética com ação fotoprotetora.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 METABOLISMO VEGETAL

As plantas medicinais são utilizadas pelos homens desde os primórdios, e o evidente interesse científico no início do século passado alimentou grande avanço nas pesquisas de plantas medicinais utilizadas na medicina popular, resultando no isolamento e purificação de diversos compostos naturais bioativos. Apesar do surgimento de dificuldades na obtenção de compostos promissores, alguns obstáculos na disponibilização de medicamentos a partir de produtos naturais para a população estão sendo contornados pelo avanço nas técnicas de isolamento e elucidação estrutural, que estão sendo acoplados a métodos que permitem a análise de muitas amostras em menos tempo (BERNARDES et al., 2017).

Os estudos fitoquímicos têm por objetivo determinar a presença de grupos de metabólitos secundários e caracterizar os constituintes químicos presentes em plantas. As plantas medicinais já utilizadas pela medicina popular constituem, assim, fonte promissora de compostos bioativos (REGINATTO, 2017), oriundos do metabolismo vegetal.

O metabolismo vegetal pode ser dividido em metabolismo primário e secundário. O metabolismo primário ou basal pode ser definido como o conjunto de processos comuns e que apresentam semelhança nas espécies vegetais, e que levam à síntese de substâncias importantes para a manutenção dos processos vitais primários da planta, como os carboidratos, proteínas, lipídios e ácidos nucleicos. Estes processos biossintéticos geram, além de intermediários para outras vias metabólicas, energia e compostos com poder redutor, e ocorrem a partir de reações de óxido-redução de compostos orgânicos (REZENDE et al., 2016).

Já o metabolismo secundário (ou especial) resulta na biossíntese de compostos de alta complexidade e que não apresentam funções bem definidas no metabolismo do vegetal, visto que não participam na geração de energia, crescimento ou divisão celular. Estes compostos são caracterizados pela baixa massa molecular e pela distribuição restrita entre as plantas, sendo importantes para quimiotaxonomia e sistemática entre famílias, gêneros e muitas vezes até espécies (KREIS et al., 2017; REZENDE et al., 2016).

Os compostos químicos produzidos pelo metabolismo secundário das plantas apresentam potencial terapêutico (KREIS et al., 2017), e acredita-se que surgiram com a função de proteção contra ambientes ricos em oxigênio, com ação antioxidante, além de protegerem os vegetais contra fungos, bactérias e outros patógenos e danos mecânicos (VIZZOTTO et al., 2010). Além disso, podem também atuar como atrativos ou repelentes de insetos polinizadores, animais que se alimentam

de plantas, na proteção contra a radiação ultravioleta, na sinalização intraespecífica, na alelopatia, estresse hídrico, dentre outras funções (REZENDE et al., 2016).

Os metabólitos secundários são originados pelos componentes do metabolismo primário, como por exemplo os alcaloides, que podem apresentar a estrutura básica de alguns aminoácidos na sua estrutura. Três princípios básicos norteiam a biossíntese de diversos metabólitos secundários: as regras do isopreno (C-5), as regras do acetato, e as regras dos aminoácidos (KREIS et al., 2017).

A biossíntese dos metabólitos secundários tem sua base na formação de blocos de construção, os quais se originam dos metabólitos simples do metabolismo anfibólico. A glicólise, ciclo de Krebs e ciclo das pentoses (ciclo de Calvin) originam os compostos, a partir destas vias que representam fontes de ácidos carboxílicos e açúcares (KREIS et al., 2017). As relações biossintéticas entre o metabolismo primário e secundário são demonstradas na Figura 1.

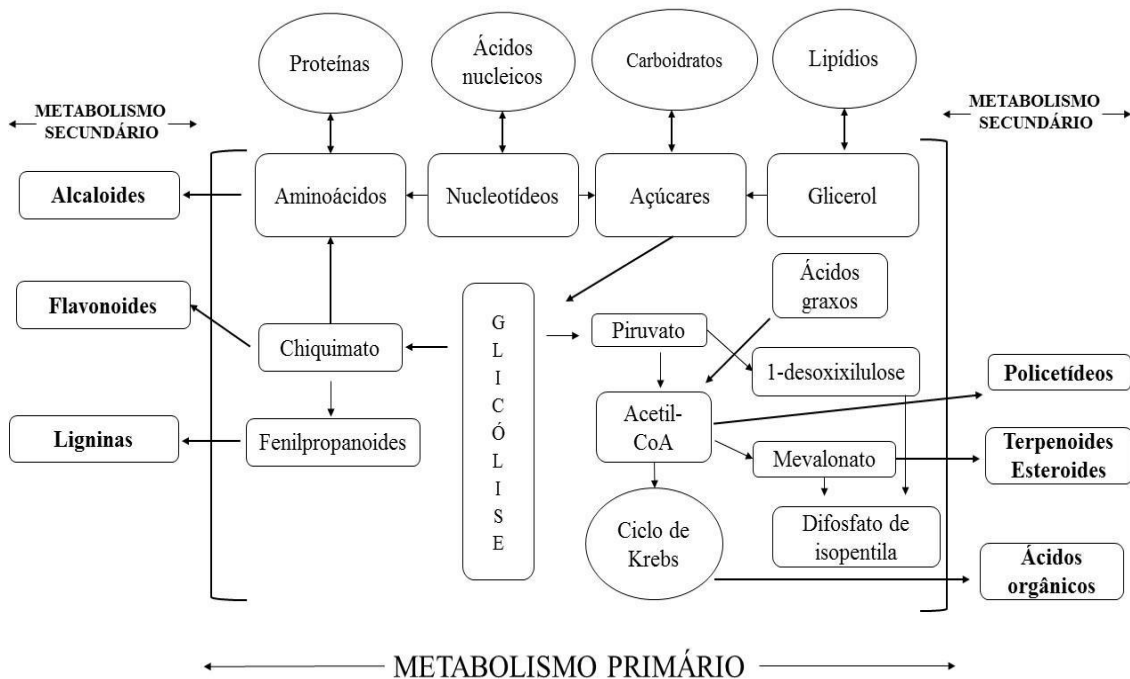


Figura 1: Rotas biossintéticas do metabolismo primário e suas relações com o metabolismo secundário (ou especial).

Fonte: Adaptado de KREIS et al., 2017.

A classificação dos produtos naturais é geralmente organizada conforme sua via biossintética, visto que poucas são as vias que originam estes metabólitos, e por conta disso, poucos são os grupos nos quais os metabólitos secundários são classificados (Tabela 1).

Tabela 1: Metabólitos secundários com interesse terapêutico e sua origem biossintética.

Rota biossintética	Metabólitos secundários originados
Acetil-CoA	Poliacetilênicos
	Policetídeos
	Flavonoides e estilbenos
Aminoácidos	Aminas
	Alcaloides verdadeiros
	Glicosinatos
	Glicosídeos cianícos
1-desoxi- <i>D</i> -Xilulose	Tetraterpenos
	Bloco de construção dos hemiterpenos
	Diterpenos
	Monoterpenos
	Triterpenos e esteroides
Mevalonato	Sesquiterpenos
	Cumarinas
Ácido cinâmico	Fenilpropanoides
	Ácidos fenilcarboxílicos

Fonte: Adaptado de KREIS et al., 2017.

2.1.1 Compostos fenólicos

Constituídos de pelo menos um anel aromático substituído por pelo menos um grupamento hidroxila (VIZZOTTO et al., 2010), compostos fenólicos são metabólitos secundários originados de plantas e fungos, e são produzidos para proteção contra raios UV, insetos, vírus e bactérias. Algumas espécies produzem esta classe de compostos para inibir o crescimento de outras plantas (alelopatia) (HELENO et al., 2015). Ainda podem exercer papel importante na reprodução, proteção contra patógenos e predadores, além de contribuir para cor e características sensoriais das frutas e legumes (BALASUNDRAM et al., 2006).

Os compostos fenólicos são considerados metabólitos com via biossintética mista, pois são sintetizados a partir de duas vias metabólicas principais: a via do ácido chiquímico e a via do ácido mevalônico (VIZZOTTO et al., 2010). Podem ocorrer de forma livre (agliconas), ligados a açúcares (glicosídeos), e ainda ligados a proteínas, e outros metabólitos secundários (REZENDE et al., 2016).

Como exemplos de substâncias fenólicas, podem ser citadas as cumarinas, ácidos fenólicos, quinonas, taninos, ligninas, além dos estilbenos, fenilpropanoides e flavonoides (REZENDE et al.,

2016). Apresentam diversas atividades biológicas já relatadas, como adstringente, atividade anti-inflamatória, antineoplásica, bacteriostática, atividade antioxidante (HELENO et al., 2015) e fotoprotetora (PSOTOVA et al., 2006), antialérgica, cardioprotetora e vasodilatador (BALASUNDRAM et al., 2006).

Os fenólicos são comumente encontrados em ervas e frutas (por exemplo maçãs, frutos cítricos, cacau, uvas, damasco, pêssego, cereja, ameixa), verduras (por exemplo, cebolas, azeitonas, tomates, brócolis, alface, soja, nozes, espinafre, repolho, alcachofras, berinjelas), grãos (por exemplo, arroz selvagem), chás (verde e preto), grãos de café, própolis e vinho tinto. Podem agir como corantes e agentes aromatizantes, e fazem parte integrante da dieta humana (SVOBODOVÁ et al., 2003).

Esta classe de compostos tem sido relacionada aos benefícios para a saúde derivados do consumo de altos níveis de frutas e vegetais, que têm sido relacionados à sua atividade antioxidante (HEIM et al., 2002). Devido à sua complexidade estrutural, esta classe de metabólitos tem sido referida como “polifenóis”. A forma mais natural de ocorrência é na forma conjugada a mono e polissacarídeos, ligados a um ou mais grupamentos fenólicos, e podem ocorrer como derivados funcionais, tais como ésteres e ésteres metílicos (BALASUNDRAM et al., 2006). Embora tal diversidade estrutural resulte na ampla gama de compostos fenólicos, estes podem basicamente ser categorizados em algumas classes, conforme Tabela 2.

Tabela 2: Classes de compostos fenólicos encontrados em plantas.

Classes	Estrutura
Fenólicos simples, benzoquinonas	C_6
Ácidos hidroxibenzoicos	$C_6 - C_1$
Acetofenonas, ácidos fenilacéticos	$C_6 - C_2$
Ácidos hidroxicinâmicos, fenilpropanoídeos (cumarinas, isocumarinas, cromonas, cromenos)	$C_6 - C_3$
Naftoquinonas	$C_6 - C_4$
Xantonas	$C_6 - C_1 - C_6$
Estilbenos, antraquinonas	$C_6 - C_2 - C_6$
Flavonoides, isoflavonoides	$C_6 - C_3 - C_6$
Lignananas, neolignananas	$(C_6 - C_3)_2$
Biflavonoides	$(C_6 - C_3 - C_6)_2$
Ligninas	$(C_6 - C_3)_n$
Taninos condensados (proantocianidinas ou polímeros de flavonoides)	$(C_6 - C_3 - C_6)_n$

Fonte: BALASUNDRAM et al., 2006.

Dentre as classes de compostos fenólicos apresentados na Tabela 2, os ácidos fenólicos, flavonoides e taninos são considerados os principais fenólicos oriundos da dieta (KING; YOUNG,

1999). Os ácidos fenólicos são subdivididos em dois subgrupos, os ácidos hidroxibenzoicos (como por exemplo, o ácido gálico, ácido *p*-hidroxibenzoico, ácido protocatecuico, ácido vanílico e ácido siríntrico) e ácidos hidroxicinâmicos (como por exemplo, o ácido cafeico, ácido ferúlico, ácido *p*-cumárico, ácido sináptico) (BALASUNDRAM et al., 2006). A Figura 2 apresenta a estrutura química dos principais exemplos de ácidos fenólicos.

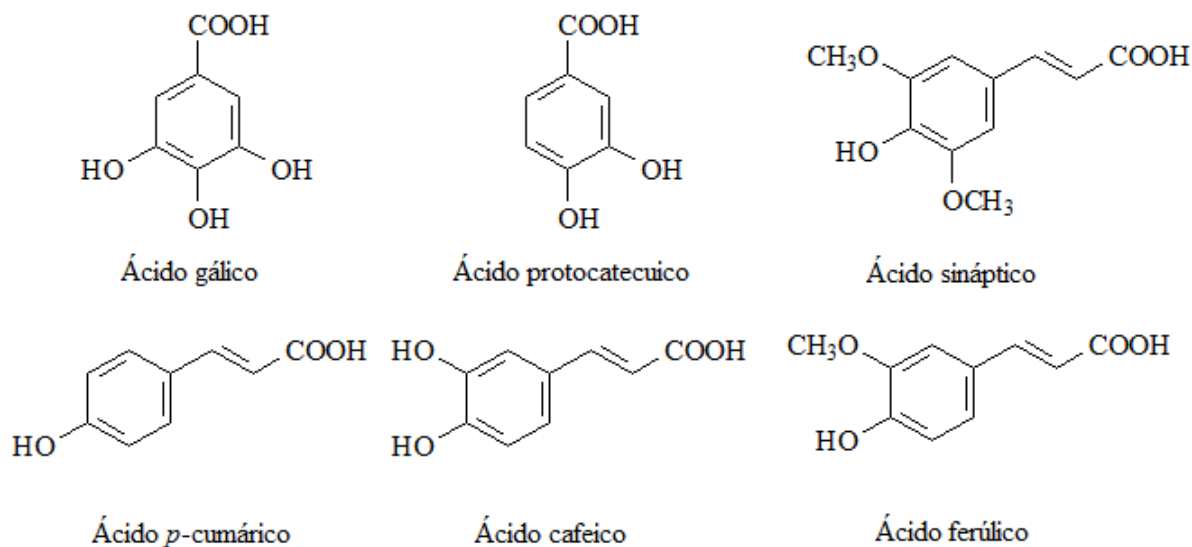


Figura 2: Exemplos de ácidos fenólicos.

Fonte: BALASUNDRAM et al., 2006.

2.1.2 Flavonoides

Os flavonoides constituem o maior grupo de compostos fenólicos de origem vegetal, e são compostos com baixo peso molecular, com 15 carbonos arranjados na configuração C₆ – C₃ – C₆ (BALASUNDRAM et al., 2006). A estrutura química básica dos flavonoides está baseada em dois anéis aromáticos A e B, unidos por uma ponte de 3 carbonos, geralmente um anel heterocíclico (Figura 3).

O anel A é derivado da via acetato/mevalonato, enquanto o anel B é derivado da fenilalanina por meio da via do chiquimato. O anel A é condensado com o sexto carbono do anel C e na posição 2 há um grupo fenila como substituinte. O anel C pode ser um anel pirano heterocíclico, que origina as estruturas básicas das leucoantocianinas e das antocianidinas, denominado de núcleo flavana. Devido ao fato do anel C apresentar-se como uma pirona, ocorre a formação das flavonas, flavonóis, flavanonas, isoflavonas, chalconas e auronas, recebendo a denominação de núcleo 4-oxo-flavonoide (Figura 4) (BALASUNDRAM et al., 2006; COUTINHO et al., 2009; MACHADO et al., 2008).

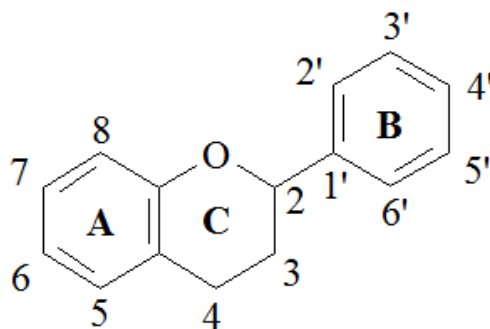


Figura 3: Estrutura básica dos flavonoides

Fonte: BALASUNDRAM et al., 2006.

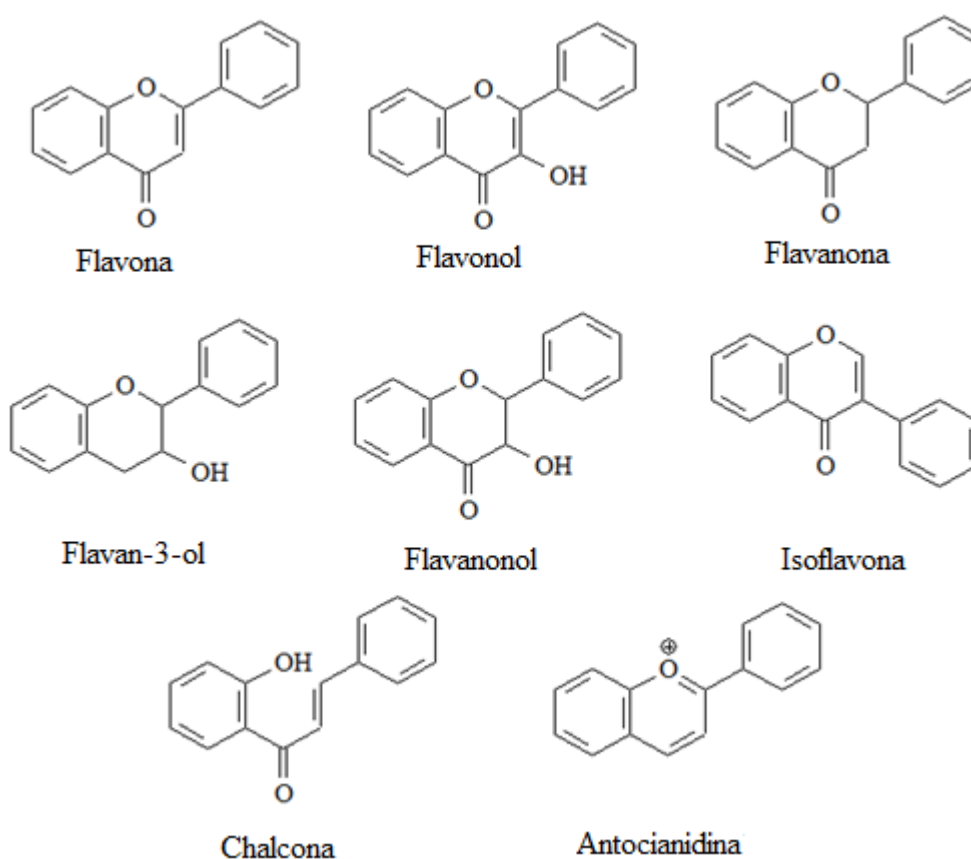


Figura 4: Estrutura básica das principais classes de flavonoides.

Fonte: BALASUNDRAM et al., 2006; COUTINHO et al., 2009; MACHADO et al., 2008.

Os flavonoides apresentam, dentre outras atividades biológicas, uma pronunciada característica atividade antioxidante, que é relacionada à sua capacidade de eliminar radicais livres, doar átomos de hidrogênio ou elétrons, ou quelatos de cátions de compostos metálicos (BALASUNDRAM et al., 2006). A estrutura química complexa dos flavonoides, bem como a diversidade de suas moléculas, torna a relação estrutura-atividade mais complicada do que para os ácidos fenólicos. Algumas das características estruturais e natureza das substituições nos anéis B e C

podem determinar a atividade antioxidante dos flavonoides. O grau de hidroxilação e as posições dos grupos hidroxil no anel B, em particular uma estrutura *orto*-dihidroxílica do anel B nas posições (conhecido como grupo “catecol”), resulta em maior atividade à medida que se confere maior estabilidade ao radical por deslocalização de elétrons, ou pode ainda atuar como sítio de ligação preferencial para metais (BALASUNDRAM et al., 2006). Já a presença do chamado grupo pirogalo (grupos hidroxila nas posições 3', 4' e 5' no anel B, pode aumentar a atividade antioxidante de flavonoides, em comparação com aqueles que possuem um único grupo hidroxila. Porém, sob algumas condições específicas, estes compostos podem agir como substâncias pró-oxidativas (SEERAM; NAIR, 2002). Uma condição que pode alterar a estrutura dos fenólicos é o tratamento com radiação ionizante, que pode causar a perda de elétrons, transformando as substâncias em partículas eletricamente carregadas. Este mecanismo pode provocar a formação de radicais livres que podem atacar outras moléculas (OKUNO, 2013). Estudos têm demonstrado que a irradiação pode afetar as atividades biológicas de extratos vegetais, inclusive melhorar resultados para a atividade antimicrobiana (ZANTAR et al., 2015) e antioxidante (KHATTAK, 2012).

Outra característica que pode ser citada sobre a relação estrutura-atividade antioxidante dos flavonoides, é a presença de dupla ligação entre o carbono 2 e 3, conjugados com o grupo 4-oxo, no anel C, o que aumentaria a capacidade antioxidante (PIETTA, 2000). Já a ligação dupla, associada com o grupamento hidroxila no carbono 3 este anel aumentaria a atividade antioxidante, como exemplo da molécula do kaempferol (SEERAM; NAIR, 2002).

2.1.3 Fracionamento, isolamento, purificação e identificação / elucidação estrutural de metabólitos secundários

O isolamento e purificação de metabólitos secundários pode ser realizado por meio de fracionamento dos extratos vegetais, que também pode fornecer frações enriquecidas em determinadas classes de metabólitos, ou pode ainda reduzir teores de compostos tóxicos (REGINATTO, 2017).

A obtenção dos extratos brutos é a primeira etapa para o isolamento de compostos, e várias técnicas extrativas podem ser utilizadas para o preparo de extratos vegetais, como maceração, infusão, decocção, percolação, extração contínua à quente por Soxhlet, extração por hidrodestilação (aparelho de Clevenger), extração em contracorrente, extração assistida por micro-ondas ou ultrassom, extração por fluido supercrítico e turbólise ou turboextração (TIWARI et al., 2011; OLIVEIRA, 2015; OLIVEIRA et al., 2016).

Atualmente, técnicas mais modernas e automatizadas têm sido desenvolvidas e amplamente estudadas, com o intuito de aumentar a eficiência extrativa para a obtenção de extratos com maior rapidez, menor quantidade de solventes, menor degradação de compostos químicos e o aprimoramento e controle de fatores que possam influenciar na reprodutibilidade do método extrativo.

A extração pelo método ASE foi a técnica escolhida para o presente trabalho, visando a extração de compostos fenólicos com maior reprodutibilidade e controle. Esta é uma técnica totalmente automatizada, na qual podem ser utilizados diversos solventes ou misturas nas mais variadas proporções. O princípio deste método extrativo baseia-se na aplicação de altas pressões e temperaturas, possibilitando o aumento da solubilização dos compostos químicos, influenciando na cinética de extração, com menor tempo e volume de solventes (WIBISONO et al., 2009).

O processo de extração por meio do aparelho de ASE consiste no bombeamento do solvente através da célula de extração previamente preenchida com uma mistura do material vegetal em estado sólido ou semissólido com um agente de preenchimento, como por exemplo, terra diatomácea, que tem como objetivo impedir a agregação entre as partículas do material a ser extraído, proporcionando distribuição mais homogênea do material vegetal dentro da célula. Durante todo o processo extrativo, a célula de extração é mantida sob aquecimento e pressão (entre 1500 e 2000 psi). Uma vantagem proporcionada por este equipamento é a possibilidade de ajuste nos parâmetros de extração, como pressão, temperatura, ciclos e tempo de extração em cada ciclo (tempo estático), até a remoção completa dos compostos bioativos do material. Portanto, é possível a realização de uma infinidade de extratos com a variação dos parâmetros, inclusive com gradientes de concentração ou polaridade de solventes (GOMES, 2013).

Um método que tem se demonstrado muito útil na análise química de produtos naturais é a espectrofotometria, sendo comumente utilizados para quantificar produtos naturais, como os compostos fenólicos (LI et al., 2008) e flavonoides (MARQUES et al., 2012) em extratos vegetais e frações, além de serem amplamente utilizadas na avaliação de atividades biológicas *in vitro*, como atividade fotoprotetora (MANSUR et al., 1986) e atividade antioxidante (PRIETO et al., 1999; UCHÔA et al., 2015; OLIVEIRA-JÚNIOR et al., 2012).

A espectrofotometria UV-Vis compreende a faixa do espectro da radiação eletromagnética entre 200 a 800 nm, sendo de 200 a 400 nm considerada a região ultravioleta e de 400 a 800 nm considerada a região do visível, permitindo determinar a absorção de luz da amostra (PAVIA et al., 2010).

Outra técnica bastante utilizada na análise de produtos naturais é a espectrometria de massas (EM), técnica utilizada para identificar e quantificar compostos conhecidos e desconhecidos, além de fornecer dados sobre propriedades químicas e estruturais das moléculas, realizando análises com

pequenas quantidades de amostra (ao nível de picograma) e concentrações reduzidas em misturas quimicamente complexas (CROTTI et al., 2006).

Os componentes básicos do espectrômetro de massas são o sistema de introdução de amostra, fonte de ionização, analisador de massas, detector e registrador, conforme a Figura 5 (DINIZ, 2011).

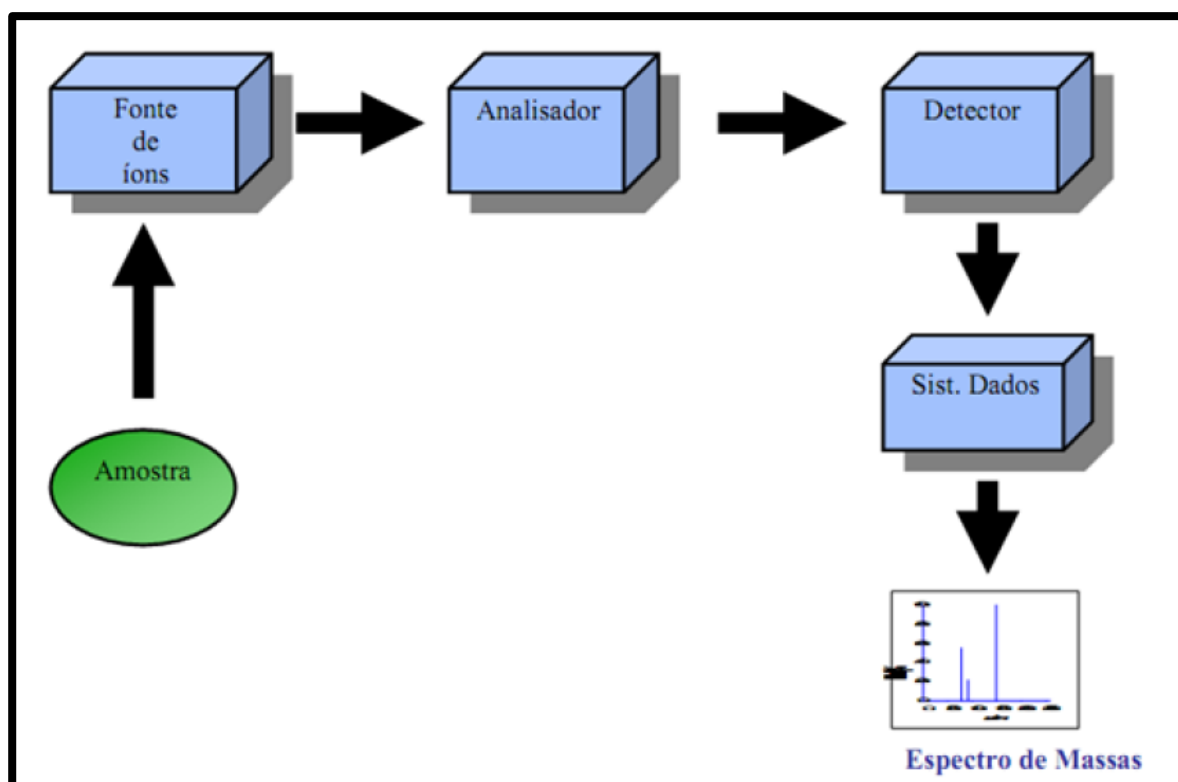


Figura 5: Componentes do espectrômetro de massas.

Fonte: DINIZ, 2011.

A fonte de ionização é um dispositivo que promove a ionização dos compostos químicos da amostra. Diversas são as técnicas de ionização hoje disponíveis, sendo as mais conhecidas a ionização por elétrons (EI), ionização química (CI), bombardeamento por átomos rápidos (FAB), ionização por desorção a laser assistida por matriz (MALDI), ionização química a pressão atmosférica (APCI) e ionização por *electrospray* (IES) (DINIZ, 2011). Esta última técnica tem se difundido às mais diversas áreas da ciência, e sua importância tem se refletido no número crescente de artigos científicos publicados utilizando a técnica (CROTTI et al., 2006). Dentre as vantagens da IES-EM, podem ser citadas a sua alta sensibilidade e seletividade, além da facilidade de uso e consumo reduzido de amostra (DINIZ, 2011).

Na ionização por “*electrospray*”, podem ser gerados os íons moleculares, as moléculas protonadas/desprotonadas (íons quasi-moleculares) e moléculas cationizadas ou anionizadas. O processo de formação de cada um destes íons pode ser compreendido considerando o balanço entre três processos, as reações redox que produzem os íons moleculares ($M^{\cdot-}$ e $M^{+\cdot}$); reações ácido / base

que resultam na formação de moléculas protonadas ou desprotonadas ($[M+H]^+$ ou $[M+H]^-$); e na coordenação com cátions ou ânions, que leva à formação de moléculas cationizadas, ($[M+Na]^+$, $[M+K]^+$, por exemplo), ou anionizadas ($[M+Cl]^-$, por exemplo) (CROTTI et al., 2006).

A determinação estrutural dos compostos químicos isolados é uma parte importante do estudo fitoquímico. Após o fracionamento e isolamento dos compostos, sua estrutura química deve ser confirmada, visando a identificação de compostos já conhecidos ou a elucidação de compostos inéditos. A principal técnica espectroscópica de identificação de compostos orgânicos é a espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN), tendo em vista que auxilia na identificação do esqueleto carbono-hidrogênio de uma substância orgânica. Comparada à outras técnicas espectroscópicas, a RMN não torna possível apenas a identificação da funcionalidade de um carbono específico, mas também permite determinar a configuração dos carbonos vizinhos, e em muitos casos, pode até determinar a estrutura inteira da molécula analisada (PAVIA et al., 2010)

2.1.4 Técnicas hifenadas para a análise fitoquímica

O acoplamento entre duas ou mais técnicas analíticas, resultando na obtenção de uma ferramenta mais eficiente e rápida comparada com as técnicas convencionais deu origem ao termo “técnicas hifenadas”, como por exemplo o acoplamento de métodos de separação como a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) ou a cromatografia a gás (CG), com técnicas que funcionam como detectores, como por exemplo a espectrofotometria de UV-Vis (DAD), espectrometria de massas (EM e EM/EM) e ressonância magnética nuclear (RMN), que fornecem informações complementares sobre a estrutura química dos componentes da amostra (RODRIGUES et al., 2006). Alguns exemplos de técnicas hifenadas são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3: Exemplos de técnicas hifenadas e suas características.

Técnica hifenada	Características
CG-EM	Utilizada para identificação de compostos, fornece informação estrutural da molécula e permite comparação com bibliotecas espectrais.
CG-EM-EM	Utilizada para confirmação estrutural de moléculas.
CLAE-DAD	Utilizada para identificação de compostos conhecidos, através da comparação do tempo de retenção e espectro de UV com o padrão analítico. Não fornece informação estrutural.
CLAE-EM	Raramente resulta na identificação definitiva. Muitas vezes acoplado com CLAE-DAD para fornecer informações estruturais complementares.
CLAE-EM-EM	Determinação de novos compostos, com incrível vantagem da simplicidade no preparo da amostra e rapidez na obtenção dos resultados.
CLAE-RMN	Fornecer informações estruturais (espectro de RMN de 1H). Constitui-se a técnica mais poderosa na determinação estrutural de substâncias inéditas com novos esqueletos e em misturas biologicamente ativas.

Fonte: Adaptado de RODRIGUES et al., 2006.

As técnicas hífenadas têm ganhado destaque na análise química, principalmente devido ao fato da possibilidade de utilização de pequenas quantidades (miligramas) de analito na sua forma purificada, de forma diferente das técnicas sem hífenação, que só são possíveis após longo processo de purificação em grandes quantidades (RODRIGUES et al., 2006).

As técnicas hífenadas possibilitam também os estudos com abordagens metabolômicas, que visam a caracterização do conjunto de metabólitos de baixa massa molecular (com até 1500 Da) presentes em um sistema biológico, conjunto este chamado de metaboloma (CANUTO et al., 2018).

O recente desenvolvimento rápido de uma variedade de plataformas analíticas, incluindo GC, CLAE, cromatografia líquida acoplada a espectroscopia EM e RMN, poderia permitir a separação, detecção, caracterização e quantificação desses metabólitos e caminhos metabólicos relacionados. Devido à complexidade do metaboloma e às diversas propriedades dos metabólitos, nenhuma plataforma analítica única poderia ser aplicada para detectar todos os metabólitos em uma amostra biológica. O uso combinado de abordagens analíticas instrumentais modernas revelou resultados ideais nos estudos metabolômicos e tem sido benéfico para aumentar a cobertura de metabólitos detectados que não podem ser alcançados por técnicas de análise única. As plataformas integradas têm sido frequentemente usadas para proporcionar uma detecção sensível e confiável de milhares de metabólitos em uma amostra de biológica (ZHANG et al., 2012).

Atualmente, dentre as várias técnicas disponíveis para a análise e identificação de compostos fenólicos, a cromatografia líquida de alta eficiência apresenta destaque e pode ser acoplada a diferentes detectores, como por exemplo o arranjo de diodos (DAD). A identificação e quantificação de compostos por CLAE-DAD possibilita a coleta de dados espectrais de cada sinal cromatográfico, fornecendo informações para confirmar a identidade e pureza de cada sinal (CALDAS et al., 2011).

A espectrometria de massas é considerada a técnica mais utilizada na metabolômica, uma vez que proporciona análises rápidas, com alta sensibilidade e seletividade. A técnica hífenada com a cromatografia líquida (CLAE-EM ou LC-MS, do inglês *Liquid Chromatography – Mass Spectrometry*) vem sendo cada vez mais aplicada a estudos metabolômicos de produtos naturais, devido à sua robustez, sensibilidade, seletividade e fácil operação (CANUTO et al., 2018).

2.2 FORMULAÇÕES COSMÉTICAS COM AÇÃO FOTOPROTETORA

2.2.1 A pele e a radiação solar

A radiação solar compreende parte do espectro eletromagnético, e é emitida em distintas faixas de comprimentos de onda, variando entre 290 a 3000 nm, e inclui a radiação ultravioleta, que varia da radiação UVC (200-290 nm), UVB (290-320 nm) e UVA (320-400 nm); a radiação visível

(400-760 nm) e radiação infravermelha (IV) (760-3000 nm) (AKHALAYA et al., 2014; SOUZA, 2016).

A pele humana desempenha papel importante na proteção do organismo contra agentes externos, inclusive a radiação solar. A pele é um órgão complexo, composto por três tecidos distintos estrutural e funcionalmente, a epiderme, derme e hipoderme. A epiderme é a camada mais externa, composta por queratinócitos, que compõem o epitélio escamoso estratificado. Após diferenciação, estas células formam a camada basal, espinhosa, granulosa, lúcida e estrato córneo. Na epiderme, também são encontrados o melanócitos, células responsáveis pela produção de melanina; células de Langerhans, que são células imunes, e as células de Merkel, receptoras do tato, ligadas a terminações nervosas (MARIONNET et al., 2015; STIEFEL; SCHWACK, 2015). Já na derme é onde se encontram o tecido conjuntivo de suporte, tecido fibroso e elástico responsável pela flexibilidade e resistência da pele. Nesta região, são encontrados apêndices, como glândulas sudoríparas, folículos pilosos e também os vasos sanguíneos e linfáticos (MARIONNET et al., 2015; SOUZA, 2016).

A profundidade de penetração da radiação solar na pele é orientada pelo comprimento de onda. Os comprimentos mais curtos, como a radiação UVB pode alcançar a epiderme, enquanto longos comprimentos de onda como da radiação infravermelho, podem alcançar até o tecido subcutâneo (SARGENT; TRAVERS, 2016). Desta maneira, as diferentes regiões do espectro solar podem promover diferentes danos à pele, sendo a radiação UVB a mais deletéria entre elas, pois apesar da sua penetração apenas na epiderme, possui maior energia associada, e promove maiores danos à pele, causando efeitos diretos às células e ao DNA, o que pode promover mutações (SOUZA, 2016).

Os efeitos da radiação ultravioleta na pele estão relacionados ao aparecimento de eritemas (queimaduras solares), pigmentação da pele, fotoenvelhecimento, alterações no sistema imune e câncer de pele, sendo que a radiação UVB é completamente carcinogênica após a exposição prolongada (SARGENT; TRAVERS, 2016; SOUZA, 2016).

O câncer de pele e o fotoenvelhecimento tem apresentado crescimento ao longo dos anos em todo o planeta, apresentando proporções epidêmicas. Segundo dados do Instituto Nacional do Câncer, a letalidade do melanoma, o tipo de câncer mais frequente, é elevada (INCA, 2016). Desta forma, a proteção da pele contra a radiação solar torna-se de grande relevância para a preservação da saúde da pele.

2.2.2 Fotoproteção

O uso de fotoprotetores é considerado atualmente como a medida mais eficaz para a prevenção dos danos causados pela radiação solar, inclusive contra o câncer de pele (CORREA, 2012; SOUZA, 2016; SARGENT; TRAVERS, 2016).

Fisiologicamente, a pele possui mecanismos de proteção natural contra a radiação solar, que apresenta eficácia satisfatória apenas em determinados limites de exposição. Dentre estes mecanismos, podem ser citadas a síntese de melanina, o espessamento do estrato córneo e da epiderme, formação do ácido urocânico, mecanismos de reparação de DNA e ativação de antioxidantes endógenos (SOUSA, 2016). Uma vez que estes mecanismos são limitados, a necessidade de fotoproteção toma grande importância, o que envolve medidas como o uso de roupas, chapéus e óculos específicos para a proteção solar, bem como o uso correto de produtos cosméticos fotoprotetores (CORREA, 2012).

2.2.3 Formulações cosméticas com ação fotoprotetora

De acordo com a RDC n° 30 (BRASIL, 2012), um protetor solar pode ser definido como uma preparação cosmética com finalidade exclusiva de proteger a pele e lábios contra a radiação solar (UVA e UVB), absorvendo, dispersando ou refletindo esta radiação. Para o registro de produtos cosméticos no Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) exige a realização de testes que visam garantir a pureza, integridade e devida identificação dos ingredientes ativos, para os cosméticos classificados como grau II, incluindo os fotoprotetores. Esta exigência também abrange as matérias-primas ativas vegetais (BRASIL, 2015). A ANVISA define ainda que, para a escolha do filtro solar, a RDC n° 69 (BRASIL, 2016) deve ser consultada, pois nela há uma lista de filtros ultravioletas permitidos para o uso em cosméticos, que são considerados seguros para o uso na composição dos fotoprotetores.

Com um desenvolvimento apropriado, com o devido cumprimento de exigências, os cosméticos naturais obtidos a partir da biodiversidade brasileira podem então ser tão eficazes quanto os demais produtos atualmente comercializados com ingredientes sintéticos, desde que seja garantida a constância da qualidade do produto e da sua ação biológica. Desta forma, o desenvolvimento de cosméticos a partir de matérias-primas naturais requer um estudo sério e aprofundado, com a devida caracterização quanto aos aspectos botânicos, agrônômicos, fitoquímicos, farmacológicos, toxicológicos, farmacotécnicos e de desenvolvimento de metodologias analíticas (KLEIN et al, 2009).

Para o desenvolvimento de um fotoprotetor, várias características devem ser levadas em consideração, antes da escolha da forma farmacêutica. Além da segurança e eficácia, o tipo de produto, consumidor alvo, parte do corpo, atividades adicionais inseridas ao produto (substâncias antioxidantes), aspecto (cor, odor), solubilidade do filtro solar no veículo, são alguns exemplos de características importante a serem analisadas (SURMAN et al., 2009). Desta forma, torna-se possível a escolha da forma farmacêutica ideal para a incorporação do filtro solar.

A avaliação da eficácia de fotoprotetor é realizada por meio da análise da sua capacidade de proteção da pele contra eritemas e edemas, redução do risco de queimaduras e carcinoma de células da camada basal e espinhosa (VIOLANTE et. al., 2009). Uma das formas mais utilizadas de se avaliar a eficácia dos protetores é a determinação do Fator de Proteção Solar (FPS) (ANDRADE, 2015).

A determinação do FPS pode ser realizada por metodologias *in vitro* e *in vivo*. O ensaio *in vitro* apresenta vantagens associadas a rapidez, reprodutibilidade, menor custo e a inexistência de exposição a riscos por parte de voluntários ou animais. Estes métodos utilizam diluições seriadas e análises por métodos espectrofotométricos (MANSUR et al., 1986; ANDRADE, 2015).

O método espectrofotométrico de soluções diluídas em álcool é um dos métodos *in vitro* mais empregados, pois mostrou ser rápido, eficaz e possui boa correlação com os testes *in vivo*, tendo como desvantagem a utilização restrita de substâncias insolúveis no solvente sugerido pelo método, como por exemplo os filtros físicos (MANSUR et al., 1986; NASCIMENTO et. al., 2009).

As formulações cosméticas com ação fotoprotetora geralmente apresenta uma combinação de dois ou mais filtros solares, com o objetivo de elevar o FPS (Fator de Proteção Solar) e tornar mais efetiva a proteção nas faixas UVA e UVB. Os filtros solares utilizados nas formulações podem ser classificados em orgânicos (também chamados de químicos) ou inorgânicos (também chamados de físicos); e em filtros UVA, UVB ou UVA/UVB, tomando como base a região do espectro ultravioleta em que absorvem radiação (BAREL et al., 2009; CORREA, 2012).

Os filtros inorgânicos são aqueles que formam uma barreira física contra a penetração da radiação solar através da pele, refletindo a radiação UV-Vis, e por conta disso são considerados também filtros “físicos”. Os principais filtros inorgânicos disponíveis atualmente são o óxido de zinco (ZnO), que oferece proteção UVA/UVB, e dióxido de titânio (TiO₂), que oferece proteção UVB. Estes filtros são recomendados para a formulação de fotoprotetores de uso infantil, peles sensíveis e gestantes, além de elevar o FPS, pois são considerados filtros mais seguros e mais fotoestáveis do que os filtros orgânicos (CORREA, 2012; SOUZA, 2016).

Já os filtros solares orgânicos são compostos aromáticos conjugados a um grupo carbonila e a um radical nas posições “*orto*” e “*para*”, com grupamentos doadores de elétrons substituindo estas posições no anel aromático. A absorção da radiação ocorre em determinado comprimento de onda, passando a molécula para um estado mais excitado, de maior energia, e ao retornarem ao estado

fundamental, emitem a energia absorvida para a atmosfera em um maior comprimento de onda, menos prejudicial à pele. Devido a este processo, são também considerados filtros “químicos”. Recuperam, então, a capacidade de absorver a radiação UV repetidamente, caracterizando assim a sua fotoestabilidade (CORREA, 2012; SOUZA, 2016). Como exemplos de filtros solares orgânicos, pode-se citar o ácido *p*-aminobenzoico e derivados, derivados do ácido cinâmico, salicilatos, benzofenonas, derivados da cânfora, derivados do dibenzoilmetano e antranilatos (BAREL et al., 2009; CORREA, 2012).

Além da escolha dos filtros solares, torna-se importante a planejar a influência dos demais ingredientes na formulação fotoprotetora, e a escolha do veículo é fator importante para uma melhor aceitação do produto e a obtenção do nível de FPS desejado. Várias são as formas farmacêuticas que podem ser utilizadas para a incorporação de um filtro solar, e podem ser classificadas de acordo com a solubilidade em veículos à base de água, óleo, água e óleo, etanol e óleo, ou ainda quanto à consistência (SURMAN et al., 2009). As emulsões têm sido as formas mais utilizadas na preparação de fotoprotetores nos últimos anos, pois possibilitam a incorporação de filtros lipo e hidrofílicos, que podem atuar sinergicamente, melhorando assim a eficácia do produto. São considerados por alguns autores os melhores veículos para produtos com esta finalidade, porém, apesar de bastante utilizado, este tipo de veículo apresenta desvantagens, como por exemplo a instabilidade das preparações, que ocorre por conta da presença de moléculas com solubilidades diferentes, necessitando a utilização de substâncias que evitem a separação de fases, o que pode ser um problema do ponto de vista farmacotécnico e de custo para a formulação. Quanto ao aspecto, podem apresentar um caráter gorduroso, o que pode não ser confortável para o consumidor (FLOR et al., 2007; CORREA, 2012).

Os géis surgem então como uma alternativa a estas desvantagens. Eles podem ser caracterizados como sistemas semissólidos, com dispersões de pequenas ou grandes moléculas em um veículo líquido, que adquire consistência semelhante a geleias pela adição de um agente gelificante. Além de vários benefícios observados na forma farmacêutica gel, a formulação apresenta menor grau de intoxicação com possibilidade de aplicação em diversos locais (CORDEIRO et al., 2013).

Os géis utilizados em preparações fotoprotetoras podem apresentar características hidrofílicas ou lipofílicas. Os hidrofílicos são aqueles preparados à base de água ou álcool (etanol). Os géis preparados à base de etanol podem apresentar maior capacidade fotoprotetora do que os aquosos, mas apresentam grandes desvantagens, como a possibilidade de causar desidratação e ressecamento da pele. Já os géis lipofílicos são preparados à base de emulsões (os chamados “gel-creme”), que são estabilizadas por coloides hidrofílicos (CHORILLI, et al., 2007).

A eficácia da formulação fotoprotetora está diretamente ligada à aceitação do produto pelo consumidor, visto que não são apenas os níveis de FPS que garantem a proteção solar, mas também

a quantidade, forma e frequência de aplicação do produto fotoprotetor na pele a ser protegida (MILESI; GUTERRES, 2002; CORREA, 2012). Nesse contexto, a qualidade do produto é parâmetro importante, tanto para a aceitação do produto, como para a segurança do consumidor, visto que produtos que não atendam aos requisitos de qualidade podem proporcionar a degradação dos componentes da fórmula, originando substâncias com toxicidade elevada, podendo causar riscos à saúde (MISHRA et al., 2012). Portanto, os estudos de controle de qualidade e estabilidade dos cosméticos exercem papel fundamental no desenvolvimento das formulações.

Com a avaliação da estabilidade do produto cosmético, é possível avaliar o desempenho do produto exposto a condições ambientais, desde a fabricação até o prazo de validade. Desta forma, o estudo de estabilidade fornece informações importantes sobre a segurança e eficácia do produto, além de uma previsão da aceitação pelo consumidor, visto que os estes estudos são considerados preditivos, em condições que visam também acelerar possíveis alterações que podem ocorrer nas condições normais do mercado e transporte (BRASIL, 2004). Portanto, o estudo de estabilidade de produtos cosméticos contribui para o desenvolvimento da formulação, além de fornecer informações importantes sobre o armazenamento (BRASIL, 2004).

Alguns aspectos devem ser considerados nos estudos de estabilidade. Os fatores físicos englobam as propriedades físicas originais como aspecto, cor, odor e uniformidade. Os fatores químicos devem envolver a integridade química dos componentes ativos, bem como os teores destes ingredientes. Já em relação aos fatores microbiológicos, os produtos cosméticos devem manter as características microbiológicas, conforme requisitos especificados (BRASIL, 2004).

Levando em consideração estes fatores, ensaios devem ser realizados, visando à obtenção de informações sobre a estabilidade dos produtos em um curto período de tempo. Com isso, amostras devem ser armazenadas tanto em condições extremas como as condições recomendadas de armazenagem, visando acelerar mudanças que podem ocorrer dentro do prazo de validade. Os ensaios de estabilidade seguem uma sequência de testes chamados de preliminares, acelerados e de prateleira (BRASIL, 2004).

2.2.4 O papel dos antioxidantes

O metabolismo aeróbico envolve várias reações químicas, dentre elas mecanismos de oxido-redução e transferência de elétrons. Desta forma, os radicais livres podem ser considerados como um dos mediadores do metabolismo celular, e são moléculas que possuem um par de elétrons desemparelhado, altamente reativas. Os radicais livres são essenciais para os processos de produção de energia, crescimento celular, sinalização química e síntese de importantes biomoléculas (BARREIROS et al., 2006).

Os radicais livres são desativados por agentes endógenos, como enzimas (S-glutationa peroxidase, catalase e superóxido desmutase), ou ainda por substâncias obtidas por meio da ingestão, como vitaminas, minerais e substâncias oriundas do metabolismo secundários de plantas, que são caracterizados por sua capacidade antioxidante (ALVES et al., 2010).

O estresse oxidativo é uma condição decorrente do desequilíbrio entre a produção de radicais livres e a estabilização destes pelos agentes antioxidantes endógenos ou exógenos. O excesso de radicais livres desencadeia uma série de reações bioquímicas deletérias, e podem ser responsáveis pelo surgimento de doenças crônico-degenerativas, como artrite, doenças cardiovasculares, câncer, catarata, doenças autoimunes e envelhecimento precoce (ALVES et al., 2010; OLIVEIRA, 2014).

Os principais agentes indutores de patologias relacionadas ao estresse oxidativo são as espécies reativas que possuem um elétron desemparelhado em um átomo de oxigênio, caracterizando assim as Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) ou nitrogênio (ERNs). De forma geral, as substâncias antioxidantes são aquelas que podem retardar, prevenir ou reparar os danos oxidativos causados pelas EROs à uma molécula alvo. Os antioxidantes podem proteger a pele dos radicais livres por diversos meios, e podem ser incorporados em produtos cosméticos, como os protetores solares, com o objetivo de reduzir os danos oxidativos causados pelas EROs induzidas pela radiação solar (BAREL et al., 2009). Vários estudos demonstram os efeitos benéficos da associação entre os filtros solares e antioxidantes, e estas formulações associadas obtiveram melhores resultados na proteção contra os danos causados pela radiação UV (WU et al., 2011; HAAG et al., 2014; GREYER-BECK et al., 2014). Nesse sentido, o potencial antioxidante de substâncias tem sido investigado, porém, poucos estudos mostram esta avaliação em formulações tópicas (SOUZA, 2016).

Diversas técnicas têm sido utilizadas para a determinação da atividade antioxidante *in vitro*, como o método de sequestro do radical DPPH, a inibição da formação do radical ABTS e a formação do complexo fosfomolibdênio. No método do sequestro do radical DPPH, é avaliada a atividade sequestradora do radical livre 2,2- difenil-1-picrilhidrazila de coloração púrpura, que absorve a 515 nm, por ação de um antioxidante (HO-R). O DPPH é reduzido, formando difenilpicril hidrazina, de coloração amarela, com conseqüente desaparecimento da absorção, podendo a mesma ser monitorada pelo decréscimo da absorbância (KENNY et al., 2015).

Por sua vez, no método de inibição do radical ABTS (ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico), a atividade antioxidante mede a quantidade do radical livre (ABTS+) formado na presença de metmioglobina e peróxido de hidrogênio com e sem a adição dos componentes antioxidantes da amostra. O cromóforo do radical ABTS+ (azul ou verde) é formado pela reação entre o ABTS e o persulfato de potássio. A descoloração do radical ABTS+, na presença de compostos antioxidantes, pode ser medido em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 734 nm (KENNY et al., 2015).

Na avaliação da atividade antioxidante pela formação do complexo fosfomolibdênio, é determinado de modo quantitativo a redução de molibdênio VI para molibdênio V, que pode ser observado com a formação da coloração verde (fosfato/ molibdênio V) em pH ácido. A leitura é realizada em 695 nm. Neste método, o ácido ascórbico é o mais indicado como padrão (PRIETO et al, 1999; CAMPOS; FRASSON, 2011).

2.2.5 Atividade antimicrobiana

O uso indiscriminado de antibióticos ao longo dos anos tem acelerado o processo de resistência microbiana, que hoje é considerado um problema de saúde de nível mundial. A OMS (2019) estima que até o ano de 2050, 10 milhões de pessoas morrerão ao ano devido à resistência aos antimicrobianos, superando estimativas de outras doenças graves e prevalentes, como o câncer por exemplo (OMS, 2019).

Os mecanismos de resistência mais importantes são aqueles que podem ser adquiridos e transmitidos, e consistem na produção de enzimas microbianas que inativam os antibióticos, ou por modificações no microrganismo que impedem a chegada do fármaco no seu local de ação, ou ainda em alterações no mecanismo de ação do antibiótico (SILVA, 2018). Os antibióticos, portanto, são compostos naturais ou sintéticos capazes de inibir o crescimento ou causar a morte de fungos ou bactérias. Para que seja possível a sua ação, estes fármacos precisam atravessar a barreira superficial do microrganismo e se fixar sobre estruturas ou mecanismos bioquímicos envolvidos na sua multiplicação ou sobrevivência. Vários são os mecanismos de ação antimicrobiana, mas todos podem atuar como bactericidas, quando causam a morte da bactéria, ou bacteriostáticos, quando promovem a inibição do crescimento microbiano. Os mecanismos de ação destes compostos podem residir na inibição da síntese de ácidos nucleicos e proteínas da parede celular ou na alteração da membrana celular da bactéria, interferindo na bomba de efluxo, por exemplo (GUIMARÃES et al., 2010; SILVA, 2018).

Um fator que tem contribuído para o aumento da resistência aos agentes antimicrobianos é a inclusão destes em produtos não medicamentosos, como os cosméticos e alimentos. Os agentes conservantes antimicrobianos mais utilizados são os parabenos, e por estes serem considerados pouco efetivos contra *Pseudomonas aeruginosa*, muitas vezes outros conservantes são adicionados, como fenoxietanol, isotiazolinonas ou imidazolidiniluréia. Além da relação com a resistência microbiana, os estudos sobre a conservação têm ganhado grande importância por conta do potencial de irritação e toxicidade dos conservantes (CORRÊA, 2018).

Por conta disso, agentes antimicrobianos naturais têm sido apontados como uma alternativa aos agentes conservantes em produtos cosméticos, com novos mecanismos de ação ou que proporcione menores efeitos adversos na pele (ANDRADE, 2016). Os extratos vegetais ricos em

flavonoides têm sido apontados como importantes fontes de substâncias com esta ação (XIE et al., 2015).

Os mecanismos da atividade antimicrobiana dos flavonoides envolvem a inibição da síntese de ácidos nucleicos; inibição da função da membrana citoplasmática; inibição do metabolismo energético; inibição da aderência e formação de biofilme; inibição das porinas na membrana celular, afetando a bomba de efluxo; alterações na permeabilidade de membrana e diminuição da patogenicidade (XIE et al. 2015).

Diante deste contexto, é notável a importância do estudo da atividade antimicrobiana de extratos vegetais ricos em flavonoides, o que pode agregar valor às formulações cosméticas.

2.2.6 Fotoprotetores naturais

Com base na estrutura química dos filtros solares orgânicos, podemos verificar a presença de anéis aromáticos, além da utilização no setor cosmético de filtros orgânicos derivados do ácido cinâmico e salicilato, produtos de origem natural. Adicionalmente, com a constante busca por novas moléculas fotoestáveis para a utilização em protetores solares, atualmente têm-se destacado o desenvolvimento de fotoprotetores com filtros baseados em produtos naturais. Esta busca envolve, principalmente, a capacidade de absorção da luz ultravioleta pelos grupamentos cromóforos da molécula, associada à possível atividade antioxidante (GUARATINI et al., 2009).

Vários compostos químicos de origem natural, principalmente de espécies vegetais, podem cumprir estes requisitos, e a literatura científica vem apresentando diversos derivados vegetais com atividade antioxidante, cuja composição química apresenta substâncias com anéis aromáticos, como por exemplo, propiofenonas, derivados do ácido cafeico, lignanas e flavonoides (ALENCAR-FILHO et al., 2016; OLIVEIRA-JÚNIOR; ALMEIDA, 2012; GUARANTINI et al., 2009). Desta forma, a atividade antioxidante e fotoprotetora de derivados vegetais ricos nestas classes de metabólitos secundários representa, portanto, grande potencial para o desenvolvimento de formulações cosméticas com ação fotoprotetora.

Alguns estudos já apresentam a atividade fotoprotetora de flavonoides, que absorvem a radiação UVA e UVB, devido à sua estrutura química ser composta por anéis aromáticos e duplas ligações conjugadas (ALENCAR-FILHO et al., 2016), como alguns flavonoides e ácidos fenólicos com atividade fotoprotetora (Tabela 4).

Tabela 4: Alguns flavonoides e ácidos fenólicos com atividade fotoprotetora.

Compostos	FPS UVA	FPS UVB
Rutina	4,92	4,72
Quercetina	5,77	10,3
Crisina	-	18,6
Apigenina	-	28,8
Naringenina	-	12,3
Kaempferol	-	24,9
Catequina	-	7,3
Galangina	-	16,2
Resveratrol	-	19,2
Ácido Cafeico	-	28,0
Ácido dimetil Cafeico	-	16,6
Fenil-etil éster do Ácido Cafeico	-	15,8
Ácido Ferúlico	-	11,9

Fonte: Adaptado de ALENCAR-FILHO et al., 2016.

2.3 O GÊNERO *Hymenaea*

Hymenaea é um gênero da família Fabaceae, altamente distribuído da América Central à América do Sul, principalmente na bacia amazônica, apresenta aproximadamente de 25 espécies descritas nas Américas (PETTIT et al., 2003). O gênero é caracterizado por sua distribuição neotropical, inclui uma espécie de ocorrência no leste da África (MARTIN et al., 1974). Plantas do gênero *Hymenaea* são conhecidas no Brasil como “jatobá”, “jetaí”, “jataí-uva” e “jetaíba”, além de serem comumente utilizadas na medicina tradicional brasileira para o tratamento de inflamações, infecções bacterianas, reumatismo e anemia (GAZZANEO et al., 2005; AGRA et al., 2007). No entanto, nas cascas, uma resina pode ser encontrada e esta é utilizada na medicina tradicional para o tratamento de ferimentos, distúrbios gástricos e bronquite (MARSAIOLI et al., 1975). A característica principal das espécies de *Hymenaea* é a sua composição essencial de diterpenos nos extratos e resina das cascas do caule (DOMÉNECH-CARBÓ et al., 2009) e flavonoides (CARNEIRO et al., 1993; CLOSA et al., 1997; ALMEIDA et al., 2012).

O uso tradicional de *Hymenaea* como uma alternativa terapêutica tem despertado interesse de cientistas em todo o mundo. Na Nicarágua, o uso tradicional foi relatado, e as partes vegetais citadas foram as cascas e folhas, utilizadas como fortificantes (BARRET, 1994). Na costa leste da África, a resina das espécies *Hymenaea gaertneriana* e *Hymenaea verrucosa* são empregadas como matéria-

prima para a produção de vernizes (JOST et al., 1989). No Brasil, este gênero é citado em muitos estudos, principalmente na região Nordeste e Central. No Nordeste, há estudos etnofarmacológicos interessantes sobre as espécies de *Hymenaea* que descrevem o seu uso na forma de decocções ou xaropes para tosse, anemia, (AGRA et al., 2007; CUNHA; BORTOLOTTI, 2011), bronquite, inflamação, antioxidante (CHAVES; BARROS, 2012; OLIVEIRA et al., 2012), sinusite, espasmos abdominais, problemas na próstata, asma, gripe comum e para problemas pulmonares, além da resina em forma de patch para cicatrização de ferimentos (CHAVES; BARROS, 2012).

No que tange às atividades farmacológicas de *Hymenaea*, são relatadas na literatura estudos que avaliaram a atividade anticâncer e os resultados foram positivos (SAMPAIO et al., 1984). As plantas do gênero são utilizadas como chás e xaropes (LEITÃO et al., 2013), e os frutos e a farinha das sementes são utilizados como alimentos (OLIVEIRA et al., 2012). Em alguns artigos, o gênero foi um dos mais citados em estudos etnofarmacológicos (CHAVES; BARROS, 2012; CUNHA; BORTOLOTTI, 2011; ALBUQUERQUE et al., 2007a; MENDES; CARLINI, 2007). As partes citadas da planta são as cascas, resina, galhos e epicarpo contra tosse, gripe, bronquite, fraqueza, anemia, inflamações da próstata, úlcera e gastrite (AGRA et al., 2007; ALBUQUERQUE et al., 2007b). A resina de *Hymenaea* é encontrada na composição de âmbar, uma resina fóssil (HEINRICHS et al., 2013). Uma publicação do século 19, escrita por um naturalista europeu, cita espécies de *Hymenaea* utilizadas no Brasil, o qual cita a utilização de frutos e sementes para tosse e como fortificante (OLIVEIRA et al., 2011).

