

Universidade Federal de Uberlândia

DIEGO GODINA PRADO

**Estudo químico dos extratos das folhas de *Cassia bakeriana*
biomonitorado pela atividade antifúngica**

Uberlândia

2018

DIEGO GODINA PRADO

**Estudo químico dos extratos das folhas de *Cassia bakeriana*
biomonitorado pela atividade antifúngica**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como requisito do Curso bacharelado em Química Industrial da Universidade Federal de Uberlândia, para a obtenção do grau de graduado em Química Industrial.

Orientador: Prof. Dr. Alberto de Oliveira

Coorientadora: Tiara da Costa Silva

Uberlândia

2018

DIEGO GODINA PRADO

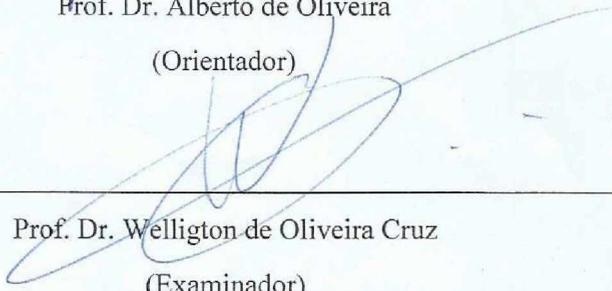
**Estudo químico dos extratos das folhas de *Cassia bakeriana*
biomonitorado pela atividade antifúngica**

Trabalho de Conclusão de Curso
aprovado para obtenção do título
de Bacharel em Química Industrial
pela Universidade Federal de
Uberlândia (MG) pela banca
examinadora formada por:

Uberlândia, ____ de Dezembro de 2018



Prof. Dr. Alberto de Oliveira
(Orientador)



Prof. Dr. Wellington de Oliveira Cruz
(Examinador)



Dr. Mário Machado Martins
(Examinador)

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus.

Agradeço a minha família, meu pai Raul José, minha mãe Elizabete Godina e minhas irmãs Beatriz Godina e Luciene Aparecida, pelo apoio e suporte dados ao longo de toda a graduação.

Agradeço aos meus amigos que fiz durante a graduação: David, Diego, Iury, Jonathan, Karoline, Leonardo, Luiza, Yasmim e William.

Agradeço ao pessoal do Nuppen pelo acolhimento durante o período de realização deste trabalho, em especial a Tiara Costa que me auxiliou ao longo deste trabalho.

Agradeço a todos professores que de alguma forma contribuíram na minha graduação, em especial o professor Dr. Alberto Oliveira que me orientou neste trabalho.

Agradeço ao Instituto de Química e a UFU.

Agradeço à FAPEMIG (APQ-01392-14) pelo financiamento deste trabalho.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

*“Todos os homens sonham, mas não da mesma forma.
Os que sonham de noite, nos recessos poeirentos das suas mentes,
acordam de manhã para verem que tudo, afinal, não passava de vaidade.
Mas os que sonham acordados, esses são homens perigosos,
pois realizam os seus sonhos de olhos abertos, tornando-os possíveis.”*

(T. E. Lawrence)

RESUMO

A *Cassia bakeriana* é uma árvore típica da Tailândia, pertencente à família Fabaceae, conhecida popularmente como cássia-rósea. Esta espécie não possui muitos estudos relacionados à atividade biológicas em relação aos seus extratos, porém pertence a um gênero (*Cassia*) que possui inúmeros trabalhos publicados com diversas atividades biológicas avaliadas. Assim, neste trabalho foi realizado o fracionamento do extrato etanólico das folhas da *C. bakeriana* através de extração líquido-líquido com solventes de diferentes polaridades, seguido da prospecção fitoquímica em cromatografia em camada delgada (CCD) com auxílio de reveladores específicos para as principais classes de metabólitos secundários; foi testado a atividade dos extratos e partições contra três espécies de fungos causadores da candidíase através da concentração inibitória mínima (CIM), onde a partição diclorometano (PD) se mostrou a mais ativa para as três espécies, sendo mais ativa contra a espécie *Candida glabrata*, sendo obtido um valor de CIM de 93,75 $\mu\text{g mL}^{-1}$. A PD foi então submetida a espectrometria de massas a fim de identificar os principais compostos presentes, sendo identificados flavonoides, como o kampferol (m/z 285,0407), a (epi)catequina (m/z 289,0715), flavonoides com grupos glicosídeos em sua estrutura como a quercetina-3-*O*-glucosídeo (m/z 463,0880), ácidos fenólicos como o ácido *p*-cumárico (m/z 163,0402), o ácido ferúlico (m/z 193,0505), a antraquinona réina (m/z 283,0252) e alguns ácidos graxos. Com base em estudos encontrados na literatura acredita-se que estes compostos podem estar relacionados com a atividade antifúngica encontrada para a partição diclorometano.