Vários estudos farmacológicos *in vivo* confirmam o potencial medicinal do gênero, que foi considerado ativo para várias atividades, como diurético, moluscicida, antibacteriano, antifúngico, inibidor de tirosinase, anti-inflamatório, antinociceptivo, antiviral, antioxidante, antiespasmódico, miorrelaxante, leishmanicida, inseticida, imunomodulador, antitumoral, antiulcerogênico, antidiarreico (OLIVEIRA et al., 2018).

2.4 A ESPÉCIE *Hymenaea martiana*

Hymenaea. martiana é uma árvore nativa na região Nordeste do Brasil, também conhecida como “jatobá”, pertencente ao gênero *Hymenaea* (Figura 6). Shanley e Medina (2005) caracterizam esta planta como árvore de porte grande, com 15 a 20 metros de altura, possuindo copa arredondada com folhagem densa e casca espessa, tronco reto, com cerca de 2 metros de diâmetro. Esta planta é oriunda da África, podendo ser encontrada no México, Cuba e América do Sul, apresentando grande distribuição no território brasileiro (SOUZA, 2008).



Figura 6: *Hymenaea martiana*. A: Árvore. B: Flores. C: Frutos.

Fonte: OLIVEIRA, 2015.

H. martiana tem sido utilizada na medicina tradicional para o tratamento de anemia e gastrite. Estudos etnobotânicos de plantas medicinais comercializadas na Paraíba, Brasil, mostraram que esta árvore foi uma das mais citadas (ANSELMO et al., 2012). Em 2005, a espécie apresentou o terceiro maior valor de uso, que foi calculado através de um método quantitativo que demonstra a importância relativa das espécies conhecidas localmente. Esta planta foi mencionada para o tratamento dos fluidos biológicos, inflamações e reumatismo, sendo destacada como a espécie de maior importância representativa de um grupo de plantas utilizadas para tratamentos de tecidos esqueléticos, músculos e conectivos. A planta é consumida principalmente como um extrato alcoólico, utilizando bebida destilada (“cachaça”) ou vinho (GAZZANEO et al., 2005). Além disso, as comunidades utilizam a planta como alimento, material de construção e como planta medicinal (SILVA; ANDRADE, 2005).

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

sementes foram maiores e mais robustas do que outras espécies do gênero. A distinção entre as espécies *H. courbaril* e *H. martiana* foi realizada também pela diferença entre os frutos (CUNHA-SILVA et al., 2012).

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

Calixto e colaboradores (1992a) estudaram os efeitos de *H. martiana* sob o músculo liso. O extrato hidroalcoólico causou deslocamento dependente de concentração na curva de resposta de vários neurotransmissores. Em íleo de cobaias, em concentrações de 50 a 100 mg/mL, o extrato causou discreto deslocamento da curva resposta obtida com bradicinina e acetilcolina. Depressão destes transmissores foi obtida em concentrações de 200 mg/mL do extrato. Estes dados mostram a atividade potencial da planta contra contrações induzidas por alguns neurotransmissores não-vasculares em músculo liso (CALIXTO et al., 1992a).

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

Cechinel-Filho et al., em 2000, também investigaram as propriedades antinociceptiva e anti-edematogênica da astilbina, componente majoritário isolado de *H. martiana*, assim como derivados obtidos por modificação estrutural, como taxifolina e compostos relacionados. A avaliação foi desenvolvida por vários métodos, como contorção induzido por ácido acético e teste de formalina, edema de pata induzido por carragenina, dextrana e bradicinina em ratos. Astilbina, taxifolina e seus derivados tetrametilados exibiram potente atividade antinociceptiva dose-dependente no teste de

contorção abdominais induzidor por ácido acético (i.p.). Estas duas substâncias foram potentes em atenuar a segunda fase do teste da formalina. Ambos os componentes exibiram efeito anti-edematogênico em edema de pata induzido por dextrana, e se mostraram mais potentes do que o ácido acetilsalicílico e paracetamol. A taxifolina penta-acetilada inibiu o edema de pata induzido por bradicinina.

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

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

Por outro lado, a atividade antimicrobiana de *H. martiana* foi testada contra fungos patogênicos. O extrato bruto e a fração hidroalcoólica apresentaram alta atividade contra *Cryptococcus neoformans*, enquanto as frações metanólicas e butanólicas foram mais ativas contra *Trichopyton rubrum*, *Trichopyton mentagrophytes* e *Microsporium canis* (SOUZA et al., 2009).

Quimicamente, os flavonoides glicosilados astilbina e engelitina e a cromona eucrifina foram identificados nas cascas da espécie. Além disso os compostos, que foram capazes de antagonizar respostas da bradicinina. Este efeito pode explicar as ações analgésica e anti-inflamatória desta planta. Astilbina é um flavonoide originalmente identificado como um ingrediente ativo presente no extrato bruto de cascas desta espécie com atividade antioxidante (CECHINEL et al., 2000), e foi caracterizado como o composto majoritário do extrato das cascas (CARNEIRO et al., 1993).

O NEPLAME (Núcleo de Estudos e Pesquisas de Plantas Medicinais) tem desenvolvido estudos com a espécie *H. martiana*. O teor de compostos fenólicos totais de *H. martiana* foi determinado por CLAE-DAD) e teores consideráveis foram obtidos, com $428,50 \pm 5,91$ de equivalentes de ácido gálico/g do extrato etanólico e $705,50 \pm 7,22$ mg de equivalentes de ácido gálico no extrato acetato de etila. O teor de flavonoides totais foi de $394,90 \pm 8,43$ e $479,60 \pm 10,38$ para os dois extratos, respectivamente. O extrato etanólico apresentou maior atividade antioxidante em relação ao ácido ascórbico e BHA, utilizando o método do sequestro do radical DPPH, com valores de IC_{50} de $0,84 \pm 0,26$ µg/mL (ALMEIDA et al, 2012).

Um outro estudo desenvolvido pelo grupo evidenciou a forte presença de compostos fenólicos e flavonoides, bem como terpenos, derivados antracênicos e esteroides em extratos obtidos por diferentes métodos em várias partes da planta. A extração por maceração das cascas foi o método que

demonstrou ser mais eficiente para a extração de compostos fenólicos e flavonoides das cascas de *H. martiana* (OLIVEIRA et al., 2016). Uma otimização de extração foi realizada com as cascas da espécie, e foram estudados os métodos extrativos por maceração e turbólise. A melhor condição extrativa foi considerada com o extrato obtido por turbólise preparado com etanol a 50% e proporção 1:30, o qual apresentou melhores resultados no planejamento fatorial para rendimento, compostos fenólicos totais e flavonoides totais (OLIVEIRA, 2015).

O potencial de *H. martiana* para o tratamento de mastite em caprinos foi avaliado *in vivo* ainda pelo NEPLAME. Os animais foram experimentalmente induzidos com cepas de *Staphylococcus aureus* e foram tratados uma formulação contendo o extrato etanólico bruto da planta apresentou atividade antibacteriana. O efeito foi atribuído à presença de compostos fenólicos, principalmente flavonoides, no extrato da planta (PEIXOTO et al., 2015).

Os flavonoides têm sido caracterizados como os compostos majoritários das cascas desta espécie, mais especificamente a astilbina, e a ocorrência desta classe de metabólitos tem sido relacionada com o seu uso medicinal (CARNEIRO et al, 1993; CECHINEL et al, 2000). A Figura 7 apresenta os compostos fenólicos (três flavonoides e uma cromona) identificados nas cascas de *H. martiana*.

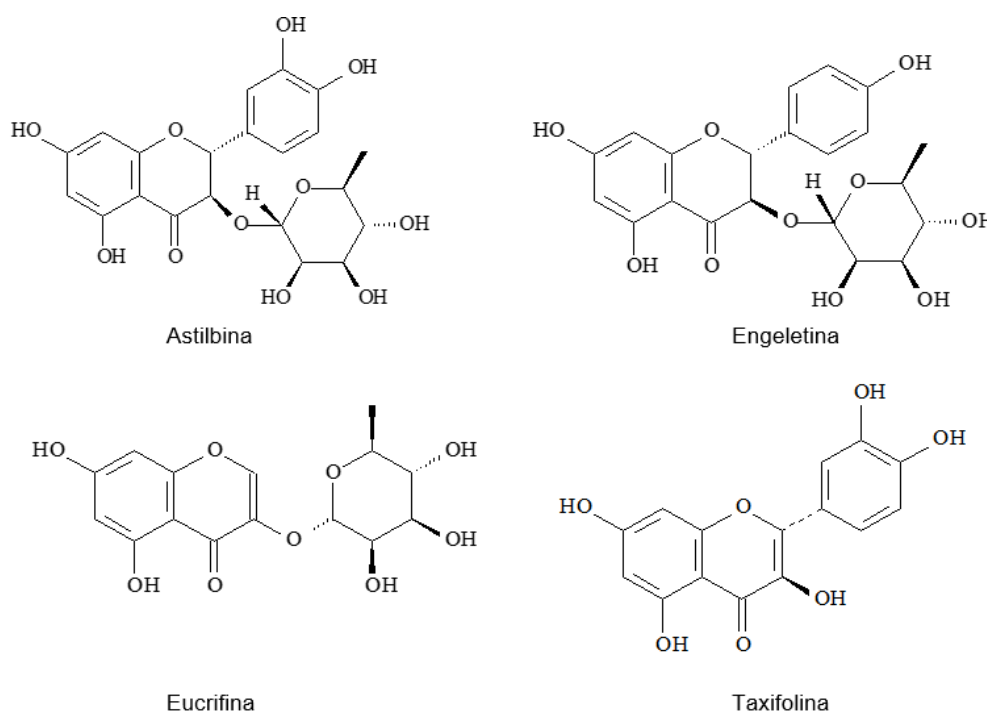


Figura 7: Compostos fenólicos já identificados em *Hymenaea martiana* (CARNEIRO et al, 1993; CECHINEL et al, 2000; ALMEIDA et al, 2012).

Fonte: OLIVEIRA, 2015.

Diante do exposto, os dados encontrados sobre *Hymenaea martiana* demonstram o potencial terapêutico e antioxidante da espécie caracterizada por uma composição química rica em flavonoides

com atividades biológicas já relatadas. Entretanto, o desenvolvimento e avaliação de nenhum produto cosmético com esta espécie foi encontrado na literatura, demonstrando o potencial inovador do presente estudo.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Realizar um estudo fitoquímico do extrato das cascas de *Hymenaea martiana*, bem como incorporar o extrato etanólico em uma formulação fitocosmética com ação fotoprotetora, antioxidante e antimicrobiana.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter o extrato etanólico das cascas de *H. martiana*;
- Avaliar o teor de compostos fenólicos e flavonoides totais do extrato bruto e frações de *H. martiana*;
- Avaliar a atividade antioxidante, antimicrobiana e fotoprotetora *in vitro* do extrato bruto e frações;
- Realizar um estudo para a detecção de flavonoides por CLAE-EM na fração bioativa;
- Realizar o fracionamento, isolamento e purificação de flavonoides na fração de melhores resultados para as atividades avaliadas, por meio de métodos cromatográficos;
- Realizar a identificação espectroscópica dos flavonoides isolados;
- Avaliar o potencial fotoprotetor e antioxidante das frações obtidas e compostos isolados;
- Realizar uma prospecção tecnológica do gênero *Hymenaea*, com uma busca de patentes em bancos de dados nacionais e internacionais, a fim de avaliar o potencial tecnológico do gênero;
- Incorporar o extrato etanólico bruto de *H. martiana* em uma formulação fitocosmética com ação fotoprotetora.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A revisão bibliográfica foi realizada de forma constante durante toda a execução do projeto, utilizando como base de dados o Chemical Abstracts, Web of Science, Science Direct e o Portal Periódicos da CAPES, na área de produtos naturais.

4.2 COLETA E PROCESSAMENTO DO MATERIAL VEGETAL

As cascas de *Hymenaea martiana* foram coletadas na cidade de Petrolina, Pernambuco, Brasil, em julho de 2015, e foram identificados no Herbário da Universidade Federal do Vale do São Francisco (HVASF), com exsicata nº 6444 (Figura 16), coordenadas 09°11'04.30" S, 040°18'05.40" W, 357 m de altura. O material foi seco em temperatura média de 40 °C em estufa de circulação de ar (Ethiktechno[®], modelo 420 TD), por um período de 72 horas. Após a secagem, o material foi pulverizado em moinho de facas (Quimis[®]). A espécie possui cadastro no SisGen (Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético) sob o cadastro: A3E4538 (Anexo).



Figura 8: Identificação botânica de *Hymenaea martiana*. Exsicata nº 6444.

Fonte: OLIVEIRA, 2015.

4.3 OBTENÇÃO DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO E FRAÇÕES

Tendo em vista que investigações anteriores evidenciaram melhores controles das condições e parâmetros do método extrativo (OLIVEIRA, 2015; OLIVEIRA et al., 2016), o método extrativo empregado para o desenvolvimento deste trabalho foi a extração por ASE (Extração Acelerada por Solventes), além das vantagens deste método salientadas anteriormente na revisão bibliográfica (item 2.1.3), não foram encontrados na literatura consultada estudos com o extrato da espécie obtido por ASE, sendo esta mais uma evidência do ineditismo do presente trabalho.

As cascas secas e pulverizadas de *H. martiana* (aproximadamente 300 g) foram submetidas à extração no equipamento de ASE (Thermo Scientific Dionex® ASE 350) (Figura 9), equipado com célula extratora de aço inoxidável com fechamento hermético e cartucho de papel 22 x 50 mm, um frasco de lavagem (rinse) e frascos coletores (vidro transparente) com capacidade de 250 mL. Esta etapa do estudo foi desenvolvida em parceria com o Instituto Nacional do Semiárido (INSA) em Campina Grande-PB.

Como os analitos de interesse do presente estudo são os compostos fenólicos, tomando como base a composição fitoquímica das cascas da espécie, relatada em estudos anteriores, o etanol foi escolhido como o solvente extrator. Esta escolha foi baseada no fato dos compostos fenólicos serem considerados substâncias com polaridade entre intermediária e alta, e os solventes sugeridos para a sua extração são o metanol, água acidificada, acetato de etila e etanol, sendo este último preferido (VÁZQUEZ et al., 2012; WANG et al., 2016). Desta forma, o etanol 99% foi utilizado como solvente extrator, temperatura de extração 50 °C, tempo estático 15 minutos, fluxo 5 mL/min, com duas extrações por célula, empregando a metodologia de Gomes (2015) para a extração de compostos fenólicos por ASE.



Figura 9: Equipamento de Extração Acelerada por Solventes (ASE) Thermo Scientific Dionex[®] ASE 350.

Após o processo de extração, a solução extrativa foi concentrada em evaporador Thermo Scientific Rocket Evaporator[®], na temperatura de 45 °C (Figura 10). O solvente residual foi retirado em estufa de ar circulante Ethiktechno[®], modelo 420 TD, a 45 °C por 24 horas obtendo 67,0 g do Extrato Etanólico Bruto (Hm-EEB).

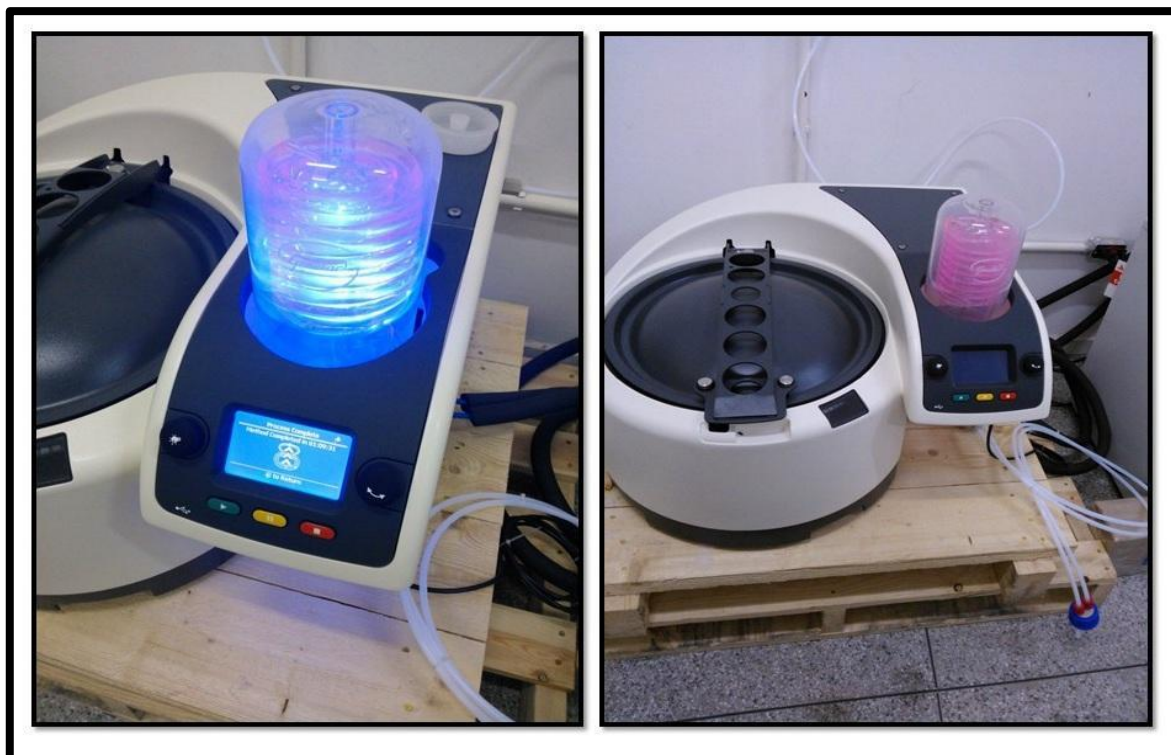


Figura 10: Evaporador Thermo Scientific Rocket Evaporator®.

Uma parte do Hm-EEB (10,0 g) foi solubilizado numa mistura MeOH:H₂O (3:7 v/v), sendo posteriormente submetida à partição líquido-líquido, em funil de separação, sob agitação manual, de forma exaustiva com hexano, clorofórmio e acetato de etila. Após esse procedimento, os solventes foram evaporados em rotaevaporador a uma temperatura média de 50 °C, fornecendo a fração hexânica (Hm-Fr.Hx), fração clorofórmica (Hm-Fr.CHCl₃) e fração acetato de etila (Hm-Fr.AcOEt) (Figura 11).

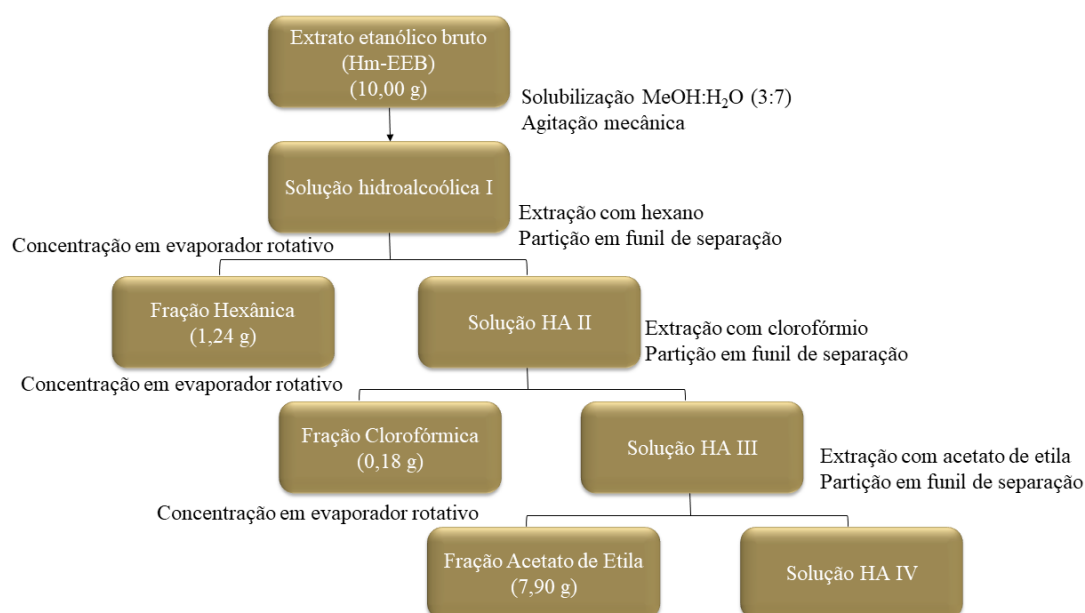


Figura 11: Esquema representativo do processo de partição líquido-líquido do Hm-EEB.

4.4 ESTUDO FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES

4.4.1 Determinação do teor de compostos fenólicos totais

Os estudos de determinação do teor de compostos fenólicos em plantas podem ser realizados utilizando o método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu, que é o método colorimétrico de oxidação-redução mais utilizado. O reagente de Folin-Ciocalteu é formado a partir da mistura do ácido fosfomolibídico e o ácido fosfotungstístico. Nesta mistura, o molibdênio e o tungstênio apresentam-se estado de oxidação 6^+ (Figura 12). Estes elementos, porém, na presença de agentes redutores, como os compostos fenólicos, formam os chamados molibdênio e tungstênio de coloração azul, que absorvem em 765 nm, cuja coloração permite a determinação da concentração das substâncias redutoras (LI et al., 2008).

Esta reação ocorre em meio alcalino, sendo o carbonato de sódio (Na_2CO_3) a base mais indicada. É importante ressaltar que a intensidade da coloração é controlada pelo número de grupamentos hidroxila, e o composto padrão de referência mais utilizado é o ácido gálico (NACZK et al., 2004).

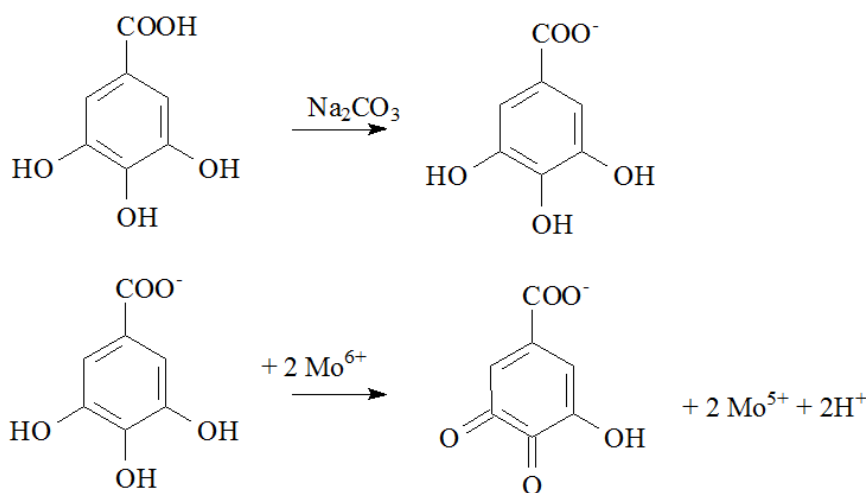


Figura 12: Reação do ácido gálico com o reagente de Folin-Ciocalteu.

Fonte: SILVA, 2013.

O teor de compostos fenólicos totais foi mensurado utilizando o método colorimétrico que utiliza o reagente de Folin-Ciocalteu (Sigma-Aldrich®) e ácido gálico como padrão, baseado no método descrito por Li e colaboradores (2008). Para isso, uma alíquota (200 μL) das amostras diluídas foi

adicionada à 1 mL do reagente de Folin-Ciocalteu previamente diluído (1:10) em água destilada, sendo misturados logo em seguida. A mistura foi deixada em repouso por 3 minutos, mantidos na ausência da luz, e posteriormente foram adicionados 800 µL de uma solução estoque de Na₂CO₃ 7,5%. As soluções finais foram deixadas em repouso na ausência da luz por 120 minutos. Ao final do processo, a absorvância de cada solução foi determinada em espectrofotômetro (Quimis[®]) em 735 nm contra o branco (todos os componentes, exceto a amostra em análise) e os resultados foram plotados em um gráfico que correlaciona a absorvância da amostra com sua concentração. Assim, o teor de compostos fenólicos totais dos extratos foi expresso em mg de equivalentes de ácido gálico por grama de amostra (mg EqAG/g) através da curva de calibração do ácido gálico. A curva de calibração foi obtida em concentrações que variaram de 50 a 500 µg/L, $R^2 = 0,9923$. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

4.4.2 Determinação do teor de flavonoides totais

O teor de flavonoides totais foi determinado para as amostras que obtiveram valores significativos de teor de compostos fenólicos totais através do método colorimétrico por complexação metálica descrito anteriormente (MARQUES et al., 2012), em que a catequina como padrão. Uma solução padrão de catequina de 5 mg/mL em etanol absoluto e soluções amostra na mesma concentração e solvente foram preparadas e foi adicionado 0,2 mL de solução de AlCl₃ 2,5% etanólico e 3,80 mL de etanol absoluto. Tais soluções foram deixadas em repouso por 30 minutos à 25 °C. Ao final do processo, a absorvância de cada solução foi determinada em espectrofotômetro (Quimis[®]) em 408 nm contra o branco (todos os componentes, exceto a amostra em análise), cujos resultados foram plotados em um gráfico que correlaciona a absorvância da amostra com sua concentração. Desta maneira, o teor de flavonoides totais dos extratos foi expresso como mg de equivalentes de catequina por grama de amostra (mg EC/g), por meio da curva de calibração da catequina. A curva de calibração foi obtida em concentrações que variaram de 2,5 a 20 µg/mL, com $R^2 = 0,9987$. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

4.4.3 Determinação do fator de proteção solar (FPS)

A atividade fotoprotetora foi avaliada para as amostras que obtiveram valores significativos de teor de compostos fenólicos totais e flavonoides totais, utilizando a leitura espectrofotométrica de soluções diluídas, de acordo com o Método de Mansur com adaptações (MANSUR et al., 1986; OLIVEIRA-JÚNIOR et al., 2017). As amostras foram previamente secas em estufa a 40 °C por 60 minutos. As soluções-amostra foram preparadas na concentração de 100 mg/L. Varreduras de 260 a

400 nm com intervalos de 5 nm foram realizadas em um espectrofotômetro (Quimis[®]), com cubetas de quartzo de 1 cm de caminho óptico.

Os cálculos foram realizados considerando os intervalos de λ determinados (Equação 1).

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

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

4.4.4. Determinação da atividade antioxidante

A atividade antioxidante foi avaliada para as amostras que obtiveram valores significativos de teor de compostos fenólicos totais e flavonoides totais.

4.4.4.1 Sequestro do radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH)

O sequestro do radical DPPH foi avaliado segundo descrito por Brand-Williams et al. (1995). Uma solução de DPPH (Sigma-Aldrich[®]) foi preparada na concentração de 20 mg/mL e soluções amostra nas concentrações de 0,31, 0,62, 0,12, 0,25, 0,5 e 1 mg/mL, ambas em metanol. Ácido ascórbico foi utilizado como controle positivo (1 mg/mL), enquanto 40 μ L da solução metanólica diluída com 250 μ L da solução de DPPH foi utilizado como controle negativo. Metanol (200 μ L) foi adicionado a 200 μ L a cada uma das amostras. O metanol foi utilizado como o branco. Em seguida, 250 μ L da solução de DPPH foi adicionado a 40 μ L de cada uma das soluções amostra. A leitura em espectrofotômetro de Ultravioleta UV-Vis (Shimadzu[®] UV 1601) foi realizada em 517 nm, 25 minutos após adição de DPPH às soluções amostra. Todas as leituras foram realizadas em triplicata.

As atividades sequestrantes (AS) de DPPH dos extratos ou fases foram expressas em porcentagem, segundo a Equação 2:

$$(\%AS) = \left[\frac{(A_{controle} - A_{amostra})}{A_{controle}} \cdot 100 \right] \quad (2)$$

Onde $A_{controle}$ é a absorvância inicial do controle etanólico com DPPH e $A_{amostra}$ a absorvância para a amostra.

4.4.4.2 Sequestro do radical ABTS⁺

O sequestro do radical livre ABTS⁺ (Sigma[®]) das amostras foi realizada de acordo com Uchôa et al. (2015). A solução de ABTS⁺ 7 mM foi preparada adicionando persulfato de potássio 140 mM e a mistura foi deixada em repouso ao abrigo da luz à temperatura ambiente (25 °C) por 12 a 16 horas, para a formação do radical. A solução ABTS⁺ foi diluída em etanol até obter absorvância 0,7 (± 0,02) em 732 nm, resultando na solução de ABTS⁺ padronizada.

As leituras foram obtidas utilizando alíquotas de 30 µL das soluções amostra preparadas com concentração de 1 mg/mL, adicionando 3 mL da solução de ABTS⁺ padronizada. As amostras foram medidas em diferentes intervalos de tempo (6, 15, 30, 45, 60 e 120 min) em 734 nm. A porcentagem de inibição da oxidação foi calculada e plotada em função da concentração do padrão antioxidante Trolox (SIGMA[®]), cujos resultados foram expressos em capacidade antioxidante equivalente ao trolox (TEAC, µM).

4.4.4.3 Determinação da capacidade antioxidante total – método do fosfomolibdênio

A capacidade antioxidante total (%TAA) foi avaliada através do método do fosfomolibdênio (PRIETO et al., 1999). As soluções foram preparadas na concentração de 1 mg/mL, e 0,1 mL foi adicionado a 1 mL da solução reagente (600 mM de ácido sulfúrico, 28 mM de fosfato de sódio e 4 mM de molibdato de amônio). As soluções foram submetidas a aquecimento em banho maria a 90 °C por 90 minutos.

Em seguida, as leituras foram realizadas em 695 nm contra o controle (1 mL do reagente e 0,1 mL do solvente). A %TAA foi expressa em relação ao ácido ascórbico e calculada de acordo com a Equação 4:

$$\%TAA = \frac{(As-Ac)}{Aaa-Ac} \times 100 \quad (3)$$

Onde Ac representa a absorvância do controle, As a absorvância da amostra e Aaa a absorvância do ácido ascórbico.

4.4.5 Avaliação da atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana foi realizada para as amostras que obtiveram valores significativos de teor de compostos fenólicos totais e flavonoides totais. O Hm-EEB e Hm-Fr.AcOEt foram testados contra os seguintes microorganismos: *Staphylococcus aureus* (ATCC - UFPEDA 02, ATCC - UFPEDA 4212, Isolado clínico - UFPEDA 705, Isolado clínico - UFPEDA 659), *Enterococcus faecalis* (UFPEDA 138), *Klebsiella pneumoniae* (UFPEDA 396), *Candida albicans* (UFPEDA 1007), *C. tropicalis* (UFPEDA 1011) e *C. krusei* (UFPEDA 1002). As cepas microbianas utilizadas foram obtidas do Departamento de Antibióticos (Universidade Federal de Pernambuco, Brasil).

4.4.5.1 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

Os valores de CIM para as bactérias e fungos foram determinados através do método de microdiluição em caldo, de acordo com o CLSI (2012). A leitura foi realizada em leitor de microplacas a 600 nm, antes e após a incubação a 37 °C por 24h. Os valores de CIM para as leveduras foram determinados através do método de microdiluição em caldo, de acordo com o CLSI M27 A3 (2008). A leitura foi realizada em leitor de microplacas a 492 nm, antes e após a incubação a 35 °C por 48h.

As concentrações das amostras testadas frente às diferentes espécies e linhagens de microrganismos variaram de 0,09 a 5 mg/mL.

4.4.5.2 Determinação da concentração bactericida mínima (CBM)

A CBM das amostras foi determinada de acordo com os valores de CIM, e 5 µL foram retirados a partir dos poços de CIM e transferidos para placas com meio Müeller-Hington Agar, incubadas a 37 °C por 24h. A CBM foi referida como a mínima concentração das amostras com bactérias não-viáveis.

4.4.5.3 Determinação da concentração fungicida mínima (CFM)

A CFM das amostras foi determinada de acordo com os valores de CIM. 5 µL retirados a partir dos poços de CIM foram transferidos para placas com meio Agar Sabouraud Dextrose e incubadas a 35 °C por 24h. A CFM foi referida como a mínima concentração das amostras com leveduras não-viáveis.

4.4.6 Desreplicação e detecção de flavonoides em Hm-Fr.AcOEt, através de análise por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (CLAE-EM)

A análise em CLAE-EM foi desenvolvida com a fração Hm-Fr.AcOEt, pois foi a fração com melhores resultados no teor de compostos fenólicos totais e flavonoides totais. Esta análise foi realizada em parceria com o Núcleo de Pesquisas em Produtos Naturais e Sintéticos da Universidade de São Paulo – Ribeirão Preto-SP, utilizando um equipamento de CLAE (Shimadzu Prominence[®]), equipada com duas bombas binárias (LC-20AD), unidade de desgaseificação (DGU-20A), amostrador automático (SIL-20AHT), forno (CTO-20A), módulo de comunicação (CBM-20A), detector de arranjo diodo (SPD-M20A) e uma coluna de fase reversa (Luna – Phenomenex[®], 250 mm x 4,6 mm, 5 µm). A fase móvel foi composta por uma mistura de solvente A (0,1% ácido fórmico em água ultrapurificada) e solvente B (0,1% de ácido fórmico em metanol), com fluxo de 1 mL/min.

O cromatógrafo foi acoplado a um espectrômetro de massas AmaZon SL ion trap (Bruker Daltonics[®]), equipado com ionizador eletrospray e analisador ion trap, nas seguintes condições: voltagem do capilar 3500 V; placa final 500 V; nebulizador 60 psi; fluxo de gás 10,0 L.min⁻¹ e temperatura do gás 330 °C.

Os resultados foram analisados utilizando o banco de dados on-line do GNPS (Global Natural Product Social Molecular Networking) (GNPS, 2017; WANG et al., 2016). Os dados obtidos no cromatógrafo acoplado ao espectrômetro de massas foram convertidos para o formato mzXML diretamente no software DataAnalysis 4.2 (Bruker Daltonics[®]), e submetidos à análise de desreplicação no banco de dados do GNPS. As substâncias foram consideradas identificadas na amostra se os espectros de massas obtivessem pelo menos seis íons que combinam e pontuação de cosseno (*cosine score*) acima de 0,5 (OLIVEIRA et al., 2017).

As fórmulas moleculares e nomenclaturas das substâncias foram obtidas no PubChem (PUBCHEM, 2017) e ChemSpider (CHEMSPIDER, 2017).

4.4.7 Perfil cromatográfico por HPLC-DAD da fração Hm-Fr.AcOEt

O perfil cromatográfico da fração Hm-Fr.AcOEt foi desenvolvida preparando uma solução amostra (5 mg/mL) com solubilização assistida por ultrassom. A amostra foi analisada em um equipamento Agilent 1260 Infinity, com desgaseificador e bomba quaternária (G1311D), injetor automático (G1329B), forno de coluna (G1316A) e detector DAD (G4212B). A coluna utilizada foi Zorbax[®] (Agilent), SB-C18 5 µm; 4,6 x 250 mm com uma pré-coluna Zorbax[®] (Agilent) SB-C18 5

μm e 4.6 x 12.5 mm. A fase móvel foi composta por água (A) e acetonitrila (B) (LiChrosolv®, Merck), em um fluxo de 2,4 mL/min e gradiente linear conforme segue: 92% (A) - 65% (A) (0-15min). A temperatura da coluna foi de 30 °C, a detecção foi realizada em *full scan* (190-400 nm). O cromatograma foi integrado em 256 nm.

4.4.8 Fracionamento, isolamento, purificação e identificação estrutural de flavonoides da fração Hm-Fr.AcOEt

A cromatografia de exclusão molecular em coluna (CC) foi utilizada com o objetivo de isolar os flavonoides da fração Hm-Fr.AcOEt (Figura 13), composta por uma coluna de vidro na posição vertical, com 42 cm de comprimento, 2,5 cm de diâmetro. A fase estacionária utilizada foi o Sephadex-LH20®, e para a fase móvel foi utilizado metanol 100%. O processo foi desenvolvido em temperatura ambiente, sob pressão atmosférica.



Figura 13: Processo de fracionamento em cromatografia em coluna (Sephadex-LH20®) com a fração Hm-Fr.AcOEt do extrato das cascas de *Hymenaea martiana*.

Desta forma, 420 mg da amostra previamente solubilizada com metanol foram inseridas na coluna previamente preparada com a fase estacionária, e esta foi eluída com a fase móvel (metanol 100%). Foram obtidas 27 frações, que foram avaliadas por meio de cromatografia em camada delgada analítica (CCDA) e posteriormente unidas as que apresentaram R_f semelhantes, resultando em 6 grupos de frações (GFr-1-6) (Figura 14).

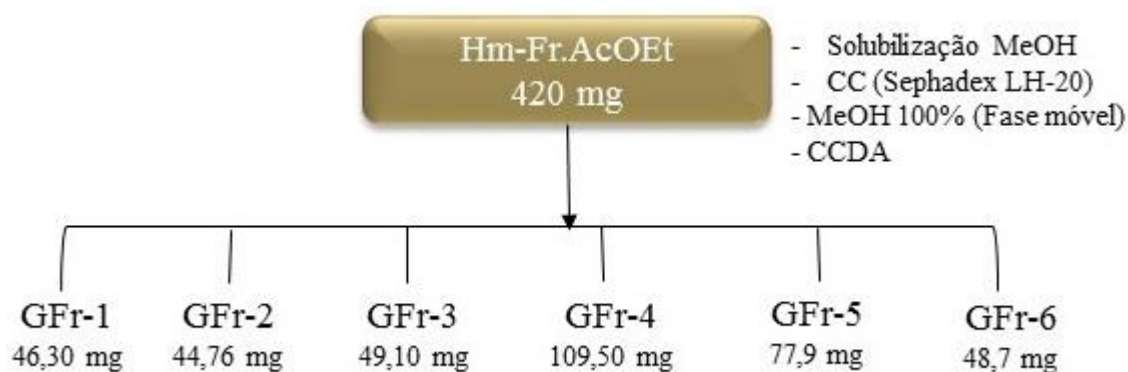


Figura 14: Fracionamento cromatográfico da fração acetato de etila (Hm-Fr.AcOEt) do extrato das cascas de *Hymenaea martiana*.

Estas frações foram avaliadas quanto às atividades fotoprotetora (conforme item 4.4.3) e antioxidante (item 4.4.4).

As frações foram submetidas à análise de RMN em um espectrometro Bruker ASCEND III 400 operando a 9,4 Tesla, observando ^1H e ^{13}C a 400 e 100 MHz, respectivamente, equipado com sonda multinuclear de detecção direta (BBO) de 5 mm com gradiente de campo no eixo z . Os experimentos de RMN uni (^1H e $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$) e bidimensionais (^1H - ^1H COSY, ^1H - ^{13}C HSQC e ^1H - ^{13}C HMBC) foram adquiridos a 296 K em DMSO- d_6 (contendo 0,05% de TMS). Os experimentos de RMN de correlação direta (^1H - ^{13}C HSQC) e longa distância (^1H - ^{13}C HMBC) foram otimizados para a constante de acoplamento $^1J_{(\text{C}, \text{H})}$ e $^{\text{LR}}J_{(\text{C}, \text{H})}$ de 140 e 8 Hz, respectivamente. Os deslocamentos químicos estão expressos em ppm (δ) e as multiplicidades dos sinais indicadas segundo a convenção: *s* (simpleto), *sl* (simpleto largo), *d* (duplete), *dd* (duplo duplete), *ddd* (duplo duplo duplete), *dddd* (duplo duplo duplo duplete), *dl* (duplete largo), *dm* (duplo multiplete), *t* (triplete). As constantes de acoplamento (*J*) são expressas em Hertz (Hz).

4.5 INCORPORAÇÃO DO EXTRATO ETANÓLICO DE *Hymenaea martiana* EM UMA FORMULAÇÃO FITOCOSMÉTICA

Com o intuito de realizar uma busca de anterioridade para uma prospecção do potencial tecnológico do gênero *Hymenaea*, foi realizada uma busca pelos pedidos de patentes depositados no banco de dados nacional e internacionais, a fim de avaliar o potencial tecnológico do gênero.

4.5.1 Prospecção tecnológica do gênero *Hymenaea*

A pesquisa do tipo prospecção foi executada analisando os pedidos de patente depositados nos bancos de dados nacional e internacionais, a fim de avaliar o potencial tecnológico do gênero. Os bancos de dados *European Patent Office* (EPO), *World Intellectual Property Organization* (WIPO), *United States Patent and Trademark Office* (USPTO) e o banco de dados do Instituto Nacional de Propriedade Industrial do Brasil (INPI) foram analisados para tal.

A pesquisa foi realizada em janeiro de 2017, empregando os “*Hymenaea*” e “jatobá” (para a base de dados brasileira) e “*Hymenaea*” (para as bases de dados internacionais). Foram empregados como palavras-chave, sendo considerados válidos os documentos que apresentassem esses termos no título e/ou resumo. Foram analisados todos os pedidos de patente existentes até janeiro de 2017.

4.5.2 Preparo da base em gel Carbopol®

Visando a demonstração de uma aplicação tecnológica para o extrato bruto de *H. martiana*, a incorporação do extrato em uma base cosmética semissólida em gel Carbopol® foi realizada, cujas formulações obtidas foram submetidas a análises de controle de qualidade e estudo de estabilidade preliminar, segundo diretrizes sanitárias (BRASIL, 2010; BRASIL, 2004).

O gel base utilizado foi composto por Carbopol® 940 na concentração de 1%, metilparabeno, propilparabeno, trietanolamina, EDTA e água destilada. Esta base foi preparada dispersando o agente gelificante (Carbopol®) em água com conservante Metilparabeno (Nipagin®), Propilparabeno (Nipazol®), juntamente com umectante (propilenoglicol). Em seguida, deixou-se em repouso inicial por 24 horas, para facilitar a preparação do gel na dispersão do Carbopol® na água. Posteriormente o agente alcalinizante (trietanolamina) foi misturado até atingir uma faixa de pH entre 5,0 e 5,5 obtendo-se um gel transparente.

Na Tabela 6, é apresentada a composição da formulação da base gel de Carbopol®.

Tabela 6: Formulação da base gel de Carbopol®.

Excipientes	Concentração	Ação
Carbopol® 940	1%	Agente gelificante
Metilparabeno	0,1%	Conservante
Propilparabeno	0,2%	Conservante
Propilenoglicol	7%	Umectante
EDTA	0,1%	Agente quelante
Trietanolamina	q.s.p. (pH = 5,0 a 5,5)	Agente alcalinizante
Água purificada	q.s.p.	Veículo

4.5.3 Incorporação do extrato etanólico de *Hymenaea martiana* na base de gel Carbopol®

A partir da base gel de Carbopol® preparada, foram incorporados o filtro químico e extrato bruto de *H. martiana* (Hm-EEB) previamente levigado em dipropilenoglicol, em diferentes concentrações (Tabela 6). Após a manipulação, o pH das formulações foi ajustado para 6,0 utilizando solução de trietanolamina, e as preparações foram armazenados em tubos falcon transparente de 50 mL à temperatura ambiente.

O filtro químico UVA/B hidrossolúvel composto por ácido-2-fenilbenzimidazol-5-sulfônico e ácido-2-hidroxi-4-metoxibenzofenona-5-sulfônico (Fagron®) foi utilizado nas concentrações informadas na Tabela 7.

As formulações foram avaliadas quanto ao controle de qualidade e estabilidade preliminar, conforme descrito a seguir.

Tabela 7: Composição das formulações fotoprotetoras.

Componentes	Ação	F1	F2	F3	F4
Filtro químico	Filtro UVA/ UVB	5%	0%	5%	10%
Hm-EEB	Filtro-Teste	0%	5%	5%	10%
Base gel	Veículo	q.s.p.	q.s.p.	q.s.p.	q.s.p.

4.5.4 Controle de qualidade e estudo de estabilidade preliminar das formulações

As formulações foram submetidas aos testes de controle de qualidade, de acordo com a caracterização físico-química e química das formulações-teste. Como análises físico-químicas, foram analisados o aspecto, cor, odor, determinação de pH em solução aquosa a 10%, densidade relativa (método do picnômetro), espalhabilidade e teste da resistência à centrifugação. Como análises

químicas, foram doseados os compostos fenólicos totais (conforme item 4.4.1), flavonoides totais (conforme item 4.4.2), atividade antioxidante (método de DPPH, conforme item 4.4.4.1) e atividade fotoprotetora (conforme item 4.4.3). As análises de controle de qualidade foram realizadas 24 horas após a manipulação.

As propriedades organolépticas foram analisadas macroscopicamente. As cores foram comparadas visualmente entre os produtos testados com a cor do padrão (extrato bruto Hm-EEB). Com relação ao odor, foram comparados o odor do produto teste com o odor do extrato bruto. Para a avaliação das propriedades organolépticas após o ciclo de gelo/degelo, amostras foram classificadas, como: normal, sem alteração; levemente modificada; modificada; intensamente modificada.

Para a determinação do pH, em uma dispersão aquosa a 10% (p/p) da amostra em água destilada foi preparada e esta foi avaliada usando pHmetro digital (MS Tecnopon, model mPA-210, Brazil). O eletrodo foi inserido diretamente na dispersão aquosa (BRASIL, 2010) e valores entre 5,5 e 6,5, compatíveis com o pH cutâneo, foram usados como critério de estabilidade.

A determinação da consistência por extensibilidade foi realizada como proposto por Isaac; Uchiyama (1998). A amostra de produto (0,3 g) foi colocada entre duas placas de vidro, com 10 x 20 cm e 0,5 cm de espessura, sendo uma delas disposta sobre um papel milimetrado, colado em uma placa de madeira. A adição de pesos, a cada três minutos, na placa superior, promove o espalhamento do produto, que pode ser medido como extensibilidade, em centímetros. Os resultados obtidos foram plotados em um gráfico no software Microsoft Excel® 2017.

Para o teste de resistência à centrifugação, 1 g da amostra foi pesado em eppendorf e submetido a rotação de 3000 rpm em centrífuga (Fanen, model 206 BL, Brasil) durante 30 minutos à temperatura ambiente (OLIVEIRA-JÚNIOR et al., 2017).

Para calcular a densidade de massa da substância (ρ_t) em uma determinada temperatura (t), esta foi calculada a partir de sua densidade relativa (d_t^t) pela fórmula: $\rho_t = d(\text{água}) d_t^t + 0,0012$, expressa em g/mL (BRASIL, 2010). A densidade relativa da substância foi determinada através de picnômetro. Utilizou-se um picnômetro limpo e seco, com capacidade de, no mínimo, 5 mL que tenha sido previamente calibrado. A calibração consiste na determinação da massa do picnômetro vazio e da massa de seu conteúdo com água, recentemente destilada e fervida. Transferiu-se a amostra para o picnômetro, removeu-se excesso da substância, e este foi pesado. O peso da amostra foi obtido através da diferença de massa do picnômetro cheio e vazio. Calculou-se a densidade relativa (d_{20}^{20}) determinando a razão entre a massa da amostra líquida e a massa da água.

A formulações-teste foram submetidas a estudos de estabilidade preliminar de acordo com os procedimentos descritos no Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos (BRASIL, 2004). O teste de estabilidade preliminar durou 15 dias. Os ciclos de congelamento e descongelamento alternaram

24 em 24 horas em temperaturas de $-5\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ e 24 horas em temperaturas de $40\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$, respectivamente. Ao término do ciclo de gelo/degelo, todas as análises realizadas no tempo zero (ou dia 01) do controle de qualidade foram repetidas (análises físico-químicas e químicas).

Todos os testes de controle de qualidade e estabilidade preliminar foram realizados conforme Farmacopeia Brasileira 5ª Edição (BRASIL, 2010) e Guia de Estabilidade para Produtos Cosméticos da ANVISA (BRASIL, 2004).

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todas as determinações foram realizadas em triplicata. Foram realizadas análises de variância ANOVA, um critério, seguido de comparações múltiplas pelo teste de Tukey. Valores foram considerados significativamente diferentes quando $p < 0,05$. Foram utilizados os softwares GraphPad Prism[®] 5.0, Microsoft Excel[®] 2017.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ESTUDO FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES *IN VITRO* DO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES

5.1.1 Determinação de compostos fenólicos totais, flavonoides totais, atividade fotoprotetora, antioxidante e antimicrobiana do extrato bruto e frações

O teor de compostos fenólicos totais e flavonoides totais do extrato etanólico bruto e frações obtidos das cascas de *Hymenaea martiana* são apresentados na Tabela 8.

Tabela 8: Teor de compostos fenólicos totais e flavonoides totais do Hm-EEB e frações.

Amostra	Compostos Fenólicos Totais (mg EAG/g) ± D.P.	Flavonoides Totais (mg EC/g) ± D.P.
Hm-EEB	420,125 ± 0,05 ^a	311,41 ± 0,05 ^a
Hm-Fr.AcOEt	393,04 ± 0,03 ^b	353,83 ± 0,012 ^b
Hm-Fr.Hx	78,84 ± 13,45 ^c	N.D.
Hm-Fr.CHCl ₃	58,28 ± 3,95 ^d	N.D.

Legenda: D.P. = Desvio Padrão. N.D. = Não detectado. Letras iguais na mesma coluna indicam não diferença estatística conforme ANOVA (seguido de Tukey), $p < 0.05$.

De acordo com os dados obtidos, o maior teor de compostos fenólicos foi encontrado no Hm-EEB, seguido pela Hm-Fr.AcOEt, corroborando estudos anteriores realizados com as cascas desta espécie, porém em valores inferiores (ALMEIDA et al., 2012; OLIVEIRA, 2015; OLIVEIRA et al., 2016). Isto pode ser justificado pelo método extrativo utilizado, assim como os volumes e diluições empregados nos métodos de determinação de compostos fenólicos (OLIVEIRA et al., 2016; ALMEIDA et al., 2012). A polaridade e solubilidade do solvente na fração Hm-Fr.AcOEt pode estar associada a uma maior concentração de compostos fenólicos que foram extraídos no Hm-EEB (ROBY et al., 2013).

O teor de flavonoides totais no Hm-EEB e Hm-Fr.AcOEt demonstra que estes compostos estão em concentrações significativamente altas, sendo fortes candidatos aos marcadores químicos da espécie. Nas frações Hm-Fr.Hx e Hm-CHCl₃ não foi detectado teor de flavonoides totais, sendo, portanto, a Hm-AcOEt e o Hm-EEB as amostras que contêm as maiores concentrações dos compostos de interesse. Esta fração foi então escolhida para um estudo fitoquímico mais aprofundado.

A Tabela 8 apresenta os resultados das atividades antioxidante e fotoprotetora do Hm-EEB e Hm-Fr.AcOEt. Os dados apresentados neste estudo também demonstram a alta capacidade antioxidante (TEAC), analisada através do método de inibição do radical ABTS⁺, com $83,75 \pm 11,96\%$ e $98,98 \pm 1,06\%$ para o Hm-EEB e Hm-Fr.AcOEt, respectivamente. A fração Hm-Fr.AcOEt apresentou a maior capacidade antioxidante total (método do Fosfomolibdênio), com $85,97 \pm 6,30\%$. Em contrapartida, o Hm-EEB apresentou a maior atividade sequestrante do radical DPPH, com 91,4%. A atividade antioxidante significativa do Hm-EEB e fração Hm-Fr.AcOEt apontam o grande potencial cosmético e farmacêutico da espécie investigada.

Tabela 9: Atividade antioxidante e fotoprotetora do Hm-EEB e Hm-Fr.AcOEt.

Amostra	DPPH (% AS) ± D.P.	ABTS⁺(% TEAC) ± D.P.	Fosfomolibdênio (%TAA) ± D.P.	FPS ± D.P.
Hm-EEB	$91,47 \pm 0,03^a$	$83,75 \pm 11,96^a$	$46,97 \pm 0,04^a$	$12,43 \pm 1,25^a$
Hm-Fr.AcOEt	$90,77 \pm 0,02^b$	$98,98 \pm 1,06^b$	$85,97 \pm 6,30^b$	$12,35 \pm 0,70^a$

Legenda: D.P. = Desvio Padrão. Letras iguais na mesma coluna indicam não diferença estatística conforme ANOVA (seguido de Tukey), $p < 0.05$.

Foi avaliado o potencial fotoprotetor das cascas de jatobá (*H. martiana*) (Tabela 9), e valores significativos foram encontrados. Provavelmente devido às altas concentrações de compostos fenólicos e expressiva capacidade antioxidante, o Hm-EEB e a fração Hm-Fr.AcOEt apresentaram valores relevantes, com $12,43 \pm 1,25$ e $12,35 \pm 0,70$, respectivamente. Segundo a ANVISA (BRASIL, 2012), o valor mínimo para FPS de uma formulação fotoprotetora deve ser de no mínimo 6,0, portanto, estas amostras apresentaram valores adequados para o desenvolvimento de fotoprotetores, com uma relevante atividade antioxidante.

Devido às suas propriedades fotoquímicas, os compostos fenólicos, como os flavonoides, são candidatos em potencial a substâncias fotoprotetoras e antioxidantes naturais. Como evidenciado na Figura 15, o potencial fotoprotetor de *H. martiana* apresentou valores relevantes, com o FPS do extrato bruto de $12,43 \pm 1,25$ e a fração acetato $12,35 \pm 0,70$. Quando comparados aos controles positivos quercetina e o filtro químico UVAB, os espectros de UV do extrato bruto de *H. martiana* evidenciaram uma absorção importante nas regiões UVB / UVA, sugerindo uma possível atividade fotoprotetora.

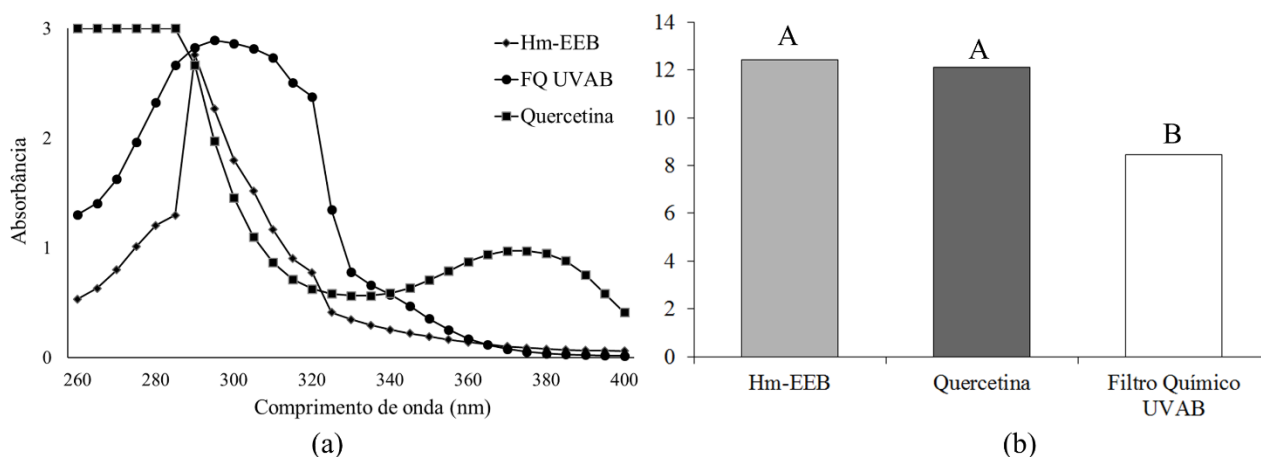


Figura 15: Varreduras de 260 a 400 nm com o Hm-EEB, quercetina e filtro químico UVAB (FQ UVAB). (a). Determinação do fator de proteção solar (FPS) espectrofotométrico (b) de Hm-EEB (100 mg / L) e padrões (quercetina e filtro químico UVAB). Os resultados são expressos como média \pm desvio padrão ($n = 3$) e letras iguais não indicam diferença estatística segundo ANOVA (seguido de Tukey), $p < 0,05$.

Alguns estudos demonstram que plantas ricas em compostos fenólicos apresentaram valores relevantes de fotoproteção. Os valores apresentados neste estudo para o teor de compostos fenólicos foram menores que os encontrados para o extrato hidroalcoólico de *Schinopsis brasiliensis*, planta considerada fotoprotetora, que apresentou $624,60 \pm 0,42$ mg EAG/g, com atividade antioxidante relevante para o método de DPPH. Já para o teor de flavonoides, o presente estudo apresentou valores maiores que *S. brasiliensis*, que apresentou $132,4 \pm 1,76$ mg equivalentes de rutina/g. Em relação aos valores de FPS, *S. brasiliensis* apresentou valores de $6,27 \pm 0,69$, valores inferiores aos encontrados com o extrato bruto e fração acetato de *H. martiana* (conforme Tabela 9) (LIMA-SARAIVA et al., 2017). Estes resultados demonstram que os extratos da espécie em estudo apresentam grande potencial fitoquímico e fotoprotetor, com relevante atividade antioxidante.

O teor de compostos fenólicos foi correlacionado à atividade antioxidante (sequestro do radical DPPH) e FPS, e os coeficientes de Pearson (ρ) e R^2 (Tabela 10). Os resultados apontam correlação fortemente positiva entre a atividade antioxidante e o teor de compostos fenólicos totais das amostras analisadas, pois os coeficientes encontrados foram próximos de 1,0, indicando que o teor de compostos fenólicos é diretamente proporcional à atividade antioxidante. Estudos prévios apontam forte relação entre a presença de compostos fenólicos e atividade antioxidante em plantas medicinais e frutas (LINS-NETO et al., 2016; SPAGOLLA et al., 2009; CARVALHO et al., 2014). Forte correlação entre o teor de compostos fenólicos e a atividade fotoprotetora (FPS) também foi apresentado nas amostras analisadas, sendo este um dado importante para o futuro desenvolvimento de fotoprotetores a partir de extratos vegetais que apresentam compostos fenólicos como marcadores químicos, como é o caso de *H. martiana*. Estes resultados indicam que o teor de compostos fenólicos é diretamente proporcional aos valores de fotoproteção no extrato avaliado. Uma atenção especial

tem sido dada às propriedades antioxidantes de plantas medicinais, devido aos antioxidantes estarem relacionados em diversas respostas biológicas, como na inflamação e na imunidade (GARG et al., 2012).

Tabela 10: Correlação entre o teor de compostos fenólicos totais, atividade antioxidante (sequestro do radical DPPH) e FPS.

	Atividade antioxidante (Sequestro do radical DPPH)		FPS	
	R ²	ρ	R ²	ρ
Compostos Fenólicos Totais	0,995	0,997	0,954	0,977

Legenda: R² = coeficiente de determinação; ρ = coeficiente de Pearson; FPS = Fator de Proteção Solar.

A atividade antibacteriana do Hm-EEB e Hm-Fr.AcOEt revelou que o extrato bruto inibiu o crescimento de três cepas de *Staphylococcus aureus*, sendo uma cepa isolada clinicamente (Tabela 11). O Hm-EEB e a fração Hm-Fr.AcOEt apresentaram ação bactericida contra uma das cepas de *S. aureus*, espécie bacteriana que, apesar de ser integrante da microbiota normal da pele, pode ser causadora de patologias e que representa grande importância em infecções hospitalares e alimentares, representando uma das espécies mais estudadas atualmente (PAHISSA, 2009). As patologias causadas por esta bactéria podem ocorrer desde uma simples infecção de pele (acne, furunculose e celulites), até infecções de maior gravidade (pneumonias, endocardites, septicemias, meningites etc.) (PFALLER, 2014; ALMEIDA et al., 2016). Esta espécie ainda pode causar lesões locais, caso as barreiras naturais da pele estejam comprometidas por traumas ou procedimentos cirúrgicos (ALMEIDA et al., 2016).

Tabela 11: CIMs e CBMs do Hm-EEB e Hm-Fr.AcOEt.

	CIM (mg/mL)		CBM (mg/mL)	
	Hm-EEB	Hm-Fr.AcOEt	Hm-EEB	Hm-Fr.AcOEt
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC UFPEDA 02)	0,15	0,62	5,00	5,00
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC UFPEDA 4212)	5,00	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> (Isolado clínico UFPEDA 705)	-	1,25	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> (Isolado clínico UFPEDA 659)	1,25	-	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i> (UFPEDA 138)	0,62	0,15	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (UFPEDA 396)	-	-	-	-

Legenda: CIM = Concentração Inibitória Mínima; CBM = Concentração Bactericida Mínima; (-) = Não detectado.