Palavras-chave: *Cassia bakeriana*, *Candida*, atividade antifúngica, produtos naturais.

ABSTRACT

Cassia bakeriana is a typical Thai tree, belonging to the Fabaceae family, popularly known as pink cassia. This species does not have many studies regarding the biological activity in relation to its extracts, but it belongs to a genus (*Cassia*) that has many published works with many evaluated biological activities. Thus, in this work the fractionation of the ethanolic extract from the leaves of *C. bakeriana* was performed through liquid-liquid extraction with solvents of different polarities, followed by phytochemical prospection in Thin Layer Chromatography (TLC) with specific developers for the main classes of secondary metabolites; the activity of the extracts and partitions against three species of fungi (that cause candidiases) was tested through the Minimum Inhibitory Concentration (MIC), where the dichloromethane partition (PD) was the most active for three species, being more active against the *Candida glabrata*, with an MIC value of 93,75 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Then, PD was the identification with Mass Spectrometry identified the main compounds as flavonoids such as kampferol (m/z 285.0407), (*epi*)-catechin (m/z 289.0715), flavonoids with glycoside groups as quercetin-3-*O*-glucoside (m/z 463.0880), phenolic acids such as *p*-coumaric acid (m/z 163.0402) and ferulic acid (m/z 193.0505), anthraquinone (m/z 283.0252) and some fatty acids. Based on studies found in the literature it is believed that these compounds may be related to the antifungal activity presented by the partition.

Keywords: *Cassia bakeriana*, *Candida*, antifungal activity, natural products.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Estrutura da morfina	14
Figura 2- Origem dos fármacos aprovados pela FDA no período de 1981-2014.	15
Figura 3- Vias de formação dos metabólitos secundários	18
Figura 4- estrutura do isopentano e do isopreno	19
Figura 5- Exemplos de terpenos	20
Figura 6- Formação de terpenos via rota do ácido mevânico	21
Figura 7- Formação de terpenos via rota do metileritritol fosfato.	22
Figura 8- Estrutura do fenol	23
Figura 9- Exemplos de flavonoides	24
Figura 10- Exemplo da biossíntese dos flavonoides liquiritigenina e naringenina	25
Figura 11- Exemplos de alcaloides	26
Figura 12- Estrutura do fluconazol	27
Figura 13- Compostos naturais com atividade antifúngica	27
Figura 14- Flavonoides com atividade antifúngica contra a espécie <i>Candida albicans</i>	28
Figura 15- Estrutura da reina	31
Figura 16- Fluxograma do processo de preparação dos extratos e partições das folhas da <i>C. bakeriana</i>	34
Figura 17- Cromatograma da PD nos modos negativo (1) e positivo (2)	41
Figura 18- Estrutura dos compostos identificados na partição diclorometano das folhas da <i>Cassia bakeriana</i>	47
Figura 19- Espectro de fragmentação para o kampferol no modo negativo	48
Figura 20- Proposta de mecanismo de fragmentação para o kaempferol em modo negativo	49
Figura 21- Espectro para o kaempferol-3- <i>O</i> -ramnosídeo no modo negativo	50
Figura 22- Proposta de mecanismo de fragmentação para o kaempferol-3- <i>O</i> -ramnosídeo (9) em modo negativo	50
Figura 23- Espectro de fragmentação para o ácido <i>p</i> -cumárico (2) no modo negativo	51

Figura 24- Espectro de fragmentação para o ácido p-cumárico (2) no modo positivo	51
Figura 25- Proposta de mecanismo de fragmentação para o ácido p-cumárico (2)	52
Figura 26- Espectro de fragmentação para a reína (16) no modo negativo	53
Figura 27- Proposta de mecanismo de fragmentação para a reína (16) no modo negativo.	53
Figura 28- Espectro de fragmentação para a reína (16) no modo positivo	53
Figura 29- Proposta de mecanismo de fragmentação para a reína (16) no modo positivo	54
Figura 30- Estrutura da rutina	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Classificação dos terpenos	19
Tabela 2- Espécie de <i>Cassia</i> com atividades biológicas atestadas	29
Tabela 3- Composição química e atividades biológicas para a <i>Cassia occidentalis</i>	30
Tabela 4- Rendimento obtido dos EH e EE das folhas de <i>Cassia bakeriana</i>	39
Tabela 5- Rendimento das partições líquido-líquido realizadas a partir do extrato etanólico	39
Tabela 6- Prospecção fitoquímica para os extratos e partições das folhas da <i>Cassia bakeriana</i>	40
Tabela 7- Proposta de identificação dos compostos da PD das folhas de <i>C. bakeriana</i>	42
Tabela 8- Valores de CIM dos extratos e partições da <i>C. bakeriana</i>	55