Na avaliação da atividade fungicida, o Hm-EEB e fração Hm-Fr.AcOEt apresentaram atividade inibitória para as espécies *Candida tropicalis* e *Candida krusei*, e as amostras analisadas apresentaram atividade fungicida para a espécie *C. tropicalis*. Nenhuma das amostras apresentou atividade inibitória nem atividade fungicida contra *Candida albicans*, principal espécie causadora de candidíase. Entretanto, espécies de *Candida* não-*C. albicans* (denominadas na literatura de NCAC, sigla do inglês, “non-*C.albicans Candida*”), como *Candida glabrata* e *Candida tropicalis* podem ser frequentemente identificadas como patógenos em humanos. O aumento da ocorrência destes patógenos tem sido relacionado à melhoria nos métodos de identificação e resistência às drogas utilizadas (SILVA et al., 2012b).

Desta forma, a atividade antimicrobiana de *H. martiana* contra patógenos presentes na pele demonstra mais uma vantagem da utilização desta espécie em um produto cosmético, podendo diminuir a adição de conservantes sintéticos nas formulações.

Tabela 12: CIMs e CFMs do Hm-EEB e Hm-Fr.AcOEt.

	CIM (mg/mL)		CFM (mg/mL)	
	Hm-EEB	Hm-Fr.AcOEt	Hm-EEB	Hm-Fr.AcOEt
<i>Candida albicans</i> (UFPEDA 1007)	-	-	-	-
<i>Candida tropicalis</i> (UFPEDA 1011)	0,62	2,50	2,50	5,00
<i>Candida krusei</i> (UFPEDA 1002)	1,25	0,31	-	-

5.1.2 Desreplicação e detecção de flavonoides em Hm-Fr.AcOEt, através de análise por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (CLAE-EM)

Os estudos de desreplicação são caracterizados pela separação de componentes de matrizes complexas, com a utilização de métodos cromatográficos e espectroscópicos, além de estudos de bioatividade. Técnicas hífenadas destacam-se para este tipo de estudo, baseando-se na comparação das informações obtidas com bancos de dados, resultando na detecção de compostos já conhecidos ou até na elucidação estrutural de novos compostos (LANG et al., 2008). Vários compostos naturais já foram identificados utilizando o método de desreplicação, como flavonoides glicosilados (WARIDEL et al., 2001; OLIVEIRA et al., 2017), derivados do ácido cafeico (PAULI et al., 1999), flavonoides e derivados de flavonoides (WOLFENDER et al., 2000) e isoflavonoides (LAMBERT et al., 2005). A Figura 23 apresenta o cromatograma obtido com a análise por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (CLAE-EM) da fração Hm-Fr.AcOEt.

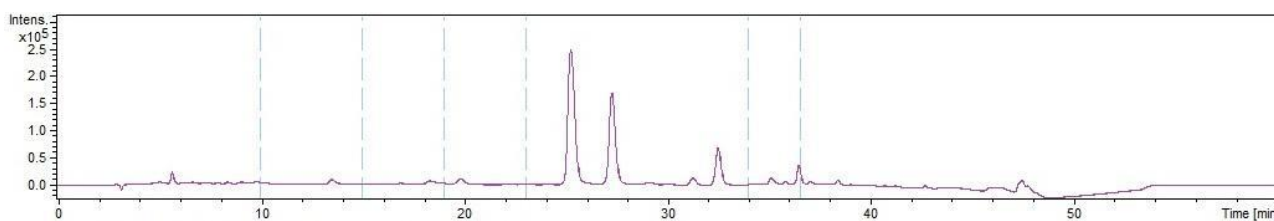
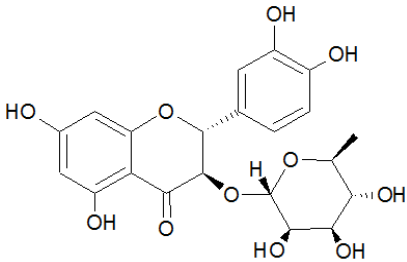
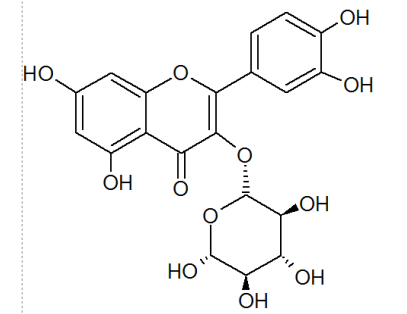
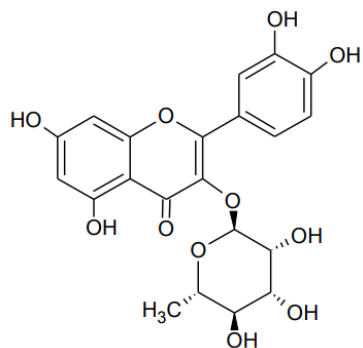


Figura 16: Cromatograma UV (190 – 700 nm) obtido com a análise em CLAE-EM da fração Hm-Fr.ActOEt.

Na desreplicação e detecção de flavonoides por CLAE-EM utilizando como banco de dados on-line o website GNPS, 18 flavonoides conhecidos foram detectados na fração Hm-Fr.AcOEt (Tabela 13), sendo estes dois flavanonóis, seis flavonóis, quatro isoflavonas, cinco flavonas e um flavan-3-ol.

Tabela 13: Flavonoides detectados por desreplificação (CLAE-EM) a partir da fração Hm-Fr.AcOEt, obtida a partir do extrato bruto das cascas de *Hymenaea martiana*.

Classe do flavonoide	Metabólito	Fórmula Molecular	Rt (min)	m/z observada (IES ⁻)	Principais fragmentos [M-H] ⁻	Atividades biológicas relatadas
Flavanonol	Astilbina		25,4	449	485,00; 512,00	Anti-inflamatória (DING et al., 2014), anti-isquêmica (DIAO et al., 2014), antirreumática (GUO et al., 2015), antinociceptiva e antiedematogênica (CECHINEL et al., 2000), antioxidante (BAKOTA et al., 2015)
	Taxifolina					
Flavonóis	Isoquercetina		36,9	463	300,02; 301,03	Antioxidante (VONGSAK et al., 2015)

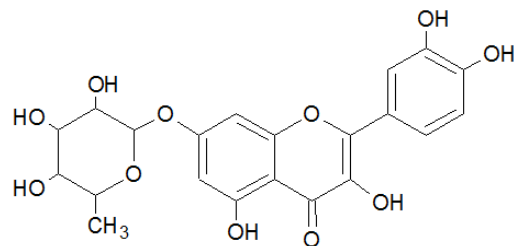
Quercetina-3-*O*- α -ramnopiranosídeo $C_{21}H_{20}O_{11}$

37,8

447

301,03

Não encontrados relatos.

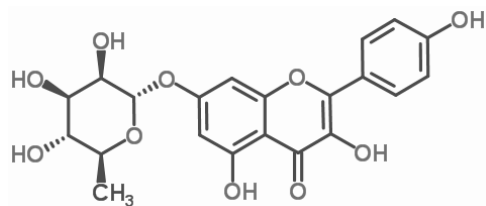
Quercetin-7-*O*-raminosídeo $C_{21}H_{20}O_{11}$

42,25

449

300,97;
322,94

Antioxidante (LIU et al., 2010)

Kaempferol-7-*O*- α -L-ramnosídeo $C_{21}H_{20}O_{10}$

41,8

431

285,97

Antioxidante (CHUA et al., 2008)

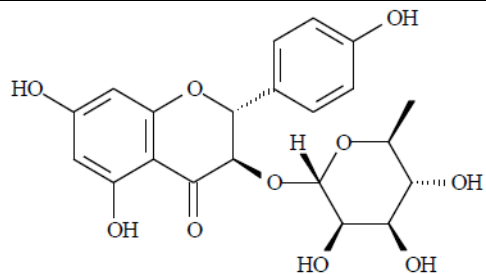
Quercetina

 $C_{15}H_{10}O_7$

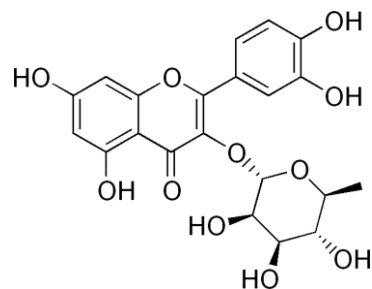
13

301

150,92;
178,91Fotoprotetora (STEVANATO et al., 2014),
antioxidante e anti-inflamatória (GARDI et al., 2015)

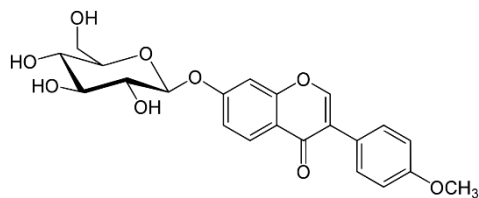


Quercitrina

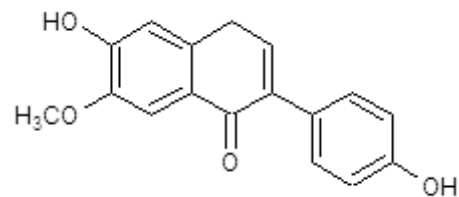


Ononina

Isoflavonas



Glicitina



6''-O-Acetil-Glicitina

 $C_{21}H_{20}O_{11}$

40,4

447

300,94

Antioxidante (ZHU et al., 2017)

 $C_{22}H_{22}O_9$

36,3

431

269,00

Antioxidante (YU et al., 2005)

 $C_{22}H_{22}O_{10}$

41,8

447

283,00;

300,97;

375,00

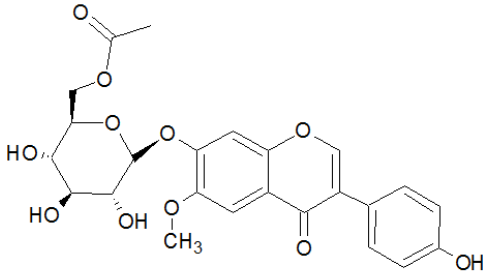
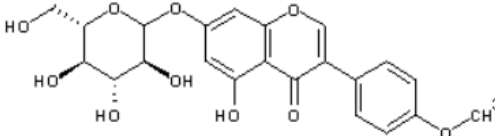
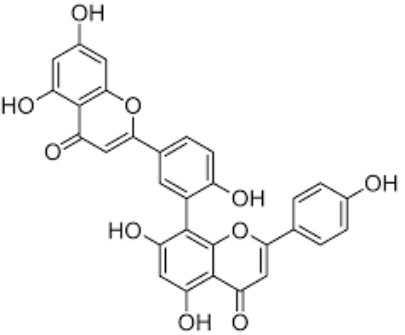
Antioxidante (GENOVESE et al., 2005)

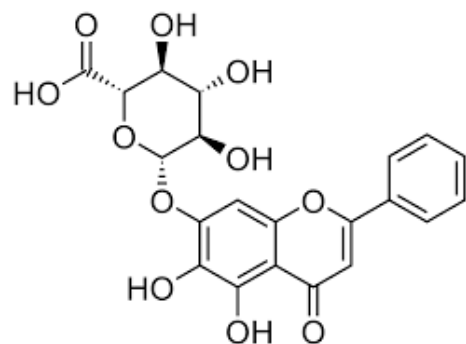
 $C_{24}H_{24}O_{11}$

489

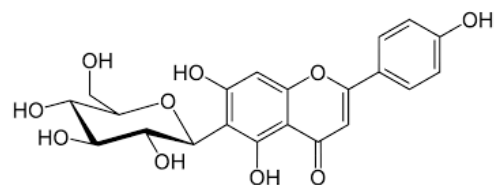
285,66

Antioxidante (GENOVESE et al., 2005)

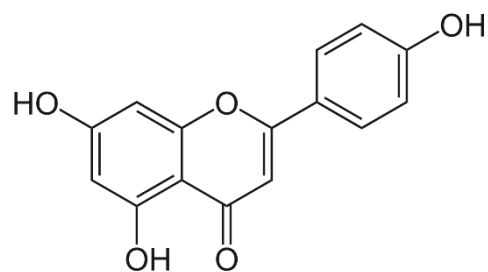
			41,9				
	Sissotrina						
		$C_{22}H_{22}O_{10}$	40,5	447	300,94		Antioxidante (ABDELHADY et al., 2015)
	Amentoflavona						
Flavonas		$C_{30}H_{18}O_{10}$	21,8	539	377,06; 403,04; 404,04		Antioxidante (TARALLO et al., 2011)
	Baicalina	$C_{21}H_{18}O_{11}$	34,3	445	253,05; 272,06; 271,06		Antioxidante (JIN et al., 2007)



Isovitexina

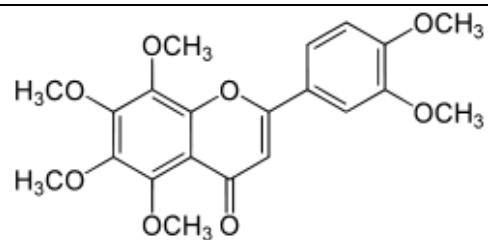


Apigenina-C-hexosil



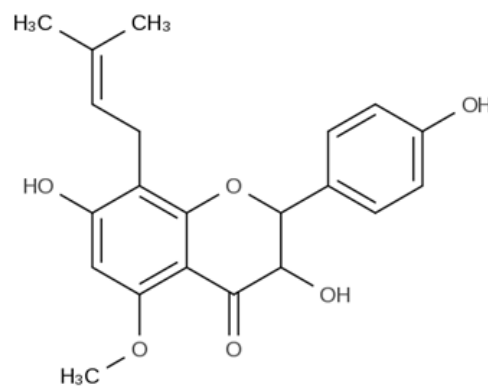
Nobiletina

$C_{21}H_{20}O_{10}$	44,1	415	283,07; 311,07; 341,08	Antioxidante (HE et al., 2016)
$C_{21}H_{19}O_{10}$	35,2	433	268,96	Antioxidante (FERRERES et al., 2009)
$C_{21}H_{22}O_8$	46,2	403	388,11; 373,09; 403,13	Antioxidante (CHEN et al., 2017)



Isoxantoflavan-3-ol

Flavan-3-ol

 $C_{20}H_{22}O_5$

11,4

369

287,00

Não encontrados relatos.

Legenda: Rt= Tempo de retenção; m/z = relação massa/carga; IES⁻= ionização por eletrospray no modo negativo.

O flavanonol astilbina foi detectado e este flavonoide já foi previamente identificado como o composto majoritário de *Hymenaea martiana* (CECHINEL et al., 2000). A astilbina é um flavonoide bioativo, com várias atividades farmacológicas comprovadas, como anti-inflamatória (CARNEIRO et al., 1993; LU et al., 2014; DING et al., 2014), anti-isquêmico (DIAO et al., 2014), tratamento de doenças autoimunes (GUO et al., 2015), antinociceptivo, antiedematogênico (CECHINEL et al., 2000) e antioxidante (ZHANG et al., 2009; BAKOTA et al., 2015).

Dentre os flavonoides identificados na fração Hm-Fr.AcOEt, a quercetina apresenta atividade fotoprotetora relatada na literatura (STEVANATO et al., 2014; CHOQUENET et al., 2008; EVANS-JOHNSON et al., 2013; VICENTINI et al., 2011), além de antioxidante (BOOTS et al., 2008; GARDI et al., 2015; RAVICHANDRAN et al., 2014) e anti-inflamatória (GARDI et al., 2015).

A atividade antioxidante já foi relatada para os demais flavonoides identificados, como a taxifolina (CHOBOT et al., 2016), isoquercetina (JIN et al., 2007; VONGSAK et al., 2015), quercetina-7-*O*-ramnosídeo (LIU et al., 2010), kaempferol-7-*O*- α -ramnosídeo (CHUA et al., 2008), quercitrina (ZHU et al., 2017), ononina (YU et al., 2005), glicitina (GENOVESE et al., 2005), sissotrina (ABDELHADY et al., 2015), amentoflavona (KIM et al., 1998; TARALLO et al., 2011), baicalina (JIN et al., 2007), isovitexina (HE et al., 2016), apigenina-*C*-hexosil (FERRERES et al., 2009), nobiletina (CHEN et al., 2017).

A identificação desses flavonoides em Hm-Fr-AcOEt demonstra o potencial bioativo do extrato das cascas de *Hymenaea martiana*, e a detecção destes compostos justifica as atividades biológicas comprovadas neste trabalho e outras da literatura consultada.

O perfil cromatográfico da fração Hm-Fr.AcOEt três compostos com tempos de retenção (Rt) de 9,9, 10,2 e 11,1 minutos, respectivamente (Figura 17). A intensidade relativa dos três picos mostrados no cromatograma confirma que estes compostos são os principais compostos detectáveis.

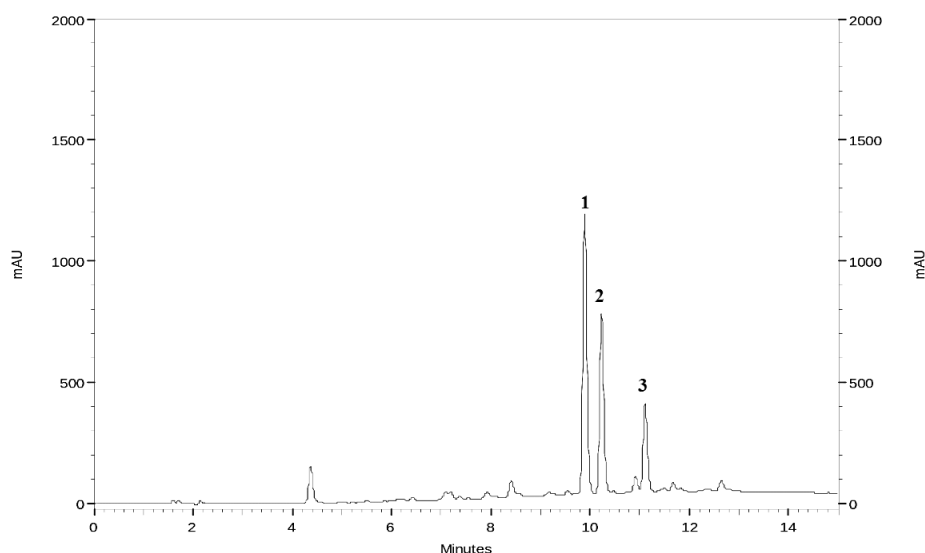


Figura 17: Cromatograma obtido com a fração Hm-Fr.AcOEt.

O espectro DAD-UV destes compostos são apresentados na Figura 18. Estas substâncias apresentam um espectro UV típico de flavonoides, o qual é caracterizado por dois picos de absorvância máxima, um entre 240-280 nm e outro entre 280-550 nm (BOBIN et al., 1995). O pico 1 apresentou absorvâncias máximas em 234 e 288 nm; o pico 2 em 236 e 288 nm, e o pico 3 em 232 e 294 nm. Estas bandas em UV podem sugerir que estas substâncias são derivadas de dihidroflavonois, como a astilbina, compostos previamente encontrado em *H. martiana* que apresenta absorvância máxima em 290 nm (PUBCHEM, 2018). Este flavonoide foi apontado como o composto majoritário do extrato acetato de etila, assim como outros flavonoides derivados da astilbina também já foram identificados na planta, como a taxifolina e engelitina (CARNEIRO et al., 1993; CECHINEL-FILHO et al., 2000).

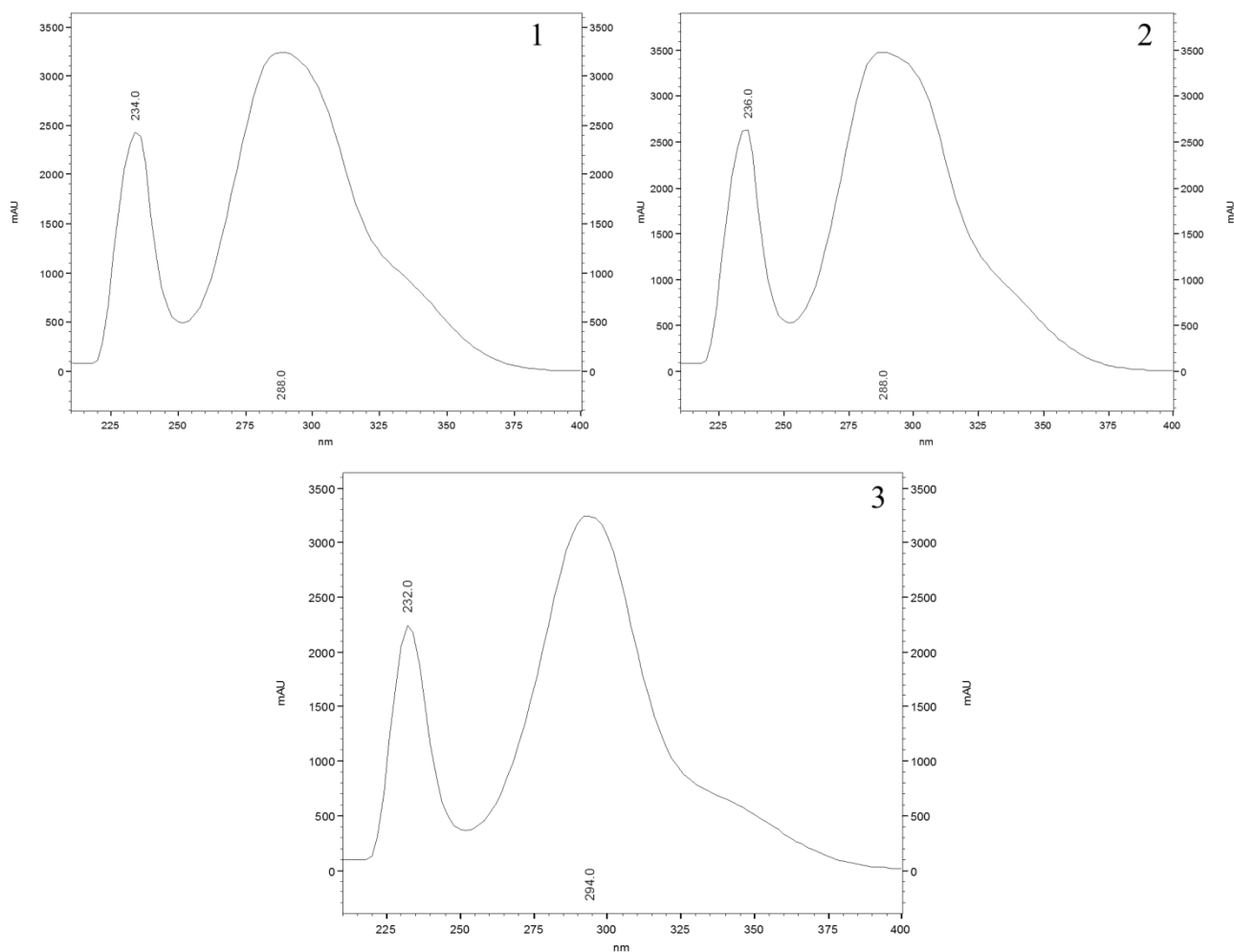


Figura 18: Espectro DAD-UV dos três compostos majoritários da fração Hm-Fr.AcOEt. 1: Composto 1, $\lambda_{\text{máx}}$: 234 e 288 nm; R_t = 9.9 min. 2: Composto 2, $\lambda_{\text{máx}}$: 236 e 288 nm; R_t = 10.2 min. 3: Composto 3, $\lambda_{\text{máx}}$: 232 e 294 nm; R_t = 11.1 min..

Perfis cromatográficos similares foram encontrados com a análise em HPLC-DAD do extrato hidroalcoólico e etanólico de *Hymenaea stigonocarpa*. Estes extratos foram comparados com o extrato hidroalcoólico da mesma espécie adicionado com o padrão astilbina, e foi possível identificar o pico 2 como esse flavonol e os outros picos como derivados de astilbina (DIMECH et al., 2013). Outro estudo que objetivou a análise qualitativa por HPLC-DAD de compostos fenólicos no extrato etanólico de *H. martiana* apresentou quatro picos com espectros DAD-UV característicos de flavonoides com absorvância máxima de 290 nm (ALMEIDA et al., 2012), de maneira semelhante ao encontrado no extrato etanólico de *H. stigonocarpa* (DIMECH et al., 2013) e no presente estudo.

O espectro DAD apresentado na Figura 25 mostra uma similaridade entre as substâncias. Por esta razão, com o objetivo de isolar e identificar estruturalmente os flavonoides majoritários do extrato etanólico de *H. martiana*, a fração Hm-Fr.AcOEt foi submetida à uma separação cromatográfica em coluna. Sephadex[®] foi escolhida como a fase estacionária devido os compostos presentes na fração apresentarem polaridade similar, fato observado na proximidade entre os

comprimentos máximos de absorvância e tempos de retenção demonstrados no cromatograma. Esta proximidade pode ainda ser justificada pelo fato da análise ter sido desenvolvida em fase reversa, e os picos terem sido detectados dentro de 15 minutos de corrida analítica, tempo relativamente curto para este tipo de análise, demonstrando que os compostos apresentam polaridade alta. Portanto, a estratégia de separação precisaria contemplar outras diferenças entre as moléculas, e por conta disso, a cromatografia por exclusão molecular foi escolhida tendo como a fase estacionária Sephadex® LH-20.

5.1.3 Fracionamento, isolamento, purificação e identificação estrutural de flavonoides da fração Hm-Fr.AcOEt

As frações obtidas por meio do fracionamento da fração Hm-Fr.AcOEt em cromatografia em coluna com Sephadex-LH20® foram avaliadas quanto à atividade antioxidante e fotoprotetora, cujos resultados obtidos são apresentados na Tabela 14.

Tabela 14: Atividade antioxidante e FPS das frações obtidas a partir do fracionamento em coluna Sephadex-LH20® da Fração Hm-Fr.AcOEt.

Amostra	DPPH (% AS) ± D.P.	ABTS ⁺ (% TEAC) ± D.P.	Fosfomolibdênio (%TAA) ± D.P.	FPS ± D.P.
GFr-1	70,52 ± 0,02 ^a	52,82 ± 2,30 ^a	50,52 ± 2,00 ^a	9,13 ± 0,01 ^a
GFr-2	87,02 ± 0,04 ^b	95,72 ± 2,30 ^b	21,17 ± 1,67 ^b	11,27 ± 0,01 ^b
GFr-3	87,02 ± 0,05 ^b	99,71 ± 0,20 ^c	60,73 ± 1,85 ^c	14,77 ± 0,02 ^c
GFr-4	80,21 ± 0,03 ^c	100,00 ± 0,00 ^c	76,32 ± 1,95 ^d	23,77 ± 0,01 ^d
GFr-5	71,23 ± 0,03 ^d	100,00 ± 0,00 ^c	103,45 ± 6,41 ^e	23,49 ± 0,03 ^c
GFr-6	75,30 ± 0,02 ^c	100,00 ± 0,00 ^c	76,60 ± 2,69 ^d	16,62 ± 0,01 ^f

Legenda: D.P. = Desvio Padrão. Letras iguais na mesma coluna indicam não diferença estatística conforme ANOVA (seguido de Tukey), $p < 0.05$.

Os dados obtidos mostram a alta atividade sequestrante do radical DPPH, com os maiores resultados para as frações GFr-2, GFr-3 e GFr-4. Já para o ensaio de inibição do radical ABTS⁺, apenas a fração GFr-1 não apresentou valores significativos, enquanto as frações GFr-4, GFr-5 e GFr-6 inibiram 100% do radical. Os valores de capacidade antioxidante total as frações GFr-4, GFr-5 e GFr-6 apresentaram os maiores valores. Estas frações também apresentaram os maiores valores de FPS, com valores entre 16,62 a 23,77, enfatizando assim a importante ação antioxidante e fotoprotetora dos compostos químicos que compõem a fração Hm-Fr.AcOEt.

De acordo com os resultados demonstrados, as frações GFr-4, GFr-5 e GFr-6 obtiveram melhores resultados de atividade antioxidante e fotoprotetora.

A análise por RMN da fração Hm-Fr.AcOEt e as subfrações obtidas por separação cromatográfica por exclusão molecular apresentou três compostos identificados como diastereoisômeros da astilbina (2*R*,3*R*)-2-(3,4-dihidroxifenil)-5,7-dihidroxi-3-[(2*S*,3*R*,4*R*,5*R*,6*S*)-3,4,5-trihidroxi-6-metiloxan-2-il]oxi}-3,4-dihidro-2*H*-1-benzopiran-4-ona) (Tabela 15). A quiralidade dos compostos presentes na Hm-Fr.AcOEt, GFr-4 e GFr-5 foi proposta em comparação aos dados espectrais encontrados na literatura (KASAI et al., 1988; DE BRITTO et al., 1995; XUEYAN et al., 2018).

Tabela 15. Dados espectrais obtidos por RMN (400 e 100 MHz para ^1H e ^{13}C , respectivamente) para os compostos majoritários das cascas de *Hymenaea martiana*.

Position	Neoastilbina (GFr-4 e GFr-5)		Astilbina (GFr-4)		Isoastilbina (GFr-4)	
	δ_{H} mult. (<i>J</i> in Hz) ^a	δ_{C} mult. ^{a,b}	δ_{H} mult. (<i>J</i> in Hz) ^a	δ_{C} mult. ^{a,b}	δ_{H} mult. (<i>J</i> in Hz) ^a	δ_{C} mult. ^{a,b}
2	5,10 <i>d</i> (11,1)	81,4	5,21 <i>d</i> (9,9)	81,3	5,55 <i>d</i> (2,7)	79,8
3	4,73 <i>d</i> (11,1)	74,7	4,63 <i>d</i> (9,9)	75,4	4,22 <i>d</i> (2,7)	73,3
4		196,2		193,9		192,9
5	11,73 <i>s</i>	163,2	11,86 <i>s</i>	162,4	11,76 <i>s</i>	163,8
6	5,91 <i>d</i> (2,1)	96,0	5,89 <i>d</i> (2,1)	95,7	5,92 <i>d</i> (2,2)	96,1
7		167,1		168,3		166,9
8	5,86 <i>d</i> (2,1)	94,9	5,84 <i>d</i> (2,1)	96,6	5,95 <i>d</i> (2,2)	95,2
9		162,3		162,0		162,1
10		100,4		99,6		100,2
1'		127,4		126,9		126,3
2'	6,91 <i>s</i>	114,5	6,89 <i>br s</i>	114,6	6,85 <i>d</i> (1,6)	114,0
3'		145,1		145,7		145,8
4'		145,9		145,0		145,0
5'	6,71 <i>s</i>	114,8	6,73 <i>s</i>	115,2	6,71 <i>s</i>	116,0
6'	6,71 <i>s</i>	119,4	6,73 <i>s</i>	118,7	6,73 <i>dd</i> (8,3 e 1,6)	117,6
1''	4,94 <i>d</i> (1,4)	101,1	4,06 <i>br s</i>	100,6	4,76 <i>d</i> (1,5)	98,8
2''	3,77 <i>dd</i> (3,2 e 1,4)	69,9	3,33 <i>br s</i>	70,1	3,29 <i>m</i>	72,2
3''	3,15 <i>dd</i> (9,4 e 3,2)	70,0	3,41 <i>dd</i> (9,4 e 3,0)	70,4	3,12 <i>m</i>	71,5
4''	3,03 <i>m</i>	71,1	3,15 <i>dd</i> (9,4 e 3,0)	71,7	3,40 <i>m</i>	72,4
5''	2,26 <i>dq</i> (6,2)	68,8	3,90 <i>m</i>	68,8	3,77 <i>m</i>	69,9
6''	0,79 <i>d</i> (6,2)	17,5	1,05 <i>d</i> (6,2)	17,6	0,84 <i>d</i> (6,2)	17,5

^aDados de RMN foram obtidos em 296 K com TMS como referência interna em 0.00 ppm com DMSO- d_6 .

^bMultiplicidades determinadas por experimentos DEPT 135, HSQC e HMBC. Multiplicidade: *s* = singlet, *br s* = broad singlet, *d* = doublet, *dd* = doublet of doublets, *t* = triplet, *q* = quartet, *dq* = doublet of quartets.

A análise de RMN da fração **Hm-Fr.AcOEt** e subsfrações **GFr-4** e **GFr-5** revelou a presença de compostos em mistura. Em se tratando de **GFr-4**, os espectros de RMN de ^1H , $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ e mapas de correlação ^1H - ^1H COSY, ^1H - ^{13}C HSQC e ^1H - ^{13}C HMBC indicaram a presença de três conjuntos de sinais em proporções diferentes, sugerindo a existência de uma mistura de três flavonoides glicosilados (DE BRITTO et al., 1995) (ANEXO VII). O primeiro conjunto de sinais no espectro de RMN de ^1H mostrou a presença de dois dupletos em δ 5,91 (1H, *d*, *J* = 2.1 Hz) e 5,86 (1H, *d*, *J* = 2.0

Hz), relativos aos hidrogênios em C-6 e C-8, respectivamente, caracterizando um anel 6,8-dissubstituído do anel A de um flavonoide. Observou-se ainda a presença dos simpletos em δ 6,71 (2H, *s*) e δ 6,91 (1H, *s*), no qual o primeiro mostrou integração para dois hidrogênios e correlação direta HSQC com os carbonos em δ 114,8 (C-5') e δ 119,4 (C-6'), enquanto o segundo revelou correlação direta com o carbono em δ 114,5 (C-1'), sendo estes compatíveis com padrão de substituição 3',4'-dissubstituído do anel B do flavonoide (ANEXO VII). Além disso, a existência de dois dupletos em δ 5,91 (1H, *d*, $J = 11,1$ Hz) and δ 4,73 (1H, *d*, $J = 11,1$ Hz) correlacionando diretamente com os carbonos em 81,4 e 74,7, justificam a presença deste em C-2 e C-3. Constatou-se ainda que o sinal em δ 4,73 mostrou correlação a longa distância HMBC com os carbonos em δ 81,1 (C-2), 101,1 (C-1''), 127,4 (C-1') e 196,2 (C-4) caracterizando o anel C do flavonoide, concluindo sua glicosilação em C-3, uma vez que o duplete em 4,94 (1H, *d*, $J = 1,4$ Hz) que correlaciona diretamente com o 101,1 (C-1'') e a longa distância com os carbonos em δ 68,8 (C-5''), 69,9 (C-2'') e 74,7 (C-3) da unidade glicosídica. Ademais, a presença de um dupletos em δ 0,79 (3H, *d*, $J = 6,2$ Hz) sugerindo a presença de uma metila, correlacionando diretamente com o carbono 17,5 e a longa distância com os carbonos em C-5'' e δ 71,7 (C-4''). A constante de acoplamento em 1,4 Hz para o hidrogênio em C-1'' e a metila em C-6'' permitiu concluir que corrobora com a presença de uma α -ramnose. Assim, os dados de RMN em comparações com a literatura permitiram concluir que o composto trata-se da neoastilbina ((2*S*,3*S*)-taxifolina-3-O- α -L-ramnosídeo) (KASAI et al., 1988; DE BRITTO et al., 1995).

O segundo conjunto de dados observado no espectro de RMN de ^1H de **GFr-4** mostrou um sistema de spins similares a neoastilbina, confirmado com base nos mapas de correlação ^1H - ^1H COSY, ^1H - ^{13}C HSQC e ^1H - ^{13}C HMBC (ANEXO VII). A principal diferença deste em relação a neoastilbina reside na estereoquímica dos hidrogênios em C-2 e C-3 relativos aos dupletos δ 5,21 (1H, *d*, $J = 9,9$ Hz) and δ 4,63 (1H, *d*, $J = 9,9$ Hz) correlacionando diretamente com os carbonos em 81,3 e 75,4 (Tabela 15). Assim, comparações com dados da literatura permitiu constatar que o segundo composto presente em **GFr-4** trata-se da astilbina (ou (2*R*,3*R*)-taxifolina-3-O- α -L-ramnosídeo) (KASAI et al., 1988; DE BRITTO et al., 1995). Por sua vez, os sistemas de spins para o terceiro composto também diferiram da neoastilbina e astilbina pelos dupletos em δ 5,55 (1H, *d*, $J = 2,7$ Hz) and δ 4,22 (1H, *d*, $J = 2,7$ Hz) relativos aos hidrogênios em C-2 e C-3. A análise dos dados de RMN uni e bidimensionais em comparações com dados da literatura permitiu concluir que o composto trata-se da isoastilbina (ou (2*R*,3*S*)-taxifolina-3-O- α -L-ramnosídeo) (XUEYAN et al., 2018) (Tabela 15 e ANEXO VII).

Os dihidroflavonoides isoméricos neoastilbina, astilbina e isoastilbin também se mostraram como compostos majoritários em fração **Hm-Fr.AcOEt**, enquanto **GFr-5** possibilitou a identificação da neoastilbina (Tabela 15 e ANEXO VIII).

Além das diferenças químicas entre os hidrogênios H-2 e H-3, os altos valores para a constante de acoplamento desses hidrogênios para neoastilbina ($J = 11,1$ Hz) e astilbina ($J = 9,9$ Hz) sugerem uma configuração *trans* do anel heterocíclico, enquanto o valor baixo de acoplamento para isoastilbina ($J = 2,7$ Hz) indica uma configuração *cis*. A estereoquímica destes compostos foi deduzida por comparação com dados reportados na literatura (KASAI et al., 1988; DE BRITTO et al., 1995; XUEYAN et al., 2018). As estruturas químicas das substâncias propostas estão apresentadas da Figura 19.

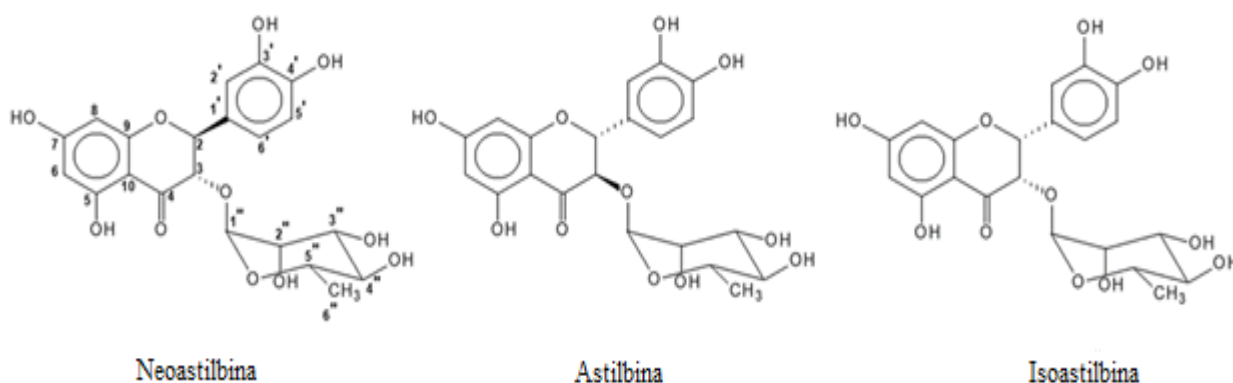


Figura 19: Dihidroflavonoides majoritários identificados na fração Hm-Fr.AcOEt de *H. martiana*.

Os compostos isolados foram encontrados nas frações GFr-4 e GFr-5, e estas frações apresentaram os melhores resultados para as atividades antioxidante e fotoprotetora (Tabela 14), evidenciando a bioatividade dos compostos identificados e sua relação com as atividades biológicas de *H. martiana*. Além das atividades biológicas descritas anteriormente, vários estudos podem ser encontrados com a identificação e isolamento de astilbina e seus isômeros. Astilbina e isoastilbina foram isoladas da uva (*Vitis vinifera*), e seus mecanismos de atividade antioxidante em nível celular foi demonstrado. Resultados interessantes foram encontrados, pois dentre as diversas substâncias isoladas da uva, a astilbina apresentou os melhores resultados para a atividade antioxidante, enquanto a isoastilbina apresentou o valor mais baixo (XUEYAN et al., 2018).

Outro estudo evidenciou o efeito hepatoprotetor de astilbina isolada das cascas de *H. martiana* e suas ações foram consideradas melhores do que a vitamina E, além de restaurar lipoperóxidos e prostanoïdes do tecido hepático para os níveis basais (CLOSA et al., 1997). Apesar destes resultados, não foram encontrados estudos com a identificação e isolamento de isômeros da astilbina em *Hymenaea martiana*, além de não terem sido encontrados estudos que demonstrassem a atividade

fotoprotetora nem da astilbina, nem de seus isômeros, evidenciando mais uma vez o ineditismo dos resultados apresentados no presente estudo.

5.2 INCORPORAÇÃO DO EXTRATO ETANÓLICO DE *Hymenaea martiana* EM UMA FORMULAÇÃO FITOCOSMÉTICOA COM AÇÃO FOTOPROTETORA

5.2.1 Prospecção tecnológica do gênero *Hymenaea*

Foram encontrados o total de 102 depósitos de patentes nos bancos de dados consultados, sendo o USPTO o banco com maior número de patentes encontradas, com 44 patentes, seguido pelo WIPO, com 28 patentes; o EPO com 19, e o INPI, banco de dados brasileiro, com 10 depósitos de patentes envolvendo o gênero *Hymenaea* (Figura 20).

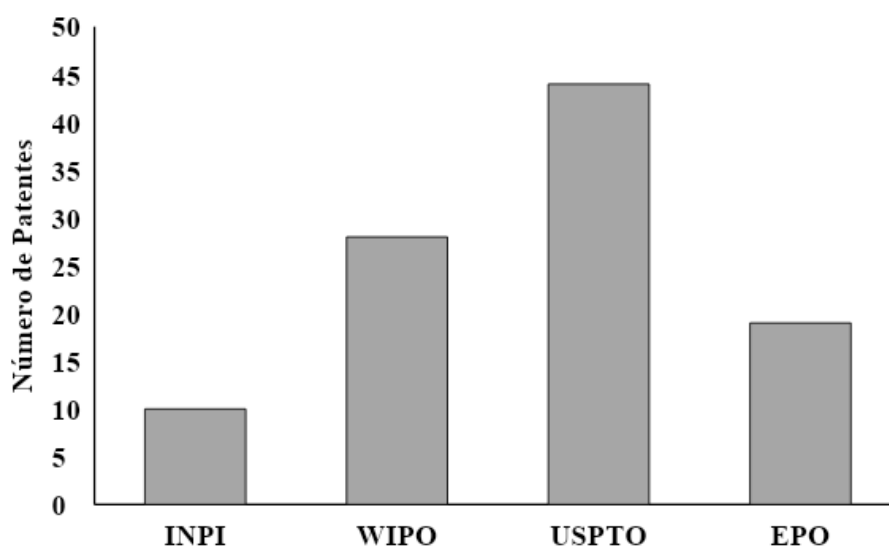


Figura 20: Número de dos pedidos de patentes depositados por base de dados com o gênero *Hymenaea*. INPI= Instituto Nacional de Propriedade Industrial; WIPO=World Intellectual Property Organization; USPTO= United States Patent Office; EPO= European Patent Office.

De acordo com a Figura 21, o Japão lidera com o maior número de patentes depositadas com o gênero em estudo, com 35 patentes, seguido pelos Estados Unidos, com 32 patentes depositadas. O Brasil aparece em terceiro lugar, com 21 patentes depositadas.

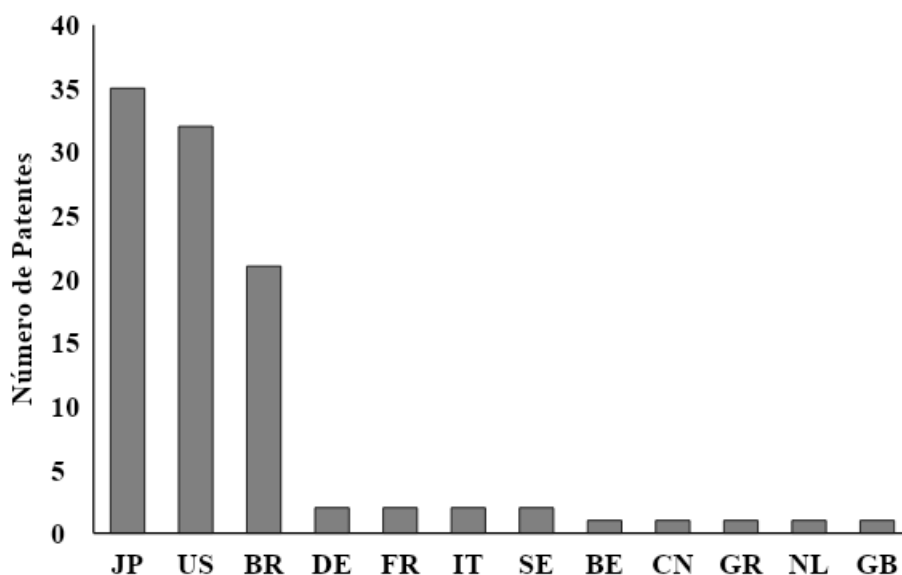


Figura 21: Distribuição de dos pedidos de patentes depositados nas bases de dados com o gênero *Hymenaea*.

Legenda: DE (Alemanha), BE (Bélgica), BR (Brasil), CN (China), US (Estados Unidos da América), FR (França), GR (Grécia), NL (Holanda), IT (Itália), JP (Japão), GB (Reino Unido) e SE (Suécia).

A Figura 21 mostra resultados controversos em relação às regiões de ocorrência do gênero e de depósito de patentes. O Brasil é o único país encontrado nesta pesquisa que é localizado na distribuição geográfica do gênero, que apresenta distribuição natural da América Central à América do Sul (PETTIT et al., 2003). A grande quantidade de patentes oriundas do Japão e Estados Unidos mostra que o gênero possui potencial econômico em regiões onde não ocorre naturalmente e que não apresenta condições climáticas favoráveis ao cultivo. Resultados semelhantes foram encontrados em outras prospecções, como em um estudo em que os Estados Unidos lideraram o ranking com patentes com a planta *Ananas comosus* (OLIVEIRA-JÚNIOR; ALMEIDA, 2012), país que não apresenta condições climáticas favorável para o cultivo ou ocorrência natural desta planta. Estes dados mostram a necessidade de maiores incentivos à pesquisa e desenvolvimento tecnológico, visando melhor exploração econômica e sustentável da flora nativa dos países da América Central e do Sul.

Na Figura 22, é apresentada uma evolução anual no número de patentes depositadas nos últimos 22 anos nas bases de dados consultadas. O maior número de patentes foi depositado no ano de 2003, com uma queda no número de depósitos até 2007, com posterior aumento até o ano de 2011. Um leve aumento pode ser percebido em 2015, e uma patente foi depositada em 2017. Estes dados mostram que, a partir de 1995, todos os anos apresentaram pelo menos 1 patente depositada, o que enfatiza o potencial econômico do gênero em estudo.

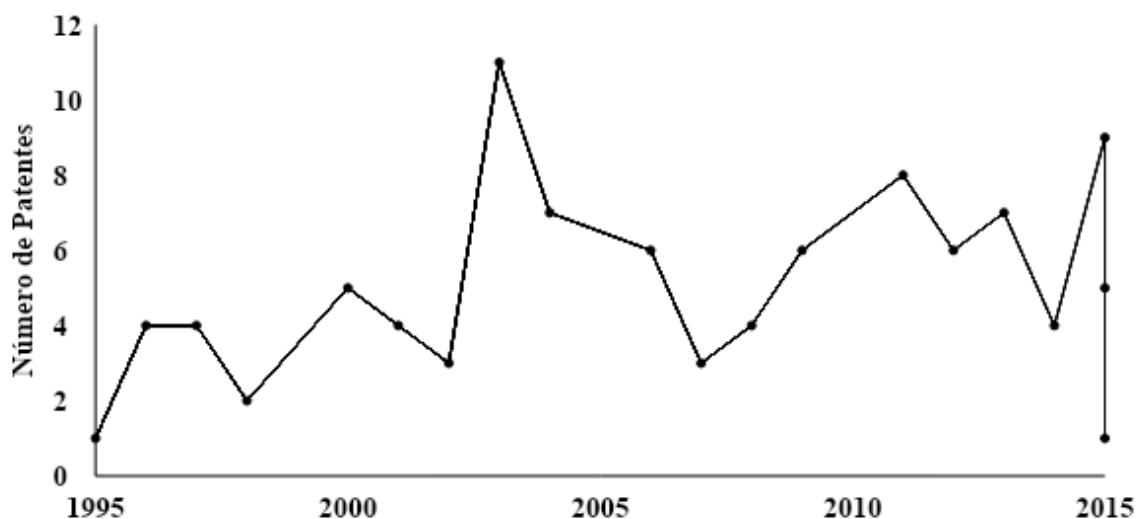


Figura 22: Evolução anual dos pedidos de patentes depositados nos últimos 22 anos com o gênero *Hymenaea*.

Dentre os 102 depósitos de patentes, 18,73% foram classificados no código IPC A61K, que contempla preparações com finalidades médicas, odontológicas ou higiênicas. Outras subclasses que apresentaram ocorrência relativamente alta, foram A61Q (uso específico de cosméticos ou produtos de higiene) e A61P (atividade terapêutica específica de compostos químicos ou preparações medicinais), evidenciando a aplicação medicinal e cosmética do gênero *Hymenaea*, em conformidade com as propriedades farmacológicas já evidenciadas em estudos científicos (GAZZANEO et al., 2005; AGRA et al., 2007; MARSAIOLI et al., 1975).

Outras subclasses apresentadas englobam compostos moleculares e orgânicos (C08), alimentos e produtos alimentícios (A23 e A23L), polissacarídeos e seus derivados (C08B), microrganismos ou enzimas (C12N), conservação de alimentos ou produtos alimentícios (A01N) e composição de compostos macromoleculares (C08L) (Tabela 16).

Um dado importante encontrado nesta pesquisa mostra que o gênero *Hymenaea* apresenta um potencial econômico relacionado a seu valor madeireiro, com patentes nas subclasses relacionadas à construção civil e edificações, inseridos na Tabela 16 como “Outros”. Este fato é de grande relevância, visto que atualmente está em discussão a problemática da conservação da diversidade biológica e da utilização sustentável de seus componentes, com o desenvolvimento de novos materiais renováveis e diminuição da utilização de madeira em edificações. Investimentos na pesquisa científica do potencial terapêutico de plantas medicinais pode contribuir para um melhor aproveitamento e estimular a sua utilização sustentável, implicando uma maior pressão para a conservação das espécies (BRASIL, 2011). A distribuição dos pedidos de patentes por CIP são apresentados na Tabela 16.

Tabela 16: Distribuição por CIP dos pedidos de patentes depositados com o gênero *Hymenaea*.

CIP	Frequência (%)
A61K	18,73
A61Q	10,86
A61P	7,87
C08	7,49
A23	6,37
A23L	3,75
C08B	3,75
C12N	3,00
A01N	3,00
C08L	3,00
Outros	32,21

Diante do exposto, a prospecção tecnológica de *Hymenaea* evidencia o potencial econômico e terapêutico do gênero e a originalidade do presente trabalho, visto que, apesar de haver patentes nas classificações de uso específico de cosméticos ou produtos de higiene, não foi encontrada nenhuma patente envolvendo formulações fotoprotetoras com o gênero *Hymenaea*, nem com a espécie em estudo, justificando assim o desenvolvimento de uma formulação com ação fotoprotetora com as cascas de *Hymenaea martiana*.

5.2.2 Incorporação do extrato etanólico de *Hymenaea martiana* em uma formulação fitocosmética

O desenvolvimento de uma formulação com ação fotoprotetora com as cascas de *H. martiana* foi realizado dada a significância dos resultados apresentados relacionados ao potencial antioxidante, antimicrobiano e fotoprotetor da espécie, assim como a inexistência de estudos nessa vertente com espécies de *Hymenaea*.

A Figura 23 apresenta as quatro formulações teste. Foi realizada a análise das quatro formulações, o que permitiu observar que as formulações apresentaram aspectos visuais e homogeneidade adequados para formulações cosméticas, antes e após os ciclos de gelo/degelo.

Foi possível observar que a formulação F1 apresentou-se transparente, enquanto a formulação F2 apresentou coloração marrom escuro. Por sua vez, as formulações F3 e F4 mostraram tonalidade marrom claro. Todas as formulações exibiram alta homogeneidade e odor característico.

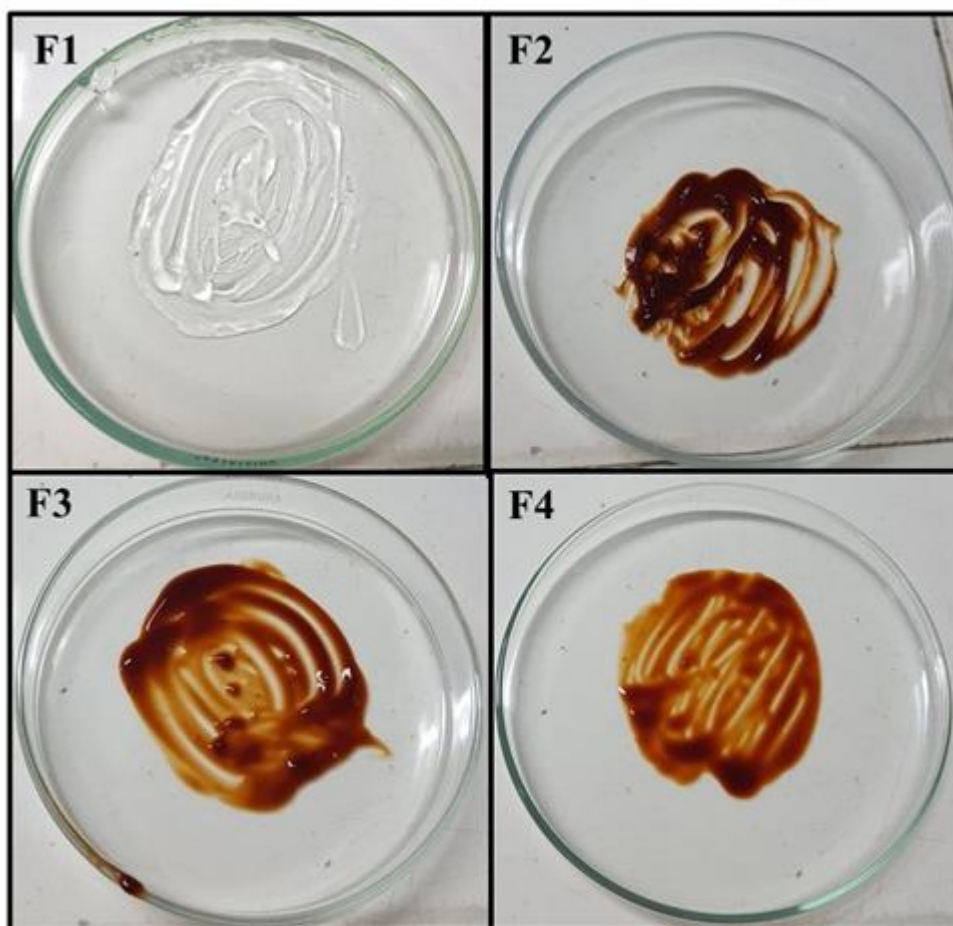


Figura 23: Formulações imediatamente após a manipulação utilizando a base em gel Carbopol®. F1: Base gel Carbopol® + Filtro UVAB 5%; F2: Base gel Carbopol® + Hm-EEB 5%; F3: Base gel Carbopol® + Filtro UVAB 5% + Hm-EEB 5%; F4: Base gel Carbopol® + Filtro UVAB 10% + Hm-EEB 10%.

As formulações apresentaram aspecto homogêneo, com consistência firme e não foram evidenciados sinais de alterações nem separação de fases após o teste de centrifugação, exceto para F1. Essa formulação, composta apenas pelo filtro químico UVAB na concentração de 5%, imediatamente após a manipulação exibiu coloração transparente, com aspecto homogêneo e sem alteração no odor da base de gel, com FPS igual a $15,46 \pm 0,03$, valores de acordo com o informado na ficha técnica do fornecedor. Entretanto, após aproximadamente 12 horas da manipulação, a formulação F1 mostrou alteração na coloração, com flocos brancos por todo o gel, demonstrando que houve cristalização do filtro químico na base de gel. Desta forma, a cristalização do ingrediente ativo indica incompatibilidade entre o composto e a base cosmética (Figura 28).



Figura 24: Formulação F1 composta por base gel Carbopol® + Filtro UVAB 5% após 12 horas de manipulação.

Apesar da incompatibilidade encontrada na formulação F1, as formulações F3 e F4, que apresentavam na composição o filtro químico UVAB e extrato bruto de *H. martiana*, não mostraram precipitação nem floculação do filtro químico. Este fato evidencia uma possível capacidade estabilizante do extrato adicionado, pois nenhuma das formulações com extrato e filtro químico apontaram qualquer sinal de incompatibilidade, mesmo após teste de centrifugação e ciclo de gelo/degelo (Tabela 17).

Tabela 17. Controle de qualidade físico-químico das formulações-teste com o extrato das cascas de *H. martiana* antes e depois do ciclo de gelo/degelo.

	Formulações-teste							
	F1		F2		F3		F4	
	T ₀	T ₁₂	T ₀	T ₁₂	T ₀	T ₁₂	T ₀	T ₁₂
Aspecto	H	F*	H	H	H	H	H	H
Cor	T	T	ME	ME	MA	MA	MA	MA
Odor	SG	SG	SG	SG	SG	SG	SG	SG
Centrifugação	N	N**	N	N	N	N	N	N
pH	6,02 ± 0,08	5,54 ± 0,12	6,09 ± 0,14	5,56 ± 0,44	6,01 ± 0,24	6,06 ± 0,31	6,02 ± 0,06	6,07 ± 0,43
Densidade relativa (mg/mL)	0,9965 ± 0,02	0,9899 ± 0,16	0,9945 ± 0,02	0,9978 ± 0,12	0,9672 ± 0,02	0,9644 ± 0,22	0,9512 ± 0,51	0,9592 ± 0,68

Legenda: H= Homogêneo; F= Presença de flocos; T= cor transparente; MA= cor marrom avermelhado; ME= cor marrom escuro; SG= odor *Sui generis*, característico; N= indica normal, sem alterações. SF= separação de fases. *A formulação F1 apresentou alterações no aspecto após 12h de manipulação. **A formulação F1, mesmo cristalizado, após centrifugação não apresentou precipitados.

A formulação F2, contendo apenas o Hm-EEB na concentração de 5%, apresentou-se com coloração marrom escuro, com brilho e consistência adequada e um agradável odor amadeirado do extrato bruto. Já a formulação F3 e F4, contendo Hm-EEB o filtro químico, exibiu coloração marrom clara, odor e brilho semelhante à formulação F2.

Porém, uma leve diminuição na consistência do gel pôde ser observada nas formulações F3 e F4, com a adição do filtro químico e extrato bruto imediatamente após a manipulação e correção do pH, mas o aspecto semissólido da formulação foi mantido. Esse comportamento pode ser constatado com a queda dos valores de densidade de massa das formulações (Tabela 17), à medida em que foram aumentadas as concentrações de filtro químico e extrato nas formulações F3 e F4 em relação às formulações F1 e F2. Apesar do gel Carbopol[®] ser constituído por uma rede polimérica de ácido acrílico de alto peso molecular, possuir ter seu potencial de viscosidade completo pela adição de uma base orgânica ou inorgânica, como trietanolamina ou hidróxido de sódio, à dispersão aquosa do gel (CORRÊA et al., 2005), a correção do pH com trietanolamina para valores compatíveis com o pH cutâneo, que é estabelecido entre 5,5 e 6,5 imediatamente após a manipulação não proporcionou aumento da consistência das formulações. Este fato pode ser então atribuído ao aumento da concentração de ativos adicionados, visto que a densidade foi diminuindo, à medida em que foram aumentadas as concentrações de filtro químico e extrato nas formulações F3 (contendo 5% de filtro químico e 5% de extrato bruto) e F4 (10% de filtro químico e 10% de extrato bruto). Em um estudo com o desenvolvimento de gel contendo óleo essencial de gengibre (*Zingiber officinale*), as densidades apresentadas pelas diferentes formulações variaram entre 0,97 e 1,06 g/mL, com pH entre 5,8 e 6,9 (CORDEIRO et al., 2013), valores próximos aos encontrados no presente estudo. Portanto, os valores de densidade apresentados para as formulações propostas contendo o extrato de *H. martiana* estão dentro dos valores esperados para o desenvolvimento de géis.

Outro parâmetro relacionado à reologia foi analisado nas formulações dos géis preparados. A espalhabilidade das formulações foi calculada (Figura 29) e esses dados podem mostrar informações importantes sobre a eficácia e aspectos sensoriais das formulações. Um gel fotoprotetor deve ter uma extensibilidade adequada, contribuindo para a formação de um filme sobre a pele. Desta forma, a formulação pode garantir o Fator de Proteção Solar (FPS) informado. Os resultados apresentados pelas formulações propostas estão acima dos valores encontrados para emolientes utilizados em emulsões comerciais (ISAAC et al., 2008), demonstrando que os géis desenvolvidos com o extrato de *H. martiana* obtiveram uma extensibilidade adequada para formulações fotoprotetoras.

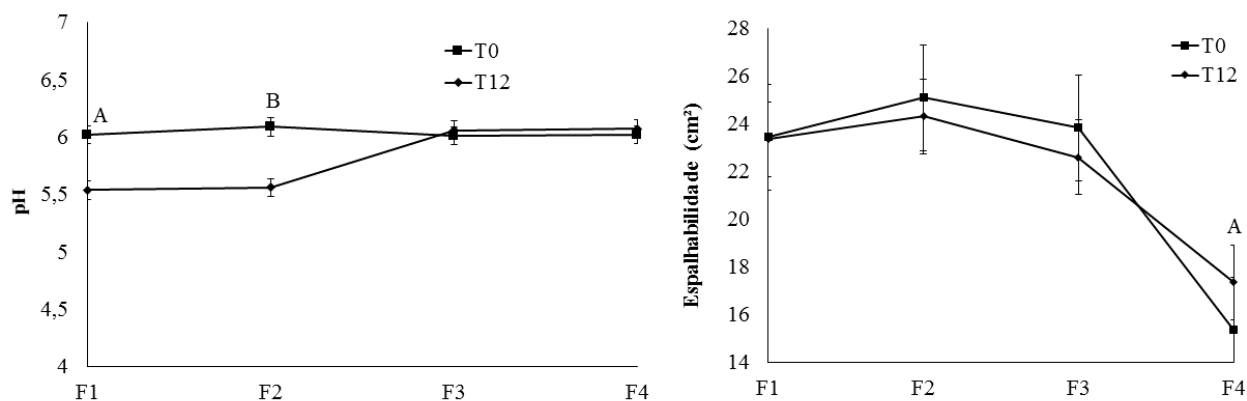


Figura 25: Espalhabilidade das formulações fotoprotetoras (F1-F4) antes (T0) e depois (T12) do estudo de estabilidade preliminar. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão, onde A ($p < 0.05$ T0 versus T12) e B ($p < 0.05$ T0 versus T12), de acordo com o teste t de Student.

Diante destes resultados, pode-se observar que as formulações contendo apenas o extrato de *H. martiana* (F2) ou a adição deste com o filtro químico UVAB (F3 e F4) não apresentaram alterações, separação de fases ou mudança de coloração após o teste de resistência à centrifugação, além de apresentarem resultados físico-químicos adequados antes e após a estabilidade preliminar, demonstrando que estas formulações atendem aos requisitos mínimos de qualidade para a formulações tópicas em gel.

Além dos parâmetros físico-químicos de controle de qualidade, a atividade antioxidante das formulações foi avaliada após a manipulação. Os resultados são apresentados na Tabela 18, e pode-se verificar que a formulação F1, não apresentou atividade antioxidante significativa. Entretanto, a formulação F2, composta por 5% de Hm-EEB, apresentou $77,55 \pm 0,02$ % AS (método DPPH), $26,60 \pm 1,90$ % TEAC (método ABTS) e $15,00 \pm 0,55$ % TAA (método fosfomolibdênio), demonstrando que a substituição do filtro químico pelo extrato bruto interferiu na atividade antioxidante, causando um aumento significativo. Já a formulação F3, composta por 5% do filtro químico UVAB e 5% do Hm-EEB, apresentou $29,52 \pm 0,11$ % AS, $4,60 \pm 0,10$ % TEAC e $6,55 \pm 0,09$ % TAA, demonstrando uma diminuição nos valores encontrados em relação à para a formulação contendo apenas o extrato bruto. A formulação F4, composta por 10% do filtro químico UVAB e 10% do extrato bruto, apresentou $57,88 \pm 0,10$ % AS, $34,60 \pm 1,20$ % TEAC e $12,92 \pm 0,12$ % TAA, evidenciando que o aumento na concentração dos filtros solares aumentou a atividade antioxidante da formulação F4 em relação à formulação F3. A adição do extrato bruto, portanto, pode fornecer uma vantagem para as formulações.

Tabela 18: Atividade antioxidante e fotoprotetora das formulações preparadas com extrato das cascas de *H. martiana*.

Formulações	DPPH (% AS) ± D.P.	ABTS ⁺ (% TEAC) ± D.P.	Fosfomolibdênio (%TAA) ± D.P.
F1	00,00 ± 0,00 ^a	0,40 ± 2,50 ^a	5,42 ± 0,08 ^a
F2	77,55 ± 0,02 ^b	26,60 ± 1,90 ^b	15,00 ± 0,55 ^b
F3	29,52 ± 0,11 ^c	4,60 ± 0,10 ^a	6,55 ± 0,09 ^c
F4	57,88 ± 0,10 ^d	34,60 ± 1,20 ^c	12,92 ± 0,12 ^d

Legenda: D.P. = Desvio Padrão. Letras iguais na mesma coluna indicam não diferença estatística conforme ANOVA (seguido de Tukey), $p < 0.05$.

No entanto, pode-se observar que a adição dos filtros químicos UVAB e do extrato bruto na concentração de 5% (formulação F3) causou uma queda na atividade antioxidante. Este resultado pode sugerir uma interação química entre o filtro químico e o extrato bruto, o que pode ser justificado pelo caráter químico do extrato bruto da casca de *H. martiana*, que foi considerado levemente ácido em estudo anterior, devido à alta concentração de compostos fenólicos (OLIVEIRA, 2015). O pH ácido pode interferir nos elétrons da estrutura química dos filtros solares, passando o produto para absorver a radiação UV em diferentes comprimentos de onda (RIBEIRO, 2006) Vale ressaltar que essa interferência não foi encontrada na atividade fotoprotetora (Figura 24).

Por outro lado, o aumento da quantidade do extrato bruto para 10% na formulação F4 resultou em aumento tanto, da atividade antioxidante quanto da atividade fotoprotetora, indicando que essa concentração afetou positivamente as atividades avaliadas. Assim, o monitoramento do pH, tanto no controle de qualidade e em estudos preliminares de estabilidade é importante para monitorar essa possível interação (BRASIL, 2004).

Portanto, os resultados evidenciados para a atividade antioxidante das formulações testadas podem agregar maior valor ao desenvolvimento da formulação fotoprotetora, uma vez que pode proporcionar uma diminuição no uso de aditivos sintéticos com ação antioxidante na formulação, o que poderia trazer menos efeitos indesejáveis (KRISHNAIAH et al., 2011).

A avaliação da atividade fotoprotetora das formulações testadas é mostrada na Figura 24. A formulação F2, contendo apenas o extrato bruto, apresentou um valor de FPS maior que 6,0, valor que atende ao mínimo exigido pela ANVISA (BRASIL, 2012), demonstrando que o potencial fotoprotetor das espécies em estudo. As formulações contendo o filtro químico e o extrato bruto (formulações F3 e F4) mostraram um aumento considerável nos valores de FPS, em relação às formulações contendo os filtros testados isoladamente (formulações F1 e F2), o que pode sugerir um efeito sinérgico entre os filtro químico e extrato bruto na atividade fotoprotetora.

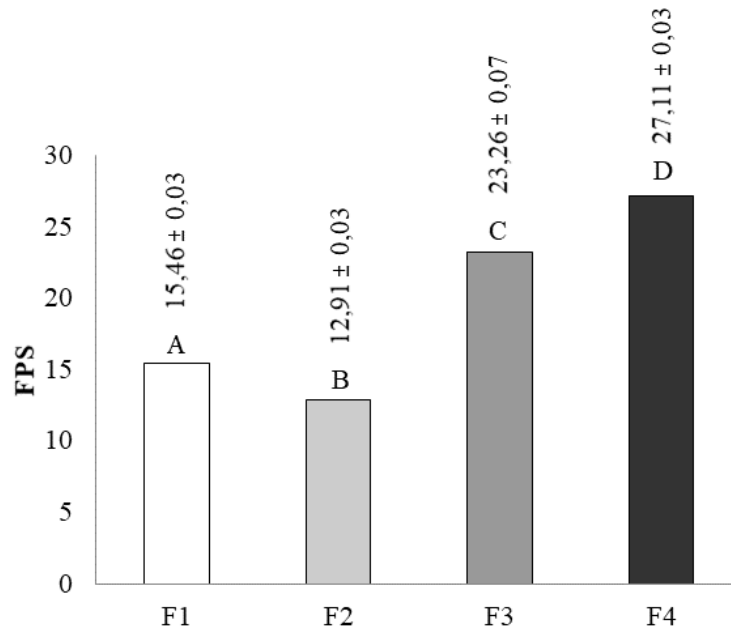


Figura 26: FPS das formulações de gel Carbopol®. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão ($n = 3$), onde letras diferentes indicam diferença significativa entre as amostras ($p < 0.05$), conforme ANOVA, seguido pelo teste de Tukey.

Com os resultados apresentados no presente estudo, a formulação F4 apresentou o melhor resultado para a atividade fotoprotetora com atividade antioxidante significativa, assim como uma possível ação estabilizante do filtro químico UVAB, atendendo todos os requisitos de controle de qualidade e estabilidade preliminar, podendo ser, portanto, considerado um produto promissor, uma vez que a adição de filtros solares naturais aos filtros químicos é considerada uma alternativa para aumentar a segurança e eficácia dos fotoprotetores.

6 CONCLUSÃO

Os dados obtidos no presente estudo trazem informações importantes sobre a composição fitoquímica do extrato das cascas de *Hymenaea martiana*, e ainda demonstra uma aplicação tecnológica importante para este derivado vegetal.

Foi obtido um extrato etanólico por Extração Acelerada por Solvente (ASE), um método sofisticado e automatizado, que se mostrou eficaz para a extração de compostos fenólicos na espécie estudada. O estudo fitoquímico do extrato demonstrou que os compostos fenólicos, principalmente os flavonoides, constituem a classe majoritária de metabólitos secundários. Flavonoides bioativos foram identificados na espécie pela primeira vez por CLAE-EM, e os flavonoides astilbina e os isômeros neoastilbina e isoastilbina foram isolados por Sephadex® e identificados por RMN no extrato, corroborando estudos anteriores. A identificação dos isômeros de astilbina na espécie em estudo ainda não foi encontrada na literatura científica disponível, evidenciando mais uma colaboração importante destes resultados para o estudo fitoquímico de *H. martiana*.

O extrato e frações obtidos a partir da espécie em estudo apresentaram resultados importantes nas avaliações das atividades antioxidante, antimicrobiana e fotoprotetora. O conhecimento sobre estas atividades pode agregar valor terapêutico e cosmético à espécie em estudo, com correlação fortemente positiva entre os compostos fenólicos e as atividades avaliadas.

Formulações contendo o extrato bruto foram preparadas, apresentando atividade antioxidante e fotoprotetora relevantes e resultados de controle de qualidade e estabilidade preliminar adequados, evidenciando a viabilidade da veiculação do extrato bruto obtido em formulações cosméticas. Os resultados da atividade fotoprotetora das formulações demonstraram um efeito sinérgico entre o extrato bruto e o filtro químico UVAB hidrofílico avaliado, trazendo resultados promissores para o desenvolvimento de uma formulação fitocosmética com ação fotoprotetora, antioxidante e antimicrobiana.

Diante destes resultados, o presente estudo fornece dados inéditos e importantes para o estudo fitoquímico e futuro desenvolvimento de produtos farmacêuticos e fitocosméticos a partir do extrato de *H. martiana*, uma planta nativa do Nordeste brasileiro com um grande potencial biotecnológico e terapêutico.

REFERÊNCIAS

- ABDELHADY, M.I.S.; KAMAL, A.M.; OTHMAN, S.M.; MUBARAK., M.S.; HADDA, T.B. Total polyphenolic content, antioxidant, cytotoxic, antidiabetic activities, and polyphenolic compounds of *Sophora japonica* grown in Egypt. *Medicinal Chemistry Research*, v. 24, p. 482-495, 2015.
- AGRA, M.F.; FREITAS, P.F.; BARBOSA-FILHO, J.M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 17, n. 1, p. 114-140, 2007.
- AKHALAYA, M.Y.; MAKSIMOV, G.V.; RUBIN, A.B.; LADEMANN, J.; DARVIN, M.E. Molecular action mechanisms of solar infrared radiation and heat on human skin. *Ageing Research Reviews*, v.16, p. 1-11, 2014.
- ALBUQUERQUE, U.P.; MONTEIRO, J.M.; RAMOS, M.A.; AMORIM, E.L.C. Medicinal and magic plants from a public market in northeastern Brazil. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 110, p. 76-91, 2007a.
- ALBUQUERQUE, U.P.; MEDEIROS, P.M.; ALMEIDA, A.L.S.; MONTEIRO, J.M.; LINS-NETO, E.M.F.; MELO, J.G.; SANTOS, J.P. Medicinal plants of the Caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: A quantitative approach. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 114, p. 325-354, 2007b.
- ALENCAR-FILHO, J.M.T.; SAMPAIO, P.A.; PEREIRA, E.C.V.; OLIVEIRA-JÚNIOR, R.G.; SILVA, F.S.; ALMEIDA, J.R.G.S.; ROLIM, L.A.; NUNES, X.P.; ARAÚJO, E.C.C. Flavonoids as photoprotective agents: a systematic review. *Journal of Medicinal Plants Research*, v. 10, n. 47, p. 848-864, 2016.
- ALMEIDA, J.R.G.S.; SILVA, M.E.G.C.; GUIMARÃES, A.L.; OLIVEIRA, A.P.; ARAÚJO, C.S.; SIQUEIRA-FILHO, J.A.; FONTANA, A.P.; DAMASCENO, P.K.F.; BRANCO, C.R.C.; BRANCO, A. HPLC-DAD analysis and antioxidant activity of *Hymenaea martiana* Hayne (Fabaceae). *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, v. 4, n. 2, p. 1160-1166, 2012.
- ALMEIDA, M.S.C.; MENDONÇA, R.L.; FREITAS, M.Z.C.; VANDESMET, L.C. *Staphylococcus aureus*. *Mostra Científica em Biomedicina*, vol. 1, n. 01, 2016.
- ALVES, C.Q.; DAVID, J.M.; DAVID, J.P.; BAHIA, M.V.; AGUIAR, R.M. Métodos para a determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos. *Química Nova*, v.33, n. 10, p. 2202-2210, 2010.
- ANDRADE, B.A. *Atividade fotoprotetora in vitro de espécies medicinais da caatinga pernambucana e incorporação em gel dermatológico*. 2015. 71 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

ANDRADE, J.C. *Avaliação da eficácia do extrato de folhas de Schinopsis brasiliensis Engler como conservante em uma formulação cosmética*. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) - Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2016. 29 p.

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

ARAÚJO, E.M.P. *Técnicas espectroscópicas e quimiométricas como ferramentas na confirmação da estrutura de substâncias isoladas de produtos naturais ou obtidas por síntese*. 2011. 130 f. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia, Salvador.

ARAÚJO, C.S. *Estudo fitoquímico e atividade biológica in vitro de Annona vepretorum Mart. (Annonaceae)*. 2013. 198 f. Dissertação (Mestrado em Recursos Naturais do Semiárido), Universidade Federal do Vale do São Francisco, Petrolina.

BAKOTA, E.L.; WINKLER-MOSER, J.K.; BERHOW, M.A.; PALMQUIST, D.E.; LIU, S.X. Antioxidant activity of hybrid grape pomace extracts derived from midwestern grapes in bulk oil and oil-in-water emulsions. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, vol. 92, p. 1333-1348, 2015.

BALASUNDRAM, N.; SUNDRAM, K.; SAMMAN, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*, v. 99, p. 191-203, 2006.

BAREL, A.O.; PAYE, M.; MAIBACH, H.I. *Handbook of cosmetic science and technology*. 3ª Edição. Nova Iorque: Informa Healthcare, 2009. 869 p.

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

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

BERNARDES, L.S.C.; LANG, K.L.; PETROVICK, P.R.; SCHENKEL, E.P. Produtos naturais e o desenvolvimento de fármacos. In: SIMÕES, C.M.O. [et al.] (Org.). *Farmacognosia: do produto natural ao medicamento*. Porto Alegre: Artmed, 2017.

BOBIN, M. F.; RAYMOND, M.; MARTINI, M.C. UVA/UVB absorption properties of natural products. *Cosmetics & Toiletries*, v. 109, p. 63-78, 1995.

BOOTS, A.W.; HAENEN, G.R.M.M.; BAST, A. Health effects of quercetin: From antioxidant to nutraceutical. *European Journal of Pharmacology*, v. 585, p. 325-337, 2008.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. *Lebensmittel-Wissenschaft Technologie*, v. 28, p. 25–30, 1995.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos*. 1ª Edição. Brasília: ANVISA, 2004. 52 p.

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

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. *Espécies Nativas da Flora Brasileira de Valor Econômico Atual ou Potencial: Plantas para o Futuro - Região Sul*. Brasília: MMA, 2011. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/estruturas/sbf2008_dcbio/_ebooks/regiao_sul/Regiao_Sul.pdf>. Acesso em 06/03/2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 30 de 1 de junho de 2012. – Aprova o Regulamento Técnico do Mercosul para Fotoprotetores. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília, 2012.

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

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 07 de 10 de fevereiro de 2015. Dispõe sobre os requisitos técnicos para a regularização de produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes e dá outras providências. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília, 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 69 de 23 de março de 2016. Dispõe sobre o "Regulamento técnico Mercosul sobre lista de filtros ultravioletas permitidos para produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes". *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília, 2016.

CALDAS, S. S.; GONÇALVES, F. F.; PRIMEL, E. G.; PRESTES, O. D.; MARTINS, M. L.; ZANELLA, R. Principais técnicas de preparo de amostra para a determinação de resíduos de agrotóxicos em água por cromatografia líquida com detecção por arranjo de diodos e por espectrometria de massas. *Química Nova*, v. 34, n. 9, p. 1604-1617, 2011.

CALIXTO, J.B.; YUNES, R.A.; MEDEIROS, Y.S. Differential antagonistic effect of hydroalcoholic extract from *Hymenaea martiana* Hayne arzeik on kinin and other agonist-induced

contractions of the isolated rat uterus and guinea-pig ileum. *Phytotherapy Research*, v. 6, n. 6, p. 322-326, 1992a.

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

CAMPOS, J.S.; FRASSON, A.P.Z. Avaliação da atividade antioxidante do extrato aquoso de *Lafoensia pacari* A. ST-HIL. em emulsão não-iônica. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, v. 32, n. 3, p. 363-368, 2011.

CANUTO, G.A.B.; COSTA, J.L.; CRUZ, P.L.R.; SOUZA, A.R.L.; FACCIO, A.T. KLASSEN, A.; RODRIGUES, K.; TAVARES, M.F.M. Metabolômica: Definições, estado-da-arte e aplicações representativas. *Química Nova*, v. 41, n. 1, p. 75-91, 2018.

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

CARNEIRO, F.M.; SILVA, M.J.P.; BORGES, L.L.; ALBERNAZ, L.C.; COSTA, J.D.P. Tendências dos estudos com plantas medicinais no Brasil. *Revista Sapiência*, vol, 3, n. 2), p.44-75, 2014.

CARVALHO, A.V.; MATTIETTO, R.A.; RIOS, O.A.; MORESCO, K.S. Mudanças nos compostos bioativos e atividade antioxidante de pimentas da região amazônica. *Agricultural Research in the Tropics*, v. 44, p. 399-408, 2014.

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

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

CHEMSPIDER, *Search and share chemistry*. Disponível em: < <http://www.chemspider.com/>>. Acesso em 13/11/2017.

CHEN, X.M.; TAIT, A.R.; KITTS, D.D. Flavonoid composition of orange peel and its association with antioxidant and anti-inflammatory activities. *Food Chemistry*, v. 218, p. 15-21, 2017.

CHOBOT, V.; HADACEK, F.; BACHMANN, G.; WECKWERTH, W.; KUBICOVA, L. Pro- and antioxidant activity of three selected flavan type flavonoids: catechin, eriodictyol and taxifolin. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 17, p. 1-9, 2016.

CHOQUENET, B.; COUTEAU, C.; PAPARIS, E.; COIFFARD, L.J.M. Quercetin and rutin as potential sunscreen agents: determination of efficacy by an in vitro method. *Journal of Natural Products*, v. 71, n. 6, p. 1117-1118, 2008.

CHORILI, M.; BRIZANTE, A.C.; RODRIGUES, C.A.; SALGADO, H.R.N. Aspectos gerais em sistemas transdérmicos de liberação de fármacos. *Revista Brasileira de Farmácia*, v. 88, n. 1, p. 7-13, 2007.

CHUA, M.T.; TUNG, Y.T.; CHANG, S.T. Antioxidant activities of ethanolic extracts from the twigs of *Cinnamomum osmophloeum*. *Bioresource Technology*, v. 99, p. 1918–1925, 2008.

CLOSA, D.; TORRES, M.; HOTTER, G.; BIOQUE, G.; LEON, S.; GELPI, E.; ROSELLÓ-CATAFAU, J. Prostanoids and free radicals in CI4C-induced hepatotoxicity in rats: effect of astilbin. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, v. 56, n. 4, p. 331-334, 1997.

CLSI. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically*: approved standard. 9th ed. CLSI document M07-A9. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, USA, 2012.

CLSI. *Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts*. 3th ed. CLSI document M27-A3. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, USA, 2008.

COLLINS, C.H., BRAGA, G.L., BONATO, P.S. *Fundamentos de cromatografia*. Campinas: Editora da UNICAMP, 2006. 452p.

CORDEIRO, M.S.F.; COSTA, J.K.B.; LIMA, C.G.; JÚNIOR, J.D.C.C.; MELO, A.F.M. Desenvolvimento tecnológico e avaliação de estabilidade de gel dermatológico a partir do óleo essencial de gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe). *Revista Brasileira de Farmácia*. v. 94, n. 2, p. 148-153, 2013.

CORREA, G.O.P. *Avaliação in vitro da citotoxicidade e potencial de irritação de conservantes antimicrobianos utilizados em cosméticos*. Dissertação parcial (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Araraquara, 2018. 34 p.

CORREA, M.A. *Cosmetologia: Ciência e Técnica*. 1ª Edição. São Paulo: Medfarma, 2012. 492 p.

CORRÊA, N.M.; CAMARGO-JÚNIOR, F.B.; IGNÁCIO, R.F.; LEONARDI, G.R. Avaliação do comportamento reológico de diferentes géis hidrofílicos. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v.41, n. 1, p. 73-78, 2005.

COUTINHO, M.A.S.; MUZITANO, M.F.; COSTA, S.S. Flavonoides: potenciais agentes terapêuticos para o processo inflamatório. *Revista Virtual de Química*, v. 1, n. 3, p. 241-256, 2009.

CROTTI A.E.M.; VESSECCHI, R.; LOPES, J.L.C.; LOPES, N.P. Espectrometria de massas com ionização por "eletrospray": processos químicos envolvidos na formação de íons de substâncias orgânicas de baixo peso molecular. *Química Nova*, v. 29, n. 2, p. 287-282, 2006.

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

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

DE BRITTO, J.; MANICKAM, V.S.; GOPALAKRISHNAN, S.; USHIODA, T.; TANAKA, N. Determination of aglycone chirality in dihydroflavonol 3-O- α -L-rhamnosides by ^1H NMR spectroscopy. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, v. 43, p. 338-339, 1995.

DEGANI, A.L.; CASS, Q.B.; VIEIRA, P.C. Cromatografia: um breve ensaio. *Química Nova na Escola*, n. 7, p. 21-25, 1998.

DIAO, H.; KANG, Z.K.; HAN, F.; JIANG, W. Astilbin protects diabetic rat heart against ischemia-reperfusion injury via blockade of HMGB1-dependent NF- κ B signaling pathway. *Food and Chemical Toxicology*, v. 63, p. 104-110, 2014.

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

DING, Y.; LIANG, Y.; DENG, B.; QIAO, A.; WU, K.; XIAO, W.; GONG, W. Induction of TGF- β and IL-10 production in dendritic cells using astilbina to inhibit dextran sulfate sodium-induced colitis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 446, p. 529-534, 2014.

DINIZ, M. E. R. *Uso da técnica de espectrometria de massas com ionização por eletrospray (ESI-MS) para o estudo do mecanismo de reações orgânicas e avaliação do perfil de fragmentação de*

bis-hidroxiiminas aromáticas. 2011. 93 f. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

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

EVANS-JOHNSON, J.A.; GARLICK, J.A.; JOHNSON, E.J.; WANGA, X.D.; CHEN, C.Y.O. A pilot study of the photoprotective effect of almond phytochemicals in a 3D human skin equivalent. *Journal of Photochemistry and Photobiology B*, v. 126, p. 17-25, 2013.

FERRERES, F.; SOUSA, C.; VALENTÃO, P.; ANDRADE, P.B.; SEABRA, R.M.; GIL-IZQUIERDO, A. New C-deoxyhexosyl flavones and antioxidante properties of *Passiflora edulis* leaf extract. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 55, p. 10187-10193, 2007.

FLOR, J.; DAVOLOS, M.R.; CORREA, M.A. Protetores Solares. *Química Nova*, v. 30, p. 153-158, 2007.

GARDI, C.; BAUEROVA, K.; STRINGA, B.; KUNCIROVA, V.; SLOVAK, L.; PONIST, S.; DRAFI, F.; BEZAKOVA, L.; TEDESCO, I.; ACQUAVIVA, A.; BILOTTO, S.; RUSSO, G.L. Quercetin reduced inflammation and increased antioxidant defense in rat adjuvant arthritis. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 583, p. 150-157, 2015.

GARG, D., SHAIKH, A., MULEY, A. AND MARAR, T. *In vitro* antioxidant activity and phytochemical analysis in extracts of *Hibiscus rosasinensis* stem and leaves. *Free Radicals and Antioxidants*, v. 2, p. 3-6, 2012.

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

GNPS: Global Natural Products Social Molecular Networking. Disponível em: <<https://gnps.ucsd.edu>>. Acesso em 13/11/2017.

GENOVESE, M.I.; HASSIMOTTO, N.M.A.; LAJOLO, F.M. Isoflavone profile and antioxidant activity of Brazilian soybean varieties. *Food Science and Technology International*, v. 11, p. 205-211, 2005.

GOMES, S.V.F. *Aplicação do planejamento box-behnken na otimização de método de extração de flavonoides usando extração acelerada com solventes (ASE) e quantificação de marcadores químicos por CLAE-DAD-UV em espécies do gênero Passiflora*. Tese (Pós-graduação em Química), Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2013. 161 p.

GRETER-BECK, S.; MARINI, A.; JAENICKE, T.; KRUTMANN, J. Photoprotection of human skin beyond ultraviolet radiation. *Photodermatology, Photoimmunology and Photomedicine*, v. 30, p. 167-174, 2014.

GUARANTINI, T.; CALLEJON, D.R.; PIRES, D.C.; LOPES, J.N.C.; LIMA, L.M.; GIANELLANETO, D.; SUSTOVICH, C.; LOPES, N.P. Fotoprotetores derivados de produtos naturais: perspectivas de mercado e interações entre o setor produtivo e centros de pesquisa. *Química Nova*, v. 32, n. 3, p. 717-721, 2009.

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

GUIMARÃES, D.O.; MOMESSO, L.S.; PUPO, M.T. Antibióticos: Importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. *Química Nova*, v. 33, n.3, p. 667-679, 2010.

GUO, L.; LIU, W.; LU, T.; GUO, W.; GAO, J.; LUO, Q.; WU, X.; SUN, Y.; WU, X.; SHEN, Y.; XU, Q. Decrease of functional activated T and B cells and treatment of glomerulonephritis in lupus-prone mice using a natural flavonoid astilbina. *PLoS ONE*, v. 10, n. 4, e0124002, p. 1-15, 2015.

HAAG, S.F. et al. Enhancement os skin radical scavenging activity and stratum corneum lipids after application of a hyperforin-rich cream. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 86, p. 227-233, 2014.

HE, M.; MIN, J.W.; KONG, W.L.; HE, X.H.; LI, J.X.; PENG, B.W. A review on the pharmacological effects of vitexin and isovitexin. *Fitoterapia*, v. 115, p. 74-85, 2016.

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

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

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

IHA, S.M.; MIGLIATO, K.F.; VELLOSA, J.C.R.; SACRAMENTO, L.V.S.; PIETRO, R.C.L.R.; ISAAC, V.L.B.; BRUNETTI, I.L.; CORRÊA, M.A.; SALGADO, H.R.N. Estudo fitoquímico de goiaba (*Psidium guajava* L.) com potencial antioxidante para o desenvolvimento de formulação fitocosmética. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 18, n. 3, p. 387-393, 2008.

IKAWA, M.; SCHAPER, T.D.; DOLLARD, C.A.; SASNER, J.J. Utilization of Folin-Ciocalteu phenol reagent for the detection of certain nitrogen compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 51, p. 1811-1815, 2003.

INCA. *Estimativas 2016*. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2016>>. Acesso em 30 de abril de 2016.

ISAAC, V. L. B.; UCHIYAMA, C. L. Influência da combinação de tensoativos associada a agentes espessantes na viscosidade de xampus. In: *Jornada Farmacêutica da UNESP*, 45., 1998, Araraquara, SP. Araraquara, 1998. p.11.

ISAAC, V.L.B.; CEFALI, L.C.; CHIARI, B.G.; OLIVEIRA, C.C.L.G.; SALGADO, H.R.N.; CORRÊA, M.A. Protocolo para ensaios físico-químicos de estabilidade de fitocosméticos. *Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences*, v. 29, p. 81-96, 2008.

JIN, Y.; LU, Y.; HAN, G.; et al. Comparative study on in vitro anti-free radical activities of quercetin, isoquercetin, and rutin. *Chinese Traditional Patent Medicine*, vol. 38, n. 3, p. 408-412, 2007.

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

KASAI, R.; HIRONO, S.; CHOU, W.H.; TANAKA, S.; CHEN, F.H. Sweet dihydroflavonol rhamnoside from leaves of *Engelhardtia chrysolepsis*, a chinese folk medicine, Hung-qi. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, V. 36, p. 4167-4170, 1988.

KENNY, O.; BRUNTON, N.P.; SMYTH, T.L. In vitro protocols for measuring the antioxidant capacity of algal extracts. In: STENGEL, D.B.; CONNAN, S. (Org.). *Natural products from marine algae: Methods and protocols. Methods in Molecular Biology*. v. 1308. Nova Iorque: Springer Science Business Media, 2015.

KHATTAK, K.F. Evaluation of microbial loads, physical characteristics, chemical constituents and biological properties of radiation processed *Fagonia arabica*. *Radiation Physics and Chemistry*, v. 81, p. 679-685, 2012.

KIM, H.K.; SON, K.H.; CHANG, H.W.; KANG, S.S.; KIM, H.P. Amentoflavone, a plant biflavone: A new potential anti-inflammatory agent. *Archives of Pharmacal Research*, v. 21, n. 4, p. 406-410, 1998.

KING, A.; YOUNG, G. Characteristics and occurrence of phenolic phytochemicals. *Journal of the American Dietetic Association*, v. 99, p. 213–218, 1999.

KLEIN, T.; LONGHINI, R.; BRUSCHI, M.L.; MELLO, J.C.P. Fitoterápicos: um mercado promissor. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, v.30. n.3, p.241-248, 2009.

KREIS, W.; MUNKERT, J.; PÁDUA, R.M. Biossíntese de metabólitos primários e secundários. In: SIMÕES, C.M.O. [et al.] (Org.). *Farmacognosia: do produto natural ao medicamento*. Porto Alegre: Artmed, 2017.

KRISHNAIAH, D.; SARBATLY, R.; NITHYANANAM, R. A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. *Food and Bioproducts Processing*, v. 89, p. 217–223, 2011.

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

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

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

LI, A.B.; WONGA, C.C.; KA-WING, C.; CHEN, F. Antioxidant Properties in Vitro and Total Phenolic Contents in Methanol Extracts from Medicinal Plants. *Swiss Society of Food Science and Technology*, v. 41, p. 385-390, 2008.

LINS-NETO, J.R.; UCHÔA, A.D.A.; MOURA, P.A.; BEZERRA-FILHO, C.M.; TENÓRIO, J.C.G.; SILVA, A.G.; XIMENES, R.M.; SILVA, M.V.; CORREIA, M.T.S. Phytochemical screening, total phenolic content and antioxidant activity of some plants from Brazilian flora. *Journal of Medicinal Plants Research*, v. 10, p. 409-416, 2016.

LIU, H.; MOU, Y.; ZHAO, J.; WANG, J.; ZHOU, L.; WANG, M.; WANG, D.; H. J.; YU, Z.; YANG, F. Flavonoids from *Halostachys caspica* and Their Antimicrobial and Antioxidant Activities. *Molecules*, vol. 15, p. 7933-7945, 2010.

- LU, C.L.; ZHU, W.; WANG, M.; XU, X.J.; LU, C.J. Antioxidant and anti-inflammatory activities of phenolic-enriched extracts of *Smilax glabra*. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, v. 2014, 910438, p.1-8, 2014.
- MACHADO, H.; NAGEM, T.J.; PETERS, V.M.; FONSECA, C.S.; OLIVEIRA, T.T. Flavonoides e seu potencial terapêutico. *Boletim do Centro de Biologia da Reprodução*, v. 27, n.1/2, p. 33-39, 2008.
- MANSUR, J.S.; BREDER, M.V.R.; MANSUR, M.C.A.; AZULAY, R.D. Determinação do fator de proteção solar por espectrofotometria. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, v. 61, p.121-124, 1986.
- MARIONNET, C.; TRICAUD, C.; BERNERD, F. Exposure to non-extreme solar UV daylight: Spectral characterization, effects on skin and photoprotection. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 16, p. 68-90, 2015.
- MARKHAM, K. R. *Techniques of flavonoid identification*. London: Academic Press, 1982. 113 p.
- MARQUES, G. S.; MONTEIRO, R. P. M; LEÃO, W. F.; LYRA, M. A. M.; PEIXOTO, M.S.; ROLIM-NETO, P. J.; XAVIER, H. S.; SOARES, L. A. L. Avaliação de procedimentos para quantificação espectrofotométrica de flavonoides totais em folhas de *Bauhinia forficata* Link. *Química Nova*, v. 35, n. 3, p. 517-522, 2012.
- MARSAIOLI, A.J.; LEITÃO-FILHO, H.F.; CAMPELLO, J.P. Diterpenes in the bark of *Hymenaea courbaril*. *Phytochemistry*, v. 14, n. 8, p. 1882-1883, 1975.
- MARTIN, S.S.; LANGENHEIM, J.H.; ZAVARIN, E. Quantitative variation in leaf pocket resin composition in *Hymenaea courbaril*. *Biochemical Systematics and Ecology*, v. 2, p. 75-87, 1974.
- MELO, E.A.; GUERRA, N.B. Ação antioxidante de compostos fenólicos naturalmente presentes em alimentos. *Boletim do SBCTA*, v.36, n. 1, p. 1-11, 2002.
- MENDES, R.F.; CARLINI, E.A. Brazilian plants as possible adaptogens: An ethnopharmacological survey of books edited in Brazil. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 109, p. 493-500, 2007.
- MILESI, S.S.; GUTERRES, S.S. Fatores determinantes da eficácia de fotoprotetores. *Caderno de Farmácia*, v. 18, n. 2, p. 81-87, 2002.
- MISHRA, A.K.; MISHRA, A.; CHATTOPADHYAY, P. Assessment of physical stability and photoprotective activity of topical formulations added with calendula oil. *Oriental Pharmacy and Experimental Medicine*, v. 12, n. 1, p. 35-40, 2012.

NACZK, M.; SHAIDI F. Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography*, v. 1054, n. 1-2, p. 95-111, 2004.

NASCIMENTO, C.S.; NUNES, L.C.C.; LIMA, A.A.N.; GRANGEIRO-JR, S.; ROLIM-NETO, P.J. Incremento do FPS em formulação de protetor solar utilizando extratos de própolis verde e vermelha. *Revista Brasileira de Farmácia*, vol. 90, p. 334-339, 2009.

NELSON, D.L.; COX, M.M. *Princípios de Bioquímica de Lehninger*. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.

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

OLIVEIRA, A.P. *Estudo fitoquímico e atividade biológica de Leonotis nepetifolia cultivada e selvagem: um estudo comparativo*. 2014. 229 f. Dissertação (Mestrado em Recursos Naturais do Semiárido), Universidade Federal do Vale do São Francisco, Petrolina.

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

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

OLIVEIRA, F.G.S. *Influência do método extrativo sobre a produção de compostos fenólicos em Hymenaea martiana (Fabaceae) e controle de qualidade da droga vegetal*. 2015. 198 f. Dissertação (Mestrado em Recursos Naturais do Semiárido), Universidade Federal do Vale do São Francisco, Petrolina.

OLIVEIRA, F.G.S.; LIMA-SARAIVA, S.R.G.; OLIVEIRA, A.P.; RABÊLO, S.V.; ROLIM, L.A.; ALMEIDA, J.R.G.S. Influence of the extractive method on the recovery of phenolic compounds in different parts of *Hymenaea martiana* Hayne. *Pharmacognosy Research*, v. 8, n. 4., 2016.

OLIVEIRA, F.G.S.; ARAÚJO, C.S.; ROLIM, L.A.; BARBOSA-FILHO, J.M.; ALMEIDA, J.R.G.S. The genus *Hymenaea*: A chemical and pharmacological review (Chapter 12). In: *Studies in Natural Products Chemistry*, v. 58. Amsterdam: Elsevier, 2018. p. 339-388.

OLIVEIRA, G.G.; CARNEVALE-NETO, F.; DEMARQUE, D.P.; PEREIRA-JÚNIOR, J.A.S.; PEIXOTO-FILHO, R.C.S.; MELO, S.J.; ALMEIDA, J.R.G.S.; LOPES, J.L.C.; LOPES, N.P. Dereplication of flavonoid glycoconjugates from *Adenocalymma imperatoris-maximilianii* by

untargeted tandem mass spectrometry-based molecular networking. *Planta Medica*, v. 83, p. 636-646, 2017.

OLIVEIRA-JÚNIOR, R.G.; ALMEIDA, J.R.G.S. Prospecção tecnológica de *Ananas comosus* (BROMELIACEAE). *Revista GEINTEC*, v. 2, n.5, p. 505-513, 2012.

OLIVEIRA-JÚNIOR, R.G.; ARAÚJO, C.S.; SANTANA, C.R.R.; SOUZA, G.R.; LIMA-SARAIVA, S.R.G.; GUIMARÃES, A.L.; OLIVEIRA, A.P.; SIQUEIRA-FILHO, J.A.; PACHECO, A.G.M.; ALMEIDA, J.R.G.S. Phytochemical screening, antioxidant and antibacterial activity of extracts from the flowers of *Neoglaziovia variegata* (Bromeliaceae). *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, v. 4, n. 10, p. 4489-4494, 2012.

OLIVEIRA-JÚNIOR, R.G.; SOUSA, G.R.; GUIMARÃES, A.L.; OLIVEIRA, A.P.; ARAÚJO, C.S.; SILVA, J.C.; PACHECO, A.G.M.; LIMA-SARAIVA, S.R.G.; ROLIM, L.A.; ROLIM-NETO, P.J.; CASTRO, R.N.; ALMEIDA, J.R.G.S. Photoprotective, antibacterial activity and determination of phenolic compounds of *Neoglaziovia variegata* (Bromeliaceae) by high performance liquid chromatography-diode array detector (HPLC-DAD) analysis. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 9, n. 22, p. 576–584, 2015.

OLIVEIRA-JÚNIOR, R.G.; SOUSA, G.R.; FERRAZ, C.A.A.; OLIVEIRA, A.P.; ARAÚJO, C.S.; LIMA-SARAIVA, S.R.G.; REIS, S.A.G.B.; GONÇALVES, T.M.; ROLIM, L.A.; ROLIM-NETO, P.G.; CÉSAR, F.C.S.; ALMEIDA, J.R.G.S. Development and evaluation of photoprotective o/w emulsions containing hydroalcoholic extract of *Neoglaziovia variegata* (Bromeliaceae). *The Scientific World*, v. 2017, Article ID 5019458, p. 1-8, 2017.

OLIVEIRA-JÚNIOR, R.G.; FERRAZ, C.A.A.; SOUZA, G.R.; GUIMARÃES, A.L.; OLIVEIRA, A.P.; LIMA-SARAIVA, S.R.G.; ROLIM, L.A.; ROLIM-NETO, P.J.; ALMEIDA, J.R.G.S. Phytochemical analysis and evaluation of antioxidant and photoprotective activities of extracts from flowers of *Bromelia laciniosa* (Bromeliaceae). *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, v. 31, n. 3, p. 600–605, 2017.

OMS – ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. *Não há tempo a perder: acautelar o futuro contra infecções resistentes aos medicamentos*. Relatório para o secretário geral das Nações Unidas, abril 2019. Disponível em: <https://www.who.int/antimicrobial-resistance/interagency-coordination-group/IACG_final_summary_PT.pdf?ua=1>. Acesso em 26 de julho de 2019.

PAHISSA, A. *Infecciones producidas por Staphylococcus aureus*. 1ª Ed. .Barcelona: ICG Marge, SL, 2009. 183p.

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

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; VYVYAN, J. R. *Introdução à espectroscopia*. 1ª Ed. Editora Cengage Learning. 2010, p. 716.

- PEIXOTO-SOBRINHO, T. J. S. Otimização de Metodologia Analítica para o Doseamento de Flavonoides de *Bauhinia cheilanta* (Bongard) Steudel. *Química Nova*, v. 33, n. 2, p. 288-291, 2010.
- PETTIT, G.R.; MENG, Y.; STEVENSON, C.A.; DOUBEK, D.L.; KNIGHT, J.C.; CICHACZ, Z.; PETTIT, R.K.; CHAPUIS, J.C.; SCHIMIDT, J.M. Isolation and structure of palstatin from the amazon tree *Hymenaea palustris*. *Journal of Natural Products*, v. 66, n. 2, p. 259-262, 2003.
- PFALLER, M.R. *Microbiologia médica*. 7ª Edição. Rio de Janeiro: Elsevier, 2014. 605 p.
- PIETTA, Pier G. Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products*, v. 63, n. 7, p. 1035-1042. 2000.
- POLONINI, H.C.; LIMA, L.L.; GONCALVES, K.M.; CARMO, A.M.; SILVA, A.D.; RAPOSO, N.R. Photoprotective activity of resveratrol analogues. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 21, p. 964-968, 2013.
- POLONINI, H.C.; RAPOSO, N.R.; BRANDÃO, M.A.F. Natural sunscreens for primary prevention of skin cancer. *Revista de Atenção Primária à Saúde*, v. 14, n. 2, p. 216-223, 2011.
- PRIETO, P.; PINEDA, M.; AGUILAR, M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: Specific application to the determination of vitamin E. *Analytical Biochemistry*, v. 269, p. 337-341, 1999.
- PSOTOVA, J.; SVOBODOVA, A.; KOLAROVA, H.; WALTEROVA, D. Photoprotective properties of *Prunella vulgaris* and rosmarinic acid on human keratinocytes. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, v. 84, p. 167-174, 2006.
- PUBCHEM*: Open Chemistry Database. Disponível em: < <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>>. Acesso em 13/11/2018.
- RAVICHANDRAN, R.; RAJENDRAN, M.; DEVAPIRIAM, D. Antioxidant study of quercetin and their metal complex and determination of stability constant by spectrophotometry method. *Food Chemistry*, v. 146, 472-478, 2014.
- REGINATTO, F.H. Introdução à análise fitoquímica. In: SIMÕES, C.M.O. [et al.] (Org.). *Farmacognosia: do produto natural ao medicamento*. Porto Alegre: Artmed, 2017.
- REZENDE, F.M.; ROSADO, D.; MOREIRA, F.A.; CARVALHO, W.R.S. Vias de síntese de metabólitos secundários em plantas. In: PEÑA, M.H. [et al.] (Org.). *VI Botânica no Inverno 2016*. 1ª Ed. São Paulo: Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, 2016. p. 93-104.

RIBEIRO, C. **Fotoproteção e fotoprotetores. Cosmetologia aplicada à Dermoestética.** São Paulo: Pharmabooks, 2006.

ROBY, M.H.H., SARHAN, M.A., SELIM, K.A.H. AND KHALEL, I.K. Evaluation of antioxidant activity, total phenols and phenolic compounds in Thyme (*Thymus vulgaris* L.), Sage (*Salvia officinalis* L.), and Marjoram (*Origanum majorana* L.) extracts. *Industrial Crops and Products*, v. 43, p. 827-831, 2013.

RODRIGUES, M.V.N.; REHDER, V.L.G.; SARTORATTO, A.; BOAVENTURA-JÚNIOR, S.; SANTOS, A.S. O emprego de técnicas hifenadas no estudo de plantas medicinais. *Revista Multiciência*, v. 7, p. 1-14, 2006.

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

SARGENT, E.V.; TRAVERS, J.B. Examining the differences in current regulatory processes for sunscreens and proposed safety assessment paradigm. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, v. 79, p. 125-141, 2016.

SEERAM, N. P.; NAIR, M. G. Inhibition of lipid peroxidation and structure–activity related studies of the dietary constituents anthocyanins, anthocyanidins, and catechins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 50, p. 5308–5312, 2002.

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

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

SILVA, S.; NEGRI, M.; HENRIQUES, M.; OLIVEIRA, R.; WILLIAMS, D.W.; AZEREDO, J. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. *FEMS Microbiology Review*, v. 36, p. 288-305, 2012b.

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

SILVA, M.F.S. *Estudo químico e avaliação da atividade antibacteriana de Pityrocarpa miniliformis (Benth) Luckon & R.W. Jobson (Fabaceae).* 2013. 148 f. Dissertação (Mestrado em Recursos Naturais do Semiárido) - Universidade Federal do Vale do São Francisco, Petrolina.

SILVA, R.V. Extrato dos frutos de *Spondias purpurea* L. como princípio ativo para formulação fitocosmética fotoprotetora. 2015. 81 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana.

SILVA, J.B.P. Avaliação do potencial antimicrobiano de extratos de própolis e do óleo essencial de *Melaleuca leucadendron* (L.) e proposição de um mecanismo de ação. Dissertação – Mestrado em Biotecnologia, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2018. 78 p.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P. A pesquisa e a produção brasileira de medicamentos a partir de plantas medicinais: a necessária interação da indústria com a academia. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.12, n.1, p.35-40, 2002.

SIQUEIRA CÉSAR, F.C.; CARNEVALE NETO, F.; PORTO, G.S.; CAMPOS, P.M. Patent analysis: a look at the innovative nature of plant-based cosmetics. *Química Nova*, v. 40, n. 7, pp. 840–847, 2017.

SOUZA, A.A.; LAVERDE-JÚNIOR, A. Aplicação da espectroscopia de ressonância magnética nuclear para estudos de difusão molecular em líquidos: a técnica DOSY. *Química Nova*, v. 25, n. 6, p. 1022-1026, 2002.

SOUZA, A. C. M.; SILVA, M. R. R. *Potencial antifúngico de extratos de Hymenaea martiana*. 2008. 99 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Tropical), Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás, Goiânia.

SOUZA, C. *Desenvolvimento e avaliação da eficácia clínica de fotoprotetores com ação em toda a região do espectro solar*. 2016. 147 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

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

SPAGOLLA, L.C.; SANTOS, M.M.; PASSOS, L.M.L.; AGUIAR, C.L. Extração alcoólica de fenólicos e flavonóides totais de Mirtilo “Rabbiteye” (*Vaccinium ashei*) e sua atividade antioxidante. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, v. 30, p. 59-64, 2009.

STEVANATO, R.; BERTELLE, M.; FABRIS, S. Photoprotective characteristics of natural antioxidant polyphenols. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, v. 69, p. 71-77, 2014.

STIEFEL, C.; SCHWACK, W. Photoprotection in changing times - UV filter efficacy and safety, sensitization process and regulatory aspects. *International Journal of Cosmetic Sciences*, v. 37, p. 2-30, 2015.

SURMAN, L.L.; BARBOSA, L.M.Q.; SIQUEIRA, S.D.V.S.; SILVA, K.G.H.; OLIVEIRA, A.G.; EGITO, E.S.T. Potencialidades de Veículos Microemulsionados para Fotoprotetores Físicos. *Latin American Journal of Pharmacy*, v. 28, n. 1, p. 133-140, 2009.

SVODODOVÁ, A.; PSOTOVÁ, J.; WALTEROVÁ, D. Natural phenolics in the prevention of UV-induced skin damage: a review. *Biomedical Papers*, v. 147, n. 2, p. 137-145, 2003.

TARALLO, V.; LEPORE, L.; MARCELLINI, M. PIAZ, D.F.; TUDISCO, L.; PONTICELLI, S.; LUND, F.W.; ROEPSTORFF, P.; ORLANDI, A.; PISANO, C.; TOMMASI, N.; FALCO, S. The biflavonoid amentoflavone inhibits neovascularization preventing the activity of proangiogenic vascular endothelial growth factors. *Journal of Biological Chemistry*, v. 286, n. 22, p. 19641-19651, 2011.

TIWARI, P.; KUMAR, B.; KAUR, M.; KAUR, G.; KAUR, H. Phytochemical screening and extraction: a review. *International Pharmaceutica Scientia*, v. 1, n. 1, p. 98-106, 2011.

TROVÃO, D.M.B.M.; FERNANDES, P.D.; ANDRADE, L.A.; DANTAS-NETO, J. Variações sazonais de aspectos fisiológicos de espécies da Caatinga. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, v. 11, n. 3, p. 307-311, 2007.

UCHÔA, A.D.A.; OLIVEIRA, W.F.; PEREIRA, A.P.C.; SILVA, A.G.; CORDEIRO, B.M.P.C.; MALAFAIA, C.B.; ALMEIDA, C.M.A.; SILVA, N.H.; ALBUQUERQUE, J.F.C.; SILVA, M.V.; CORREIA, M.T.S. Antioxidant activity and phytochemical profile of *Spondias tuberosa* Arruda leaf extracts. *American Journal of Plant Sciences*, v. 6, p. 3038-3044, 2015.

VÁSQUEZ, G., FERNÁNDEZ-AGULLÓ, A., GÓMEZ-CASTRO, C., FREIRE, M.S., ANTORRENA, G., GONZÁLEZ-ÁLVAREZ, J. Response surface optimization of antioxidants extraction from chestnut (*Castanea sativa*) Bur. *Industrial Crops and Products*, v. 35, p. 126–134, 2012.

VELASCO, M.V.R.; BALOGH, T.S.; PEDRIALI, C.A.; SARRUF, F.D.; PINTO, C.A.S.O.; KANEKO, T.M.; BABY, A.R. Associação da rutina com p-metoxicinamato de octila e benzofenona-3: avaliação in vitro da eficácia fotoprotetora por espectrofotometria de refletância. *Latin American Journal of Pharmacy*, v. 27, p. 23-27, 2008.

VICENTINI, F.T.M.C.; HE, T.; SHAO, Y.; FONSECA, M.J.V.; VERRI-JR, W.A.; FISHER, G.J.; XU, Y. Quercetin inhibits UV irradiation-induced inflammatory cytokine production in primary human keratinocytes by suppressing NF- κ B pathway. *Journal of Dermatological Sciences*, v. 61, p. 162-168, 2011.

VIOLANTE, I.M.P.; SOUZA, I.M.; VENTURINI, C.L.; RAMALHO, A.F.S.; SANTOS, R.A.N.; FERRARI, M. Avaliação in vitro da atividade fotoprotetora de extratos vegetais do cerrado de Mato Grosso. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 19, n. 2A, p. 452-457, 2009.

VIZZOTO, M.; KROLOW, A.C.; WEBER, G.E.B. *Metabólitos secundários encontrados em plantas e sua importância*. 1ª Ed. Pelotas: EMBRAPA Clima Temperado, 2010. 16 p.

VONGSAK, B.; MANGMOOL, S.; GRITSANAPAN, W. Antioxidant activity and induction of mRNA expressions of antioxidant enzymes in HEK-293 cells of *Moringa oleifera* leaf extract. *Planta Medica*, v. 81, p. 1084-1089, 2015.

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

WANG, M. et al. Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Product Social Molecular Networking. *Nature Biotechnology*, v. 34, n. 8, p. 828-837, 2016.

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

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

WU, Y.; MATSUI, M.S.; CHEN, J.Z.; JIN, X.; SHU, C.M.; JUN, G.Y.; DONG, G.H.; WANG, Y.K.; GAO, X.H.; CHEN, H.D.; LI, Y.H. Antioxidants add protection to a broad-spectrum sunscreen. *Clinical and Experimental Dermatology*, v. 36, p. 178-187, 2011.

XIE, Y.; YANG, W.; TANG, F.; CHEN, X.; REN, L. Antibacterial activities of flavonoids: Structure-activity relationship and mechanism. *Current Medicinal Chemistry*, v. 22, n. 1, p. 132-149, 2015.

XUEYAN, R.; JIA, Y.; XUEFENG, Y.; LIDAN, T.; QINGJUN, K. Isolation and purification of five phenolic compounds from Xinjiang wive grape (*Vitis vinifera*) and determination of their antioxidant mechanism at cellular level. *European Food Research Technology*, v. 244, p. 1569-1579, 2018.

YU, D.; DUAN, Y.; BAO, Y.; WEI, C.; AN, L. Isoflavonoids from *Astragalus mongholicus* protect PC12 cells from toxicity induced by L-glutamate. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 98, p. 89-94, 2005.

ZANTAR, S.; HAOUZI, R.; CHABBI, M.; LAGLAOUI, A.; MOUHIB, M.; BOUJNAH, M.; BAKKALI, M.; ZERROUK, M.H. Effect of gamma irradiation on chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of *Thymus vulgaris* and *Mentha pulegium* essential oils. *Radiation Physics and Chemistry*, v. 115, p. 6-11, 2015.

ZHANG, Q.F.; ZHANG, Z.R.; CHEUNG, H.Y. Antioxidant activity of rhizoma *Smilacis glabrae* extracts and its key constituent-astilbin. *Food Chemistry*, v. 115, p. 297–303, 2009.

ZHANG, A.; SUN, H.; WANG, P.; HAN, Y.; WANG, X. Modern analytical techniques in metabolomics analysis. *Analyst*, v. 137, n. 2, p. 293-300, 2012.

ZHU, L.; CHEN, J.; TAN, J.; LIU, X.; WANG, B. Flavonoids from *Agrimonia pilosa* Ledeb: Free radical scavenging and DNA oxidative damage protection activities and analysis of bioactivity-structure relationship based on molecular and electronic structures. *Molecules*, v. 22, 195, p. 1-11, 2017.

ANEXOS

ANEXO I - Artigo submetido à revista *Phytochemical Analysis* – Fator de Impacto 2.337**HPLC-DAD and NMR characterization of isomers of dihydroflavonoids from the barks of *Hymenaea martiana* Hayne (Fabaceae)****Short title: Isolation and characterization of dihydroflavonoids from *H. martiana***

Fernanda Granja da Silva Oliveira ^a; Ana Paula Sant'Anna da Silva ^b; Bruno de Oliveira Veras ^b; Joelma Pessoa Gonçalves ^b; Amanda Dias de Araújo ^b; Alexandre Gomes da Silva ^b; Elisabete Regina Fernandes Ramos Ribeiro ^b; Tayane de Cássia Dias Mendes Silva ^b; Daniel Rodrigo Cavalcante de Araújo ^c; Wolfgang Harand ^c; Hortênsia Barbosa Pinto ^d; Sarah Raquel Gomes de Lima-Saraiva ^e; Ana Paula de Oliveira ^e; Lívia Macedo Dutra ^e; Vera Lúcia de Menezes Lima ^b; Márcia Vanusa da Silva ^b; Larissa Araújo Rolim ^f; Jackson Roberto Guedes da Silva Almeida ^{e*}

^a Post-graduation on Biotechnology, State University of Feira de Santana, 44036-900, Feira de Santana, Bahia, Brazil.

^b Department of Biochemistry, Federal University of Pernambuco, 50670-901, Recife, Pernambuco, Brazil.

^c National Institute of Semiarid/ Ministry of Science, Technology and Innovation (INSA/MCTI), 58434-700, Campina Grande, Paraíba, Brazil.

^d Federal Institute of Education, Science and Technology of Sertão Pernambucano, 56302-320, Petrolina, Pernambuco, Brazil.

^e Center for Studies and Research of Medicinal Plants, Federal University of San Francisco Valley, 56304-917, Petrolina, Pernambuco, Brazil. E-mail: jackson.guedes@univasf.edu.br

^f Analytical Center of Drugs, Medicine and Food, Federal University of São Francisco Valley, 56304-917, Petrolina, Pernambuco, Brazil.

Short Abstract

Aiming to develop a phytochemical study and *in vitro* activities of the barks of *Hymenaea martiana*, this study submitted the ethyl acetate fraction of the crude extract to a HPLC-DAD profiling, showing three dihydroflavonols as the major compounds. The subfractions obtained by chromatographic separation presented important activities *in vitro*, and **neostilbin (1)**, **astilbin (2)** and **isoastilbin (3)** were identified by NMR. This study reports two isomers of astilbin for the first time in *H. martiana*, demonstrating the bioactive potential of this species.

Funding information

None.

Abstract

Introduction

Hymenaea martiana, known as "jatobá", traditionally used in tropical medicine for the treatment of inflammation and rheumatism.

Objective

The aim of the study was to develop a phytochemical study and *in vitro* activities of the barks of *H. martiana*, including the isolation and characterization of the main flavonoids.

Methodology

The crude extract from the barks of *H. martiana* was fractionated and total phenolic compounds, total flavonoids were determined. The HPLC-DAD profiling was developed and the ethyl acetate fraction was submitted to adsorption column chromatography (CC). The subfractions obtained were evaluated for antioxidant and photoprotective *in vitro* activity, as well as analyzed by NMR spectroscopy.

Results

The crude extract presented a significant amount of phenolic compounds and flavonoids, and the ethyl acetate fraction showed the highest content of these compounds. In the HPLC-DAD method, three bioactive flavonoids were identified as dihydroflavonols, with important activities related in the literature. The group of fractions obtained by chromatographic separation showed important *in vitro* activities. After the analysis of the NMR data and comparison with data previously reported in the literature, the substances were identified as isomers of astilbin (2*R*,3*R*)-taxifolin-3-O- α -L-rhamnoside.

Conclusions

The results show the phytochemical characteristics of *H. martiana*. The HPLC-DAD analysis and NMR data could identify the major compounds of the extract as important bioactive flavonoids, as astilbin and two isomers, these last being reported for the first time in *H. martiana*, demonstrating the bioactive potential of this species.

Keywords: Flavonoids; Antioxidant activity; Sun Protection Factor; *Hymenaea martiana*; HPLC-DAD, NMR spectroscopy.

INTRODUCTION

The use of medicinal plants is present throughout the history of mankind, not only for food use, but also for ritualistic and therapeutic use. Medicinal plants have been the main therapeutic resource available, but technological advances have brought synthetic drugs for the treatment of diseases. Currently, society has been valuing the use of natural products with therapeutic properties, probably due to the search for healthy habits, as well as problems with the efficient treatment of certain diseases¹.

Some researchers suggest that about two thirds of the plant species have medicinal value, and the antioxidant potential has great relevance, since they can reduce the oxidative stress in the cells, besides being useful in the treatment of diverse diseases, as cardiovascular problems, inflammatory processes and until cancer².

Thus, flavonoids stand out among the main classes of natural products and are characterized as polyphenols, and are composed of a benzopyran or chroman nucleus, attached to an aromatic ring, forming the fundamental nucleus "phenyl benzopyran". These compounds are responsible for pharmacological activities, such as antioxidant, antimicrobial, and photoprotective activities²⁻³.

Among the medicinal plants found in Caatinga phytogeographical domain, *Hymenaea martiana* can be highlighted, a tree native to the Northeast region, popularly known as "jatobá". The barks, leaves and fruits of this species are used in traditional medicine for the treatment of anemia and gastritis, prepared as alcoholic extract and tea from the barks. This species is also used for inflammations and rheumatism⁵.

Studies demonstrate the chemical composition of *H. martiana*, with the presence of some flavonoids, such as astilbin, eucrifin, engelitin, taxifolin and phenolic compounds. These flavonoids are being related to the pharmacological activities^{2,6,7}. Despite some flavonoids were already isolated from this species, some isomers were not purified yet, and some *in vitro* activities of these flavonoids were not investigated.

Then, probably based on the chemical composition of *H. martiana* described in the literature, this species could present antioxidant, antimicrobial and photoprotective activity, and the flavonoids could justify these activities. The correlation between the phenolic compound content and the antioxidant activity could also emphasize the medicinal and pharmaceutical potential of this species.

In this context, the aim of the study was to develop a phytochemical study and *in vitro* activities of the barks of *H. martiana*, including the isolation and characterization of the main flavonoids.

MATERIALS AND METHODS

Plant material

The barks of *H. martiana* were collected in the city of Petrolina, Pernambuco, Brazil, in July 2015, and were identified by the Federal University of São Francisco Valley Herbarium (HVASF), in the Federal University of São Francisco Valley, with voucher specimen n° 6444, coordinates 09°11'04.30" S, 040°18'05.40" W, 357 m high. The barks were dried at 40°C for 72 h in air circulation oven (ETHIKTECHNO®, Model TD 420), and pulverized using a mill (QUIMIS®).

Extract preparation

For the preparation of the crude extract, 300 g of the barks were submitted to extraction in the National Institute of Semiarid (INSA, Campina Grande, Paraíba, Brazil), using the Accelerated Solvent Extraction (ASE) Thermo Scientific Dionex® ASE 350, equipped with a stainless steel cell extractor hermetic sealed. For this, the vegetable powder had its granulometry homogenized using sieves of mesh 14 and 35, then this material together with diatomaceous earth (2:1) was distributed in 15 extracellular cells of 100 mL with capacity for 20 g of vegetal material each. The extraction occurred with 99.5% ethanol, with a temperature of 40°C, for 15 minutes, flow of 5 mL/min and average pressure of 1500 psi., with two extractions per cell.

After the extraction process, the solvent extraction was concentrated in a Thermo Scientific Rocket Evaporator at 40°C. The residual solvent was eliminated in an oven (Ethiktechno®) at 45°C for 24 hours, obtaining 67 g of the crude ethanolic extract.

The crude ethanolic extract (10 g) was solubilized in a mixture of methanol and water (3:7 v/v), which was submitted to a liquid-liquid partition in a separation flask, with manual shake, extensively, with hexane, chloroform and ethyl acetate. After this process, the solutions were concentrated for solvent evaporation under vacuum at 50°C, obtaining the 1.24 g of the hexane fraction, 0.18 g of the chloroform fraction, and 7.90 g of the ethyl acetate fraction.

Determination of total phenolic compounds

The total phenolic compounds content was measured by Folin-Ciocalteu method⁸. The 200 µL of diluted extract and fractions (1 mg/mL) were added to 1 mL of 1:10 diluted Folin-Ciocalteu reagent. After 4 min, 0.8 mL of saturated sodium carbonate solution (75 g/L). After 120 minutes of incubation at room temperature, protected from light, absorbance was measured at 765 nm. Gallic acid (50 - 500 µg/L) was used for calibration of standard curve ($R^2 = 0.9923$). The results were expressed as milligram of gallic acid equivalent (mg GAE)/g of dry weight of plant extract. All assays were developed in triplicate.

Determination of total flavonoids

The total flavonoid content was measured for the samples with significant values for the total phenolic compounds, by the colorimetric method by the metallic complexation⁹. A standard solution and the extract and fractions solutions (1 mg/mL) in ethanol 99% were prepared, and 0.2 mL of aluminum chloride 2.5% alcoholic solution and 3.80 mL of ethanol. The solutions could stand at room temperature for 30 minutes. The absorbance of each solution was obtained at 408 nm in a spectrophotometer (Quimis®) against the blank (all solvents except the sample). The total flavonoids

were expressed as mg of equivalents of catechin per gram of sample (mg EC/g), using a standard curve with catechin as reference (2.5 – 20 µg/mL, $R^2 = 0.9987$). All assays were carried out in triplicate.

Antioxidant *in vitro* activity

Determination of Total Antioxidant Capacity (TAC). Total Antioxidant Capacity was determined by phosphomolybdenum method¹⁰. A volume of 0.1 mL of fraction solutions (1 mg/mL) were added to 1 mL of reagent solution (sulfuric acid 600 mM, sodium phosphate 28 mM and ammonium molybdate 4 mM). The tubes were incubated at 95°C for 90 min, and then the absorbance was measured at 695 nm against the blank. Ascorbic acid was used as reference and the Total Antioxidant Capacity was expressed as equivalent of ascorbic acid. The TAC (%) was calculated using the following formula: $TAC (\%) = [(absorbance\ of\ the\ sample - absorbance\ of\ the\ blank) / (absorbance\ of\ ascorbic\ acid - absorbance\ of\ the\ blank) \times 100]$. All assays were carried out in triplicate.

Inhibition of 2,2-Azino-Bis-(3 Ethylbenzothiazoline)-6-Sulfonic Acid (ABTS⁺) radical. The inhibition of ABTS⁺ radical (Sigma[®]) of the samples was developed according to method previously described¹¹. The ABTS⁺ solution 7mM was prepared adding potassium persulfate 140 mM and the mixture was allowed to stand protected from light at room temperature for 12 – 16 hours (time required for radical formation) before its use. The ABTS⁺ solution was standardized with the dilution with ethanol to an absorbance of 0.7 (± 0.02) at 732 nm. The absorbance of the samples was measured using 30 µL of the sample solutions (1 mg/mL), added to 3 mL of the standardized ABTS⁺ solution 7 mM, in different periods of time (6, 15, 30, 45, 60 and 120 min) at 734 nm. The inhibition of the oxidation was calculated and plotted as a function of reference antioxidant concentration (Trolox) and expressed as Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC, µM).

DPPH free radical scavenging assay. The free radical scavenging activity was measured using the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazil (DPPH) assay¹², with adaptations. A DPPH stock solution was prepared (20 mg/mL) with methanol. Sample solutions were diluted in methanol to final concentrations of 0.31, 0.62, 0.12, 0.25, 0.5, and 1 mg/mL. Standard solution was prepared with ascorbic acid (1 mg/mL) as positive control and negative control was prepared with 40µL of methanolic diluted with 250µL of DPPH solution. Methanol (200 µL) plus plant extracts solutions (200 µL) were used as a blank. Then, 250µL of DPPH solution was added to 40µL of each sample solution. The absorbance each sample was measured at 517 nm with the aid of an ELX 800 universal reader (Biotek Instruments, Inc., Winooski, USA), 25 minutes after the addition of DPPH solution to the sample solutions. The Antioxidant Activity (AA) was calculated using the following formula: $AA\% = [(absorbance\ of\ the\ control - absorbance\ of\ the\ sample) / absorbance\ of\ the\ control] \times 100$. All assays were carried out in triplicate.

Antimicrobial activity

The crude extract and the ethyl acetate fraction were tested against the following microorganisms: *Staphylococcus aureus* (ATCC - UFPEDA 02; ATCC - UFPEDA 4212; Clinically isolated - UFPEDA 705; Clinically isolated - UFPEDA 659); *Enterococcus faecalis* (UFPEDA 138); *Klebsiella pneumoniae* (UFPEDA 396); *Candida albicans* (UFPEDA 1007); *C. tropicalis* (UFPEDA 1011) e *C. krusei* (UFPEDA 1002). The strains were obtained from the Department of Antibiotics (Federal University of Pernambuco, Brazil).

Values for Minimal Inhibitory Concentration (MIC) for the bacteria were determined by the microdilution method¹³. Measures were developed in microplates reader at 600 nm, before and after incubation at 37°C for 24 hours.

MIC values for yeasts were determined by the microdilution method¹⁴. Measures were developed in microplates reader at 492 nm, before and after incubation at 35°C for 48 hours. Tested

sample concentrations against the different species and microorganism's lineages ranged from 0.09 to 5.0 mg/mL.

Minimal Bactericidal Concentration (MBC) were determined, according to the MIC's values. From the wells of MIC, 5 μ L were transferred to plates with Mueller Hington Agar and incubated at 37°C for 24 hours. The MBC were referred as the minimal sample concentration with non-viable bacteria.

The Minimal Fungicidal Concentration was determined, according to the MICs values. From the wells of MIC, 5 μ L were transferred to plates with Sabouraud Dextrose Agar and incubated at 35°C for 24 hours. The MFC were referred as the minimal sample concentration with non-viable yeasts.

Sun Protection Factor (SPF) *in vitro* Determination

The photoprotective activity was evaluated by spectrophotometric method of diluted solutions¹⁵. Samples were dried in oven at 40°C for 60 minutes, and then dilutions were prepared (5, 25, 50 e 100 mg/L). A spectrophotometer (Quimis[®]) was used, with quartz cuvettes with 1 cm optical path for the acquisition of the spectra. Calculations of the Sun Protection Factor (SPF) were made considering the intervals λ determined using the following formula: $SPF = \text{Correction Factor} \times \text{Amount of absorbance } 290\text{-}320 \text{ nm} \times \text{Erythemogenic Effect of radiation } (\lambda) \times \text{Spectrophotometric reading of sample absorbance } (\lambda)$.

HPLC-DAD chromatographic fingerprint of the ethyl acetate fraction

A HPLC-DAD fingerprint of the ethyl acetate fraction was developed. A sample solution was prepared at the concentration of 5 mg/mL, with a step of ultrasound-assisted solubilization. The chromatograph profile was developed in an Agilent 1260 Infinity equipment, with a quaternary pump

and degasser (G1311D), automatic injector (G1329B), column oven (G1316A), and DAD detector (G4212B). The column used was a Zorbax[®] (Agilent), SB-C18 5 μ m; 4.6 x 250mm with pre-column Zorbax[®] (Agilent) SB-C18 5 μ m and 4.6 x 12.5mm. The mobile phase was composed by water (A) and acetonitrile (B) (LiChrosolv[®], Merck), in a flow rate of 2.4 mL/min and linear gradient as follows: 92% (A) - 65% (A) (0-15min). The column temperature was 30°C, detection in full scan at 190-400nm. Integration: Chromatogram 256 nm; Threshold 4e + 006 (0-15min); Width 0.2 (0 - 15 min) (for reproducibility of analyzes).

Isolation, purification and structural identification of flavonoids of the ethyl acetate fraction

To isolate the flavonoids from the ethyl acetate fraction, an adsorption column chromatography (CC) was used, consisting of a vertical glass column, 42 cm long, 2.5 cm in diameter. The process was developed at room temperature under atmospheric pressure, and 420 mg of the sample, previously solubilized with methanol, was inserted and eluted with the mobile phase (100% methanol). Twenty-seven fractions were obtained, which were evaluated and pooled according to analytical thin-layer chromatography (TLC) analysis, yielding 6 distinct groups of fractions (GF1-GF6).

These fractions were evaluated for photoprotective and antioxidant activities, and analyzed by NMR. 1D (¹H and ¹³C{¹H}) and 2D (¹H-¹H COSY, ¹H-¹³C HSQC and ¹H-¹³C HMBC) NMR data were acquired at 296 K in DMSO-d₆ on a Bruker™ ASCEND III 400 NMR operating at 9.4 T, observing ¹H and ¹³C at 400 and 100 MHz, respectively. The NMR spectrometer was equipped with a 5-mm multinuclear direct detection probe (BBO probe) with z-gradient. One-bond (HSQC) and long-range (HMBC) ¹H-¹³C NMR correlation experiments were optimized for average coupling constant ¹J_(C,H) and ^{LR}J_(C,H) of 140 and 8 Hz, respectively. All ¹H and ¹³C NMR chemical shifts (δ) are given in ppm related to the TMS signal at 0.00 ppm as an internal reference, and the coupling constants (*J*) in Hz.

Statistical analysis

All determinations were performed in triplicate and the results are shown as mean \pm standard deviation. Values were considered significantly different when $p < 0.05$. For the correlation analysis, the software GraphPad Prism[®] 5.0 and Microsoft Excel[®] 2017 were used.

RESULTS AND DISCUSSION

Determination of total phenolic compounds and total flavonoids

The content of total phenolic compounds and total flavonoids of the crude ethanolic extract and fractions obtained with the barks of *Hymenaea martiana* are presented in Table 1.

Table 1

According to the data obtained, the highest content of phenolic compounds was found in the crude extract, followed by ethyl acetate fraction, and these values correspond to that found in another study with the bark of this species, but at lower values¹⁶. This may be justified by the extraction method used, and the volumes and dilutions used in the methods for the determination of phenolic compounds used. The polarity and solubility of the solvent used in this fraction may also justify the higher concentration of phenolic compounds from the crude ethanolic extract^{2,16}.

The total flavonoid content in crude ethanolic extract and ethyl acetate fraction demonstrates that these are the major compounds of these samples, and can be strong candidates for the chemical markers of the species. In the hexane and chloroform fractions, no total flavonoid content was detected. Therefore, ethyl acetate fraction is the sample that best represents the compounds of the crude extract, with the highest yield (7.90 g) and the highest content of total flavonoids (Table 1).

This fraction was then chosen for a more in-depth phytochemical study, for the *in vitro* activities and the flavonoid isolation.

Antimicrobial activity

The antibacterial activity of the crude extract and ethyl acetate fraction was evaluated and the results are presented in Table 2. The data show that the crude extract inhibited the growth of three strains of *Staphylococcus aureus*, being a strain clinically isolated. The crude extract and the ethyl acetate fraction also showed a bactericidal action against one of the strains of *Staphylococcus aureus*, a bacterial species that, despite being part of the normal microbiota of the skin, can be a cause of pathologies and represents great importance in hospital infections and food. The pathologies caused by this bacterium can occur from a simple skin infection (acne, furunculosis and cellulitis), to infections of greater severity (pneumonia, endocarditis, septicemia, meningitis, etc.). This species can still cause local injury if the natural skin barriers are compromised by trauma or surgical procedures¹⁷.

Table 2

The fungicidal activity of crude extract and ethyl acetate fraction is also presented in Table 3. This activity was tested previously against some yeasts, and the crude extracts and hydroalcoholic fractions of *H. martiana* showed a high activity against *Cryptococcus neoformans*, the methanolic and butanoic fractions were the most active against *Trichopyton rubrum*, *Trichopyton mentagrophytes* and *Microsporum canis*¹. Complementing these previous studies found in the literature, in this study the crude extract and fraction showed inhibitory activity for the species *Candida tropicalis* and *Candida krusei*, and the analyzed samples presented fungicidal activity for species *C. tropicalis*. None of the samples showed inhibitory activity or fungicidal activity against *Candida albicans*, the main species that causes candidiasis. However, *Candida* non-*C. albicans* species (referred to in the NCAC literature as "non-*C. albicans* Candida"), such as *Candida glabrata*

and *Candida tropicalis* are often identified as pathogens in humans. The increase in the occurrence of these pathogens has been related to the improvement in the methods of identification and drug resistance used¹⁸.

Regarding antibacterial drugs, the development of new antifungal drugs has been limited, probably this attributed to the difficulty in the identification of effective agents against the fungal cells without presenting toxic effects for the normal cells of the host¹⁸. Thus, the fungicidal activity of the samples analyzed in this study emphasizes the importance of the species as an alternative source for the development of new drugs.

HPLC-DAD fingerprint of the ethyl acetate fraction

The chromatographic fingerprint obtained from the ethyl acetate fraction is shown in Figure 1. Three compounds can be observed at retention time (Rt) of 9.9, 10.2 and 11.1 minutes, respectively. The relative intensity of the three peaks shown in the 3D chromatogram (Figure 1-B) confirms that these compounds are the major detectable compounds.

Figure 1

The DAD-UV spectrum of these compounds are shown in Figure 2. These substances present the typical UV spectrum for flavonoids, which is characterized by two peaks of maximum absorbance, one between 240-280 nm and another at 280-550 nm¹⁹. The peak 1 showed maximum absorbances at 234 and 288 nm, the peak 2 at 236 and 288 nm, and the peak 3 at 232 and 294 nm. These UV bands can suggest these substances are dihydroflavonols derivatives, like astilbin, a compound previously found in *H. martiana* that shows maximum absorbance in 290 nm²⁰. This flavonoid was found to be the major constituent of the ethyl acetate extract of this species, and other flavonoids were identified: taxifolin, engelitin and eucryphin^{6,7}.

Figure 2

Similar fingerprints were found with the HPLC-DAD analysis of the hydroalcoholic and ethanolic extract of *Hymenaea stigonocarpa*. These extracts were compared to the hydroalcoholic extract added to astilbin standard, and it was possible to identify the peak 2 as this flavonol, and the other peaks as astilbin derivatives²¹. Another study that aimed the qualitative analysis by HPLC-DAD of the phenolic compounds in the ethanolic extract of *H. martiana*, presented four peaks with DAD spectra characteristic of flavonoids with maximum absorbance around 290 nm², in a similar way to that found in the ethanolic extract of *H. stigonocarpa*²¹ and in the present study (Figure 1).

The DAD spectra presented in Figure 2 show the similarity between the substances. For this reason, aiming at the isolation and structural identification of these major compounds of *H. martiana* ethanolic extract, the ethyl acetate fraction was submitted to the chromatographic column separation. It was used Sephadex as stationary phase, because the compounds presented in the chromatogram showed similar polarity, maximum absorbances and retention time to each other. This can be due the fact that the analysis was developed in reverse phase and the four major peaks were detected within 15 minutes of analysis, so it is evident that the compounds have a high polarity. So, the separation strategy should contemplate other differences between the molecules rather than polarity, and for this reason, the molecular exclusion was chosen.

Isolation, purification and structural identification / elucidation of flavonoids of the ethyl acetate fraction

The groups of fractions obtained by chromatographic separation of the ethyl acetate fraction in column chromatography with Sephadex LH20[®] were evaluated for antioxidant and photoprotective activity, and the results obtained are presented in Table 3. The data obtained show the high sequestering activity of the DPPH radical, with the highest results for GF2, GF3 and GF4. For the ABTS⁺ radical inhibition assay, only GF1 did not present significant values, while the GF4, GF5 and

GF6 inhibited 100% of the radical. On the other hand, GF4, GF5 and GF6 presented the highest values of total antioxidant capacity, in addition to revealed the highest FPS values, with values ranging from 16.62 to 23.77, thus emphasizing the important antioxidant and photoprotective action of the chemical compounds that make up the ethyl acetate fraction. According to the results, GF4 and GF5 obtained better results of antioxidant and photoprotective activity.

Table 3

The NMR analysis of ethyl acetate fraction and their groups of fractions showed the presence of three compounds identified as diastereomers of astilbin (2*R*,3*R*)-2-(3,4-dihydroxyphenyl)-5,7-dihydroxy-3-[[[(2*S*,3*R*,4*R*,5*R*,6*S*)-3,4,5-trihydroxy-6-methyloxan-2-yl]oxy]-3,4-dihydro-2*H*-1-benzopyran-4-one) (Table 4). The chirality of compounds **1**, **2** and **3** was proposed by comparison of the spectral data with the literature^{22,23,24}.

Table 4

Compounds **1**, **2** and **3** showed similar ¹H and ¹³C NMR spectra, indicating three isomers (Table 4). They could be identified as dihydroflavonoids isomers, substituted in position 3 with a rhamnosyl moiety through 1D and 2D analysis and comparison with literature data²². In this way, compound **1** was as neoastilbin or (2*S*,3*S*)-taxifolin-3-O- α -L-rhamnoside^{22,23}, compound **2** as astilbin or (2*R*,3*R*)-taxifolin-3-O- α -L-rhamnoside^{22,23}, and compound **3** as isoastilbin or (2*R*,3*S*)-taxifolin-3-O- α -L-rhamnoside²⁴ (Figure 3). The main difference lies in the change in stereochemistry in the C-ring of these compounds, specifically in the chemical shift of the hydrogens located at C-2 and C-3 (Table 4). Besides of the chemical shift differences between hydrogens H-2 and H-3 these

compounds, the large coupling constant these hydrogens for neoastilbin ($J = 11.1$ Hz) and astilbin ($J = 9.9$ Hz) suggest the trans-configuration of the heterocyclic ring, while the small coupling for isoastilbin ($J = 2.7$ Hz) indicate the cis-configuration (Figure 3, Table 4). The stereochemistry of the compounds was deduced by comparison with previous report²²⁻²⁴.

These compounds were found in the GF4 and GF5 (Figure 3), and the samples showed best results for antioxidant and photoprotective activity (Table 3). This can evidence the bioactivity of the compounds identified in the NMR analysis.

Astilbin is a bioactive flavonoid, with several pharmacological activities already reported, as anti-inflammatory^{6,25,26}, anti-ischemic²⁷, for the treatment of autoimmune diseases²⁸, antinociceptive and antioxidant²⁹. Astilbin and isoastilbin were isolated from *Vitis vinifera*, and their antioxidant mechanism at cellular level was demonstrated. Interesting results were found, because, among other substances isolated, astilbin was found to have the greatest results for antioxidant activity, while isoastilbin was the weakest one²⁴.

Astilbin was previously identified as the major component of *Hymenaea martiana* and its antinociceptive and antidematogenic activities were evidenced⁷. Additionally, the hepatoprotective effect of astilbin isolated from the barks of *H. martiana* was also evaluated, and the actions presented were greater than vitamin E. Astilbin was also able to restore lipoperoxides and prostanoids from tissue to basal levels³⁰. However, no study with the identification and isolation of astilbin isomers was found in the species, evidencing the novelty of this study.

Acknowledgments

The authors thank the Brazilian agencies CAPES and FACEPE for their financial support and the collaboration of the National Semi-arid Institute (INSA - Campina Grande - PB); the Post-graduate Program in Biotechnology (PPGBiotec) of the State University of Feira de Santana (UEFS); the

Department of Biochemistry of the Federal University of Pernambuco and Research Center on Natural and Synthetic Products (NPPNS) of São Paulo University.

Conflicts of interests

The authors declare that they have no conflict of interest.

References

1. Souza ACM, Kato L, Silva CC, Cidade AF, Oliveira CMA, Silva MRR. Antimicrobial activity of *Hymenaea martiana* towards dermatophytes and *Cryptococcus neoformans*. *Mycoses* 2009; 53:500-503.
2. Almeida JRGS, Silva MEGC, Guimarães AL, Oliveira AP, Araújo CS, Siqueira-Filho JA, Fontana AP, Damasceno PKF, Branco CRC, Branco A. HPLC-DAD analysis and antioxidant activity of *Hymenaea martiana* Hayne (Fabaceae). *J Chem Pharm Res* 2012; 4:1160-1166.
3. Oliveira-Júnior RG, Araújo CS, Santana CRR, Souza GR, Lima-Saraiva SRG, Guimarães AL, Oliveira AP, Siqueira-Filho JA, Pacheco AGM, Almeida JRGS. Phytochemical screening, antioxidant and antibacterial activity of extracts from the flowers of *Neoglaziovia variegata* (Bromeliaceae). *J Chem Pharm Res* 2012; 4:4489-4494.
4. Alencar-Filho JMT, Sampaio PA, Pereira ECV, Oliveira-Júnior RG, Silva FS, Almeida JRGS, Rolim LA, Nunes XP, Araújo ECC. Flavonoids as photoprotective agents: a systematic review. *J Med Plants Res* 2016; 10:848-864.
5. Gazzaneo LRS, Lucena RFP, Albuquerque UP. Knowledge and use of medicinal plants by local specialists in a region of Atlantic Forest in the state of Pernambuco (Northeastern Brazil). *J Ethnobiol Ethnomed* 2005;1:1-9.
6. Carneiro E, Calixto JB, Delle Monache F, Yunes RA. Isolation chemical identification and pharmacological evaluation of eucryphin, astilbin and engelitin obtained from the bark of *Hymenaea martiana*. *Int J Pharmacog* 1993;31:38-46.

7. Cechinel-Filho V, Vaz ZR, Zunino L, Calixto JB, Yunes RA. (2000). Antinociceptive and anti-oedematogenic properties of astilbin, taxifolin and some related compounds. *Drug Res* 2000;50:E281-E285.
8. Li AB, Wonga CC, Ka-Wing C, Chen F. Antioxidant Properties in Vitro and Total Phenolic Contents in Methanol Extracts from Medicinal Plants. *LWT - Food Sci Technol* 2008;41:385-390.
9. Marques GS, Monteiro RPM, Leão WF, Lyra MAM, Peixoto MS, Rolim-Neto PJ, Xavier HS, Soares LAL. Avaliação de procedimentos para quantificação espectrofotométrica de flavonoides totais em folhas de *Bauhinia forficata* Link. *Quím Nova* 2012;35:517-522.
10. Prieto P, Pineda M, Aguilar M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: Specific application to the determination of vitamin E. *Anal Biochem* 1999;269:337-341.
11. Uchôa ADA, Oliveira WF, Pereira APC, Silva AG, Cordeiro BMPC, Malafaia CB, Almeida CMA, Silva NH, Albuquerque JFC, Silva MV, Correia MTS. Antioxidant activity and phytochemical profile of *Spondias tuberosa* Arruda leave extracts. *Am J Plant Sci* 2015;6:3038-3044.
12. Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. Use of Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. *Lebenson Wiss Technol* 1995;28:25-30.
13. CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically*: approved standard. 9th ed. CLSI document M07-A9. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012. 88 p.
14. CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute. *Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts*. 3th ed. CLSI document M27-A3. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008. 13 p.
15. Mansur JS, Breder MVR, Mansur MCA, Azulay RD. (1986). Determinação do fator de proteção solar por espectrofotometria. *An Bras Dermatol* 1986;61:121-124.

16. Oliveira FGS, Lima-Saraiva SRG, Oliveira AP, Rabêlo SV, Rolim LA, Almeida JRGS. Influence of the extractive method on the recovery of phenolic compounds in different parts of *Hymenaea martiana* Hayne. *Pharmacog Res* 2016;8:270-275.
17. Almeida MSC, Mendonça RL, Freitas MZC, Vandesmet LC. *Staphylococcus aureus*. *Mostra Científica Biomedicina* 2016;1:1-7.
18. Silva S, Negri M, Henriques M, Oliveira R, Williams DW, Azeredo J. (2012). *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. *FEMS Microbiol Rev* 2012;36:288-305.
19. Bobin MF, Raymond M, Martini MC. UVA/UVB absorption properties of natural products. *C & T* 1995;7:44-50.
20. PubChem. Open Chemistry Database. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>. Accessed 13 November 2018.
21. Dimech GS, Soares LAL, Ferreira MA, Oliveira AGV, Carvalho MC, Ximenes EA. Phytochemical and antibacterial investigations of the extracts and fractions from the stem bark of *Hymenaea stignocarpa* Mart. ex Hayne and effect on ultrastructure of *Staphylococcus aureus* induced by hydroalcoholic extract. *Sci. World J* 2013;2013:104-110.
22. De Britto J, Manickam VS, Gopalakrishnan S, Ushioda T, Tanaka N. Determination of aglycone chirality in dihydroflavonol 3-*O*- α -L-rhamnosides by ^1H NMR spectroscopy. *Chem Pharm Bull* 1995;43:338-339.
23. Kasai R, Hirono S, Chou WH, Tanaka S, Chen FH. Sweet dihydroflavonol rhamnoside from leaves of *Engelhardtia chrysolepsis*, a chinese folk medicine, Hung-qi. *Chem Pharm Bull* 1988;36:4167-4170.
24. Xueyan R, Jia Y, Xuefeng Y, Lidan T, Qingjun K. Isolation and purification of five phenolic compounds from Xinjiang wive grape (*Vitis vinifera*) and determination of their antioxidant mechanism at cellular level. *Eur Food Res Technol* 2018;244:1569-1579.

25. Lu CL, Zhu W, Wang M, Xu XJ, Lu CJ. Antioxidant and anti-inflammatory activities of phenolic-enriched extracts of *Smilax glabra*. *Evid Based Complement Alternat Med* 2014;2014:1-8.
26. Ding Y, Liang Y, Deng B, Qiao A, Wu K, Xiao W, Gong W. Induction of TGF- β and IL-10 production in dendritic cells using astilbin to inhibit dextran sulfate sodium-induced colitis. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 2014;446:529-534.
27. Diao H, Kang ZK, Han F, Jiang W. Astilbin protects diabetic rat heart against ischemia–reperfusion injury via blockade of HMGB1-dependent NF- κ B signaling pathway. *Food and Chem Toxicol* 2014;63:104-110.
28. Guo L, Liu W, Lu T, Guo W, Gao J, Luo Q, Wu X, Sun Y, Wu X, Shen Y, Xu Q. Decrease of functional activated T and B cells and treatment of glomerulonephritis in lupus-prone mice using a natural flavonoid astilbin. *Plos One* 2015;10(4):1-15.
29. Bakota EL, Winkler-Moser JK, Berhow MA, Palmquist DE, Liu SX. (2015). Antioxidant activity of hybrid grape pomace extracts derived from midwestern grapes in bulk oil and oil-in-water emulsions. *J Am Oil Chem Soc* 2015;92:1333-1348.
30. Closa D, Torres M, Hotter G, Bioque G, León OS, Gelpí E, Roselló-Catafau J. Prostanoids and free radicals in Cl₄C-induced hepatotoxicity in rats: effect of astilbin. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 1997;56(4):331-334.

Table 1. Content of total phenolic compounds and total flavonoids.

Sample	Total Phenolic Compounds (mg GAE/g) ± S.D.	Total Flavonoids (mg CE/g) ± S.D.
Crude extract	402.08 ± 7.23	311.41 ± 0.05
Ethyl acetate fraction	323.75 ± 1.34	353.83 ± 0.01
Hexane fraction	78.84 ± 13.45	N.D.
Chloroform fraction	58.28 ± 3.95	N.D.

S.D.= Standard Deviation. N.D.= Non-detected. EAG= Gallic Acid Equivalent. CE= Catechin Equivalent.

Table 2. MIC and MBC of the crude extract and ethyl acetate fraction of *H. martiana*.

	MIC (mg/mL)		MBC (mg/mL)	
	Crude extract	Ethyl acetate fraction	Crude extract	Ethyl acetate fraction
<i>Staphylococcus aureus</i> (02)	0.15	0.62	5.0	5.0
<i>Staphylococcus aureus</i> (4212)	5.0	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> (705)	-	1.25	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> (659)	1.25	-	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	0.62	0.15	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	-	-	-
<i>Candida albicans</i>	-	-	-	-
<i>Candida tropicalis</i>	0.62	2.5	2.5	5.0
<i>Candida krusei</i>	1.25	0.31	-	-

Table 3. Antioxidant and photoprotective activity of the fraction obtained from the Sephadex-LH20[®] column of ethyl acetate fraction.

Sample	DPPH (%) ± S.D.	ABTS⁺ (%) ± S.D.	Phosphomolibdenum (%TAA) ± S.D.	FPS ± S.D.
GF1	70.52 ± 0.02 ^a	52.82 ± 2.30 ^a	50.52 ± 2.00 ^a	9.13 ± 0.01 ^a
GF2	87.02 ± 0.04 ^b	95.72 ± 2.30 ^b	21.17 ± 1.67 ^b	11.27 ± 0.01 ^b
GF3	87.02 ± 0.05 ^b	99.71 ± 0.20 ^c	60.73 ± 1.85 ^c	14.77 ± 0.02 ^c
GF4	80.21 ± 0.03 ^c	100.00 ± 0.00 ^c	76.32 ± 1.95 ^d	23.77 ± 0.01 ^d
GF5	71.23 ± 0.03 ^d	100.00 ± 0.00 ^c	103.45 ± 6.41 ^e	23.49 ± 0.03 ^e
GF6	75.30 ± 0.02 ^e	100.00 ± 0.00 ^c	76.60 ± 2.69 ^d	16.62 ± 0.01 ^f

S.D. = Standard deviation. Equal letters in the same column indicate no statistical difference according to ANOVA (followed by Tukey), $p < 0.05$.

Table 4. NMR data (400 and 100 MHz for ^1H and ^{13}C , respectively) for the flavonoids identified from barks of *Hymenaea martiana*.

Position	Neoastilbin		Astilbin		Isoastilbin	
	δ_{H} mult. (<i>J</i> in Hz) ^a	δ_{C} mult. ^{a,b}	δ_{H} mult. (<i>J</i> in Hz) ^a	δ_{C} mult. ^{a,b}	δ_{H} mult. (<i>J</i> in Hz) ^a	δ_{C} mult. ^{a,b}
2	5.10 <i>d</i> (11.1)	81.4	5.21 <i>d</i> (9.9)	81.3	5.55 <i>d</i> (2.7)	79.8
3	4.73 <i>d</i> (11.1)	74.7	4.63 <i>d</i> (9.9)	75.4	4.22 <i>d</i> (2.7)	73.3
4		196.2		193.9		192.9
5	11.73 <i>s</i>	163.2	11.86 <i>s</i>	162.4	11.76 <i>s</i>	163.8
6	5.91 <i>d</i> (2.1)	96.0	5.89 <i>d</i> (2.1)	95.7	5.92 <i>d</i> (2.2)	96.1
7		167.1		168.3		166.9
8	5.86 <i>d</i> (2.1)	94.9	5.84 <i>d</i> (2.1)	96.6	5.95 <i>d</i> (2.2)	95.2
9		162.3		162.0		162.1
10		100.4		99.6		100.2
1'		127.4		126.9		126.3
2'	6.91 <i>s</i>	114.5	6.89 <i>br s</i>	114.6	6.85 <i>d</i> (1.6)	114.0
3'		145.1		145.7		145.8
4'		145.9		145.0		145.0
5'	6.71 <i>s</i>	114.8	6.73 <i>s</i>	115.2	6.71 <i>s</i>	116.0
6'	6.71 <i>s</i>	119.4	6.73 <i>s</i>	118.7	6.73 <i>dd</i> (8.3 and 1.6)	117.6
1''	4.94 <i>d</i> (1.4)	101.1	4.06 <i>br s</i>	100.6	4.76 <i>d</i> (1.5)	98.8
2''	3.77 <i>dd</i> (3.2 and 1.4)	69.9	3.33 <i>br s</i>	70.1	3.29 <i>m</i>	72.2
3''	3.15 <i>dd</i> (9.4 and 3.2)	70.0	3.41 <i>dd</i> (9.4 and 3.0)	70.4	3.12 <i>m</i>	71.5
4''	3.03 <i>m</i>	71.1	3.15 <i>dd</i> (9.4 and 3.0)	71.7	3.40 <i>m</i>	72.4
5''	2.26 <i>dq</i> (6.2)	68.8	3.90 <i>m</i>	68.8	3.77 <i>m</i>	69.9
6''	0.79 <i>d</i> (6.2)	17.5	1.05 <i>d</i> (6.2)	17.6	0.84 <i>d</i> (6.2)	17.5

^aNMR experiments were acquired at 296 K with TMS as internal reference at 0.00 ppm in DMSO- d_6 . ^bMultiplicities determined by DEPT 135, HSQC and HMBC experiments. Multiplicity: *s* = singlet, *br s* = broad singlet, *d* = doublet, *dd* = doublet of doublets, *t* = triplet, *q* = quartet, *dq* = doublet of quartets.

Figure 1. Chromatograms obtained from ethyl acetate fraction of *H. martiana*. A: HPLC-DAD profile. B: 3D chromatogram.

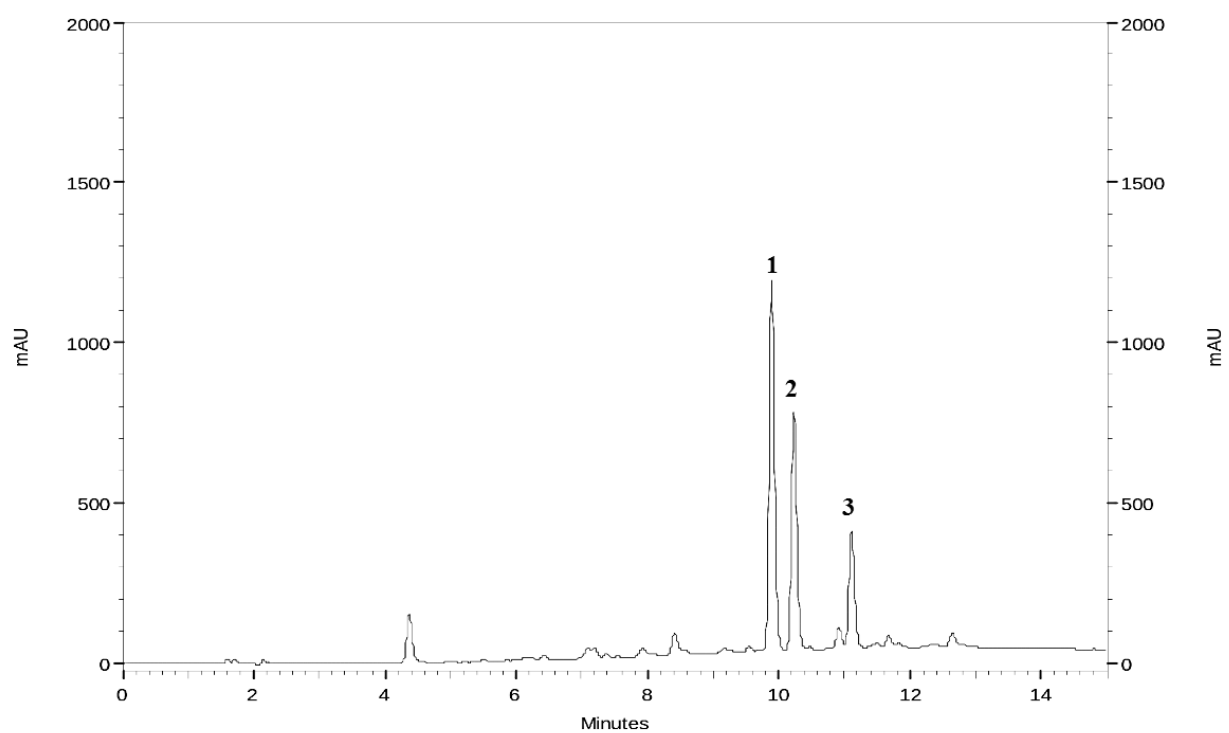


Figure 2. DAD-UV spectrum of the three major compounds from the ethyl acetate fraction. 1: Compound 1, $\lambda_{\text{m\acute{a}x}}$: 234 and 288 nm; R_t = 9.9 min. 2: Compound 2, $\lambda_{\text{m\acute{a}x}}$: 236 and 288 nm; R_t = 10.2 min. 3: Compound 3, $\lambda_{\text{m\acute{a}x}}$: 232 and 294 nm; R_t = 11.1 min.

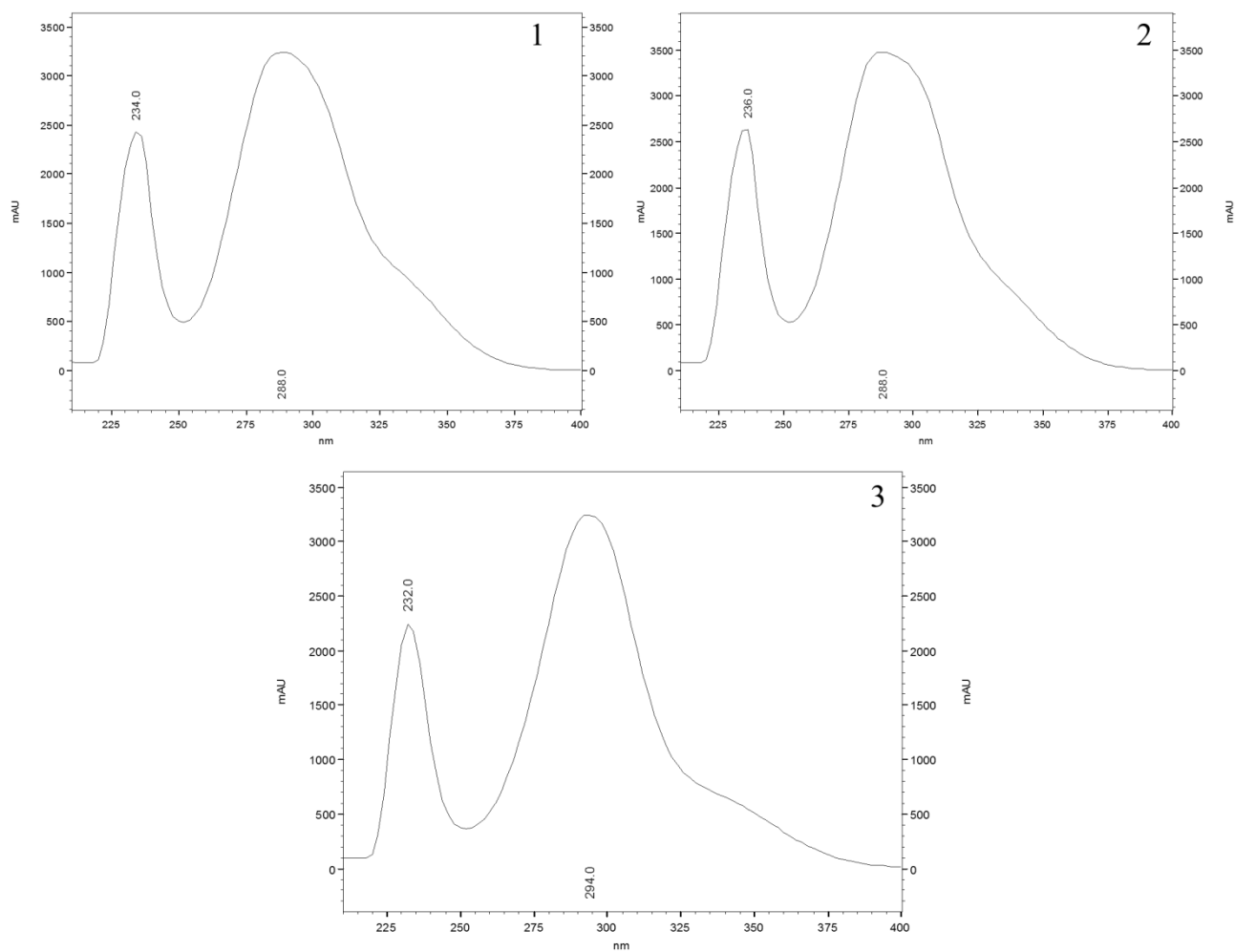
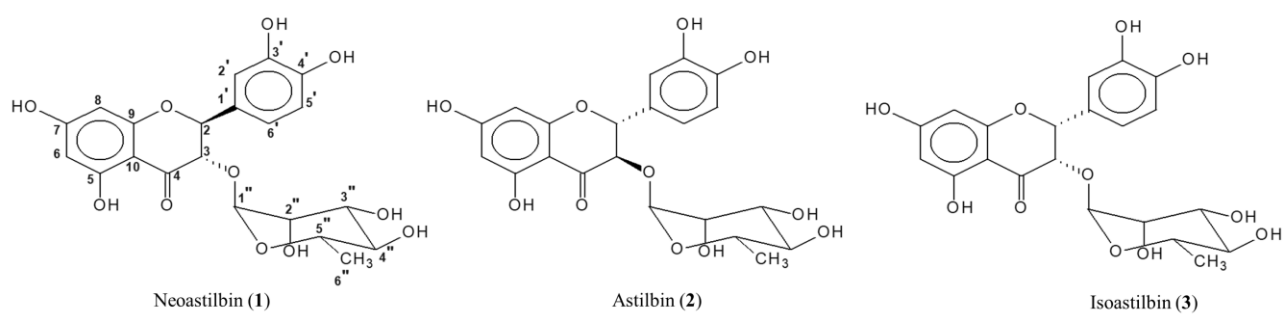


Figure 3. Dihydroflavonoids identified in the ethyl acetate fraction of *H. martiana*.

Anexo II – Artigo submetido à revista Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology– Fator de Impacto 3.165

Photoprotective activity and HPLC-ESI-IT-MS profile of flavonoids from the barks of *Hymenaea martiana* Hayne (Fabaceae): Development of topical formulations containing the hydroalcoholic extract

Fernanda Granja da Silva Oliveira ^a; Ana Paula Sant'Anna da Silva ^b; Bruno de Oliveira Veras ^b; Amanda Dias de Araújo ^b; Deyzi Caroline da Silva Barbosa ^b; Tayane de Cássia Mendes Silva ^b; Chyrlayne Marinho Silva Melo ^b; Elisabete Regina Fernandes Ramos Ribeiro ^c; Alexandre Gomes da Silva ^c; Sarah Raquel Gomes de Lima-Saraiva ^e; Silvio Alan Silvio Gonçalves Bonfim Reis ^e; Vera Lúcia de Menezes Lima ^b; Márcia Vanusa da Silva ^b; Norberto Peporine Lopes ^f; Larissa Araújo Rolim ^g; Jackson Roberto Guedes da Silva Almeida ^{e*}

^a Post-graduation on Biotechnology, State University of Feira de Santana, 44036-900, Feira de Santana, Bahia, Brazil.

^b Department of Biochemistry, Federal University of Pernambuco, 50670-901, Recife, Pernambuco, Brazil.

^c Department of Antibiotics, Federal University of Pernambuco, 50670-901, Recife, Pernambuco, Brazil.

^d Federal Institute of Education, Science and Technology of Sertão Pernambucano, 56302-320, Petrolina, Pernambuco, Brazil.

^e Center for Studies and Research of Medicinal Plants, Federal University of San Francisco Valley, 56304-917, Petrolina, Pernambuco, Brazil. E-mail: jackson.guedes@univasf.edu.br

^f Research Center for Natural and Synthetic Products, University of São Paulo, 14040-903, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil.

^g Analytical Center of Drugs, Medicine and Food, Federal University of São Francisco Valley, 56304-917, Petrolina, Pernambuco, Brazil.

Abstract

The development and production of photoprotective products has been highly focused on natural ingredients, and in addition to sunburn and skin cancer, exposure to UV radiation is also related to early cutaneous aging, which can be related to the production of reactive oxygen species (ROS), which are extremely damaging to tissues. *Hymenaea martiana* Hayne, popularly known in the Brazilian Northeast as "jatobá", had the flavonoids been related to its pharmacological activities, and astilbin was pointed as the major component of the bark's extract. A flavonoid profile of this specie was not developed yet. In this context, this work aimed to perform a phytochemical study, with the characterization of HPLC-MS-ESI-IT flavonoids from *Hymenaea martiana* bark extract, and to develop a cosmetic formulation with photoprotective action. The dried and pulverized barks were submitted to extraction with absolute ethanol, concentrated and fractionated. Total phenolic compounds, total flavonoids, sun protection factor (SPF) and antioxidant activity were determined. A HPLC-ESI-IT profile of flavonoids was developed. Photoprotective gel formulations were developed with the extract of *H. martiana*. The highest content of phenolic compounds was found in crude extract, followed by the ethyl acetate fraction. The total flavonoid content in the samples demonstrate that these are the major phenolic compounds. The crude extract showed significant antioxidant and photoprotective activity, with a strong correlation between the activities and the content of phenolic compounds. A flavonoid profile was developed, and bioactive flavonoids reported for the first time in the species were identified. In the development of the formulations, it was evidenced that the addition of the crude extract to the chemical filter increased the antioxidant activity and FPS, suggesting a synergistic effect in the photoprotection. Formulation F4 was considered a promising product. These results show the cosmetic potential of *Hymenaea martiana*, thus justifying the development of a cosmetic formulation with photoprotective activity.

Keywords: *Hymenaea martiana*; HPLC-ESI-IT-MS; Flavonoids; Sun Protection Factor; Photoprotective activity.

Declaration of interest: none

INTRODUCTION

Medicinal plants have played an important role in therapeutics since antiquity, but their value as a clinical alternative has been gaining prominence in public policies in several countries around the world, including in Brazil, which has become standardized, especially in relation to some criteria, such as safety, efficacy and quality of pharmaceuticals and cosmetics with active plant raw materials.

The development and production of photoprotective products has been highly focused on natural active ingredients, and consumers have shown preference in using natural raw material, mainly vegetable derivatives [1]. Natural products with antioxidant activity have been highlighted, due to the decrease of the undesirable effects in relation to the synthetic additives [2].

Following this trend, the development of photoprotectors currently aims at the inclusion of natural products and plant extracts in the formulations [3], mainly raw materials with antioxidant activity [4].

Ultraviolet (UV) radiation is a range of the electromagnetic spectrum that lies between 100-400 nm and is divided into UVA (320-400 nm), UVB (290-320 nm) and UVC (100-290 nm) [5]. In addition to sunburn and skin cancer, exposure to UV radiation is also related to early cutaneous aging, which can be related to the production of Reactive Oxygen Species (ROS), which are extremely damaging to tissues [6].

As a result, natural chemical compounds with antioxidant and photoprotective activities, such as phenolic compounds and flavonoids, have shown important pharmaceutical and cosmetic potential, due to their biological actions already reported. Flavonoids stand out among the main classes of natural products, being characterized as polyphenols, and are composed of a benzopyran or chroman nucleus, attached to an aromatic ring, forming the fundamental nucleus "phenyl benzopyran". Among the main pharmacological activities associated with flavonoids, antioxidant activity may be mentioned [7], immunomodulatory, anti-inflammatory, bactericidal, antiviral, hepatoprotective, gastroprotective [8]. Another activity that has been studied is the antimicrobial activity [9] and photoprotective of flavonoids [10].

Among the medicinal plants found in the Caatinga biome, stands out the *Hymenaea martiana* Hayne, popularly known in the Brazilian Northeast as "jatobá". Jatobá has traditionally been used in the form of food, building material and traditional medicine, being used in the form of alcoholic extract, for the treatment of anemia, gastritis, inflammations, rheumatism, and also as antinociceptive and analgesic [11, 12, 13]. Some substances that have been related to the pharmacological activities are flavonoids, being astilbin the major component of the bark extract [7, 11, 14, 15, 16, 17].

Due to the presence of these chemical compounds whose absorption spectrum presents with two peaks maximum between 240-280 nm and another at 300-550 nm, *Hymenaea martiana* could then be associated with the development of photoprotective preparations [18].

In this context, this work aimed to perform a phytochemical study, with the characterization of HPLC-MS-ESI-IT flavonoids from *Hymenaea martiana* bark extract, and to develop a cosmetic formulation with photoprotective action.

MATERIALS AND METHODS

Plant material

The barks of *H. martiana* were collected in the city of Petrolina, Pernambuco, Brazil, in July 2015, and were identified by the Federal University of São Francisco Valley Herbarium (HVASF), in the Federal University of São Francisco Valley, with voucher specimen n° 6444, coordinates 09°11'04.30" S, 040°18'05.40" W, 357 m high. The barks were dried at 40°C for 72 h in air circulation oven (ETHIKTECHNO®, Model TD 420), and pulverized using a mill (QUIMIS®).

Extract preparation

For the preparation of the crude extract, 300 g of the barks were submitted to extraction in the National Institute of Semiarid (INSA, Campina Grande, Paraíba, Brazil), using the Accelerated Solvent Extraction (ASE) Thermo Scientific Dionex® ASE 350, equipped with a stainless steel cell extractor hermetic sealed. For this, the vegetable powder had its granulometry homogenized using sieves of mesh 14 and 35, then this material together with diatomaceous earth (2:1) was distributed in 15 extracellular cells of 100mL with capacity for 20g of vegetal material each. The extraction occurred with 99.5% ethanol, with a temperature of 40°C, for 15 minutes, flow of 5mL / min and average pressure of 1500 psi., with two extractions per cell.

After the extraction process, the solvent extraction was concentrated in a Thermo Scientific Rocket Evaporator at 40°C. The residual solvent was eliminated in an oven (Ethiktechno®) at 45°C for 24 hours, obtaining 67 g of the crude ethanolic extract (Hm-CEE).

The crude ethanolic extract (10 g) was solubilized in a mixture of methanol and water (3:7 v/v), which was submitted to a liquid-liquid partition in a separation flask, with manual shake, extensively, with hexane, chloroform and ethyl acetate. After this process, the solutions were concentrated for solvent evaporation under vacuum at 50 °C, obtaining the 1.24 g of the hexane fraction, 0.18 g of the chloroform fraction, and 7.90 g of the ethyl acetate fraction.

Determination of total phenolic compounds

The total phenol content was measured by the colorimetric method using Folin-Ciocalteu reagent (SIGMA[®]) and gallic acid (SIGMA[®]) as standard, based on the method described by [19]. For this, an aliquot (40 μ L) of the diluted extract and fractions was added to 3.16 mL of distilled water and 200 μ L of the Folin-Ciocalteu reagent, and mixed immediately. The mixture was allowed to stand for 6 minutes and then 600 μ L of stock solution of Na₂CO₃ (200 g/L) were added and mixed. The final solutions were allowed to stand at 20°C for 2 hours. At the end of the process, the absorbance of each solution was determined in a spectrophotometer (QUIMIS[®]) at 756 nm against the blank (all components except the sample under analysis) and the results were plotted on a plot correlating the absorbance of the sample with concentration. The results were expressed as milligram of gallic acid equivalent (mg GAE)/g of dry weight of plant extract. The standard curve was obtained using gallic acid as reference (50 - 1000 mg/L, R² = 0.9923). All assays were developed in triplicate.

Determination of total flavonoids

The total flavonoid content was measured for the samples with significant values for the total phenolic compounds, by the colorimetric method by the metallic complexation [20]. A standard solution and the extract and fractions solutions (1 mg/mL) in ethanol 99% were prepared, and 0.2 mL of aluminum chloride 2.5% alcoholic solution and 3.80 mL of ethanol. The solutions could stand at room temperature for 30 minutes. The absorbance of each solution was obtained at 408 nm in a spectrophotometer (Quimis[®]) against the blank (all solvents except the sample). The total flavonoids were expressed as mg of equivalents of catechin per gram of sample (mg EC/g), using a standard curve with catechin as reference (2.5 – 20 μ g/mL, R² = 0.9937). All assays were carried out in triplicate.

Antioxidant and Photoprotective *in vitro* activity

Determination of Total Antioxidant Capacity (TAC)

Total Antioxidant Capacity was determined by phosphomolybdenum method [21]. A volume of 0,1 mL of sample solutions (1 mg/mL) were added to 1 mL of reagent solution (sulfuric acid 600 mM, sodium phosphate 28 mM and ammonium molybdate 4 mM). The tubes were incubated at 95 °C for 90 min, and then the absorbance was measured at 695 nm against the blank. Ascorbic acid was used as reference and the Total Antioxidant Capacity was expressed as equivalent of ascorbic acid. The TAC (%) was calculated using the following formula: TAC (%) = [(absorbance of the sample – absorbance of the blank)/(absorbance of ascorbic acid – absorbance of the blank) x 100]. All assays were carried out in triplicate.

Inhibition of 2,2-Azino-Bis-(3 Ethylbenzothiazoline)-6-Sulfonic Acid (ABTS⁺) radical

The inhibition of ABTS⁺ radical (Sigma[®]) of the samples was developed according to method previously described [22]. The ABTS⁺ solution 7mM was prepared adding potassium persulfate 140 mM and the mixture was allowed to stand protected from light at room temperature for 12 – 16 hours (time required for radical formation) before its use. The ABTS⁺ solution was standardized with the dilution with ethanol to an absorbance of 0.7 (\pm 0.02) at 732 nm. The absorbance of the samples was measured using 30 μ L of the sample solutions (1 mg/mL), added to 3 mL of the standardized ABTS⁺ solution 7 mM, in different periods of time (6, 15, 30, 45, 60 and 120 min) at 734 nm. The inhibition of the oxidation was calculated and plotted as a function of reference antioxidant concentration (Trolox) and expressed as Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC, μ M).

DPPH Free Radical Scavenging Assay

The free radical scavenging activity was measured using the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazil (DPPH) assay with adaptations [23]. Samples were diluted in methanol to an initial concentration of 5 mg/mL, followed by serial dilution to 0.078 mg/mL. 40 μ l of each dilution was transferred to the 96 well plate and 250 μ l of the 0.008% DPPH methanolic solution was added. The absorbance of each sample was measured at 517 nm in spectrophotometer, 25 minutos after the addition of DPPH solution to the sample solutions. The Antioxidant Activity (AA) was calculated using the following formula: AA% = [(absorbance of the control – absorbance of the sample)/absorbance of the control] x 100. All assays were carried out in triplicate.

Photoprotective activity in vitro

The photoprotective activity was evaluated by spectrophotometric method of diluted solutions. Samples were dried in oven at 40°C for 60 minutes, and then dilutions were prepared (100 mg/L). A spectrophotometer (Quimis[®]) was used, with quartz cuvettes with 1 cm optical path for the acquisition of the spectra and ethanol as blank. For maximum absorption wavelength (λ_{max}) determination, spectrophotometric scanning of the crude extract was performed at wavelengths between 260 and 400 nm, with intervals of 5 nm. Calculations of the Sun Protection Factor (SPF) were made considering the intervals λ determined using the following formula: SPF = Correction Factor x Amount of absorbance 290-320 nm x Erythemogenic Effect of radiation (λ) x Spectrophotometric reading of sample absorbance (λ). The values of EE x I are constant and previously determined. The synthetic filter benzophenone-3 (10 mg/L) and the standard flavonoid quercetin (10 mg/L) were used as positive control.

Characterization of Flavonoids by HPLC-ESI-IT-MS

The HPLC-ESI-IT-MS analysis was developed in NPPNS- Ribeirão Preto, with the ethyl acetate fraction of the Hm-CEE. This analysis was developed in a HPLC (Shimadzu Prominence[®]), equipped with two binary pumps (LC-20AD), degassing unit (DGU-20A), automatic sampler (SIL-20AHT), oven (CTO-20A), communication module (CBM-20A), -M20A) and a Luna-Phenomenex reverse phase column, 250 mm x 4.6 mm, 5 µm). The mobile phase was composed of a mixture of solvent A (0.1% formic acid in ultra-purified water) and solvent B (0.1% formic acid in methanol), following a concentration gradient, flow rate of 1 mL/min.

The chromatograph was coupled to an Amazon SL ion trap mass spectrometer (Bruker Daltonics[®]), equipped with an electrospray ionizer and ion trap analyzer, under the following conditions: 3500 V capillary; 500 V end plate; nebulizer 60 psi; gas flow 10.0 L/min and gas temperature 330°C.

The results were analyzed using the GNPS website on-line database (Global Natural Product Social Molecular Networking) (GNPS, 2017). The data obtained in the chromatograph coupled to the mass spectrometer were converted to the mzXML format directly into the software DataAnalysis 4.2 (Bruker Daltonics[®]), and submitted to dereplication analysis at GNPS website, and the substances were considered as identified in the sample if the mass spectra obtained at least six combining ions and cosine score above 0.5 [26].

Molecular formulas and classifications of substances were obtained from PubChem [27].

Preparation of Photoprotective Formulations

The base gel used was composed of Carbopol[®] 940 (Table 1). This base was prepared by dispersing the gelling agent (Carbopol[®]) in water with methylparaben preservative, along with an humidifying agent (propylene glycol). Thereafter, it could stand for 24 hours to facilitate preparation of the gel in the dispersion of Carbopol[®] in water. Subsequently, the alkalizing agent (triethanolamine) was added and mixed until a pH range of 5.0-5.5 was obtained obtaining a clear gel.

Table 1: General composition of the Carbopol[®] gel base used in the development of photoprotective formulations.

Component	Concentration (%)
Carbopol [®] 940	1,00
Methylparaben	0,10
Propylene glycol	7,00
EDTA	0,10
Triethanolamine	q.s.p. (pH = 5,0 a 5,5)

From the prepared gel base, the chemical filter and Hm-CEE were incorporated in different concentrations (Table 2). The chemical filter used was a water-soluble UVA/B filter composed of benzophenone-3 (Fagron®). The formulations were evaluated for photoprotective activities with adaptations in the concentration of the sample solution to 1 mg/mL, using the gel base as white, and antioxidant activity.

The SPF of the prepared formulations was determined using the previously described methodology, with adjustments in concentration of the sample solution to 1 mg/mL [24].

Table 2: Photoprotective formulations containing benzophenone-3 and/or crude extract in different percentages.

Components	F1	F2	F3	F4
Benzophenone-3	5%	0%	5%	10%
Hm-CEE	0%	5%	5%	10%
Gel base	s.q.	s.q.	s.q.	s.q.

The formulations were submitted to the physicochemical quality control tests, as appearance, color, odor, pH, consistency by extensibility and centrifugation resistance test.

The appearance, homogeneity, and organoleptic characteristics were evaluated by macroscopic analyses. The pH value (MS Tecnoyon, model mPA-210, Brazil) was determined by inserting the electrode directly into the aqueous dilution 1:10 (w/v) of the samples. The determination of consistency by extensibility was performed as proposed by [28], using 0.3 g of the sample placed between two glass plates, 10 x 20 cm and 0.5 cm thick, laid on a graph paper. The diameters of the formulations were measured after the addition of weights, every three minutes, on the top plate. The average extensibility was calculated in cm² by multiplying the square of the diameter by $\pi/4$. Centrifugation test was performed on 24 h after preparation of the formulations at 3000 rpm (Fanen, model 206 BL, Brazil) for 30 min at room temperature.

For the preliminary stability study, the freezing/thawing cycle method was used [29]. The formulations were submitted to physicochemical tests (appearance, color, odor, pH, consistency by extensibility and centrifugation resistance test), before (T0) and after six freezing/thawing cycles (12th day, T12). Each cycle corresponds to alternate 24 hours at high temperatures of $-5^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ and 24 hours at low temperatures of $45^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ [30].

Statistical Analysis

All determinations were performed in triplicate and the results are shown as mean \pm standard deviation. Values were considered significantly different when $p < 0.05$. For the correlation analysis, ANOVA one way, followed by the Tukey's test and the Student's t test, the softwares Statistica[®] version 10.0 (StatSoft[®], EUA), and Microsoft Excel[®] 2017 were used.

RESULTS AND DISCUSSION

Total phenolic compounds, antioxidant *in vitro* activity and SPF *in vitro* determination

The total phenolic content of the crude extract and fractions is presented in Table 3. The highest content of phenolic compounds was found in Hm-CEE, followed by the ethyl acetate fraction and the values found in the present study is lower to that found in another study with the bark of this species [31]. The content of flavonoid compounds found were significant in this study, and this results can evidence that the flavonoids are the major phenolic compounds present in the extract and ethyl acetate fraction of *H. martiana*. The difference between the results found in this study and the previous values reported in the literature can be justified by the different extractive methods, and the volumes and dilutions in the methods for the determination of phenolic compounds and flavonoids used [31].

Flavonoids were described as the major compounds of the crude extract and the ethyl acetate fraction of *H. martiana* previously [14, 32]. Flavonoids have, among other biological activities, a characteristic antioxidant activity, which is related to its capacity to eliminate free radicals donating electrons or hydrogen atoms or cations of metal chelate compounds [33]. The complex chemical structure of flavonoids, as well as the diversity of their molecules, makes the structure-activity relationship more complicated than phenolic acids. Some of the structural characteristics and nature of the substitutions in rings B and C can determine the antioxidant and photoprotective activity of flavonoids. The degree of hydroxylation and the positions of the hydroxyl groups on ring B, in particular a ring B ortho-dihydroxy structure in the positions 3' and 4' (known as the "catechol" group), results in increased activity as greater radical stability is conferred by relocation [33]. Dihydroxyflavonoids that present the catechol group in ring B have already been described in *H. martiana*. Astilbin and taxifolin were previously described in the literature, substances related to the bioactivities of the species [7, 14, 32]. Other important compounds found in the species can be cited, as engelitin, eucrifin, daucosterol [14].

Table 3: Total phenolic compounds content of the crude extract and fractions obtained from the barks of *H. martiana*.

Sample	Total Phenolic Compounds (%) \pm S.D.	Total Flavonoids (%) \pm S.D.
--------	---	---------------------------------

Crude ethanolic extract	420.125 ± 0.05	317.73 ± 0.33
Ethyl acetate fraction	393.04 ± 0.03	307.78 ± 6.20
Hexane fraction	78.84 ± 13.45	N.D.
Chloroform fraction	58.28 ± 3.95	N.D.

GAE = Gallic Acid Equivalent. S.D. = Standard Deviation.

Table 4 presents the antioxidant activity of the crude extract and fractions of *H. martiana*. These data demonstrate the high antioxidant capacity (TEAC), analyzed by the ABTS⁺ radical inhibition method, with 83.75 ± 11.96% and 98.98 ± 1.06% for crude extract and the ethyl acetate fraction, respectively. The ethyl acetate fraction had the highest total antioxidant capacity (phosphomolybdenum method), with 85.97 ± 6.30%. The crude extract showed the highest sequestering activity of the DPPH radical, with 91.4%. It was observed that the fractionation potentiated the antioxidant power by the ABTS⁺ and phosphomolybdenum methods and maintained by the DPPH. The significant antioxidant activity of the crude extract and the ethyl acetate fraction points to the great antioxidant potential of the species being studied.

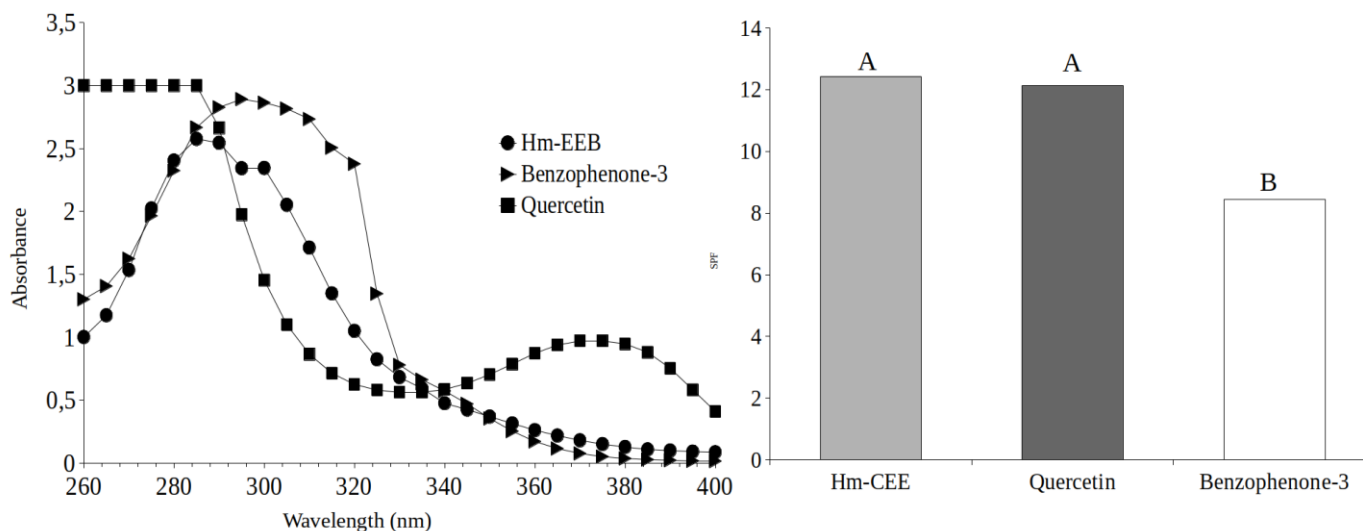
Table 4: Antioxidant activity of the crude extract and fractions obtained from the barks of *H. martiana*.

Sample	DPPH (%) ± S.D.	ABTS⁺ (% TEAC) ± S.D.	Phosphomolybdenum (%TAA) ± S.D.
Crude ethanolic extract	91.47 ± 0.03	83.75 ± 1.96	46.97 ± 0.04
Ethyl acetate fraction	90.77 ± 0.02	98.98 ± 1.06	85.97 ± 0.30
Hexane fraction	21.94 ± 0.06	9.54 ± 3.83	23.99 ± 1.94
Chloroform fraction	31.29 ± 1.07	23.56 ± 0.52	33.93 ± 3.19

TPC = Total Phenolic Compounds. GAE = Gallic Acid Equivalent. S.D. = Standard Deviation. TEAC = Trolox Equivalent Antioxidant Capacity. TAA = Total Antioxidant Capacity.

The *in vitro* photoprotective effect of crude extract was determined by Mansur method [24] and a significant absorption in the UVB/UVA regions were observed, in the spectrophotometric scanning for the crude extract and the positive controls, quercetin and the synthetic filter, suggesting a possible photoprotective activity (Figure 1).

Figure 1 - Spectrophotometric absorption spectra (a) and determination of the Sun Protection Factor (SPF) spectrophotometric (b) of Hm-CEE (100 mg/L) and standards (quercetin and benzophenone-3 at 10 mg/L). Results are expressed as mean \pm standard deviation ($n = 3$) and equal letters indicate no statistical difference according to ANOVA (followed by Tukey), $p < 0.05$.



Aiming the total protection of the skin, which is not taken care by several photoprotective formulations, containing only chemical synthetic sunscreens, vegetal extracts rich in antioxidant compounds are being widely used. This can be explained by the presence of phenolic compounds, which can provide protection against UV rays and neutralize free radicals after sun exposure. For this reason, studies have investigated antioxidant substances that absorb ultraviolet radiation in the UVA range (320-400 nm) and UVB (290-320 nm), and thus can be used as natural sunscreen. The application of the photoprotective of natural products in sunscreens formulations is a trend [3].

Due to its photochemical properties, phenolic compounds such as flavonoids are therefore great candidates for natural photoprotective and antioxidant substances. As Figure 1 presents, the photoprotective potential of the *H. martiana* showed relevant values. When compared to the positive controls quercetin and benzophenone-3, the UV spectra of the crude extract of *H. martiana* evidenced an important absorption in the UVB/UVA regions, suggesting a possible photoprotective activity.

Probably due to the high concentrations of phenolic compounds and expressive antioxidant capacity, the crude extract presented significant values for SPF, with 12.43 ± 1.25 in the concentration of 100 mg/L, value similar to the SPF presented for the flavonoid standard quercetin, which showed an SPF of 12.12 ± 0.02 in the concentration of 10 mg/L, while the synthetic filter benzophenone-3 obtained 8.45 ± 0.06 . These values can show the photochemical potential for the extract, and these results were above the levels required for sunscreens in Brazil, according to the Brazilian National Health Surveillance Agency [34], which requires that the minimum SPF value of a photoprotective formulation should be 6.0. These values were also higher than that recommended

by the US Food and Drug Administration (FDA), which considers as a sunscreen, a formulation with FPS value greater than 2.0 [35]. Therefore, these samples presented adequate values for the future development of photoprotectors, with an important antioxidant activity.

The content of phenolic compounds was correlated to antioxidant activity (DPPH radical sequestration) and SPF, and the Pearson (ρ) and R^2 coefficients were calculated. The results indicate the strong correlation between the antioxidant activity and the total phenolic compounds content of the analyzed samples ($R^2 = 0,995$; $\rho = 0,997$). Several studies point to a strong relationship between the presence of phenolic compounds and antioxidant activity in medicinal plants and fruits [36, 37]. A strong correlation between the phenolic compounds content and the photoprotective activity (SPF) was also presented in the analyzed samples ($R^2 = 0,954$; $\rho = 0,977$), an important data for the future development of photoprotectors from plant extracts that present phenolic compounds as chemical markers, as is the case of the species in study.

For a more in-depth study on the chemical composition of *H. martiana*, a metabolomic study by an HPLC-MS-ESI-IT analysis was performed to identify the main flavonoids of the species. Metabolomic studies are characterized by the separation of complex matrix components, using chromatographic and spectroscopic methods, as well as bioactivity studies. Hyphenated techniques stand out for this type of study, based on the comparison of the information obtained with databases, resulting in the detection of compounds already known or even in the structural elucidation of new compounds. Several natural compounds have been identified using the metabolomic study as flavonoid glycosides, isoflavonoids and flavonoid derivatives [26, 38, 39].

The flavonoid profiling was developed by HPLC-MS method using the GNPS website as an online database, and 18 known flavonoids were detected (Figure 2, Table 5), among two flavanonols, six flavonols, four isoflavones, five flavones and one flavan-3-ol.

Figure 2 - UV Chromatogram (190 - 700 nm) obtained with HPLC-MS-ESI-IT analysis of the ethyl acetate fraction

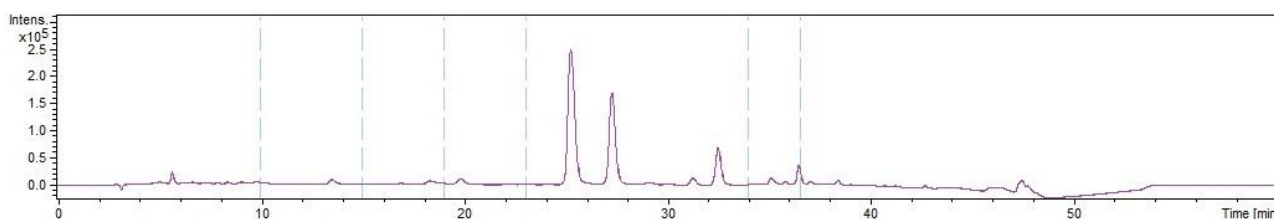


Table 5. Flavonoids detected by HPLC-ESI-IT-MS from the ethyl acetate fraction, obtained from the barks of *Hymenaea martiana*.

Flavonoid Class	Metabolite	Rt (min)	Molecular formula	<i>m/z</i> observed (ESI ⁻)	Main fragments [M-H] ⁻
Flavanonol	Astilbin	36,5	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₁	449	485,00; 512,00
	Taxifolin	16,1	C ₁₅ H ₁₂ O ₇	303	284,96; 124,90
Flavonol	Isoquercetin	36,9	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	463	300,02; 301,03
	Quercetin-3-O-alfa-rhamnopyranoside	37,8	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	447	301,03
	Quercetin-7-O-rhaminoside	42,25	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	449	300,97; 322,94
	Kaempferol-7-O-α-L-rhamnoside	41,8	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	431	285,97
	Quercetin	13,0	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	301	150,92; 178,91
	Quercitrin	40,4	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	447	300,94
Isoflavones	Ononin	36,3	C ₂₂ H ₂₂ O ₉	431	269,00
	Glycitin	41,8	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₀	447	283,00; 300,97; 375,00
	6''-O-Acetyl-Glycitin	41,9	C ₂₄ H ₂₄ O ₁₁	488	285,66
	Sissotrin	40,5	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₀	447	300,94
Flavones	Amentoflavone	21,8	C ₃₀ H ₁₈ O ₁₀	539	377,06; 403,04; 404,04
	Baicalin	34,3	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₁	445	253,05; 272,06; 271,06

					283,07;
Isovitexin	44,1	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	415		311,07;
					341,08
C-Hexosyl-apigenin	42,1	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₀	433		268,96
					388,11;
Nobiletin	46,2	C ₂₁ H ₂₂ O ₈	403		373,09;
					403,13
Flavan-3-ol	Isoxanthoflavan-3-ol	11,4	C ₂₀ H ₂₂ O ₅	369	287,00

Rt= Retention time; ESI= electrospray ionization in negative mode.

All compounds identified showed biological activities in the literature, including antioxidant, photoprotective activities. The dihydroflavonoid astilbin was previously detected, which was previously identified as the major component of *Hymenaea martiana* [14]. This flavonoid has several pharmacological activities already reported, as anti-inflammatory [14], anti-ischemic [40], antinociceptive and antiedematogenic [32], and antioxidant [33].

Among the flavonoids identified in the ethyl acetate fraction, only quercetin has photoprotective activity reported in the literature [10]. It also has antioxidant activity and anti-inflammatory activity reported [42]. This flavonoid was tested in this study, and presented a important absorption in the UVA/UVB region, and an significant photoprotection (SPF of 12,12 ± 0.02) in a low concentration (10 mg/L). This data shows the importance of the identification of this flavonoid in *H. martiana*.

The antioxidant activity has already been reported among the other identified flavonoids, such as taxifolin [43], isoquercetin [44], quercetin-7-O-rhamnoside [45], kaempferol-7-O- α -rhamnoside [46], quercitrin [47], ononin [48], glycitin [49], sissotrin [50], amentoflavone [51], baicalin [44], isovitexin [52], C-hexosyl-apigenin [53], nobiletin [54]. Thus, the identified flavonoids demonstrate the bioactive potential of bioactive extract from the barks of *Hymenaea martiana*.

In addition, only astilbin and taxifolin have been previously described in the species [14, 32]. Therefore, this is the first report of the identification of all other flavonoids described in Table 5, evidencing the novelty for the phytochemical study of the species under study.

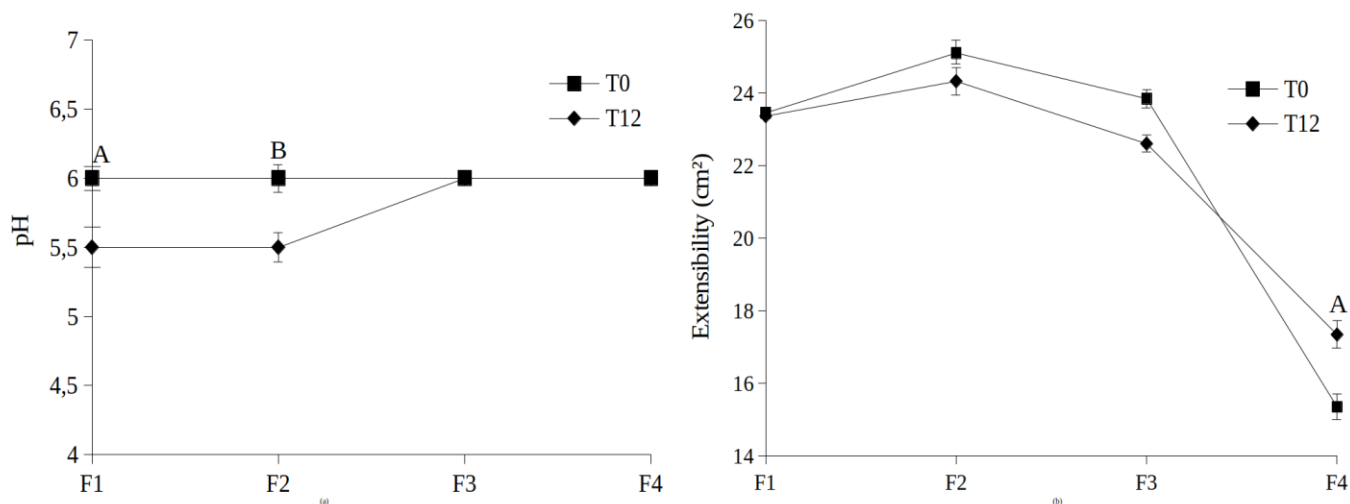
Given the significance of these results, it is evident the great antioxidant and photoprotective potential of the *Hymenaea martiana* species, as well as the originality of the present work, since no patents were found with photoprotective formulations with the genus *Hymenaea* or with the species studied in the available data, thus justifying the development of a formulation with photoprotective action with the barks of *Hymenaea martiana*.

Four test formulations were obtained using the Carbopol® gel base, the UVAB chemical filter and the Hm-EEB. It was possible to observe that the formulations presented visual aspects and homogeneity suitable for cosmetic formulations before and after the freezing / defrosting cycles.

The formulations had pH values between 5,5 and 6,0 (Figure 3) after the manipulation and after the thermal stress, values compatible with cutaneous pH (Isaac et al. 2008). In addition, the formulations did not presented any changes or phase separations after the centrifugation test over the entire period of this study (T0 and T12). The extensibility of the formulations were calculated (Figure 3) and this data can show important informations about the efficacy and sensory aspects. A photoprotective gel should have a suitable extensibility, contributing for the formation of a film on the skin. In this way, the formulation can guarantee the Sun Protection Factor (SPF) informed. The results presented by the proposed formulations are above values found for emollients used in commercial emulsions [28], demonstrating that the gels developed with the extract of *H. martiana* obtained an adequate extensibility for photoprotective formulations.

So, the results for the quality control and preliminary stability suggest the formulations showed adequate quality control properties, even after thermal stress.

Figure 3: Evaluation of pH (a) and extensibility (b) of the photoprotective formulations (F1 -F4) before (T0) and after (T12) the preliminary stability study. Results are expressed as mean \pm standard deviation, where ^A ($p < 0.05$ T0 versus T12) and ^B ($p < 0.05$ T0 versus T12), according to Student's t-test.



The antioxidant and photoprotective activities of the formulations were evaluated (Table 6). The results show that the formulation F1, which contains only the chemical UVAB filter, did not present significant antioxidant activity. The formulation F2, composed of 5% of Hm-BSE, presented $77.55 \pm 0.02\%$ AS (DPPH method), $26.60 \pm 1.90\%$ TEAC (ABTS method) and $15.00 \pm 0.55\%$ TAA (Phosphomolybdenum method), demonstrating that the replacement of the chemical filter by crude extract interfered with the antioxidant activity, causing a significant increase. The F3 formulation, composed of 5% of the UVAB chemical filter and 5% of the Hm-BSE, presented $29.52 \pm 0.11\%$ AS, $4.60 \pm 0.10\%$ TEAC and $6.55 \pm 0.09\%$ TAA, demonstrating a decrease in the values found in relation to the formulation containing only the crude extract. The F4 formulation, composed of 10% of the UVAB chemical filter and 10% of the crude extract, presented $57.88 \pm 0.10\%$ AS, $34.60 \pm 1.20\%$ TEAC and $12.92 \pm 0.12\%$ TAA, evidencing that the increase in the concentration of the sunscreens increased the antioxidant activity of the formulation F4 in relation to the formulation F3. The results show that the gel with photoprotective activity containing only the chemical filter UVAB (formulation F1), which is already commercialized, did not present antioxidant activity in the tested methods, and that the addition of the crude extract under study greatly increased this activity. The addition of the crude extract, therefore, may provide an advantage for the formulations.

Table 6: Antioxidant activity of formulations prepared with *H. martiana* extract.

Formulations	DPPH (%) \pm S.D.	ABTS ⁺ (% TEAC) \pm S.D.	Phosphomolybdenum (%TAA) \pm S.D.
--------------	---------------------	---------------------------------------	--

F1	00,00 ± 0,00	0,40 ± 2,50	5,42 ± 0,08
F2	77,55 ± 0,02	26,60 ± 1,90	15,00 ± 0,55
F3	29,52 ± 0,11	4,60 ± 0,10	6,55 ± 0,09
F4	57,88 ± 0,10	34,60 ± 1,20	12,92 ± 0,12

S.D. Standard Deviation.

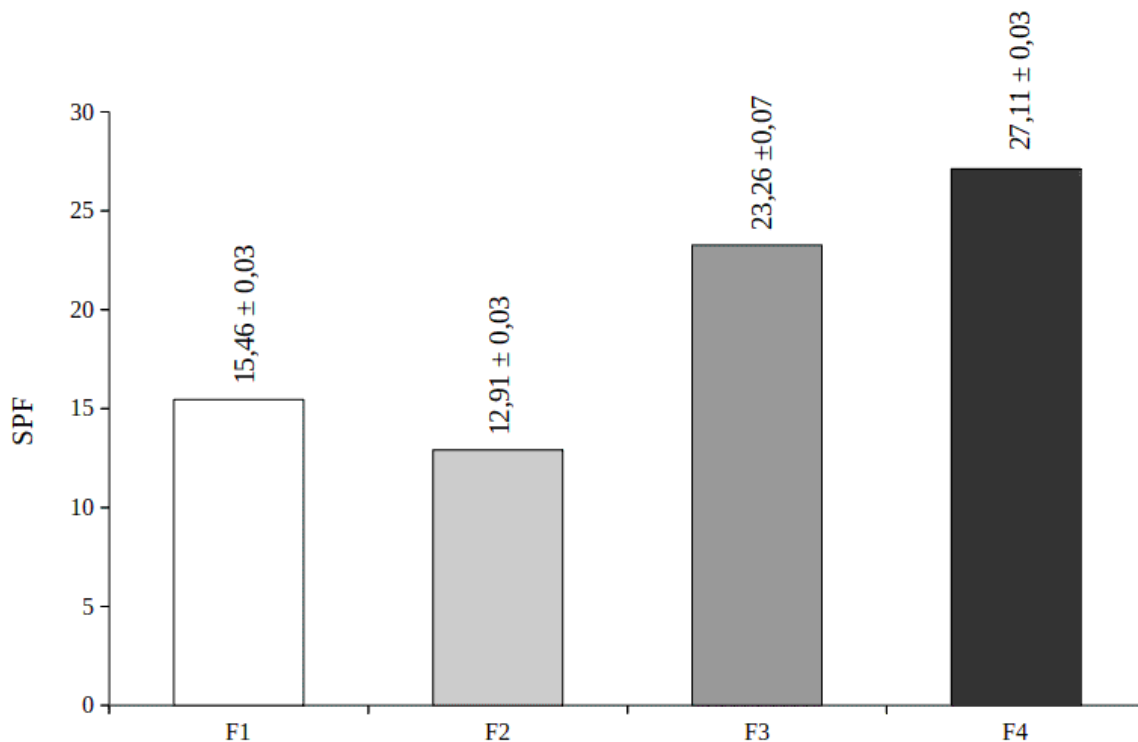
However, it can be observed that the addition of the UVAB chemical filters and the crude extract at 5% concentration (F3 formulation) caused a drop in antioxidant activity. This result may suggest a chemical interaction between the chemical filter and the crude extract, which could be justified by the pH of the crude extract of *Hymenaea martiana* bark, which was considered mildly acid in a previous study [55]. The acidic pH could interfere in the electrons in the chemical structure of the solar filters, passing the product to absorb UV radiation at different wavelengths [56]. It is noteworthy that this interference was not found in photoprotective activity.

On the other hand, increasing the amount of the crude extract to 10% resulted in an increase in both antioxidant activity and photoprotective activity, indicating that this concentration positively affected the activities evaluated. Thus, pH monitoring in preliminary stability studies is more important for monitoring this possible interaction [30].

Therefore, the results presented for the antioxidant activity of the formulations tested may add greater value to the development of the photoprotective formulation, since it may provide a decrease in the use of synthetic additives with antioxidant action in the formulation, which could bring less undesirable effects [2].

The evaluation of the photoprotective activity of the formulations tested is shown in Figure 4. The formulation containing only the crude extract presented a FPS value greater than 6.0, demonstrating the photoprotective potential of the species under study. The formulations containing the chemical filter and the crude extract (formulations F3 and F4) showed a considerable increase in the FPS values, in relation to the formulations containing the filters tested alone (formulations F1 and F2), which may suggest a synergistic effect between the chemical filter and crude extract in photoprotective activity.

Figure 4: SPF of the



formulations containing the extract of *Hymenaea martiana*.

The formulation F4 presented the best result for the photoprotective activity, with significant antioxidant activity, and it can be considered a promising product, since the addition of natural sunscreens to the chemical filters is considered an alternative to increase the safety and efficacy of photoprotectors [2].

Conclusions

The results presented in this study showed that the crude extract of *H. martiana* is composed by the phenolic compounds, mainly the flavonoids, major class of the chemical composition of the extract. Several flavonoids were identified for the first time in the species, and the flavonoids astilbin and taxifolin were identified in the extract, corroborating previous studies.

The knowledge about the antioxidant and photoprotective activity of the species can add therapeutic and cosmetic value to the study species, with a strongly positive correlation between the phenolic compounds and the evaluated activities.

Formulations containing the crude extract were prepared, presenting relevant antioxidant and photoprotective activity. The results showed a synergistic effect between the crude extract and benzophenone-3, bringing promising results for the development of a formulation with photoprotective action.

The results obtained in this study up to the present moment show the relevant antioxidant and photoprotective activity of the crude extract, demonstrating the cosmetic potential of *Hymenaea martiana*, thus justifying the development of medicinal or cosmetic formulations associated with oxidative stress and skin care.

Acknowledgments

The authors thank the Brazilian agencies CAPES and FACEPE for their financial support and the collaboration of the the Post-graduate Program in Biotechnology (PPGBiotec) of the State University of Feira de Santana (UEFS); the Department of Biochemistry of the Federal University of Pernambuco, Federal University of San Francisco Valley and the Research Center on Natural and Synthetic Products (NPPNS) of São Paulo University.

Conflicts of interests

None.

References

- [1] S.M. Iha, K.F. Migliato, J.C.R. Velloso, L.V.S. Sacramento, R.C.L.R. Pietro, V.L.B. Isaac, I.L. Brunetti, M.A Corrêa, H.R.N. Salgado, Estudo fitoquímico de goiaba (*Psidium guajava* L.) com potencial antioxidante para o desenvolvimento de formulação fitocosmética, *Braz J Pharmacog* 18 (2008) 387-393. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-695X2008000300013>
- [2] D. Krishnaiah, R. Sarbatly, R. Nithyananam, A review of the antioxidant potential of medicinal plant species, *Food Bioprod Process* 89 (2011) 217–223. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2010.04.008>
- [3] R.G. Oliveira-Júnior, J.R.G.S. Almeida, Prospecção tecnológica de fotoprotetores derivados de produtos naturais, *GEINTEC* 3 (2012) 32-40. <https://doi.org/10.7198/geintec.v3i1.85>
- [4] H.C. Polonini, L.L Lima, K.M. Goncalves, A.M. Carmo, A.D. Silva, N.R. Raposo, Photoprotective activity of resveratrol analogues, *Bioorganic & Med Chem* 21 (2013) 964-968. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2012.11.052>
- [5] C.S. Nascimento, L.C.C. Nunes, A.A.N. Lima, S. Grangeiro-Jr, P.J. Rolim-Neto, Incremento do FPS em formulação de protetor solar utilizando extratos de própolis verde e vermelha, *Braz J Pharm* 90 (2009) 334-339. http://rbfarma.org.br/files/pag_334a339_incremento_fps_257_90-4.pdf
- [6] M.V.R. Velasco, T.S. Balogh, C.A. Pedriali, F.D. Sarruf, C.A.S.O. Pinto, T.M. Kaneko, A.R. Baby, Associação da rutina com p-metoxicinamato de octila e benzofenona-3: avaliação *in vitro*

da eficácia fotoprotetora por espectrofotometria de refletância, *Lat Am J Pharm* 27 (2008) 23-27. <http://hdl.handle.net/10915/7576>

- [7] J.R.G.S. Almeida, M.E.G.C Silva, A.L. Guimarães, A.P. Oliveira, C.S. Araújo, J.A. Siqueira-Filho, A.P. Fontana, P.K.F. Damasceno, C.R.C. Branco, A. Branco, HPLC-DAD analysis and antioxidant activity of *Hymenaea martiana* Hayne (Fabaceae), *J Chem Pharm Res* 4 (2012) 1160-1166. <https://pdfs.semanticscholar.org/93e6/ace6ae819bcb19c45156e24c001eeb8c6d2e.pdf>
- [8] T. GUARDIA, A.E. ROTELLI, A.O. JUAREZ, L.E. PELZER, Anti-inflammatory properties of plant flavonoids, Effects of rutin, quercetin and hesperidin on adjuvant arthritis in rat. II *Farmaco* 56 (2001) 683-687. [https://doi.org/10.1016/S0014-827X\(01\)01111-9](https://doi.org/10.1016/S0014-827X(01)01111-9)
- [9] R.G. Oliveira-Júnior, C.S. Araújo, C.R.R. Santana, G.R. Souza, S.R.G. Lima-Saraiva, A.L. Guimarães, A.P. Oliveira, J.A. Siqueira-Filho, A.G.M. Pacheco, J.R.G.S. Almeida, Phytochemical screening, antioxidant and antibacterial activity of extracts from the flowers of *Neoglaziovia variegata* (Bromeliaceae), *J Chem Pharm Res* 4 (2012) 4489-4494. <http://www.jocpr.com/articles/phytochemical-screening-antioxidant-and-antibacterial-activity-of-extracts-from-the-flowers-of-neoglaziovia-variegata-br.pdf>
- [10] J.M.T Alencar-Filho, P.A. Sampaio, E.C.V. Pereira, R.G. Oliveira-Júnior, F.S. Silva, J.R.G.S. Almeida, L.A. Rolim, X.P. Nunes, E.C.C. Araújo, Flavonoids as photoprotective agents: a systematic review, *J Med Plant Res* 10 (2016) 848-864. <https://doi.org/10.5897/JMPR2016.6273>
- [11] M.C.A. Neves, P.C.A. Neves, J.C. Zanini, Y.S. Medeiros, R.A. Yunes, J.B. Calixto, Analgesic and anti-inflammatory activities of the crude hydroalcoholic extract obtained from the bark of *Hymenaea martiana*, *Phytother Res* 7 (1993) 356-362. <https://doi.org/10.1002/ptr.2650070507>
- [12] A.F. Anselmo, C.G. Silva, M.G.V. Marinho, F.C.V. Zanella, D.A. Xavier, Levantamento etnobotânico de plantas medicinais comercializadas por raizeiros em uma feira livre no município de Patos – PB, *Biofar Especial* (2012) 39-48. <http://sites.uepb.edu.br/biofar/download/v-especial-2012/LEVANTAMENTO%20ETNOBOT%20C%20NICO%20DE%20PLANTAS%20MEDICINAIS%20COMERCIALIZADAS%20POR%20RAIZEIROS%20EM%20UMA%20FEIRA%20LIVRE%20NO%20MUNIC%20C%20DPIO%20DE%20PATOS%20E2%80%93%20PB.pdf>
- [13] L.R.S. Gazzaneo, R.F.P. Lucena, U.P. Albuquerque, Knowledge and use of medicinal plants by local specialists in a region of Atlantic Forest in the state of Pernambuco (Northeastern Brazil), *J Ethnobiol Ethnomed* 1 (2005) 1-9. <https://dx.doi.org/10.1186%2F1746-4269-1-9>
- [14] E. Carneiro, J.B. Calixto, F. Delle Monache, R.A. Yunes, Isolation chemical identification and pharmacological evaluation of eucryphin, astilbin and engelitin obtained from the bark of *Hymenaea martiana*, *Int J Pharmacog* 31 (1993) 38-46. <https://doi.org/10.3109/13880209309082916>

- [15] J.B. Calixto, R.A. Yunes, Y.S. Medeiros, Differential antagonistic effect of hydroalcoholic extract from *Hymenaea martiana* Hayne arzeik on kinin and other agonist-induced contractions of the isolated rat uterus and guinea-pig ileum, *Phytother Res* 6 (1992) 322-326. <https://doi.org/10.1002/ptr.2650060609>
- [16] J.B. Calixto, R.A. Yunes, Y.S. Medeiros, Vascular action of the crude hydroalcoholic extract from *Hymenaea martiana* on the isolated rat and rabbit aorta, *Phytother Res* 6 (1992) 327-331. <https://doi.org/10.1002/ptr.2650060610>
- [17] D. Closa, M. Torres, G. Hotter, G. Bioque, S. Leon, E. Gelpi, J. Roselló-Catafau, Prostanoids and free radicals in CI4C-induced hepatotoxicity in rats: effect of astilbin, *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 56 (1997) 331-334. [https://doi.org/10.1016/S0952-3278\(97\)90578-0](https://doi.org/10.1016/S0952-3278(97)90578-0)
- [18] M.F. Bobin, M. Raymond, M.C. Martini, UVA/UVB absorption properties of natural products, *Cosmet Toiletries* 109 (1995) 63-78.
- [19] J.R.G.S. Almeida, M.R. Oliveira, A.L. Guimarães, A.P. Oliveira, L.A.A. Ribeiro, A.S.S.C Lúcio, L.J. Quintans-Júnior, Phenolic quantification and antioxidant activity of *Anaxagorea dolichocarpa* and *Duguetia chrysocarpa* (Annonaceae), *Int J Pharm Biol Sci* 2 (2011) 367-374. https://ijpbs.net/subscription_renewals.php?articleid=MTA4OA==
- [20] G.S. Marques, R.P.M. Monteiro, W.F. Leão, M.A.M. Lyra, M.S. Peixoto, P.J. Rolim-Neto, H.S. Xavier, L.A.L. Soares, Avaliação de procedimentos para quantificação espectrofotométrica de flavonoides totais em folhas de *Bauhinia forficata* Link, *Quím Nova* 35 (2012) 517-522. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422012000300014>.
- [21] P. Prieto, M. Pineda, M. Aguilar, Spectrophotometric Quantitation of Antioxidant Capacity through the Formation of a Phosphomolybdenum Complex: Specific Application to the Determination of Vitamin E, *Anal Biochem* 269 (1999) 337-341. <https://doi.org/10.1006/abio.1999.4019>
- [22] R. Re, N. Pellegrini, A. Proteggente, A. Pannala, M. Yang, C. Rice-Evans, Antioxidant activity applying an improved ABTS radical, *Free Radic Biol Med* 26 (1999) 1231-1237. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3)
- [23] W. Brand-Williams, M. Cuvelier, C. Berset, Use of Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity, *Lebenson Wiss Technology* 28 (1995) 25-30. [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5)
- [24] J.S. Mansur, M.N.R. Breder, M.C.D. Mansur, R.D. Azulay, Determinação do fator de proteção solar por espectrofotometria, *An Bras Dermatol* 61 (1986) 121-124. <http://www.anaisdedermatologia.org.br/detalhe-artigo/421/Determinacao-do-fator-de-protecao-solar-por-espectrofotometria>

- [25] R.M. Sayre, P.P. Agin, G.J. LeVee, E. Marlowe, A comparison of in vivo and in vitro testing of sunscreen formulas, *Photochem Photobiol*, 29 (1979) 559–566. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1979.tb07090.x>
- [26] G.G Oliveira, F. Carnevale-Neto, D.P. Demarque, J.A.S. Pereira-Júnior, R.C.S. Peixoto-Filho, S.J. Melo, J.R.G.S. Almeida, J.L.C. Lopes, N.P. Lopes, Dereplication of flavonoid glycoconjugates from *Adenocalymma imperatoris-maximiliani* by untargeted tandem mass spectrometry-based molecular networking, *Planta Med* 83 (2017) 636–646. <https://doi.org/10.1055/s-0042-118712>
- [27] PUBCHEM, PubChem Open Chemistry Database, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>, (Accessed 13 Nov 2017).
- [28] V.L.B. Isaac, L.C. Cefali, B.G. Chiari, C.C.L.G. Oliveira, H.R.N. Salgado M.A. Corrêa, Protocolo para ensaios físico-químicos de estabilidade de fitocosméticos, *J Basic Appl Pharm Sci* 29 (2008) 81–96. <https://repositorio.unesp.br/handle/11449/70617>
- [29] B.A. Khan, N. Akhtar, H. Khan, V.D.A. Braga, Development, characterization and antioxidant activity of polysorbate based O/W emulsion containing polyphenols derived from *Hippophae rhamnoides* and *Cassia fistula*, *Braz J Pharm Sci* 49 (2013) 763–773. <http://dx.doi.org/10.1590/S1984-82502013000400016>
- [30] ANVISA Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos, ANVISA (Eds.), Brasília, 2004, 52 p. <http://portal.anvisa.gov.br/documents/106351/107910/Guia+de+Estabilidade+de+Produtos+Cosm%C3%A9ticos/49cdf34c-b697-4af3-8647-dcb600f753e2>
- [31] F.G.S. Oliveira, S.R.G. Lima-Saraiva, A.P. Oliveira, S.V. Rabêlo, L.A. Rolim, J.R.G.S. Almeida, Influence of the extractive method on the recovery of phenolic compounds in different parts of *Hymenaea martiana* Hayne, *Pharmacog Res* 8 (2016) 270–275. <https://dx.doi.org/10.4103%2F0974-8490.188885>
- [32] V. Cechinel-Filho, Z.R. Vaz, L. Zunino, J.B. Calixto, R.A. Yunes, Antinociceptive and anti-oedematogenic properties of astilbin, taxifolin and some related compounds, *Drug Res* 50 (2000) E281–E285. <https://doi.org/10.1055/s-0031-1300200>
- [33] N. Balasundram, K. Sundram, S. Samman, Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses, *Food Chem* 99 (2006) 191–203. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.07.042>
- [34] ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Resolução RDC nº 30 de 1 de junho de 2012, <http://www.cosmeticsonline.com.br/ct/painel/fotos/assets/uploads/regulatorios/bef6e-RDC-30.pdf>, (2012) (Accessed 18 Set 2018).

- [35] FDA, Sunscreen: How to Help Protect Your Skin from the Sun, Food and drug, 2017, <https://www.fda.gov/Drugs/ResourcesForYou/Consumers/BuyingUsingMedicineSafely/UnderstandingOver-the-CounterMedicines/ucm239463.htm> (Accessed 18 Set 2018).
- [36] N. Badea, M. Giurginca, A. Meghea, Complex effects of sunscreen agents and flavonoid antioxidant devoted to enhance photoprotection of dermal tissues, *Mol Cryst Liq Cryst* 48 (2008) 183-192. <https://doi.org/10.1080/15421400801917981>
- [37] J.R. Lins-Neto, A.D.A. Uchôa, P.A. Moura, C.M. Bezerra-Filho, J.C.G. Tenório, A.G. Silva, R.M. Ximenes, M.V. Silva, M.T.S. Correia, Phytochemical screening, total phenolic content and antioxidant activity of some plants from Brazilian flora, *J Med Plants Res* 10 (2016) 409-416. <https://doi.org/10.5897/JMPR2015.5979>
- [38] J.L. Wolfender, P. Waridel, K. Ndjoko, K.R. Hobby, H.J.; Major, K. Hostettmann, Evaluation of Q-ToF-MS/MS and multiple stage IT-MSⁿ for the dereplication of flavonoids and related compounds in crude plant extracts, *Anal* 28 (2000) 895-906. <https://doi.org/10.1051/analusis:2000280895>
- [39] M. Lambert, D. Strk, S.H. Hansen, M. Sairafianpour, J.W. Jaroszewski, Rapid extract dereplication using HPLC-SPE-NMR: analysis of isoflavonoids from *Smirnowia iranica*, *J Nat Prod* 68 (2005) 1500-1509. <https://doi.org/10.1021/np0502037>
- [40] H. Diao, Z.K. Kang, F. Han, W. Jiang, Astilbin protects diabetic rat heart against ischemia-reperfusion injury via blockade of HMGB1-dependent NF- κ B signaling pathway, *Food and Chemical Toxicology* 63 (2014) 104-110. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.10.045>
- [41] E.L. Bakota, J.K. Winkler-Moser, M.A. Berhow, D.E. Palmquist, S.X. Liu, Antioxidant activity of hybrid grape pomace extracts derived from midwestern grapes in bulk oil and oil-in-water emulsions, *J Am Oil Chem Soc* 92 (2015) 1333-1348. <https://doi.org/10.1007/s11746-015-2698-0>
- [42] C. Gardi, K. Bauerova, B. Stringa, V. Kuncirova, L. Slovak, S. Ponist, F. Drafi, L. Bezakova, I. Tedesco, A. Acquaviva, S. Bilotto, G.L. Russo, Quercetin reduced inflammation and increased antioxidant defense in rat adjuvant arthritis, *Arch Biochem Biophys* 583 (2015) 150-157. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2015.08.008>
- [43] V. Chobot, F. Hadacek, G. Bachmann, W. Weckwerth, L. Kubicova, Pro- and antioxidant activity of three selected flavan type flavonoids: catechin, eriodictyol and taxifolin, *Int J Mol Sci* 17 (2016) 1-9. <https://dx.doi.org/10.3390%2Fijms17121986>
- [44] Y. Jin, Y. Lu, G. Han, G.; H. Sun, H. Yu, F. Jin, Comparative study on in vitro anti-free radical activities of quercetin, isoquercetin, and rutin. *Chin Trad Patent Med* 38 (2007) 408-412. http://en.cnki.com.cn/Article_en/CJFDTOTAL-ZCYO200703032.htm

- [45] H. Liu, Y. Mou, J. Zhao, J. Wang, L. Zhou, M. Wang, D. Wang, Z. Yu, F. Yang, Flavonoids from *Halostachys caspica* and Their Antimicrobial and Antioxidant Activities, *Molecules* 15 (2010) 7933-7945. <https://doi.org/10.3390/molecules15117933>
- [46] M.T. Chua, Y.T. Tung, S.T. Chang, Antioxidant activities of ethanolic extracts from the twigs of *Cinnamomum osmophloeum*. *Bioresour Technol* 99 (2008) 1918–1925. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.03.020>
- [47] L. Zhu, J. Chen, J. Tan, X. Liu, B. Wang, Flavonoids from *Agrimonia pilosa* Ledeb: Free radical scavenging and DNA oxidative damage protection activities and analysis of bioactivity-structure relationship based on molecular and electronic structures, *Molecules* 22 (2017) 1-11. <https://doi.org/10.3390/molecules22030195>
- [48] D. Yu, Y. Duan, Y. Bao, C. Wei, L. An, Isoflavonoids from *Astragalus mongholicus* protect PC12 cells from toxicity induced by L-glutamate, *J Ethnopharmacol* 98 (2005) 89–94. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2004.12.027>
- [49] M.I. Genovese, N.M.A. Hassimotto, F.M. Lajolo, Isoflavone profile and antioxidant activity of Brazilian soybean varieties, *Food Sci Technol Int* 11 (2005) 205-211. <https://doi.org/10.1177%2F1082013205054499>
- [50] M.I.S. Abdelhady, A.M. Kamal, S.M. Othman, M.S. Mubarak., T.B. Hadda, Total polyphenolic content, antioxidant, cytotoxic, antidiabetic activities, and polyphenolic compounds of *Sophora japonica* grown in Egypt, *Med Chem Res* 24 (2015) 482-495. <https://doi.org/10.1007/s00044-014-1101-2>
- [51] V. Tarallo, L. Lepore, M. Marcellini, D.F. Piazz, L. Tudisco, S. Ponticelli, F.W. Lund, P. Roepstorff, A. Orlandi, C. Pisano, N. Tommasi, S. Falco, The biflavonoid amentoflavone inhibits neovascularization preventing the activity of proangiogenic vascular endothelial growth factors, *J Biol Chem* 286 (2011) 19641-19651. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.186239>
- [52] M. He, J.W. Min, W.L. Kong, W.L.; He, X.H.; Li, J.X.; Peng, B.W, A review on the pharmacological effects of vitexin and isovitexin, *Fitoterapia* 115 (2016) 74-85. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2016.09.011>
- [53] F. Ferreres, C. Sousa, P. Valentão, P.B. Andrade, R.M. Seabra, A. Gil-Izquierdo, New C-deoxyhexosyl flavones and antioxidante properties of *Passiflora edulis* leaf extract, *J Agric Food Chem* 55 (2007) 10187-10193. <https://doi.org/10.1021/jf072119y>
- [54] X.M. Chen, A.R. Tait, D.D. Kitts, Flavonoid composition of orange peel and its association with antioxidant and anti-inflammatory activities, *Food Chem* 218 (2017) 15-21. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.09.016>
- [55] F.G.S. OLIVEIRA, Influência do método extrativo sobre a produção de compostos fenólicos em *Hymenaea martiana* (Fabaceae) e controle de qualidade da droga vegetal, 2015, Dissertation

presented for the Post-graduation program in Natural Resources of the Semiarid), Federal University of the São Francisco Valley, Brazil.

http://www.cpgrnsa.univasf.edu.br/uploads/7/8/9/0/7890742/disserta%C3%A7%C3%A3o_fernanda_granja_reunida.pdf (Accessed 26 Mar 2019)

- [56] C. Ribeiro, Fotoproteção e fotoprotetores. Cosmetologia aplicada à Dermoestética, Pharmabooks, São Paulo, 2006, 270 p. <https://www.pharmabooks.com.br/livros/details.aspx/z-cosmetologia-aplicada-a-dermoestetica-z/?isbn=858973109X>



PROSPECÇÃO TECNOLÓGICA DO GÊNERO *HYMENAEA* (FABACEAE)

TECHNOLOGICAL FORECASTING OF THE GENUS *HYMENAEA* (FABACEAE)

Fernanda Granja da Silva Oliveira¹; Sarah Raquel Gomes de Lima-Saraiva²; Suzana Vieira Rabêlo³; Domingos Diletieri Carvalho⁴; Kiara Fernanda Pereira da Silva Vicelli⁵; Jackson Roberto Guedes da Silva Almeida⁶

¹Universidade Estadual de Feira de Santana – UEFS – Feira de Santana/BA – Brasil
fernanda.gso@hotmail.com

²Universidade Federal de Pernambuco – UFPE – Recife/PE – Brasil
sarahrgl@hotmail.com

³Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE – Recife/PE – Brasil
suzana_rabelo@yahoo.com.br

⁴Universidade Federal de Pernambuco – UFPE – Recife/PE – Brasil
domingos.carvalho@ufpe.br

⁵Instituto de Desenvolvimento Estudantil – IDE – Recife/PE – Brasil
ferknanda@hotmail.com

⁶Universidade Federal do Vale do São Francisco – UNIVASF – Petrolina/PE – Brasil
jackson.guedes@univasf.edu.br

Resumo

O gênero Hymenaea apresenta cerca de 25 espécies descritas, que apresentam valor econômico por fornecerem madeira, resina, frutos, e uso medicinal das cascas do caule e dos frutos. Foi realizada uma prospecção, buscando os pedidos de patentes depositados no banco de dados nacional e internacionais. Foram encontrados 102 depósitos de patentes. A base de patentes americana apresentou maior número de depósitos, o Japão foi o país de origem com o maior número de depósitos. Foi observada uma evolução anual, que demonstrou que o gênero apresentou patentes em todos os anos, a partir de 1995. A pesquisa mostrou o valor medicinal, cosmético e alimentício do gênero, além de apresentar patentes nas áreas de construção civil e edificações. A necessidade do incentivo à pesquisa e inovação tecnológica nacional destas plantas torna-se evidente, o que pode contribuir para uma melhor conservação da biodiversidade e aumento do perfil competitivo de países como o Brasil.

Palavras-chave: prospecção tecnológica, *Hymenaea*, patentes.

Abstract

The genus Hymenaea presents about 25 species described, which present economic value for providing wood, resin, fruits, and medicinal use of stem bark and fruit. A survey was carried out,

searching for patent applications deposited in the national and international database and 102 patent deposits were found. The US patent base had the largest number of deposits, Japan was the country of origin with the largest number of deposits. An annual evolution was observed, which demonstrated that the genus presented patents in every year, from 1995. The research showed the medicinal, cosmetic and food value of the genus, and presenting patents in the areas of civil construction and buildings. The need to encourage national research and technological innovation of these plants becomes evident, which may contribute to better conservation of biodiversity and increase the competitive profile of countries such as Brazil.

Key-words: technological forecasting, *Hymenaea*, patent.

1. Introdução

Os medicamentos fitoterápicos são aqueles produzidos com matérias primas ativas vegetais, e o uso destes vem crescendo mundialmente, por ser uma alternativa mais saudável ou menos agressiva do que os medicamentos sintéticos. Nos países em desenvolvimento, as plantas medicinais podem representar inclusive uma alternativa à dificuldade de acesso aos medicamentos alopáticos (BRASIL, 2014).

Desta forma, os medicamentos à base de plantas medicinais movimentam o mercado mundial em torno de US\$ 8,5 bilhões nos Estados Unidos e US\$ 6,3 bilhões na Europa (SIMÕES; SCHENCKEL, 2002). Adicionalmente, os produtos naturais têm representado importante papel no desenvolvimento de fármacos sintéticos, sendo as fontes naturais ainda detentoras das melhores possibilidades para encontrar moléculas bioativas (COSTA-LOTUFO et al., 2010). Estima-se que mais de uma centena de compostos bioativos derivados de produtos naturais já estejam sob investigação clínica (HARVEY, 2008).

Pertencente à família Fabaceae e com grande importância terapêutica, o gênero *Hymenaea* apresenta cerca de 25 espécies descritas, com distribuição da América Central à América do Sul (PETTIT et al., 2003). Conhecidas no Brasil como “jatobá” (OLIVEIRA et al., 2012), são popularmente utilizadas na medicina tradicional para diversas enfermidades, como inflamações, reumatismo, infecções, ferimentos, anemia, distúrbios gástricos e bronquite (GAZZANEO et al., 2005; AGRA et al., 2007; MARSAIOLI et al., 1975).

Muitas espécies deste gênero apresentam valor econômico por fornecerem madeira de alta qualidade, resina e frutos comestíveis, além do uso medicinal das cascas do caule e dos frutos (BEZERRA et al., 2013). Várias substâncias bioativas já foram isoladas de *Hymenaea*, como compostos fenólicos, mais especificamente flavonoides (CARNEIRO et al., 1993; ALMEIDA et al., 2012), diterpenos (NOGUEIRA et al., 2001; DOMÉNECH-CARBÓ et al., 2009), dentre outros.

Por conta do seu potencial terapêutico e econômico, o objetivo deste estudo foi realizar uma prospecção tecnológica do gênero *Hymenaea*, analisando suas aplicações e a participação dos países nos depósitos de pedido de patente em bases nacionais e internacionais até o momento.

2. Metodologia

Foi realizada uma pesquisa do tipo prospecção, buscando os pedidos de patentes depositados no banco de dados nacional e internacionais. Foram utilizados os bancos European Patent Office (EPO), World Intellectual Property Organization (WIPO), United States Patent and Trademark Office (USPTO) e o banco de dados do Instituto Nacional de Propriedade Industrial do Brasil (INPI).

A pesquisa foi realizada em janeiro de 2017 e foram utilizadas como palavras-chave os termos “*Hymenaea*” e “jatobá” (para a base de dados brasileira) e “*Hymenaea*” (para as bases de dados internacionais), sendo considerados válidos os documentos que apresentassem esses termos

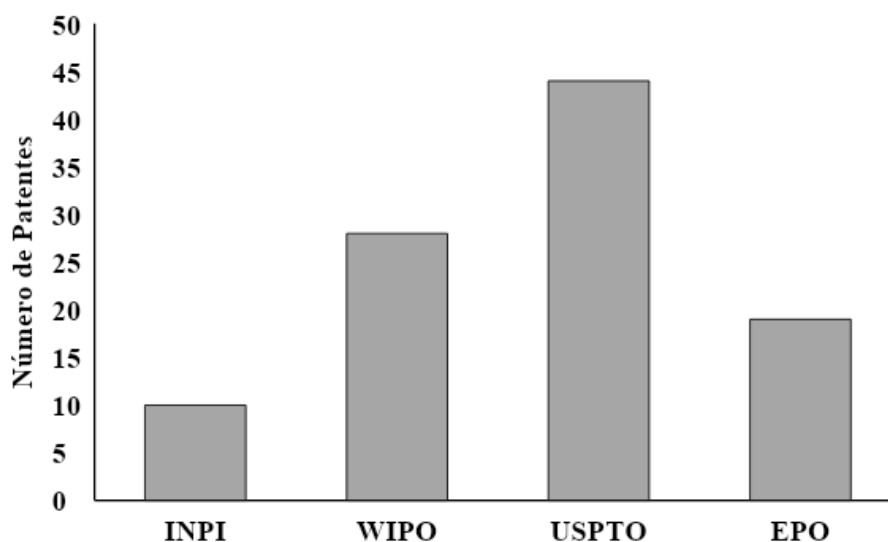
no título e/ou resumo. Foram analisados todos os pedidos de patente existentes até o presente momento.

Os dados foram analisados e os gráficos foram elaborados no software Microsoft Excel® 2017.

3. Resultados e Discussão

A prospecção realizada resultou num total de 102 depósitos de patentes nos bancos de dados consultados, sendo o USPTO o banco com maior número de patentes encontradas, com 44 patentes, seguido pelo WIPO, com 28 patentes, o EPO com 19, e o INPI, banco de dados brasileiro, onde foram encontrados 10 depósitos de patentes envolvendo o gênero *Hymenaea* (Figura 1).

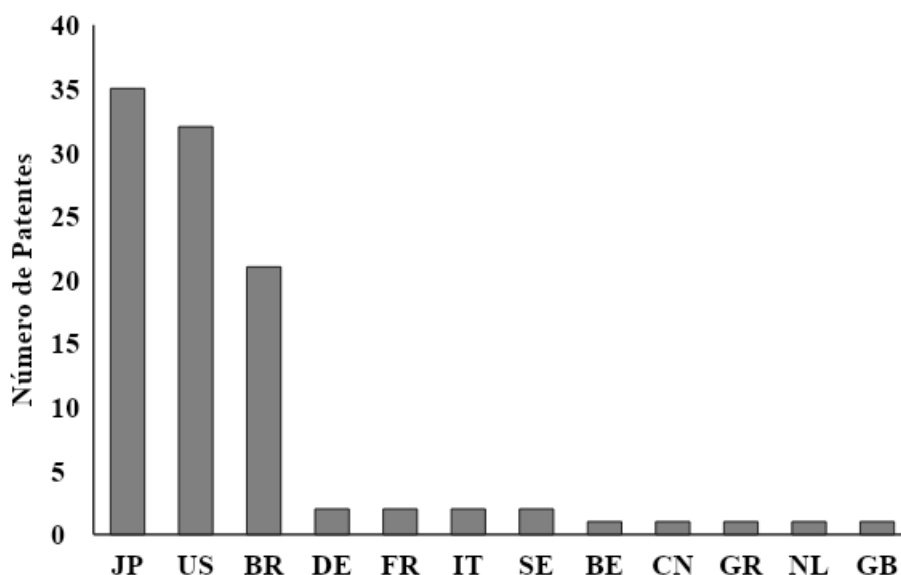
Figura 1 – Número de dos pedidos de patentes depositados por base de dados com o gênero *Hymenaea*.



Fonte: Autoria própria (2017)

De acordo com a Figura 2, o Japão lidera com o maior número de patentes depositadas com o gênero em estudo, com 35 patentes, seguido pelos Estados Unidos, com 32 patentes depositadas. O Brasil aparece em terceiro lugar, com 21 patentes depositadas até o presente momento.

Figura 2 - Distribuição de dos pedidos de patentes depositados nas bases de dados com o gênero *Hymenaea*. Legenda: DE (Alemanha), BE (Bélgica), BR (Brasil), CN (China), US (Estados Unidos da América), FR (França), GR (Grécia), NL (Holanda), IT (Itália), JP (Japão), GB (Reino Unido) e SE (Suécia).

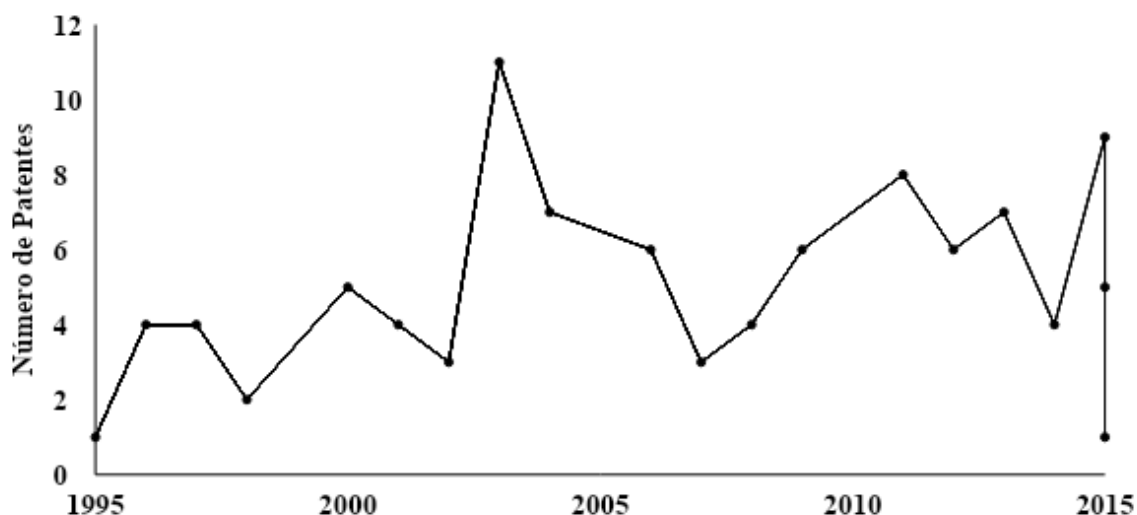


Fonte: Autoria própria (2017)

As figuras 1 e 2 mostram resultados controversos em relação às regiões de ocorrência do gênero e de depósito de patentes. O Brasil é o único país encontrado nesta pesquisa que é localizado na distribuição geográfica do gênero, que é encontrado naturalmente da América Central à América do Sul (PETTIT et al., 2003). A grande quantidade de patentes oriundas do Japão e Estados Unidos mostra que o gênero possui potencial econômico em regiões onde não ocorre naturalmente nem apresenta condições climáticas favoráveis ao cultivo. Resultados semelhantes foram encontrados em outras prospecções, como em um estudo em que os Estados Unidos lideraram o ranking com patentes com a planta *Ananas comosus* (OLIVEIRA-JÚNIOR; ALMEIDA, 2012), país que não apresenta condições climáticas favorável para o cultivo desta planta. Estes dados mostram a necessidade de maiores incentivos à pesquisa e desenvolvimento tecnológico visando melhor exploração econômica e sustentável da flora nativa dos países da América Central e do Sul.

Na Figura 3 é apresentada uma evolução anual no número de patentes depositadas nos últimos 22 anos nas bases de dados consultadas. O maior número de patentes foi depositado no ano de 2003, com uma queda no número de depósitos até 2007, com aumento até o ano de 2011. Um aumento pode ser percebido em 2015, e até o momento uma patente já foi depositada em 2017. Estes dados mostram que a partir de 1995, todos os anos apresentaram pelo menos 1 patente depositada, o que enfatiza o potencial econômico do gênero em estudo.

Figura 3 – Evolução anual dos pedidos de patentes depositados nos últimos 22 anos com o gênero *Hymenaea*.



Fonte: Autoria própria (2017).

Dentre os 102 depósitos de patentes, 18,73% foram classificados no código IPC A61K, que contempla preparações com finalidades médicas, odontológicas ou higiênicas. Outras subclasses que apresentaram ocorrência relativamente alta, foram A61Q (uso específico de cosméticos ou produtos de higiene) e A61P (atividade terapêutica específica de compostos químicos ou preparações medicinais), evidenciando a aplicação medicinal e cosmético do gênero *Hymenaea*, em conformidade com as propriedades farmacológicas já evidenciadas em estudos científicos (GAZZANEO et al., 2005; AGRA et al., 2007; MARSAIOLI et al., 1975).

Outras subclasses apresentadas englobam compostos moleculares e orgânicos (C08), alimentos e produtos alimentícios (A23 e A23L), polissacarídeos e seus derivados (C08B), microrganismos ou enzimas (C12N), conservação de alimentos ou produtos alimentícios (A01N) e composição de compostos macromoleculares (C08L) (vide Tabela 1).

Um dado importante encontrado nesta pesquisa mostra que o gênero *Hymenaea* apresenta um potencial econômico relacionado a seu valor madeireiro, com patentes nas subclasses relacionadas à construção civil e edificações, inseridos na Tabela 1 como “Outros”. Este fato é de grande relevância, visto que atualmente está em discussão a problemática da conservação da diversidade biológica e da utilização sustentável de seus componentes, com o desenvolvimento de novos materiais renováveis e diminuição da utilização de madeira em edificações. Investimentos na pesquisa científica do potencial terapêutico de plantas medicinais pode contribuir para um melhor aproveitamento e estimular a sua utilização sustentável, implicando uma maior pressão para a conservação das espécies (BRASIL, 2011).

Tabela 1 – Distribuição por CIP dos pedidos de patentes depositados com o gênero *Hymenaea*.

CIP	Frequência (%)
A61K	18,73
A61Q	10,86
A61P	7,87
C08	7,49
A23	6,37
A23L	3,75
C08B	3,75
C12N	3,00
A01N	3,00
C08L	3,00
Outros	32,21

Fonte: Autoria própria (2017)

4. Conclusões

O estudo apresentou dados importantes relacionados ao potencial econômico e terapêutico do gênero *Hymenaeae*. A base de patentes americana apresentou o maior número de patentes depositadas, e o Japão foi o país de origem com o maior número de depósitos. Foi observada uma evolução anual, que demonstrou que o gênero apresentou patentes em todos os anos, a partir de 1995. A pesquisa mostrou o valor medicinal, cosmético e alimentício do gênero, além de apresentar patentes nas áreas de construção civil e edificações.

Prospecções tecnológicas tornam-se importantes, pois apresentam um panorama internacional do perfil de exploração econômica, o que pode trazer discussões em relação à sustentabilidade e ao valor agregado de espécies vegetais nativas. Desta forma, a necessidade do incentivo à pesquisa e inovação tecnológica nacional destas plantas torna-se evidente, o que pode contribuir para uma melhor conservação da biodiversidade e aumento do perfil competitivo de países como o Brasil.

5. Referências

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

ALMEIDA, J.R.G.S.; SILVA, M.E.G.C.; GUIMARÃES, A.L.; OLIVEIRA, A.P.; ARAÚJO, C.S.; SIQUEIRA-FILHO, J.A.; FONTANA, A.P.; DAMASCENO, P.K.F.; BRANCO, C.R.C.; BRANCO, A. HPLC-DAD analysis and antioxidant activity of *Hymenaea martiana* Hayne (Fabaceae). **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, v. 4, n. 2, p. 1160-1166, 2012.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. **Espécies Nativas da Flora Brasileira de Valor Econômico Atual ou Potencial: Plantas para o Futuro - Região Sul**. Brasília: MMA, 2011. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/estruturas/sbf2008_dcbio/_ebooks/regiao_sul/Regiao_Sul.pdf>. Acesso em 06/03/2017.

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

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

COSTA-LOTUFO, L.V.; MONTENEGRO, R.C.; ALVES, A.P.N.N.; MADEIRA, S.V.F.; PESSOA, C.; MORAES, M.E.A.; MORAES, M.O. A contribuição dos produtos naturais como fonte de novos fármacos anticâncer: Estudos no Laboratório Nacional de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará. **Revista Virtual de Química**, v.2, n.1., p.47-58, 2010.

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

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

HARVEY, A.L. Natural products in drug discovery. **Drug Discovery Today**, v.13, n.19-20, p.863-868, 2008.

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.

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

OLIVEIRA-JÚNIOR, R.G.; ALMEIDA, J.R.G.S. Prospecção tecnológica de *Ananas comosus* (BROMELIACEAE). **Revista GEINTEC**, v. 2, n.5, p. 505-513, 2012.

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

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

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P. A pesquisa e a produção brasileira de medicamentos a partir de plantas medicinais: a necessária interação da indústria com a academia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.12, n.1, p.35-40, 2002.

POTENCIAL ANTIOXIDANTE E FOTOPROTETOR DE *HYMENAEA MARTIANA* HAYNE (FABACEAE): UMA PLANTA MEDICINAL NATIVA DO VALE DO SÃO FRANCISCO

*Fernanda Granja da Silva Oliveira*¹; *Ana Paula Sant'Anna da Silva*²; *Juliane Maria dos Santos Silva*^{3*}; *Amanda Dias de Araújo Uchôa*⁴; *Alexandre Gomes da Silva*⁵; *Márcia Vanusa da Silva*⁶; *Jackson Roberto Guedes da Silva Almeida*⁷

Resumo – *Hymenaea martiana* é uma espécie nativa do Nordeste, conhecida como “jatobá”. Vários estudos identificaram compostos fenólicos e atividade antioxidante, entretanto, o estudo com o extrato obtido por extração acelerada por solvente (ASE) com a espécie ainda não foi relatado. Diante deste contexto, este estudo teve como objetivo avaliar o teor de fenólicos, atividade antioxidante e fotoprotetora do extrato obtido por ASE a partir das cascas de *Hymenaea martiana*, que foram coletadas em Petrolina-PE e extraídas por ASE com etanol 99%. O extrato etanólico bruto (EEB) foi particionado nas frações hexânica, clorofórmica e acetato de etila. O teor de fenólicos totais foi determinado segundo Li *et al.*, (2008), a capacidade antioxidante segundo Re *et al.* (1999) e Prieto *et al.* (1999) e a atividade fotoprotetora, de acordo com Mansur *et al.* (1986), para todas as partições. O maior teor de fenólicos foi encontrado na fração acetato de etila, seguido pelo EEB, que também demonstram alta capacidade antioxidante pelos métodos testados e valores de FPS adequados para o desenvolvimento futuro de fotoprotetores. Estes dados servirão de subsídios para futuros estudos fitoquímicos, espectroscópicos e farmacotécnicos e para uma melhor discussão em relação aos compostos fenólicos e o potencial biotecnológico da espécie.

PALAVRAS-CHAVE: Compostos Fenólicos; Cascas; *Hymenaea martiana*.

INTRODUÇÃO

O uso de plantas medicinais está presente por toda a história da humanidade, não apenas para o uso alimentar, mas também no uso ritualístico e terapêutico. Durante longo período, as plantas medicinais constituíram o principal recurso terapêutico disponível, mas os avanços tecnológicos trouxeram as drogas sintéticas para o tratamento de enfermidades. Atualmente, a sociedade vem valorizando a utilização de produtos naturais com propriedades terapêuticas, provavelmente devido à busca por hábitos saudáveis, além de problemas com o tratamento eficiente de certas enfermidades (Souza, 2008).

Alguns pesquisadores sugerem que cerca de dois terços das espécies vegetais possuem valor medicinal, sendo o potencial antioxidante de grande relevância, pois podem reduzir o estresse oxidativo nas células, além de serem úteis no tratamento de diversas doenças, como problemas cardiovasculares, processos inflamatórios e até o câncer (Krishnaiah *et al.*, 2011).

A incidência de câncer de pele e o fotoenvelhecimento induzido pela radiação solar crescem significativamente em todo o mundo, sendo o tipo de câncer mais frequente, considerado um grande problema de saúde pública. Caracterizada como um fator genotóxico e potencialmente lesivo à pele, a radiação ultravioleta é dividida em três faixas de comprimento de onda, designadas como UVA (320-400 nm), UVB (290-320 nm) e UVC (290-100 nm), porém a importância clínica deve-se ao comprimento de onda UVA e UVB, visto que a radiação UVC é bloqueada pela camada de ozônio (Pereira, 2007).

Hymenaea martiana é uma árvore nativa da região Nordeste, conhecida popularmente como “jatobá”, utilizada na medicina tradicional para o tratamento de anemia e gastrite (Anselmo *et al.*, 2012). Vários estudos demonstram a composição química de *H. martiana*, com a presença de alguns flavonoides glicosídicos, como astilbina, eucrifina, engelitina, taxifolina e compostos fenólicos (Carneiro *et al.*, 1993; Cechinel-Filho *et al.*, 2000; Almeida *et al.*, 2012).

A preparação do extrato vegetal constitui etapa crítica no desenvolvimento de novos produtos, devido à influência de vários fatores, como a variação na produção dos princípios ativos pelo vegetal, condições extrativas, propriedades dos diversos solventes, bem como as variadas técnicas de extração disponíveis (Brasil, 2011). Técnicas modernas de extração como a Extração Acelerada por Solventes (ASE) têm sido empregada devido à rapidez, menor quantidade de solventes e o controle automatizado do tempo e temperatura, o que pode diminuir a degradação de substâncias e melhor reprodutibilidade da extração (Gomes, 2013). Entretanto, o estudo com o extrato obtido por este método com as cascas de *H. martiana* ainda não foi relatado.

Diante deste contexto, o presente estudo teve como objetivo avaliar o teor de compostos fenólicos, além da avaliação da atividade antioxidante e fotoprotetora do extrato obtido por ASE a partir das cascas de *Hymenaea martiana*.

MATERIAIS E MÉTODOS

Coleta do Material Vegetal

As cascas de *H. martiana* foram coletados na cidade de Petrolina, Pernambuco, Brasil, em julho de 2015, e foram identificados no Herbário da Universidade Federal do Vale do São Francisco (HVASF), com exsicata n° 6444, coordenadas 09°11'04.30" S, 040°18'05.40" W, 357 m de altura. O material foi seco em temperatura média de 40 °C em estufa de circulação de ar (Ethiktechno[®], modelo 420 TD), por um período de 72 horas. Após a secagem e completa estabilização, o material foi pulverizado em moinho de facas Quimis[®].

Obtenção do extrato e frações

As cascas foram submetidas à extração no Instituto Nacional do Semiárido (INSA) em Campina Grande-PB, utilizando o equipamento de Extração Acelerada por Solventes (ASE) Thermo Scientific Dionex[®] ASE 350, equipado com célula extratora de aço inoxidável com fechamento hermético e cartucho de papel 22 x 50 mm, um frasco de lavagem (rinse) e frascos coletores (vidro transparente) com capacidade de 250 mL. Foi utilizado etanol 99% como solvente extrator, temperatura de extração 50 °C, tempo estático 15 minutos, fluxo 5 mL/min, com duas extrações por célula.

Após o processo, a solução extrativa foi concentrada em evaporador Thermo Scientific Rocket Evaporator[®], na temperatura de 45 °C. O solvente residual foi retirado em estufa de ar circulante Ethiktechno[®], modelo 420 TD, a 45 °C por 24 horas, obtendo o Extrato Etanólico Bruto (EEB).

O EEB foi solubilizado numa mistura MeOH : H₂O (3:7 v/v) para obtenção da solução hidroalcoólica I. Esta foi submetida a partição líquido-líquido, em funil de separação, sob agitação manual, de forma exaustiva com hexano, clorofórmio e acetato de etila. Após esse procedimento, os solventes foram evaporados em rotaevaporador a uma temperatura média de 50 °C, fornecendo a fração hexânica, fração clorofórmica e fração acetato de etila.

Determinação do teor de compostos fenólicos totais

O teor de fenóis totais foi mensurado através do método colorimétrico que utiliza o reagente de Folin-Ciocalteu (SIGMA) e ácido gálico como padrão, baseado no método descrito por Li *et al.*, (2008). Para isso, uma alíquota (200 µL) dos extratos e partições foram diluídos e adicionados 1 mL do reagente de Folin-Ciocalteu previamente diluído (1:10) em água destilada, sendo misturados logo em seguida. A mistura foi deixada em repouso por 3 minutos, mantidos na ausência da luz, e posteriormente foram adicionados 800 µL de uma solução estoque de Na₂CO₃ 7,5% e misturados bem. As soluções finais foram deixadas em repouso mantidos na ausência da luz, por 120 minutos. Ao final do processo, a absorbância de cada solução foi determinada em espectrofotômetro (Quimis[®]).

em 735 nm contra o branco (todos os componentes, exceto a amostra em análise) e os resultados foram plotados em um gráfico que correlaciona a absorvância da amostra com sua concentração. Assim, o teor de compostos fenólicos totais dos extratos foi expresso em mg de equivalentes de ácido gálico por grama de amostra (mg EqAG/g), através da curva de calibração do ácido gálico. A curva de calibração foi obtida em concentrações que variaram de 50 a 1000 mg/L, $R^2 = 0,9923$. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

Avaliação da Capacidade Antioxidante Equivalente ao Trolox (TEAC)

Para a determinação da Capacidade Antioxidante Equivalente ao Trolox (TEAC), foi utilizado o método descrito por Re *et al.* (1999), que utiliza o radical ABTS $\cdot+$, que é formado por uma reação química com persulfato de potássio em uma relação estequiométrica de 1:0,5. Uma vez formado o radical ABTS $\cdot+$, o mesmo foi diluído em etanol até obter-se uma medida de absorvância de 0,70 ($\pm 0,02$) em um comprimento de onda de 754 nm, a uma temperatura de equilíbrio de 30 °C. Alíquotas de 20 μ L do extrato e frações foram adicionados em 2 mL do reagente ABTS. Prepararam-se curvas com soluções-padrão de Trolox, na concentração de 10 - 100 μ g/mL, com $R^2 = 0,9918$. Os resultados foram expressos em TEAC, atividade antioxidante equivalente ao Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico) em μ mol TEACg-1 de amostra.

Avaliação da Capacidade Antioxidante Total (TAC)

A Capacidade Antioxidante Total (TAC) foi determinada pelo método do fosfomolibdênio, que se baseia na determinação espectrofotométrica da redução do Mo $^{+4}$ a Mo $^{+5}$, com formação subsequente de fosfato de Mo $^{+5}$, que apresenta absorção máxima a 695 nm (Prieto *et al.*, 1999). Alíquotas de 0,1 mL dos extratos (10 mg/mL) dissolvidas em água destilada (EEB) foram combinadas, em tubo eppendorf, com 1 mL da solução reagente (ácido sulfúrico 600 mM, fosfato de sódio 28 mM e molibdato de amônio 4 mM). Os tubos foram fechados e incubados a 95 °C por 90 min. Após resfriamento, à temperatura ambiente, foi determinada a absorvância a 695 nm. Foi utilizado ácido ascórbico como padrão e a capacidade antioxidante total foi expressa em equivalentes de ácido ascórbico, de acordo com a Equação 1:

$$\text{Capacidade Antioxidante Total (\%)} = \frac{(\text{Abs amostra} - \text{Abs branco})}{(\text{Abs ácido ascórbico} - \text{Abs branco})} \times 100 \quad (1)$$

Avaliação da atividade fotoprotetora

A atividade fotoprotetora foi avaliada utilizando a leitura espectrofotométrica de soluções diluídas, de acordo com o Método de Mansur *et al.* (1986). O extrato e frações foram previamente secos em estufa a 40 °C por 60 minutos. Foram preparadas diluições com as concentrações de 5, 25, 50 e 100 mg/L. Varreduras de 290 a 320 nm, com intervalos de 5 nm foram realizadas. Foi utilizado

um espectrofotômetro (Quimis[®]), com cubetas de quartzo de 1 cm de caminho óptico para aquisição dos espectros.

Os cálculos foram realizados considerando os intervalos de λ determinados (Equação 2).

$$FPS = FC \cdot \sum_{290}^{320} EE(\lambda) \cdot abs(\lambda) \quad (2)$$

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

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O teor de compostos fenólicos totais, capacidade antioxidante equivalente ao Trolox, capacidade antioxidante total e fator de proteção solar (FPS) são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 – Teor de compostos fenólicos totais, capacidade antioxidante equivalente ao Trolox, capacidade antioxidante total e fator de proteção solar no extrato e frações

Amostra	Fenólicos totais (mg EQ ácido gálico/g de extrato)	ABTS-TEAC (%)	Fosfomolibdênio- TAC (%)	FPS
EEB	123,75 ± 7,23	83,75 ± 11,96	46,97 ± 0,04	12,43 ± 1,25
Fração Hexano	78,84 ± 13,45	9,54 ± 3,83	23,99 ± 1,94	0,95 ± 0,63
Fração Clorofórmio	58,28 ± 3,95	23,56 ± 0,52	33,93 ± 3,19	3,36 ± 0,20
Fração Acetato de Etila	202,08 ± 13,41	98,98 ± 1,06	85,97 ± 6,30	12,35 ± 0,70

Legenda: ABTS-TEAC = Capacidade Antioxidante Equivalente ao Trolox pelo método do radical ABTS. Fosfomolibdênio-TAC = Capacidade Antioxidante Total pelo método do fosfomolibdênio.

Apresentando estruturas simples e complexas, sendo constituídos de pelo menos um anel aromático substituído por pelo menos um grupamento hidroxila (Simões *et al.*, 2007), compostos fenólicos são metabólitos secundários originados de plantas e fungos. São produzidos para proteção contra raios UV, insetos, vírus e bactérias, e algumas espécies produzem compostos fenólicos para inibir o crescimento de outras plantas (alelopatia). Apresentam diversas atividades biológicas já

relatadas, como adstringente, atividade anti-inflamatória, antineoplásica, bacteriostática e atividade antioxidante (Heleno *et al.*, 2015).

De acordo com os dados obtidos, o maior teor de compostos fenólicos foi encontrado na fração acetato de etila, seguido pelo extrato etanólico bruto, o que corresponde ao encontrado em outro estudo com esta espécie, porém em valores inferiores. Isto pode ser justificado pelo método extrativo utilizado, e os volumes e diluições utilizados nos métodos de determinação de compostos fenólicos utilizados (Almeida *et al.*, 2012). A polaridade e solubilidade do solvente utilizado nesta fração pode também justificar a maior concentração de compostos fenólicos a partir do extrato etanólico bruto (Roby *et al.*, 2013).

Os dados apresentados neste estudo também demonstram a alta capacidade antioxidante do extrato etanólico bruto e da fração acetato de etila, com $83,75 \pm 11,96\%$ e $98,98 \pm 1,06\%$, respectivamente. A fração acetato de etila apresentou a maior capacidade antioxidante equivalente ao Trolox, com $85,97 \pm 6,30\%$. Vários estudos apontam forte relação entre a presença de compostos fenólicos e atividade antioxidante em plantas medicinais e frutas (Berlowski *et al.*, 2013). Atenção especial tem sido dada às propriedades antioxidantes de plantas medicinais, devido aos antioxidantes estarem relacionados em diversas respostas biológicas como na inflamação e na imunidade (Garg *et al.*, 2012) e apresentarem efeitos indesejáveis reduzidos em relação aos antioxidantes sintéticos (Krishnaiah *et al.*, 2011).

Além das queimaduras solares e câncer de pele, a exposição às radiações UV (ultravioleta) também está relacionada ao envelhecimento cutâneo precoce, que está relacionado à ação da redução das espécies reativas de oxigênio (EROs), extremamente danosas aos tecidos (Velasco *et al.*, 2008). Visando a proteção total da pele não atendida por diversas formulações fotoprotetoras, contendo apenas filtros solares químicos, os extratos vegetais ricos em compostos antioxidantes estão sendo amplamente empregados, pois podem proporcionar a proteção contra os raios UV e neutralizar os radicais livres após exposição solar (Nascimento *et al.*, 2009). Por conta disso, estudos têm pesquisado substâncias antioxidantes que absorvam radiações ultravioleta nas faixas UVA (320-400 nm) e UVB (290-320 nm), e que assim possam ser empregadas como fotoprotetores naturais. Os compostos fenólicos, como os flavonoides, portanto, são grandes candidatos (Carneiro *et al.*, 2014). Com esta razão, foi avaliado o potencial fotoprotetor das cascas de jatobá (*H. martiana*), e valores relevantes foram encontrados. Provavelmente devido às altas concentrações de compostos fenólicos e expressiva capacidade antioxidante, o extrato etanólico bruto e a fração acetato de etila apresentaram maiores valores, com $12,43 \pm 1,25$ e $12,35 \pm 0,70$, respectivamente. Segundo a ANVISA (Brasil, 2012), o valor mínimo para FPS é de 6,0, portanto, estas amostras apresentaram valores adequados para o desenvolvimento futuro de fotoprotetores, com uma importante atividade antioxidante.

CONCLUSÕES

Este estudo demonstrou que o extrato etanólico bruto obtido por ASE e a fração acetato de etila apresentaram teores relevantes de compostos fenólicos e expressiva capacidade antioxidante, sendo, podendo ser, portanto, importante fonte de compostos antioxidantes. A avaliação da atividade fotoprotetora ainda relevou um grande potencial cosmético para a espécie, podendo este estudo servir como base para o futuro desenvolvimento de formulações tópicas.

Estes dados servirão de subsídios para futuros estudos fitoquímicos, espectroscópicos e farmacotécnicos mais aprofundados, para uma melhor discussão em relação aos compostos fenólicos e o potencial biotecnológico da espécie.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a colaboração das agências brasileiras CAPES e FACEPE pelo suporte financeiro, e a colaboração do Instituto Nacional do Semiárido (Campina Grande – PB) e do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de Pernambuco.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, J.R.G.S.; SILVA, M.E.G.C.; GUIMARÃES, A.L.; OLIVEIRA, A.P.; ARAÚJO, C.S.; SIQUEIRA-FILHO, J.A.; FONTANA, A.P.; DAMASCENO, P.K.F.; BRANCO C.R.C.; BRANCO, A. (2012). HPLC-DAD analysis and antioxidant activity of *Hymenaea martiana* Hayne (Fabaceae). *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research* (4-2), pp. 1160-1166.
- ANSELMO, A.F.; SILVA, C.G.; MARINHO, M.G.V.; ZANELLA, F.C.V.; XAVIER, D.A. (2012). Levantamento etnobotânico de plantas medicinais comercializadas por raizeiros em uma feira livre no município de Patos – PB. *Biofar, Revista de Biologia e Farmácia* (Especial), pp. 39-48.
- BERLOWSKI, A., ZAWADA, K., WAWER, I. AND PARADOWSKA, K. (2013) Antioxidant Properties of Medicinal Plants from Peru. *Food and Nutrition Sciences* (4), pp.71-77.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Formulário de Fitoterápicos da Farmacopéia Brasileira*. 1ª Edição, ANVISA. Brasília, 2011.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 30 de 1 de junho de 2012. Aprova o Regulamento Técnico Mercosul sobre Protetores Solares em Cosméticos e dá outras providências. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília, 2012.
- CARNEIRO, E.; CALIXTO, J.B.; DELLE MONACHE, F.; YUNES, R.A. Isolation chemical identification and pharmacological evaluation of eucryphin, astilbin and engelitin obtained from the bark of *Hymenaea martiana*. (1993). *International Journal of Pharmacognosy* (31-1), pp. 38-46.
- CARNEIRO, F.M.; SILVA, M.J.P.; BORGES, L.L.; ALBERNAZ, L.C.; COSTA, J.D.P. (2014). Tendências dos estudos com plantas medicinais no Brasil. *Revista Sapiência*, (3-2), pp.44-75.
- CECHINEL-FILHO, V.; VAZ, Z.R.; ZUNINO, L.; CALIXTO, J.B.; YUNES, R.A. (2000). Antinociceptive and anti-oedematogenic properties of astilbin, taxifolin and some related compounds. *Drug Research* (50-3), pp. E281-E285.
- GARG, D., SHAIKH, A., MULEY, A. AND MARAR, T. (2012) In-Vitro Antioxidant Activity and Phytochemical Analysis in Extracts of *Hibiscus rosasinensis* Stem and Leaves. *Free Radicals and Antioxidants* (2), pp. 3-6.

- GOMES, S.V.F. *Aplicação do planejamento box-behnken na otimização do método de extração de flavonoides usando Extração Acelerada com Solventes (ASE) e quantificação de marcadores químicos por CLAE-DAD-UV em espécies do gênero Passiflora*. 2013. 161f. Tese (Doutorado em Química Orgânica) – Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2013.
- HELENO, S.A.; MARTINS, A.; QUEIROZ, M.J.R.P.; FERREIRA, I.C.F.R. (2015). Bioactivity of phenolic acids: Metabolites versus parent compounds: a review. *Food Chemistry* (173), pp. 501-513.
- KRISHNAIAH, D.; SARBATLY, R.; NITHYANANAM, R. (2011). A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. *Food and Bioproducts Processing*, (89), pp. 217–223.
- LI, A.B.; WONGA, C.C.; KA-WING, C.; CHEN, F. (2008) Antioxidant Properties in Vitro and Total Phenolic Contents in Methanol Extracts from Medicinal Plants. *Swiss Society of Food Science and Technology* (41), pp. 385-390.
- MANSUR, J.S.; BREDER, M.V.R.; MANSUR, M.C.A.; AZULAY, R.D. (1986). Determinação do fator de proteção solar por espectrofotometria. *Anais Brasileiros de Dermatologia* (61), pp.121-124.
- PEREIRA, B.K. *Avaliação do efeito fotoprotetor de três extratos de plantas da antártica por diferentes modelos biológicos*. 2007. 91f. Dissertação (Mestrado em Biologia Molecular e Celular) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.
- PRIETO, P.; PINEDA, M.; AGUILAR, M. (1999). Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a Phosphomolybdenum Complex: Specific application to the determination of vitamin E. *Analytical Biochemistry* (269), pp. 337-341.
- RE, R; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine* (26), pp.1231–1237.
- ROBY, M.H.H., SARHAN, M.A., SELIM, K.A.H. AND KHALEL, I.K. (2013) Evaluation of Antioxidant Activity, Total Phenols and Phenolic Compounds in Thyme (*Thymus vulgaris* L.), Sage (*Salvia officinalis* L.), and Marjoram (*Origanum majorana* L.) Extracts. *Industrial Crops and Products* (43), pp. 827-831.
- SIMÕES, C.M.O. et al. (2007). *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 6.ed. Porto Alegre: UFRGS; Florianópolis: UFSC, p. 277.
- SOUZA, A. C. M. SILVA, M. R. R. *Potencial antifúngico de extratos de Hymenaea martiana*. Dissertação de Mestrado. Medicina Tropical - Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública. Universidade Federal de Goiás. Goiânia, 2008.
- VELASCO MVR, BALOGH TS, PEDRIALI CA, SARRUF FD, PINTO CASO, KANEKO TM, BABY AR. (2008). Associação da Rutina com p-Metoxicinamato de Octila e Benzofenona-3: Avaliação In Vitro da Eficácia Fotoprotetora por Espectrofotometria de Refletância. *Latin American Journal of Pharmacy*; (27), pp. 23-27.



CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho

“POTENCIAL ANTIOXIDANTE E FOTOPROTETOR DE HYMENAEA MARTIANA HAYNE (FABACEAE): UMA PLANTA MEDICINAL NATIVA DO VALE DO SÃO FRANCISCO”

foi apresentado no I Simpósio da Bacia Hidrográfica do Rio São Francisco, realizado no Espaço Multieventos da Univas/Juazeiro-BA, no período de 5 a 9 de junho de 2016, e de autoria de:

Fernanda Granja da Silva Oliveira, Juliane Maria dos Santos Silva, Ana Paula Sant'Anna da Silva, Amanda Dias de Araújo Uchôa, Alexandre Gomes da Silva, Márcia Vanusa da Silva e Jackson Roberto Guedes da Silva Almeida.

Juazeiro, 10 de junho de 2016

Anivaldo de Miranda Pinto
Presidente do CBHSF

Renato Garcia Rodrigues
Coordenador Geral do Evento

REALIZAÇÃO



ORGANIZAÇÃO



APOIO



Anexo V- Resumo expandido publicado nos Anais do V Encontro Anual 2018 de Biofísica da UFPE.



DESREPLICAÇÃO DE FLAVONOIDES DE *Hymenaea martiana* Hayne POR LC-MS/MS

Fernanda Oliveira^{1*}, Anna Paula Sant'Anna da Silva², Amanda Dias de Araújo³, Joelma Pessoa Gonçalves², Alexandre Gomes da Silva³, Hortênsia Barbosa Pinto⁴, Suzana Vieira Rabêlo⁵, Sarah Raquel Gomes de Lima-Saraiva⁵, Vera Lúcia de Menezes Lima², Márcia Vanusa da Silva², Larissa Araújo Rolim, Jackson Roberto Guedes da Silva Almeida⁵

¹Pós-graduação em Biotecnologia, UEFS; ²Departamento de Bioquímica UFPE; ³INSA; ⁴IFSertão-PE; ⁵Núcleo de Estudos e Pesquisas de Plantas Mediciniais, UNIVASF; ⁶Central de Análise de Fármacos, Medicamentos e Alimentos, UNIVASF. *fernanda.gso@hotmail.com

INTRODUÇÃO

O uso de plantas medicinais está presente por toda a história da humanidade, não apenas para o uso alimentar, como também no uso terapêutico. Durante longo período, as plantas medicinais constituíram o principal recurso terapêutico disponível, mas os avanços tecnológicos trouxeram as drogas sintéticas para o tratamento de enfermidades. Atualmente, a sociedade vem valorizando a utilização de produtos naturais com propriedades terapêuticas, devido à busca por hábitos saudáveis, além de problemas com o tratamento eficiente de certas enfermidades (SOUZA, 2008).

Hymenaea martiana é uma árvore nativa da região Nordeste, conhecida popularmente como “jatobá”, utilizada na medicina tradicional para o tratamento de anemia e gastrite (ANSELMO et al., 2012). Vários estudos demonstram a composição química de *H. martiana*, com a presença de alguns flavonoides glicosídicos, como astilbina, eucrifina, engelitina, taxifolina e compostos fenólicos (CARNEIRO et al., 1993;

CECHINEL-FILHO et al., 2000; ALMEIDA et al., 2012).

Diante deste contexto, o presente estudo teve como objetivo realizar uma desreplicação para identificar os flavonoides no extrato obtido partir das cascas de *Hymenaea martiana*.

MATERIAIS E MÉTODOS

As cascas de *H. martiana* foram coletados na cidade de Petrolina, Pernambuco, Brasil, em julho de 2015, e foram identificados no Herbário da Universidade Federal do Vale do São Francisco

(HVASF), com exsicata n° 6444, coordenadas 09°11'04.30" S, 040°18'05.40" W, 357 m de altura. O material foi seco em temperatura média de 40 °C em estufa de circulação de ar (Ethiktechno[®], modelo 420 TD), por um período de 72 horas. Após a secagem e completa estabilização, o material foi pulverizado em moinho de facas Quimis[®].

As cascas foram submetidas à extração no Instituto Nacional do Semiárido (INSA) em Campina Grande-PB, utilizando o equipamento de Extração Acelerada por

Solventes (ASE) Thermo Scientific Dionex® ASE 350, equipado com célula extratora de aço inoxidável com fechamento hermético e cartucho de papel 22 x 50 mm, um frasco de lavagem (rinse) e frascos coletores (vidro transparente) com capacidade de 250 mL. Foi utilizado etanol 99% como solvente extrator, temperatura de extração 50 °C, tempo estático 15 minutos, fluxo 5 mL/min, com duas extrações por célula.

Após o processo, a solução extrativa foi concentrada em evaporador Thermo Scientific Rocket Evaporator®, na temperatura de 45 °C. O solvente residual foi retirado em estufa de ar circulante Ethiktechno®, modelo 420 TD, a 45 °C por 24 horas, obtendo o Extrato Etanólico Bruto (EEB-Hm).

O EEB-Hm foi solubilizado numa mistura MeOH : H₂O (3:7 v/v), que foi submetida a partição líquido-líquido, em funil de separação, sob agitação manual, de forma exaustiva com hexano, clorofórmio e acetato de etila. Após esse procedimento, os solventes foram evaporados em rotaevaporador a uma temperatura média de 50 °C, fornecendo a fração hexano (Hm-Fr.Hx), fração clorofórmio (Hm-Fr.CHCl₃) e fração acetato de etila (Hm-Fr.AcOEt). A análise em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada ao espectrômetro de massas (LC-MS/MS) foi desenvolvida NPPNSRibeirão Preto, com a fração Hm-Fr.AcOEt, pois foi a fração com melhores resultados no teor de compostos fenólicos totais e flavonoides totais. Esta análise foi realizada utilizando um equipamento de CLAE (Shimadzu Prominence®), equipada com duas bombas binárias (LC-20AD), unidade de degaseificação (DGU-20A), amostrador automático (SIL-20AHT), forno (CTO-20A),

módulo de comunicação (CBM-20A), detector de arranjo diodo (SPD-M20A) e uma coluna de fase reversa Luna - Phenomenex®, 250 mm x 4.6 mm, 5 µm). A fase móvel foi composta por uma mistura de solvente A (0,1% ácido fórmico em água ultrapurificada) e solvente B (0,1% de ácido fórmico em metanol), seguindo um gradiente de concentração, com fluxo de 1 mL/min.

O cromatógrafo foi acoplado a um espectrômetro de massas Amazon SL ion trap (Bruker Daltonics®), equipado com ionizador eletrospray e analisador ion trap, nas seguintes condições: capilaridade 3500 V; placa final 500 V; nebulizador 60 psi; fluxo de gás 10,0 L.min⁻¹ e temperatura do gás 330 °C.

Os resultados foram analisados utilizando o banco de dados on-line do website GNPS (Global Natural Product Social Molecular Networking) (GNPS, 2017; WANG et al., 2016). Os dados obtidos no cromatógrafo acoplado ao espectrômetro de massas foram convertidos para o formato mzXML diretamente no software DataAnalysis 4.2 (Bruker Daltonics®), e submetidos à análise de desreplcação no site do GNPS, e as substâncias foram consideradas identificadas na amostra se os espectros de massa obtivessem pelo menos seis íons que combinam e pontuação de cosseno (cosine score) acima de 0,5 (OLIVEIRA et al., 2017). As fórmulas moleculares e nomenclaturas das substâncias foram obtidas no PubChem (PUBCHEM, 2017) e ChemSpider (CHEMSPIDER, 2017).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os estudos de desreplcação são caracterizados pela separação de componentes de matrizes complexas, com a utilização de métodos

cromatográficos e espectroscópicos, além de estudos de bioatividade. Técnicas hífenadas destacam-se para este tipo de estudo, baseando-se na comparação das informações obtidas com bancos de dados, resultando na detecção de compostos já conhecidos ou até na elucidação estrutural de novos compostos (LANG et al., 2008). Vários compostos naturais já foram identificados utilizando o método de desrepliação, como flavonoides glicosilados (WARIDEL et al., 2001; OLIVEIRA et al., 2017), derivados do ácido cafeico (PAULI et al., 1999), flavonoides e derivados de flavonoides (WOLFENDER et al., 2000) e isoflavonoides (LAMBERT et al., 2005). A Figura 1 apresenta o de íons totais (TIC) da fração Hm-Fr.AcOEt.

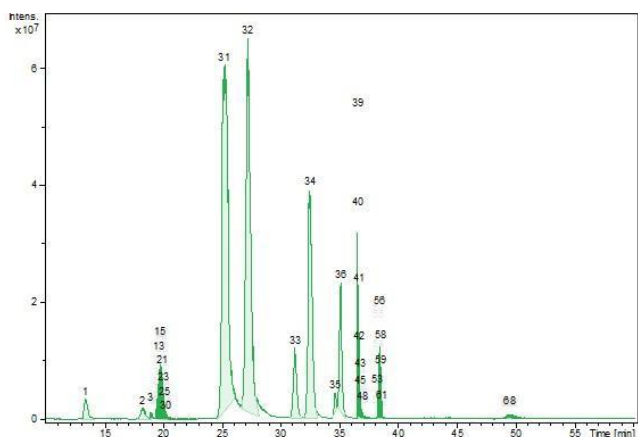


Figura 1. Cromatograma de Íons Totais (TIC) obtido com a análise em LC-MS/MS da fração HmFr.ActOEt (Fonte: Autoria própria).

Na desrepliação e detecção de flavonoides por LC-MS/MS, utilizando como banco de dados online o website GNPS, 18 flavonoides conhecidos foram detectados (Tabela 1), dentre dois flavanonóis, seis flavonóis, quatro isoflavonas, cinco flavonas e um flavan-3-ol.

O flavanonol astilbina foi detectado, flavonoide previamente identificado como o componente majoritário de *Hymenaea martiana* (CECHINEL et al., 2000). A astilbina é um flavonoide bioativo, com várias atividades farmacológicas já relatadas, como anti-inflamatória (CARNEIRO et al., 1993; LU et al., 2014; DING et al., 2014), anti-isquêmico (DIAO et al., 2014), tratamento de doenças auto-imunes (GUO et al., 2015), antinociceptivo e antiedematogênico (CECHINEL et al., 2000) e antioxidante (ZHANG et al., 2009; BAKOTA et al., 2015).

Dentre os flavonoides identificados na fração Hm-Fr.AcOEt, apenas a quercetina apresenta atividade fotoprotetora relatada na literatura (STEVANATO et al., 2014; CHOQUENET et al., 2008; EVANS-JOHNSON et al., 2013; VICENTINI et al., 2011). Também apresenta atividade antioxidante (BOOTS et al., 2008; GARDI et al., 2015; RAVICHANDRAN et al., 2014) e atividade anti-inflamatória relatada (GARDI et al., 2015).

A atividade antioxidante já foi relatada dentre os demais flavonoides identificados, como a taxifolina (CHOBOT et al., 2016), isoquercetina (JIN et al., 2007; VONGSAK et al., 2015), quercetina-7-O-ramnosídeo (LIU et al., 2010), kaempferol-7-O- α -ramnosídeo (CHUA et al., 2008), quercitrina (ZHU et al., 2017), ononina (YU et al., 2005), glicitina (GENOVESE et al., 2005), sissotrina (ABDELHADY et al., 2015), amentoflavona (KIM et al., 1998; TARALLO et al., 2011), baicalina (JIN et al., 2007), isovitexina (HE et al., 2016), C-hexosil-apigenina (FERRERES et al., 2009), nobiletina (CHEN et al., 2017). Os flavonoides identificados demonstram o potencial bioativo do extrato das cascas de

Hymenaea martiana.

A Tabela 1 apresenta os flavonoides detectados por LC-MS/MS na fração Hm-AcOEt.

Tabela 1 – Flavonoides detectados por desreplicação (LC-MS/MS) a partir da fração Hm-Fr.AcOEt, obtida a partir do extrato bruto das cascas de *Hymenaea martiana*.

Classe do flavonoide	Metabólito	Rt (min)	Fórmula Molecular	m/z observada (ESI ⁻)
Flavanonol	Astilbina	36,5	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₁	449
	Taxifolina	16,1	C ₁₅ H ₁₂ O ₇	303
Flavonóis	Isoquercetina	36,9	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	463
	Quercetina-3-O-alfarnopiranosídeo	37,8	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	447
	Quercetina-7-O-raminosídeo	42,25	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	449
	Kaempferol-7-O- α -Lramnosídeo	41,8	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	431
	Quercetina	13,0	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	301
Isoflavonas	Quercitrina	40,4	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	447
	Ononina	36,3	C ₂₂ H ₂₂ O ₉	431
	Glicitina	41,8	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₀	447
	6''-O-Acetil-Glicitina	41,9	C ₂₄ H ₂₄ O ₁₁	489
	Sissotrina	40,5	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₀	447
Flavonas	Amentoflavona	21,8	C ₃₀ H ₁₈ O ₁₀	539
	Baicalina	34,3	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₁	445
	Isovitexina	44,1	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	415
	C-Hexosil-apigenina	42,1	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₀	433
	Nobiletina	46,2	C ₂₁ H ₂₂ O ₈	403
Flavan-3-ol	Isoxantoflavan-3-ol	11,4	C ₂₀ H ₂₂ O ₅	369

Legenda: Rt= Tempo de retenção; m/z= relação massa/carga; ESI⁻= ionização por eletrospray no modo negativo.

Estudos utilizando a estratégia de biomonitoramento que visam o isolamento e purificação para a identificação ou elucidação destes e de flavonoides desconhecidos / não identificados estão sendo desenvolvidos. Métodos cromatográficos analíticos e preparativos (cromatografia em coluna, CLAE e cromatografia em camada delgada) e espectroscópicos (espectrometria de massas e ressonância magnética nuclear) estão sendo utilizados para tal fim.

CONCLUSÕES

O estudo fitoquímico do extrato bruto das cascas de *Hymenaea martiana* demonstra que os compostos fenólicos, principalmente os flavonoides, constituem a classe majoritária da composição química do extrato. Flavonoides foram identificados na espécie pela primeira vez, e os flavonoides astilbina e taxifolina foram identificados no extrato, corroborando estudos anteriores. O desenvolvimento de estudos mais aprofundados torna-se necessário para a identificação dos compostos desconhecidos ou não identificados, visando o estudo fitoquímico aprofundado da espécie em estudo.

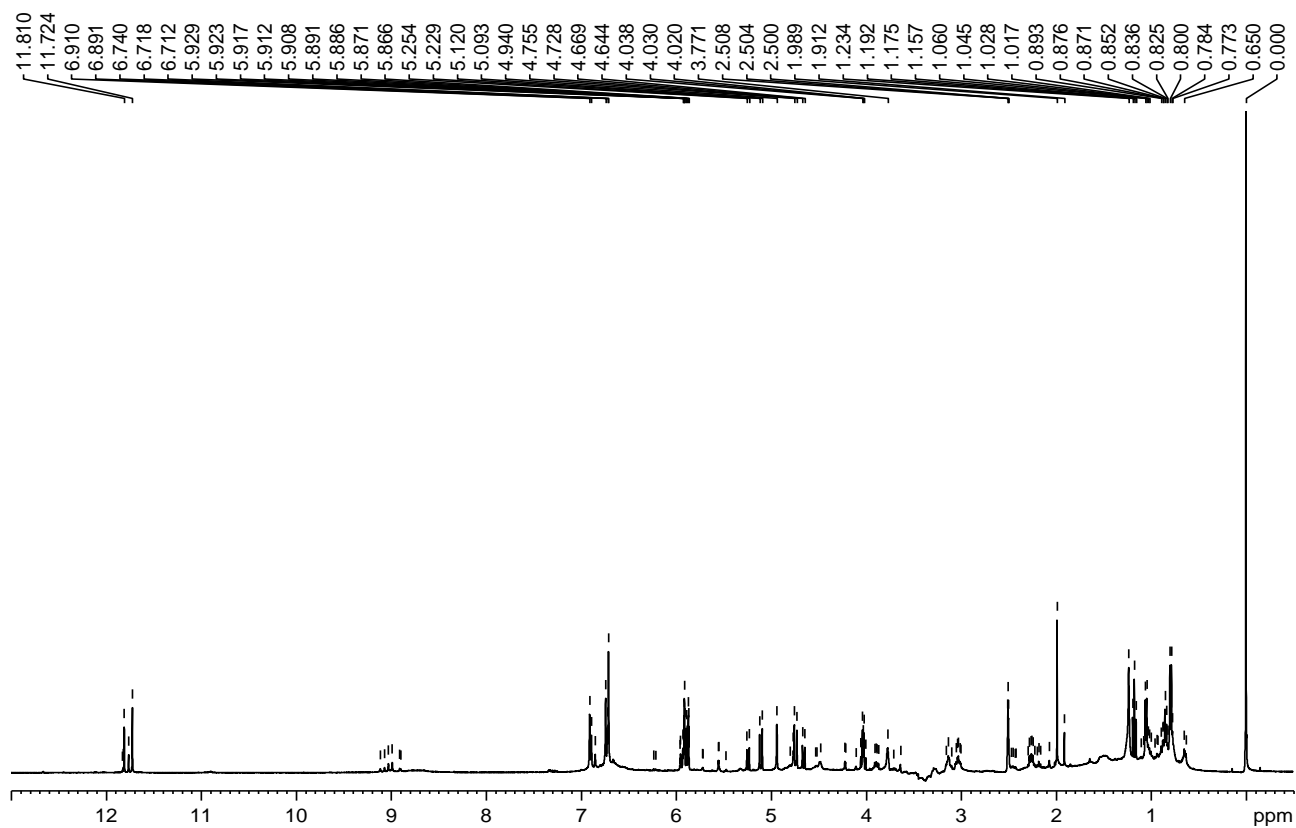
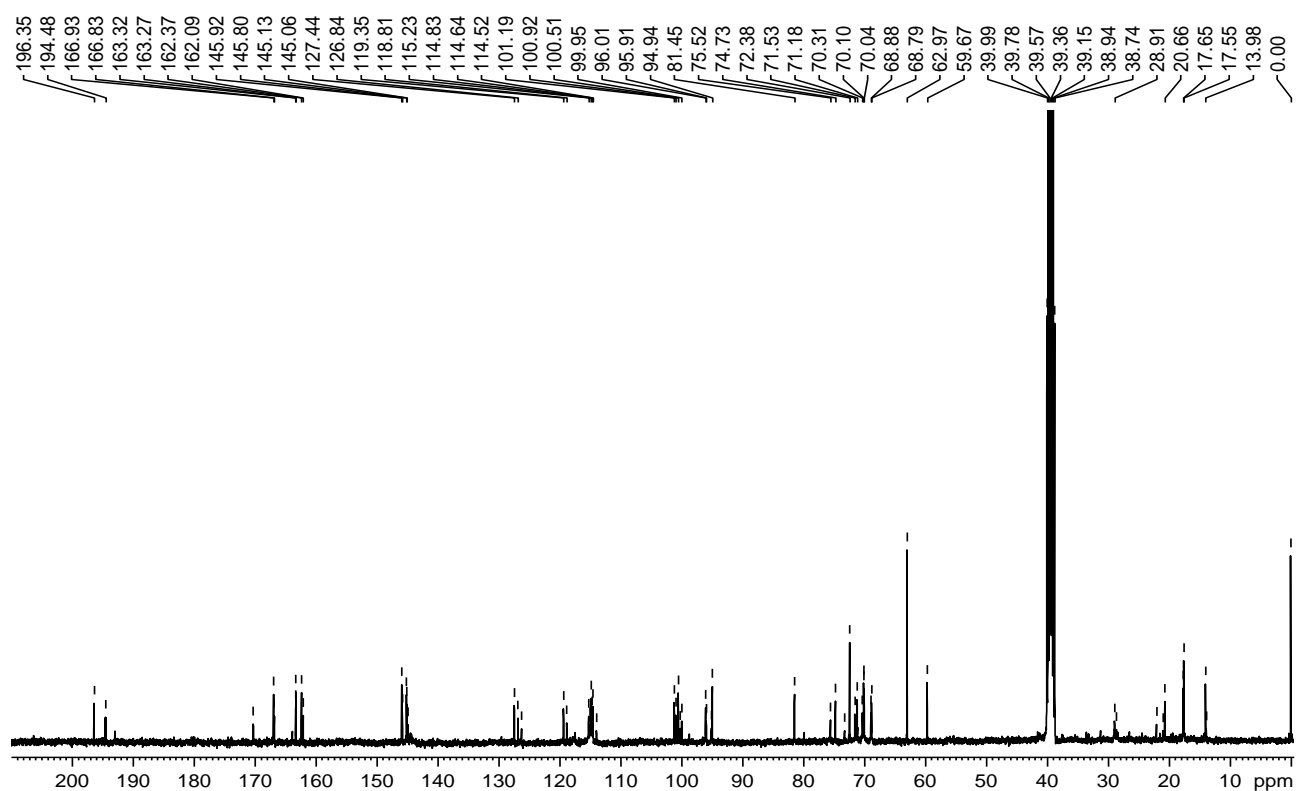
REFERÊNCIAS

- ABDELHADY, M.I.S.; KAMAL, A.M.; OTHMAN, S.M.; MUBARAK., M.S.; HADDA, T.B. Total polyphenolic content, antioxidant, cytotoxic, antidiabetic activities, and polyphenolic compounds of *Sophora japonica* grown in Egypt. **Medicinal Chemistry Research**, v. 24, p. 482-495, 2015.
- ALMEIDA, J.R.G.S.; SILVA, M.E.G.C.; GUIMARÃES, A.L.; OLIVEIRA, A.P.; ARAÚJO, C.S.; SIQUEIRA-FILHO, J.A.; FONTANA, A.P.; DAMASCENO, P.K.F.; BRANCO, C.R.C.; BRANCO, A. HPLC-DAD analysis and antioxidant activity of *Hymenaea martiana* Hayne (Fabaceae). **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, v. 4, n. 2, p. 1160-1166, 2012.
- ANSELMO, A.F.; SILVA, C.G.; MARINHO, M.G.V.; ZANELLA, F.C.V.; XAVIER, D.A. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais comercializadas por raizeiros em uma feira livre no município de Patos - PB. **Biofar, Revista de Biologia e Farmácia**, v. Especial, p. 39-48, 2012.
- BAKOTA, E.L.; WINKLER-MOSER, J.K.; BERHOW, M.A.; PALMQUIST, D.E.; LIU, S.X. Antioxidant activity of hybrid grape pomace extracts derived from midwestern grapes in bulk oil and oil-in-water emulsions. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, vol. 92, p. 1333-1348, 2015.
- BOOTS, A.W.; HAENEN, G.R.M.M.; BAST, A. Health effects of quercetin: From antioxidant to nutraceutical. **European Journal of Pharmacology**, v. 585, p. 325-337, 2008.
- CARNEIRO, E.; CALIXTO, J.B.; DELLE MONACHE, F.; YUNES, R.A. Isolation chemical identification and pharmacological evaluation of eucryphin, astilbin and engelitin obtained from the bark of *Hymenaea martiana*. **International Journal of Pharmacognosy**, v. 31, n. 1, p. 38-46, 1993.
- CECHINEL-FILHO, V.; VAZ, Z.R.; ZUNINO, L.; CALIXTO, J.B.; YUNES, R.A. Antinociceptive and anti-oedematogenic properties of astilbin, taxifolin and some related compounds. **Drug Research**, v. 50, n. 3, p. E281-E285, 2000.
- CHEMSPIDER, *Search and share chemistry*. Disponível em: < <http://www.chemspider.com/>>. Acesso em 13/11/2017.
- CHEN, X.M.; TAIT, A.R.; KITTS, D.D. Flavonoid composition of orange peel and its association with antioxidant and antiinflammatory activities. **Food Chemistry**, v. 218, p. 15-21, 2017.
- CHOBOT, V.; HADACEK, F.; BACHMANN, G.; WECKWERTH, W.; KUBICOVA, L. Pro- and antioxidant activity of three selected flavan type flavonoids: catechin, eriodictyol and taxifolin. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, p. 1-9, 2016.
- CHOQUENET, B.; COUTEAU, C.; PAPARIS, E.; COIFFARD, L.J.M. Quercetin and rutin as potential sunscreen agents: determination of efficacy by an in vitro method. **Journal of Natural Products**, v. 71, n. 6, p. 1117-1118, 2008.
- CHUA, M.T.; TUNG, Y.T.; CHANG, S.T. Antioxidant activities of ethanolic extracts from the twigs of *Cinnamomum osmophloeum*. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 1918-1925, 2008.
- DIAO, H.; KANG, Z.K.; HAN, F.; JIANG, W. Astilbin protects diabetic rat heart against ischemia-reperfusion injury via blockade of HMGB1-dependent NF- κ B signaling pathway. **Food and Chemical Toxicology**, v. 63, p. 104-110, 2014.
- DING, Y.; LIANG, Y.; DENG, B.; QIAO, A.; WU, K.; XIAO, W.; GONG, W. Induction of TGF- β and IL-10 production in dendritic cells using astilbina to inhibit dextran sulfate sodium-induced colitis. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 446, p. 529-534, 2014.
- EVANS-JOHNSON, J.A.; GARLICK, J.A.; JOHNSON, E.J.; WANGA, X.D.; CHEN, C.Y.O. A pilot study of the photoprotective effect of almond phytochemicals in a 3D human skin equivalent. **Journal of Photochemistry and Photobiology B**, v. 126, p. 17-25, 2013.
- FERRERES, F.; SOUSA, C.; VALENTÃO, P.; ANDRADE, P.B.; SEABRA, R.M.; GIL-IZQUIERDO, A. New C-deoxyhexosyl flavones and antioxidante properties of *Passiflora edulis* leaf extract. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 10187-10193, 2007.

- GARDI, C.; BAUEROVA, K.; STRINGA, B.; KUNCIROVA, V.; SLOVAK, L.; PONIST, S.; DRAFI, F.; BEZAKOVA, L.; TEDESCO, I.; ACQUAVIVA, A.; BILOTTO, S.; RUSSO, G.L. Quercetin reduced inflammation and increased antioxidant defense in rat adjuvant arthritis. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 583, p. 150-157, 2015.
- GENOVESE, M.I.; HASSIMOTTO, N.M.A.; LAJOLO, F.M. Isoflavone profile and antioxidant activity of Brazilian soybean varieties. **Food Science and Technology International**, v. 11, n. 3, p.205-211, 2005.
- GNPS: *Global Natural Products Social Molecular Networking*. Disponível em: <<https://gnps.ucsd.edu>>. Acesso em 13/11/2017.
- GUO, L.; LIU, W.; LU, T.; GUO, W.; GAO, J.; LUO, Q.; WU, X.; SUN, Y.; WU, X.; SHEN, Y.; XU, Q. Decrease of functional activated T and B cells and treatment of glomerulonephritis in lupus-prone mice using a natural flavonoid astilbina. **PLoS ONE**, v. 10, n. 4, e0124002, p. 1-15, 2015.
- HE, M.; MIN, J.W.; KONG, W.L.; HE, X.H.; LI, J.X.; PENG, B.W. A review on the pharmacological effects of vitexin and isovitexin. **Fitoterapia**, v. 115, p. 74-85, 2016.
- JIN, Y.; LU, Y.; HAN, G.; et al. Comparative study on in vitro antifree radical activities of quercetin, isoquercetin, and rutin. **Chinese Traditional Patent Medicine**, vol. 38, n. 3, p. 408-412, 2007.
- KIM, H.K.; SON, K.H.; CHANG, H.W.; KANG, S.S.; KIM, H.P. Amentoflavone, a plant biflavone: A new potential antiinflammatory agent. **Archives of Pharmacal Research**, v. 21, n. 4, p. 406-410, 1998.
- LAMBERT, M.; STRK, D.; HANSEN, S. H.; SAIRAFIANPOUR, M.; JAROSZEWSKI, J.W. Rapid extract dereplication using HPLC-SPENMR: analysis of isoflavonoids from *Smirnowia iranica*. **Journal of Natural Products**, v. 68, p. 1500-1509, 2005.
- LANG, G.; MAYHUDIN, N. A.; MITOVA, M. I.; SUN, L.; VAN DER SAR, S.; BLUNT, J. W.; COLE, A. L. J.; ELLIS, G.; LAATSCH, H.; MUNRO, M. H. G. Evolving trends in the dereplication of natural product extracts: new methodology for rapid, small-scale investigation of natural product extracts. **Journal of Natural Products**, v. 71, p. 1595-1599, 2008.
- LIU, H.; MOU, Y.; ZHAO, J.; WANG, J.; ZHOU, L.; WANG, M.; WANG, D.; H. J.; YU, Z.; YANG, F. Flavonoids from *Halostachys caspica* and their antimicrobial and antioxidant activities. **Molecules**, vol. 15, p. 7933-7945, 2010.
- LU, C.L.; ZHU, W.; WANG, M.; XU, X.J.; LU, C.J. Antioxidant and anti-inflammatory activities of phenolic-enriched extracts of *Smilax glabra*. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2014, 910438, p.1-8, 2014.
- OLIVEIRA, G.G.; CARNEVALE-NETO, F.; DEMARQUE, D.P.; PEREIRAJÚNIOR, J.A.S.; PEIXOTO-FILHO, R.C.S.; MELO, S.J.; ALMEIDA, J.R.G.S.; LOPES, J.L.C.; LOPES, N.P. Dereplication of flavonoid glycoconjugates from *Adenocalymma imperatoris-maximilianii* by untargeted tandem mass spectrometry-based molecular networking. **Planta Medica**, v. 83, p. 636-646, 2017. PAULI, G. F.; KUCZKOWIAK, U.; NAHRSTEDT, A. Solvent effects in the structure dereplication of caffeoyl quinic acids. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 37, p. 827-836, 1999.
- PUBCHEM. *Open Chemistry Database*. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>>. Acesso em 13/11/2017.
- RAVICHANDRAN, R.; RAJENDRAN, M.; DEVAPIRIAM, D. Antioxidant study of quercetin and their metal complex and determination of stability constant by spectrophotometry method. **Food Chemistry**, v. 146, 472-478, 2014.

- SOUZA, A. C. M.; SILVA, M. R. R. *Potencial antifúngico de extratos de Hymenaea martiana*. **Dissertação** (Mestrado em Medicina Tropical), Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2008.
- STEVANATO, R.; BERTELLE, M.; FABRIS, S. Photoprotective characteristics of natural antioxidant polyphenols. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 69, p. 71-77, 2014.
- TARALLO, V.; LEPORE, L.; MARCELLINI, M. PIAZ, D.F.; TUDISCO, L.; PONTICELLI, S.; LUND, F.W.; ROEPSTORFF, P.; ORLANDI, A.; PISANO, C.; TOMMASI, N.; FALCO, S. The biflavonoid amentoflavone inhibits neovascularization preventing the activity of proangiogenic vascular endothelial growth factors. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, v. 22, p. 19641-19651, 2011.
- VICENTINI, F.T.M.C.; HE, T.; SHAO, Y.; FONSECA, M.J.V.; VERRI-JR, W.A.; FISHER, G.J.; XU, Y. Quercetin inhibits UV irradiation-induced inflammatory cytokine production in primary human keratinocytes by suppressing NF- κ B pathway. **Journal of Dermatological Sciences**, v. 61, p. 162-168, 2011.
- VONGSAK, B.; MANGMOOL, S.; GRITSANAPAN, W. Antioxidant activity and induction of mRNA expressions of antioxidant enzymes in HEK-293 cells of *Moringa oleifera* leaf extract. **Planta Medica**, v. 81, p. 1084-1089, 2015.
- WANG, M. et al. Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Product Social Molecular Networking. **Nature Biotechnology**, v. 34, n. 8, p. 828-837, 2016.
- WARIDEL, P.; WOLFENDER, J-L.; NDJOKO, K.; HOBBY, K. R.; MAJOR, H. J.; HOSTETTMANN, K. Evaluation of quadrupole time-offlight tandem mass spectrometry and ion-trap multiple-stage mass spectrometry for the differentiation of C-glycosidic flavonoid isomers. **Journal of Chromatography A**, v. 926, p. 29-41, 2001. WOLFENDER, J-L.; WARIDEL, P.; NDJOKO, K.; HOBBY, K. R.; MAJOR, H. J.; HOSTETTMANN, K. Evaluation of Q-ToF-MS/MS and multiple stage IT-MSⁿ for the dereplication of flavonoids and related compounds in crude plant extracts. **Analysis**, v. 28, p. 895906, 2000.
- YU, D.; DUAN, Y.; BAO, Y.; WEI, C.; AN, L. Isoflavonoids from *Astragalus mongholicus* protect PC12 cells from toxicity induced by L-glutamate. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 98, p. 89-94, 2005.
- ZHANG, Q.F.; ZHANG, Z.R.; CHEUNG, H.Y. Antioxidant activity of rhizoma *Smilacis glabrae* extracts and its key constituent-astrilbin. **Food Chemistry**, v. 115, p. 297-303, 2009.
- ZHU, L.; CHEN, J.; TAN, J.; LIU, X.; WANG, B. Flavonoids from *Agrimonia pilosa* Ledeb: Free radical scavenging and DNA oxidative damage protection activities and analysis of bioactivity-structure relationship based on molecular and electronic structures. **Molecules**, v. 22, 195, p. 1-11, 2017.

Anexo VI – Espectros de RMN para a fração Hm-Fr.AcOEt

Figura 1. Espectro de RMN de ^1H de **Hm-Fr.AcOEt** (400 MHz, DMSO-d_6).Figura 2. Espectro de RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ de **Hm-Fr.AcOEt** (100 MHz, DMSO-d_6).

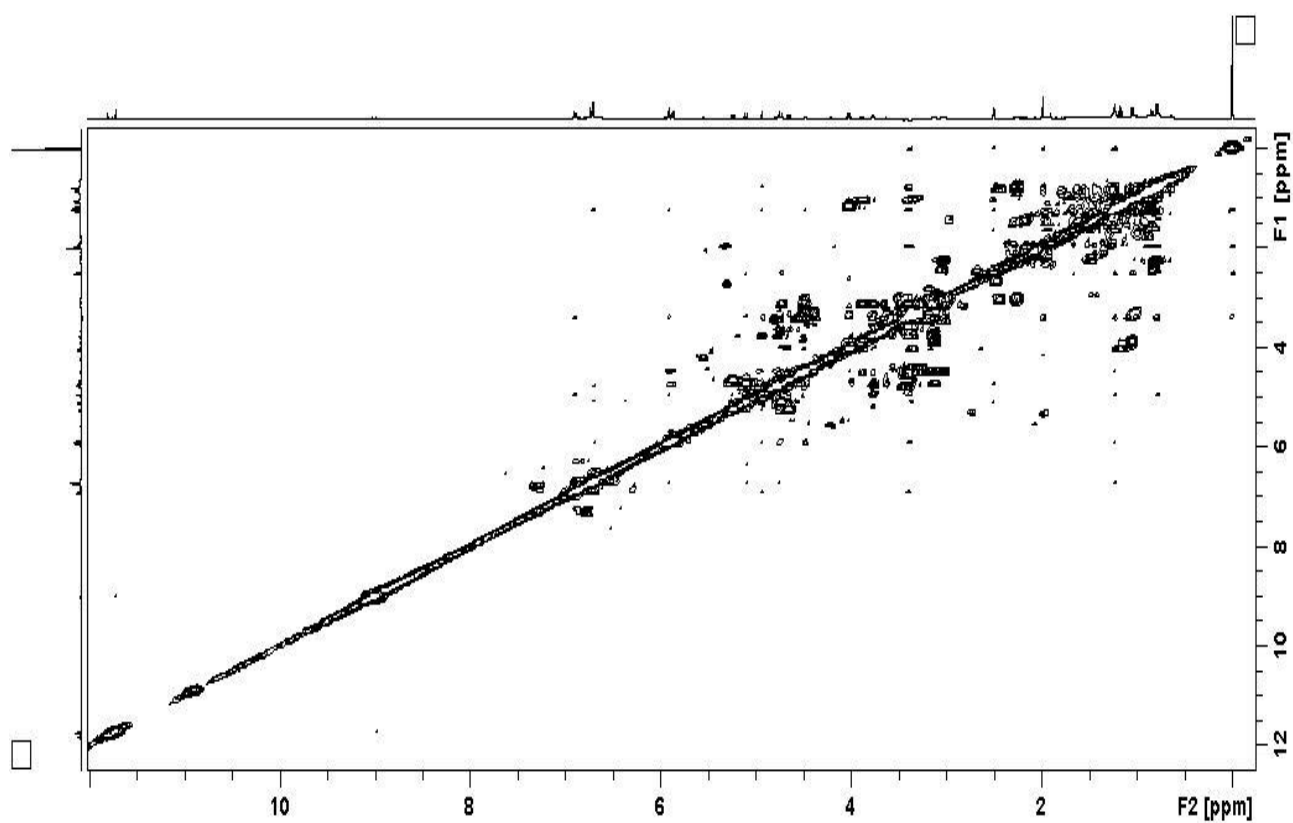


Figura 3. Mapa de correlação COSY (400 MHz, DMSO-d₆) de **Hm-Fr.AcOEt**.

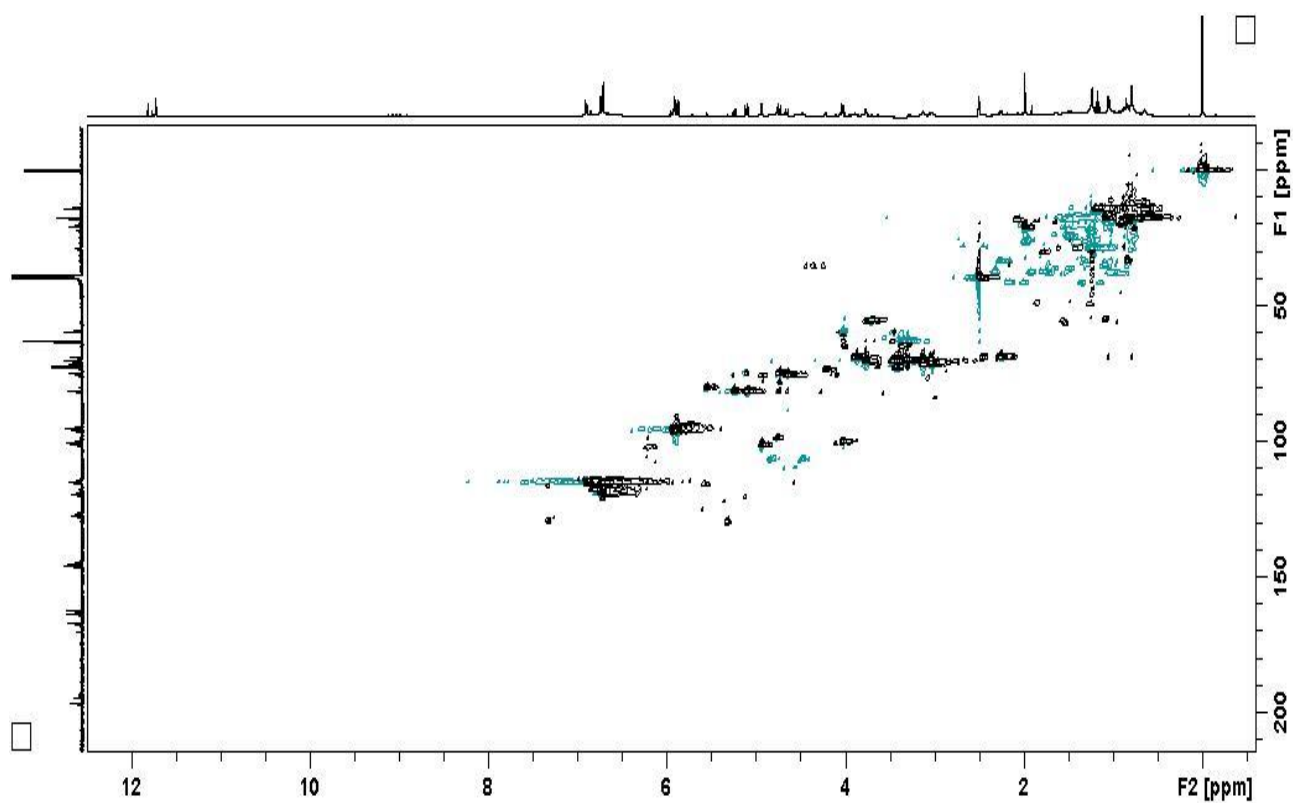


Figura 4. Mapa de correlação HSQC (¹H, 400 MHz; ¹³C, 100 MHz, DMSO-d₆) de **Hm-Fr.AcOEt**.

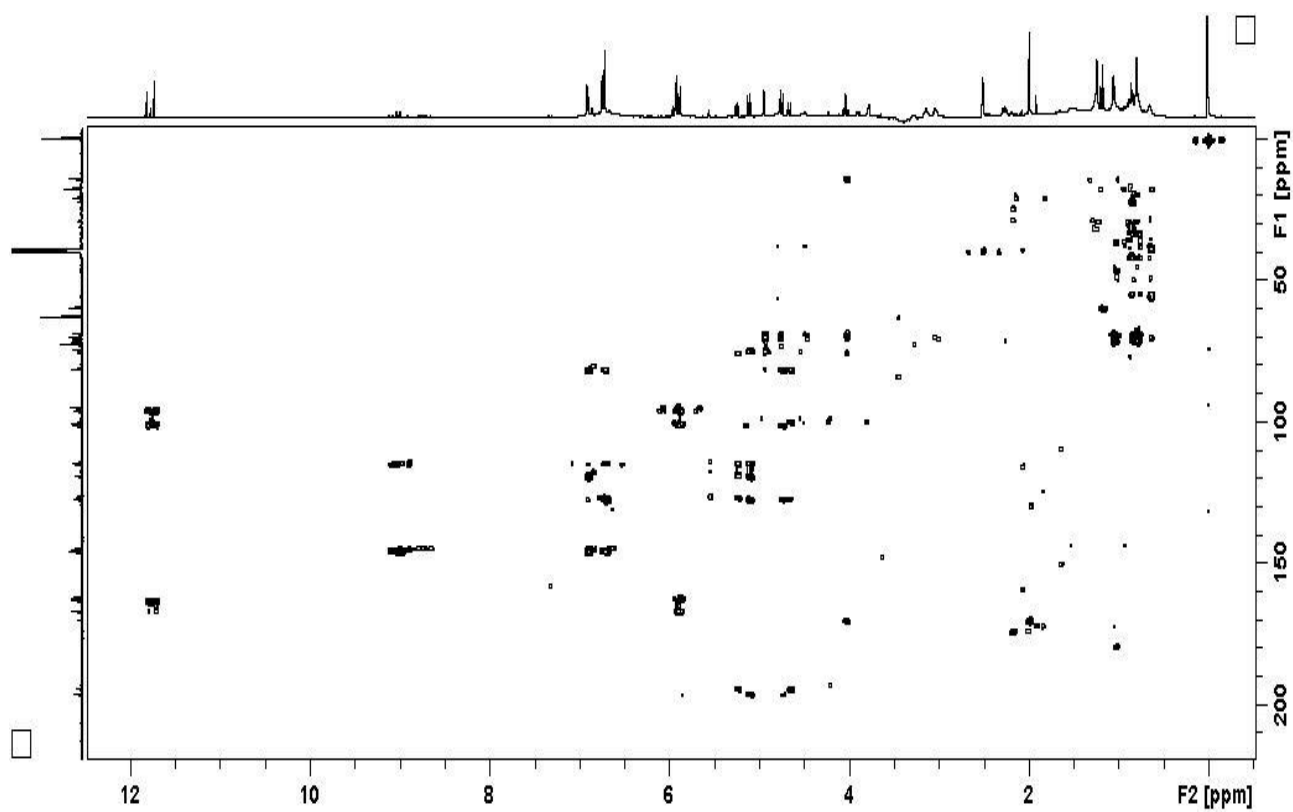


Figura 5. Mapa de correlação HMBC (^1H , 400 MHz; ^{13}C , 100 MHz, DMSO- d_6) de **Hm-Fr.AcOEt**.

Anexo VII – Espectros de RMN para a fração GFr.4

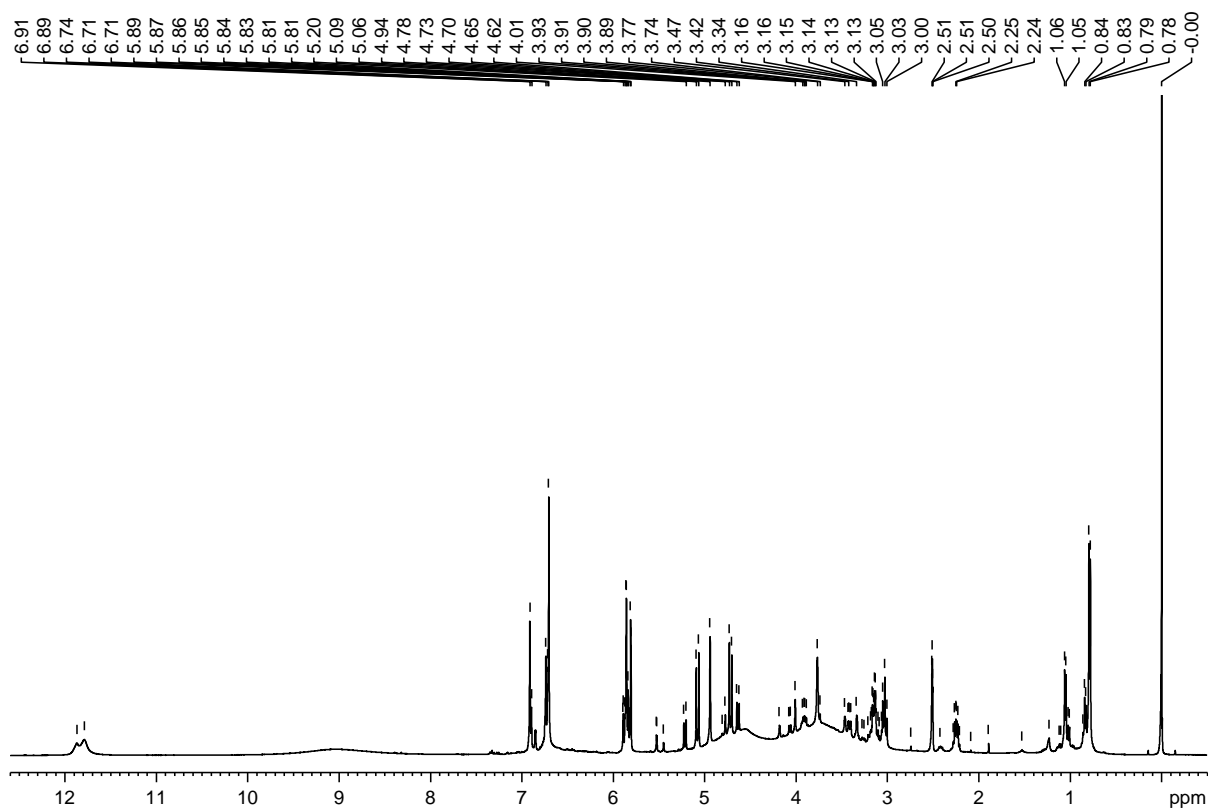


Figura 6. Espectro de RMN de ^1H de GFr-4 (400 MHz, DMSO- d_6).

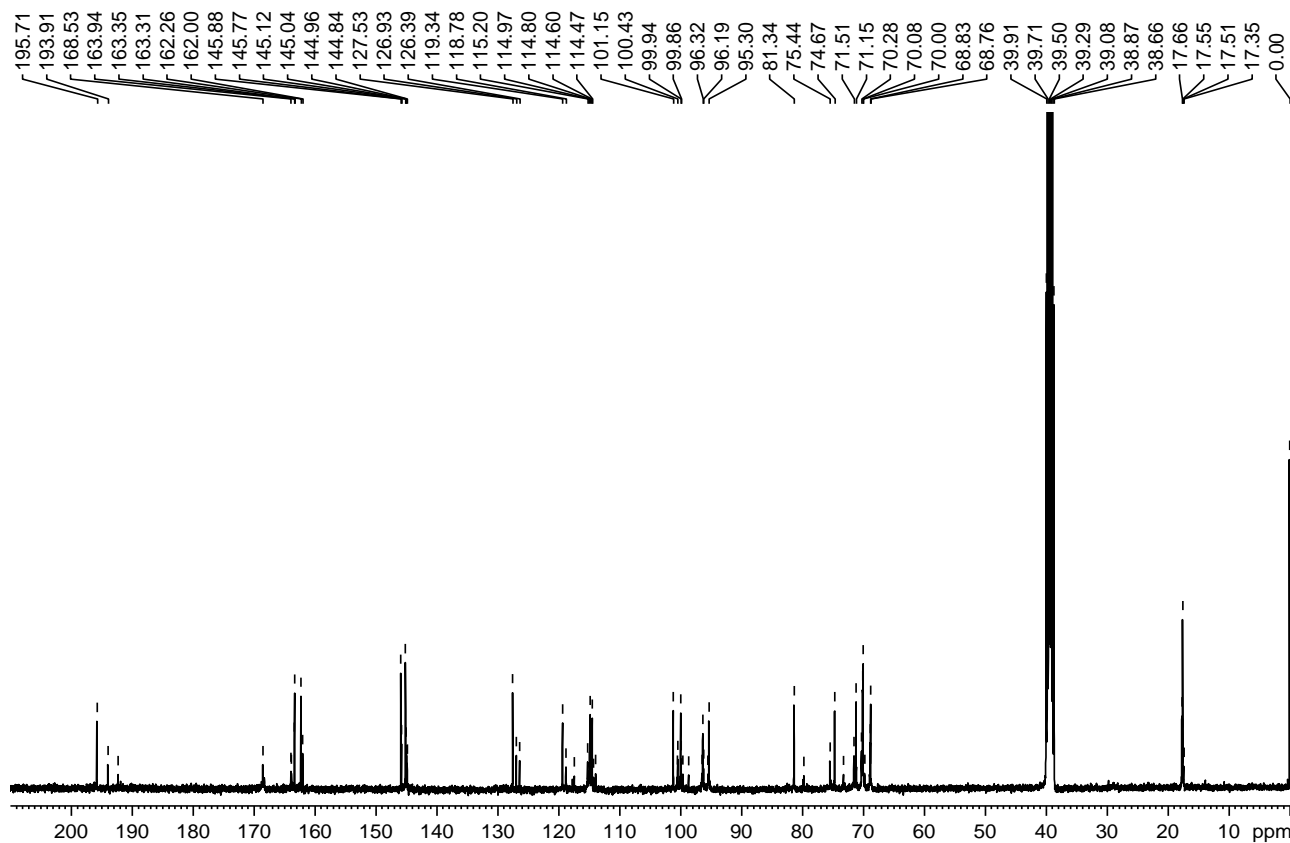


Figura 7. Espectro de RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ de GFr-4 (100 MHz, DMSO- d_6).

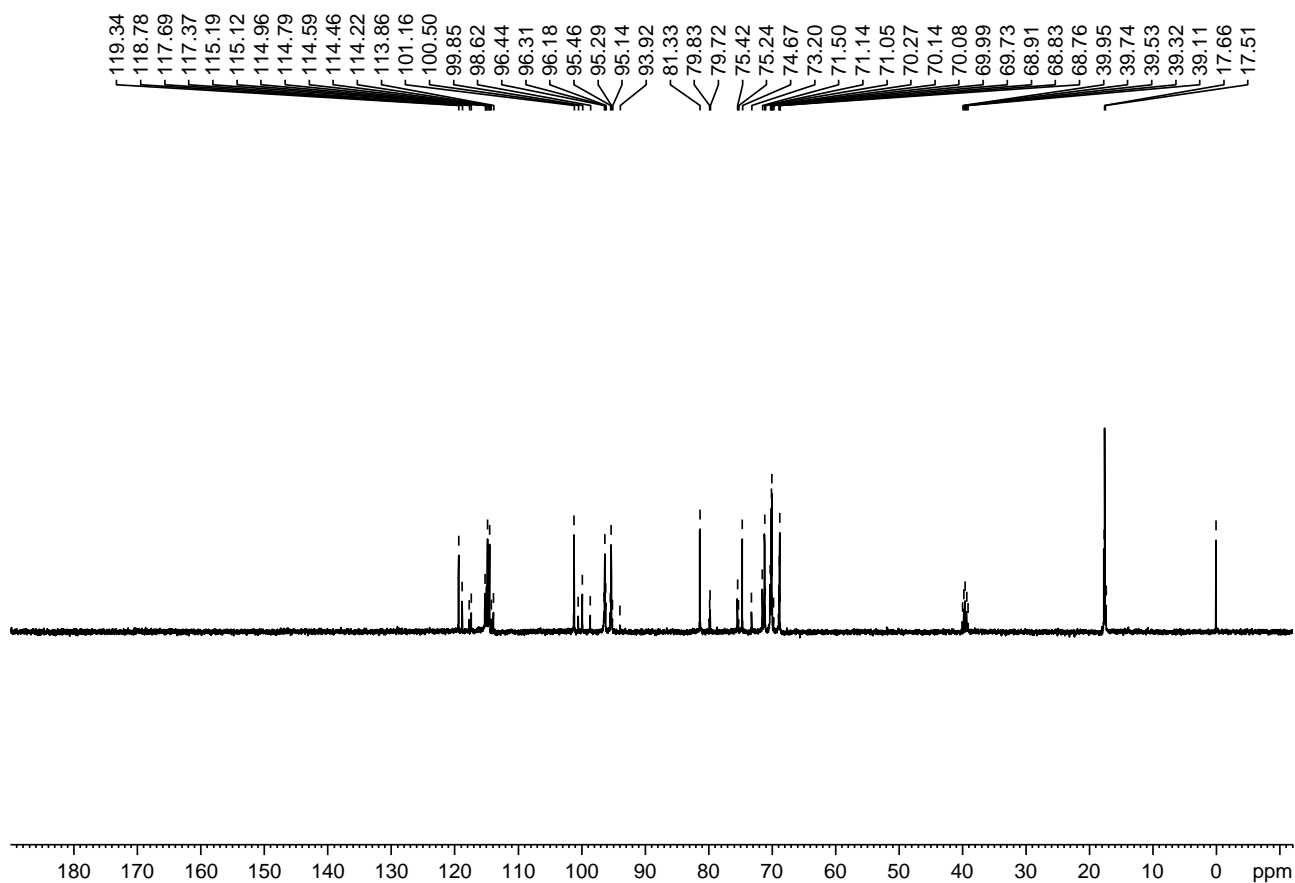


Figura 8. Espectro de RMN de DEPT 135 de **GFr-4** (100 MHz, DMSO-d₆).

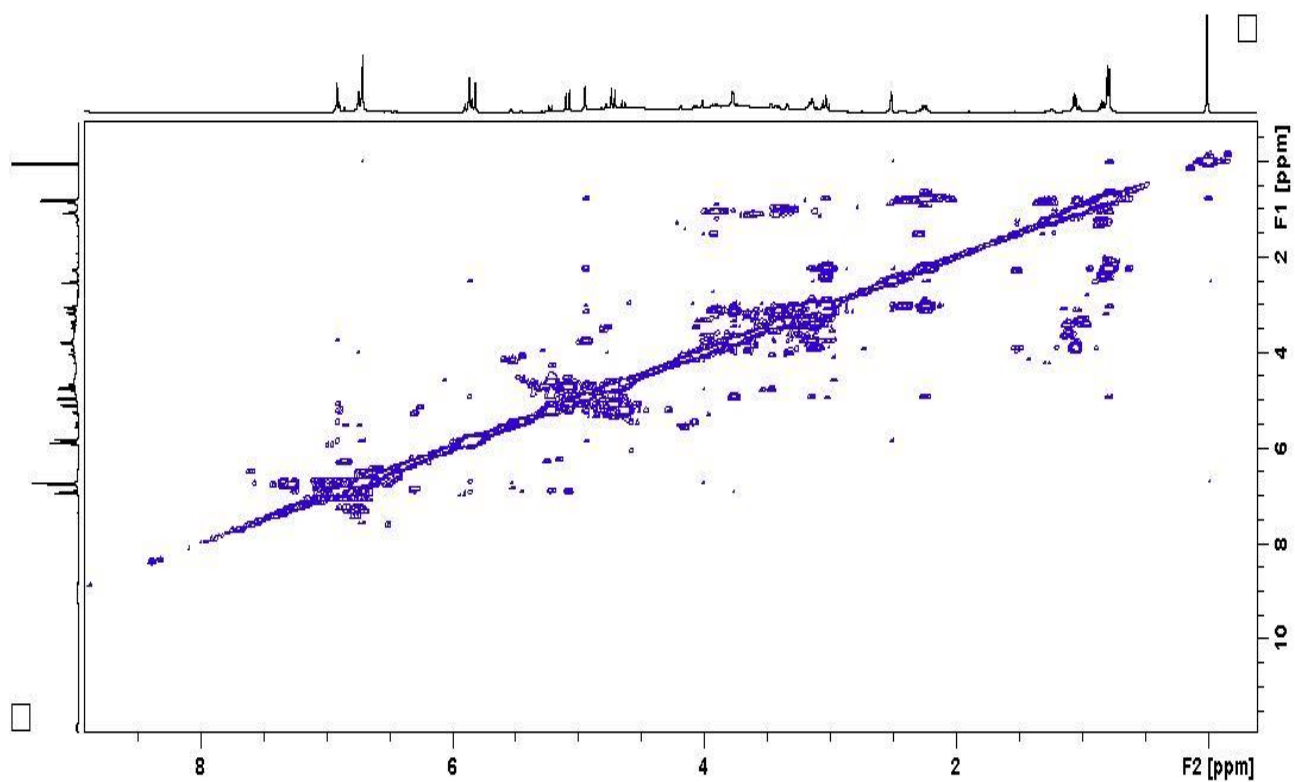


Figura 9. Mapa de correlação COSY (400 MHz, DMSO-d₆) de **GFr-4**.

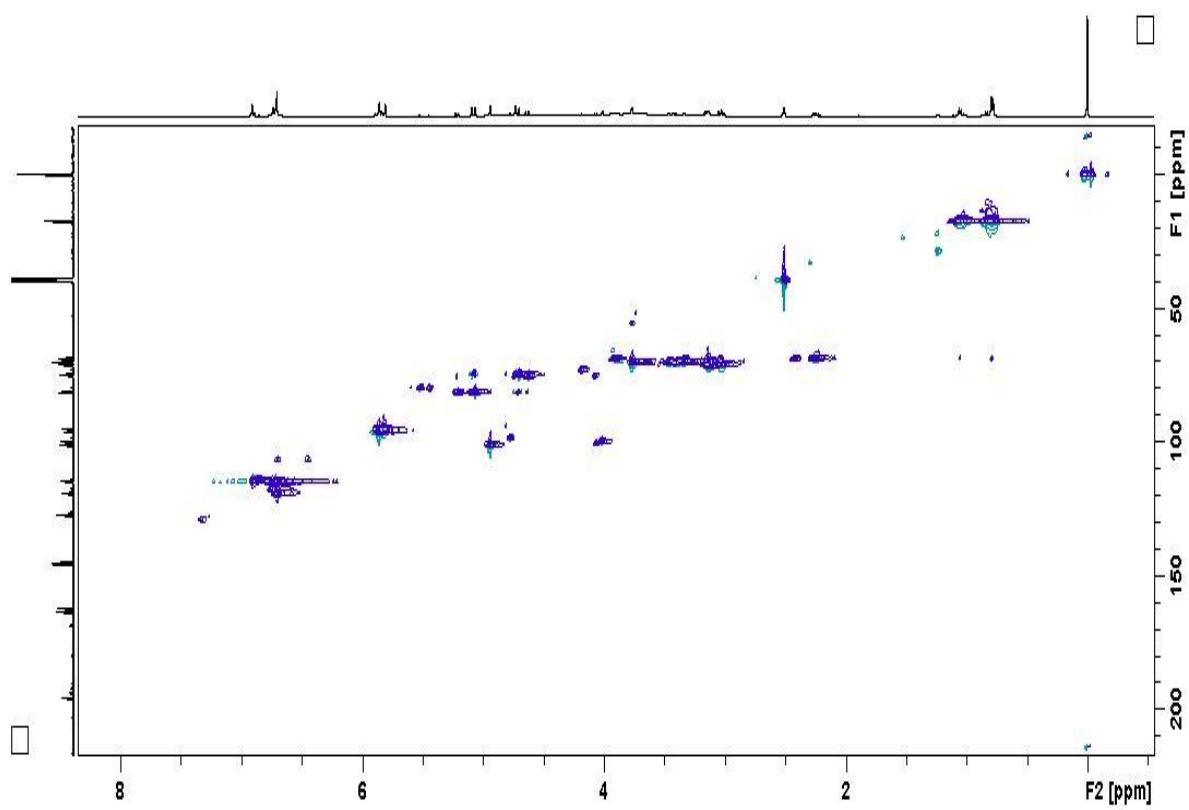


Figura 10. Mapa de correlação HSQC (^1H , 400 MHz; ^{13}C , 100 MHz, DMSO- d_6) de **GFr-4**.

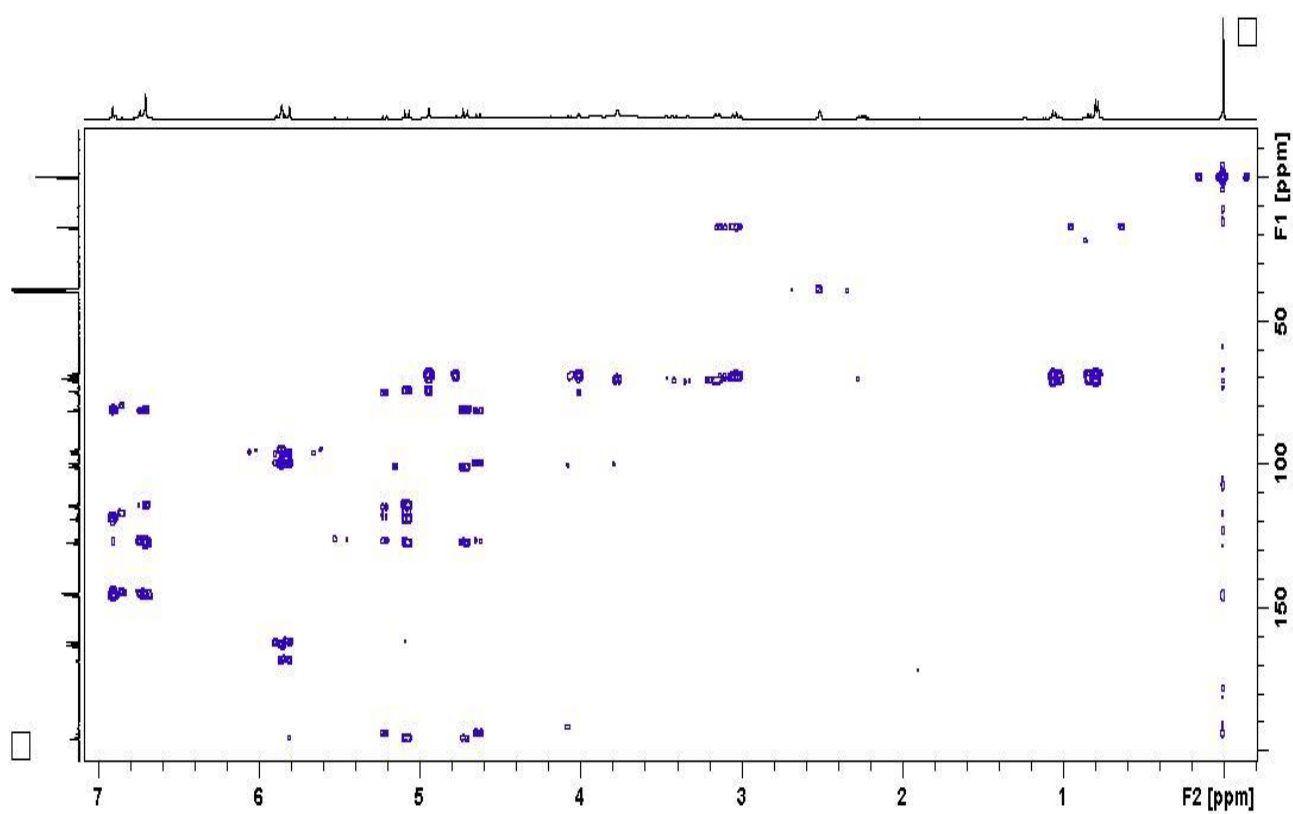


Figura 11. Mapa de correlação HMBC (^1H , 400 MHz; ^{13}C , 100 MHz, DMSO- d_6) de **GFr-4**.

Anexo VIII – Espectros de RMN para a fração GFr.5

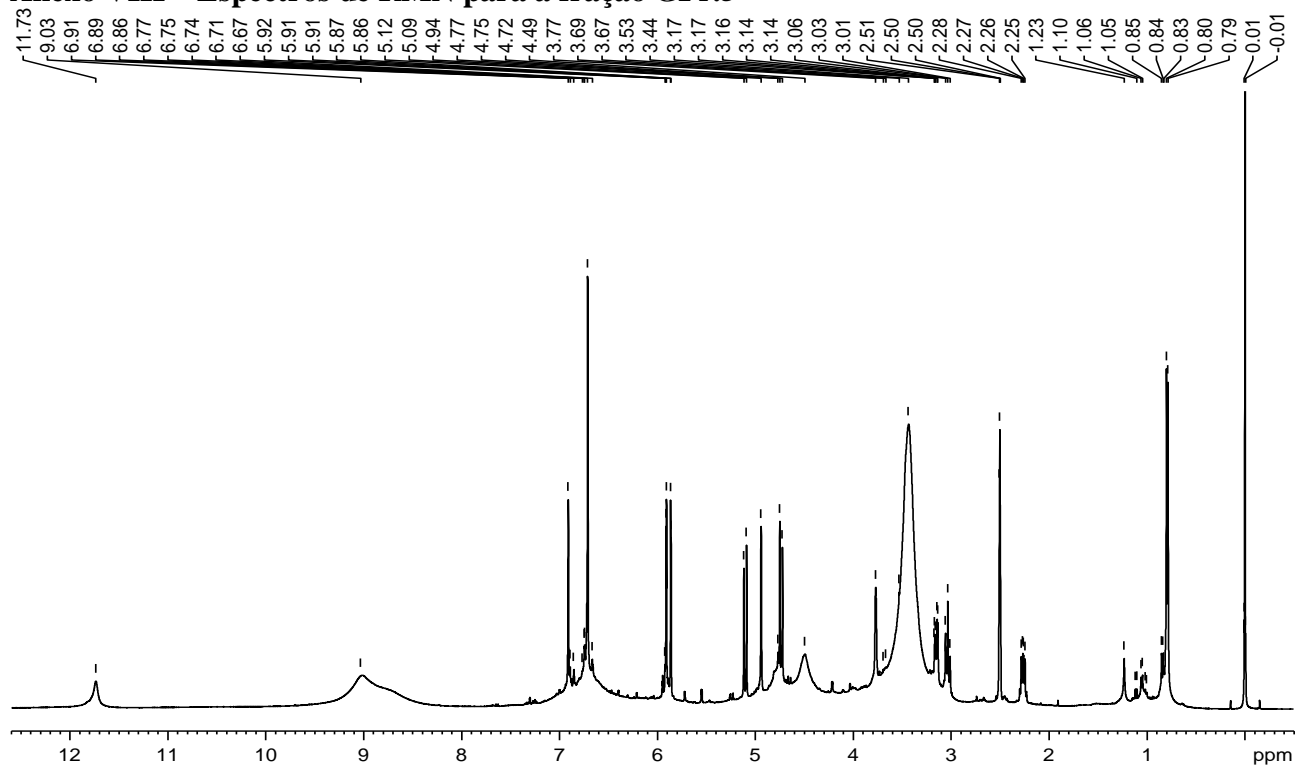


Figura 12. Espectro de RMN de ^1H de GFr-5 (400 MHz, DMSO- d_6).

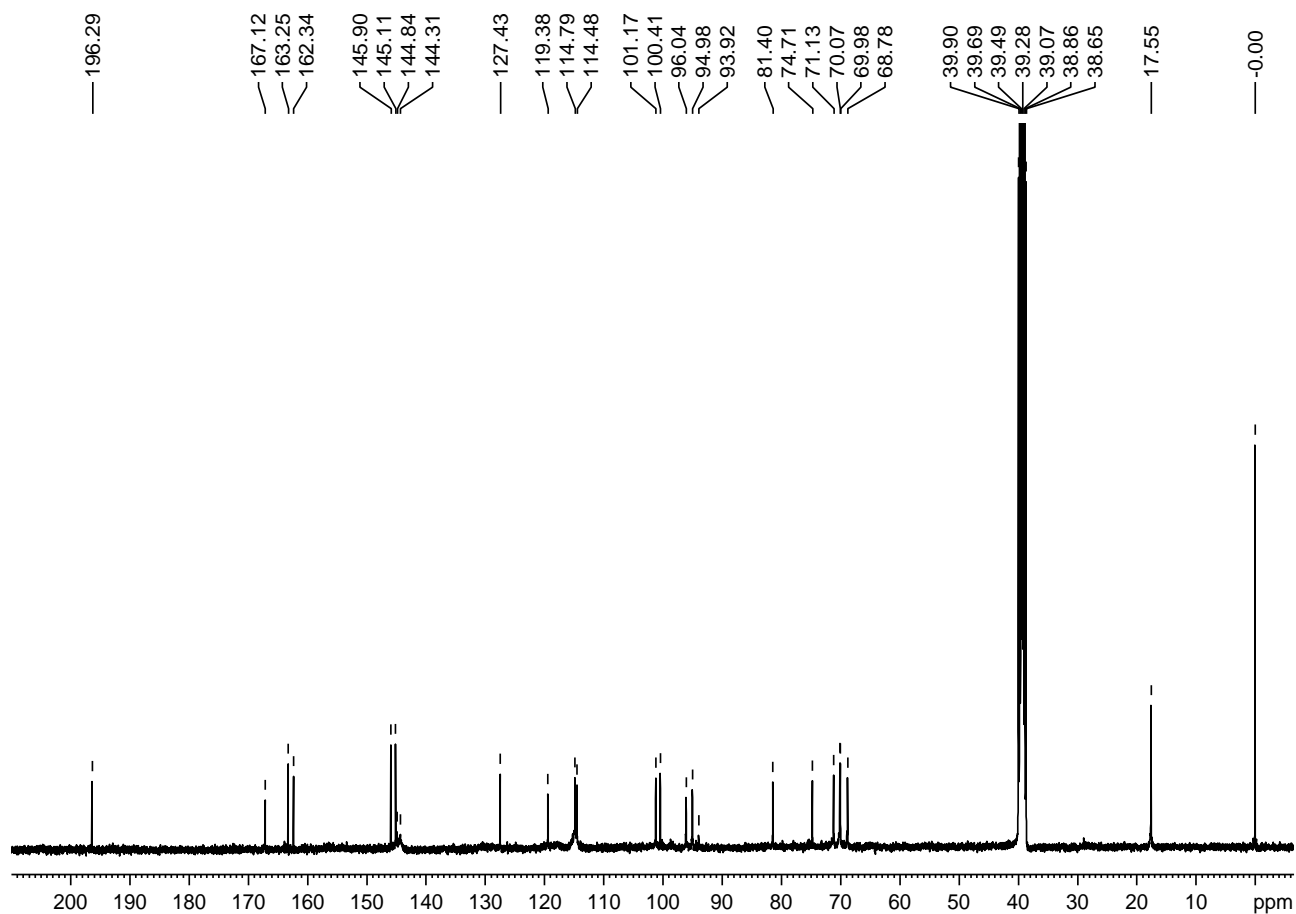


Figura 13. Espectro de RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ de GFr-5 (100 MHz, DMSO- d_6).

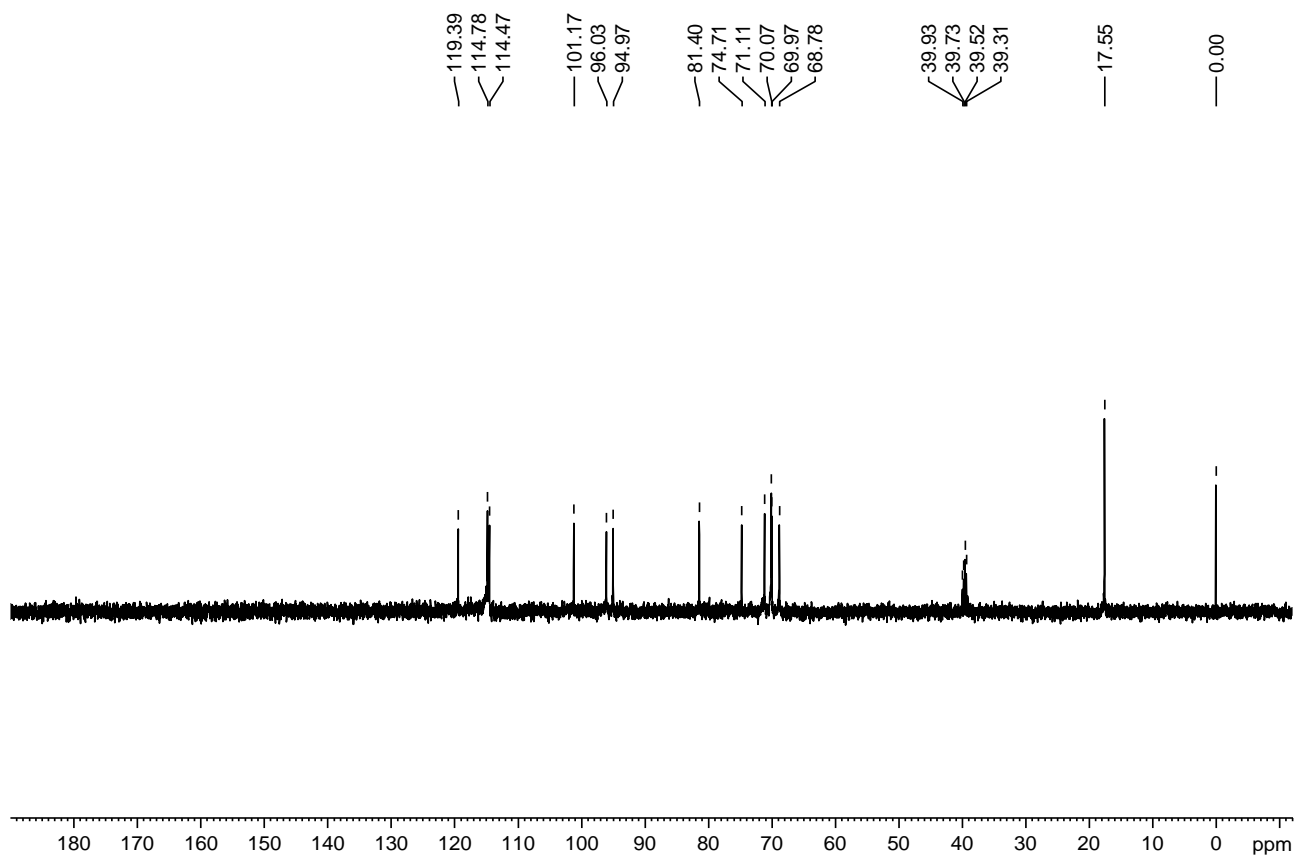


Figura 14. Espectro de RMN de DEPT 135 de **GFr-5** (100 MHz, DMSO-d₆).

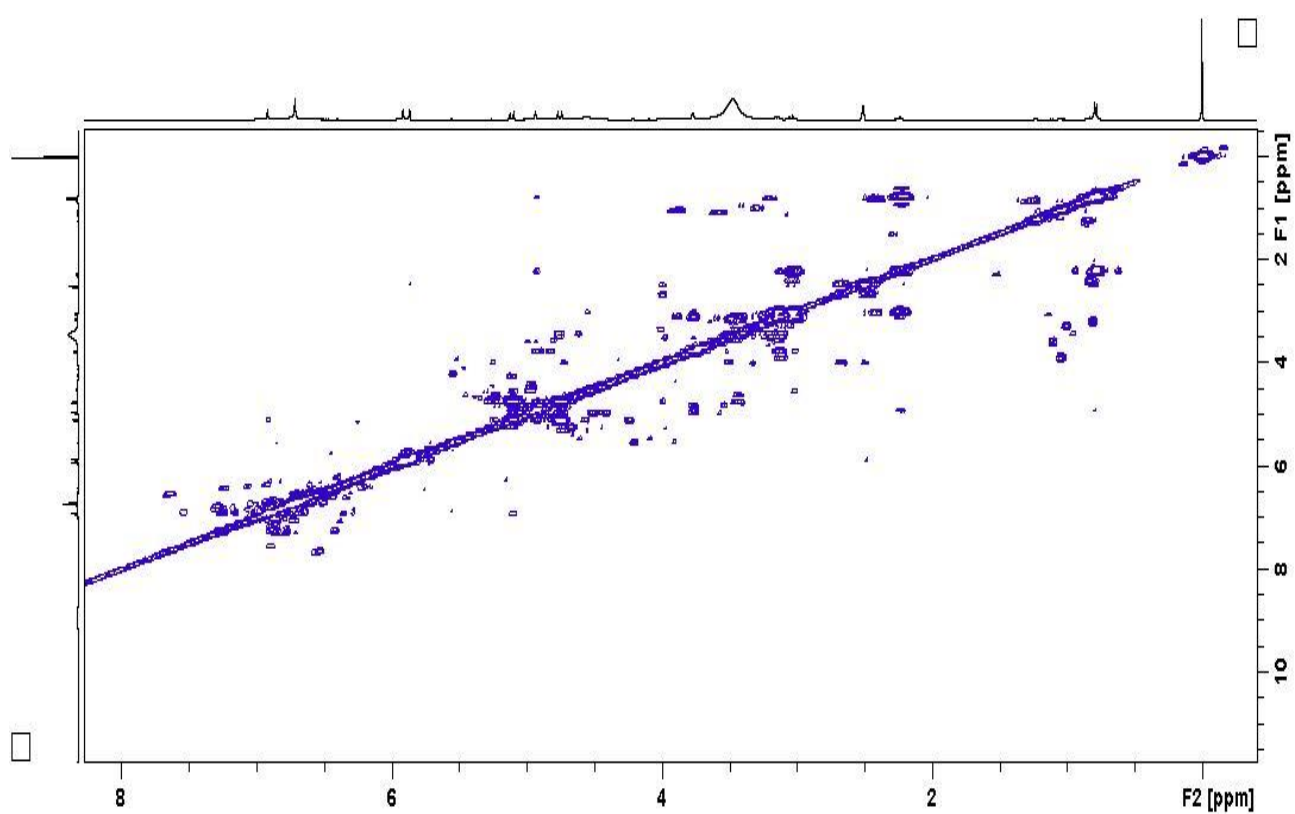


Figura 15. Mapa de correlação COSY (400 MHz, DMSO-d₆) de **GFr-4**.

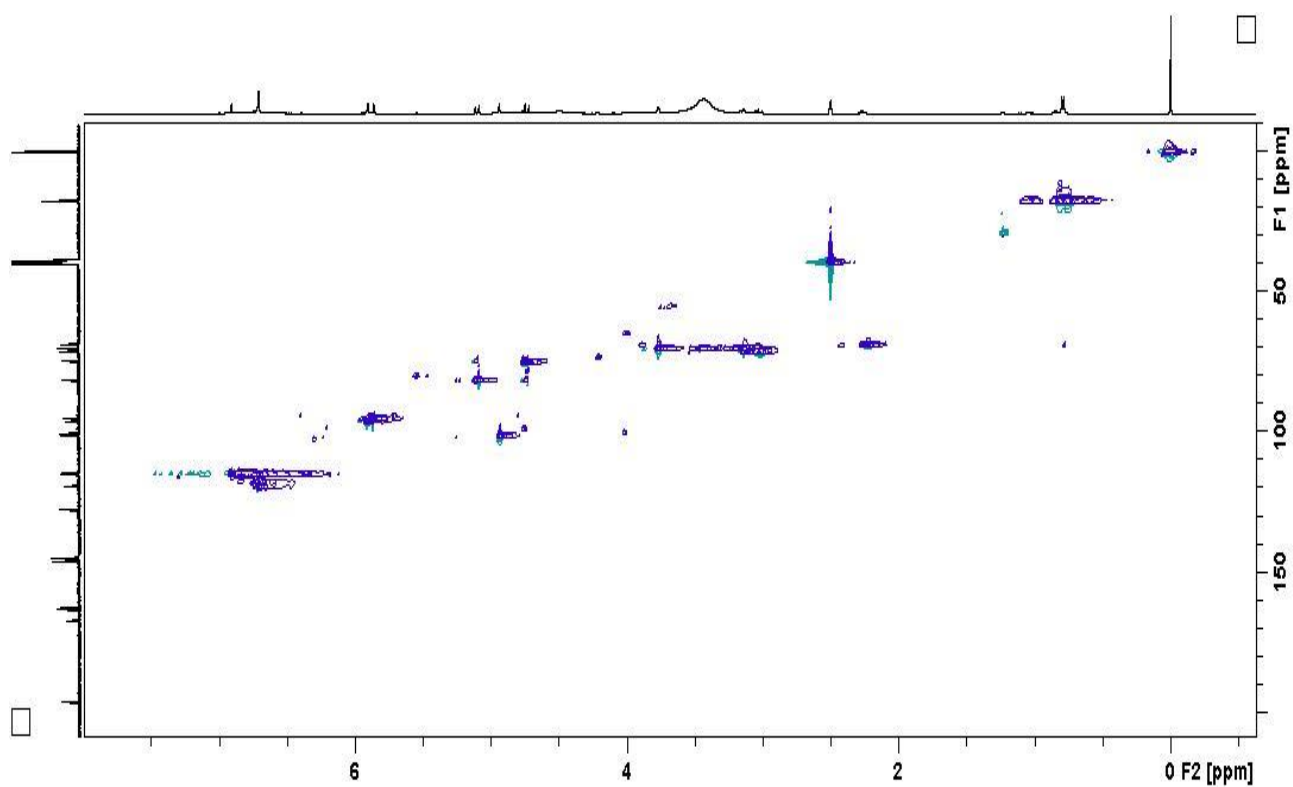


Figura 16. Mapa de correlação HSQC (^1H , 400 MHz; ^{13}C , 100 MHz, DMSO- d_6) de **GFr-5**.

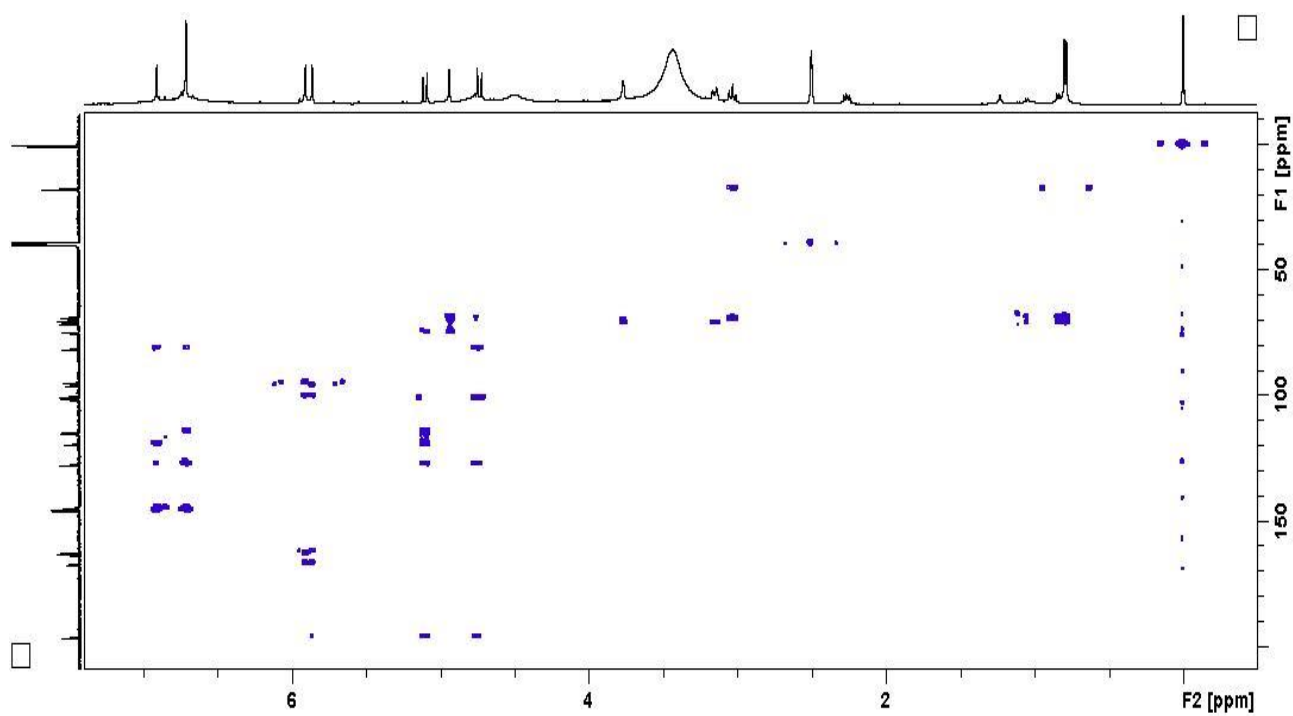


Figura 17. Mapa de correlação HMBC (^1H , 400 MHz; ^{13}C , 100 MHz, DMSO- d_6) de **GFr-5**.

Anexo IX – Cadastro SisGen



Ministério do Meio Ambiente
CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO

SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

Comprovante de Cadastro de Acesso

Cadastro nº A3E4538

A atividade de acesso ao Patrimônio Genético, nos termos abaixo resumida, foi cadastrada no SisGen, em atendimento ao previsto na Lei nº 13.123/2015 e seus regulamentos.

Número do cadastro: **A3E4538**
 Usuário: **UNIVERSIDADE FEDERAL DO VALE DO SÃO FRANCISCO**
 CPF/CNPJ: **05.440.725/0001-14**
 Objeto do Acesso: **Patrimônio Genético**
 Finalidade do Acesso:
 Pesquisa Científica **Bioprospecção** **Desenvolvimento Tecnológico**

Espécie

Hymenaea martiana

Título da Atividade: **Estudo fitoquímico, avaliação do potencial antibacteriano, citotóxico, antioxidante, fotoprotetor, antinociceptivo, anti-inflamatório e toxicologia pré-clínica de Hymenaea martiana (Fabaceae)**

Equipe

Jackson Roberto Guedes da Silva Almeida	UNIVERSIDADE FEDERAL DO VALE DO SÃO FRANCISCO
FERNANDA GRANJA DA SILVA OLIVEIRA	UNIVASF
SARAH RAQUEL GOMES DE LIMA-SARAIVA	UNIVASF
ANA PAULA DE OLIVEIRA	UNIVASF
SUZANA VIEIRA RABELO	UNIVASF
LARISSA ARAUJO ROLIM	UNIVASF

RODOLFO DE MORAES PEIXOTO	IF-Sertão
RENATA DE MORAES PEIXOTO ARAUJO	UNIVASF
LUCIANA JATOBÁ E SILVA PEIXOTO	IF-Sertão
SILVIO ALAN GONÇALVES BOMFIM REIS	UNIVASF
TELMA MARIA GUEDES DA SILVA	UFRPE
TANIA MARIA SARMENTO DA SILVA	UFRPE
RINALDO APARECIDO MOTA	UFRPE
MATEUS MATIUZZI DA COSTA	UNIVASF
MARIA EDUARDA GOMES DA CRUZ SILVA	UNIVASF
AMANDA LEITE GUIMARÃES	UNIVASF
JOSÉ ALVES DE SIQUEIRA FILHO	UNIVASF
ANDRÉ PAVIOTTI FONTANA	UNIVASF
CARLA RODRIGUES CARDOSO BRANCO	UEFS
ALEXSANDRO BRANCO	UEFS
ALESSANDRA GOMES MARQUES PACHECO	UEFS
CELSO DE AMORIM CAMARA	UFRPE
GIBSON GOMES DE OLIVEIRA	USP
NORBERTO PEPORINE LOPES	USP
JULLYANA DE SOUZA SIQUEIRA QUINTANS	UFS
LUCINDO JOSÉ QUINTANS-JUNIOR	UFS
IRWIN ROSE ALENCAR DE MENEZES	URCA
HENRIQUE DOUGLAS MELO COUTINHO	URCA
CLAUDIA DO Ó PESSOA	UFC

Parceiras Nacionais

14.045.546/0001-73 / UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA

Resultados Obtidos

Divulgação de resultados em meios científicos ou de comunicação

Identificação do meio onde foi divulgado: **Influence of the extractive method on the recov**

Identificação do meio onde foi divulgado: **Treatment of goat mastitis experimentally induc**

Identificação do meio onde foi divulgado:	HPLC-DAD analysis and antioxidant activity of
Identificação do meio onde foi divulgado:	Desrepliação de flavonoides de Hymenaea ma
Identificação do meio onde foi divulgado:	Estudo fitoquímico das folhas de Hymenaea ma
Identificação do meio onde foi divulgado:	Quantificação e determinação estrutural de con
Identificação do meio onde foi divulgado:	Potencial antioxidante e fotoprotetor de Hymen
Identificação do meio onde foi divulgado:	Physicochemical and phytochemical characteri
Identificação do meio onde foi divulgado:	Caracterização molecular, produção de biofilm
Identificação do meio onde foi divulgado:	TRIAGEM FITOQUÍMICA E ATIVIDADE FOTOPR
Identificação do meio onde foi divulgado:	Triagem fitoquímica comparativa de extratos ol
Identificação do meio onde foi divulgado:	Avaliação das atividades antioxidante e citotóx
Identificação do meio onde foi divulgado:	Análise por HPLC-DAD e atividade antioxidante
Identificação do meio onde foi divulgado:	Fenóis totais e atividade antioxidante in vitro d
Identificação do meio onde foi divulgado:	Atividade antinociceptiva do extrato etanólico t
Identificação do meio onde foi divulgado:	Prospecção de moléculas antioxidantes em ext
Identificação do meio onde foi divulgado:	Atividade antinociceptiva das fases obtidas poi
Identificação do meio onde foi divulgado:	Fernanda Granja da Silva Oliveira. Influência dc
Identificação do meio onde foi divulgado:	Alessandra Gomes Marques Pacheco. Estudo c
Identificação do meio onde foi divulgado:	Juliane Maria dos Santos Silva. Estudo fitoquín

Identificação do meio onde foi divulgado: **Juliane Maria dos Santos Silva. Estudo fitoquímico**

Identificação do meio onde foi divulgado: **Fernanda Granja da Silva Oliveira. Estudo biofarmacológico**

Identificação do meio onde foi divulgado: **Juliane Maria dos Santos Silva. Avaliação da atividade antimicrobiana**

Identificação do meio onde foi divulgado: **Maria Eduarda Gomes da Cruz Silva. Estudo químico**

Data do Cadastro: **21/10/2018 08:50:04**

Situação do Cadastro: **Concluído**



Conselho de Gestão do Patrimônio Genético
Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em **17:28** de **01/08/2019**.



SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO
DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL
ASSOCIADO - **SISGEN**