LISTA DE ABREVIATURAS

ATCC- American Type Culture collection

CIM- Concentração inibitória mínima

CCD- Cromatografia em camada delgada

CLAE/EM- Cromatografia líquida de alta eficiência hifenado ao espectrômetro de massas

DMAPP- dimetilalil difosfato

DMSO- Dimetilsulfoxido

DNA- Deoxyribonucleic acid (Ácido desoxirribonucleico)

DST- Doença sexualmente transmissível

EE- Extrato etanólico

EH- Extrato hexânico

EM/EM- Espectrometria de massas sequencial

HMG-CoA- β -hidroxi- β -metilglutaril-CoA

HIV- Human immunodeficiency vírus (Vírus da imunodeficiência humana)

IBTEC-UFU- Instituto de Biotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia

IES- Ionização por electrospray

IPP- Isopentenil difosfato

LaPeMa-UNIFRAN- Laboratório de Pesquisa em Microbiologia Aplicada da Universidade Federal de Franca

MOPS- 3-N-morfolinopropanosulfônico

MP- Metabolismo primário

MS- Metabolismo secundário

NP- Difetilboriloxietilamina

PA- Partição água

PAE- Partição acetato de etila

PB- Partição n-butanol

PD- Partição diclorometano

SUMÁRIO

1.0 INTRODUÇÃO	14
1.1 Introdução e justificativa	14
2.0 OBJETIVOS	16
2.1 Objetivos gerais	16
2.2 Objetivos específicos	17
3.0 REFERENCIAL TEÓRICO	17
3.1 Metabolismo secundário	17
3.1.1 <i>Terpenos</i>	18
3.1.2 <i>Compostos fenólicos</i>	22
3.1.3 <i>Alcaloides</i>	25
3.2 Atividade antifúngica	26
3.3 <i>Cassia bakeriana</i>: Aspectos da família e do género	28
4.0 PARTE EXPERIMENTAL	31
4.1 Materiais e métodos	31
4.1.1 <i>Instrumentação</i>	32
4.1.2 <i>Reagentes e solventes</i>	32
4.2 Procedimento experimental	32
4.2.1 <i>Coleta e preparação das amostras vegetais</i>	32
4.2.2 <i>Preparação dos extratos e extração líquido-líquido</i>	33

<i>4.2.3 Prospecção fitoquímica via cromatografia em camada delgada</i>	34
Detecção de alcaloides	35
Detecção de flavonoides	35
Detecção de antraquinonas	35
Detectores universais: detecção de terpenos, esteroides, saponinas, fenilpropanoides, flavonoides e proantocianidinas	36
<i>4.2.4 Determinação da atividade antifúngica</i>	36
Determinação da Concentração Inibitória Mínima	36
Preparo do inóculo	37
<i>4.2.5 Análise por espectrometria de massas</i>	37
5.0 RESULTADOS E DISCUSSÕES	38
5.0 Rendimentos dos extratos e extração líquido-líquido	38
5.1 Prospecção fitoquímica	40
5.2 Identificação de compostos na partição diclorometano	41
5.3 Atividade antifúngica	54
6.0 CONCLUSÃO	56

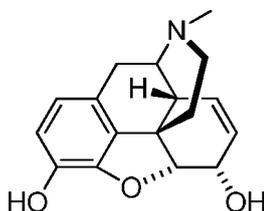
1.0 INTRODUÇÃO

1.1 Introdução e justificativa

A utilização de produtos naturais (PN) pelo homem é uma prática que acompanha a história da humanidade desde as civilizações mais antigas. O uso dessas substâncias naturais abrange desde corantes para fins estéticos, confecção de artigos religiosos, repelentes e aromatizantes e, em várias culturas, tem-se relatos do uso de PN para fins medicinais. Esta vasta utilização de PN pelos povos primitivos ao longo do tempo, possibilitou a descoberta de inúmeras substâncias de grande valor para as sociedades modernas que deram origem a diferentes fármacos. A convivência com os mais variados grupos étnicos e o aprendizado compartilhado por esses povos, teve significativa contribuição para o desenvolvimento da química de PN (VIEGAS JR; BOLZANI; BARREIRO, 2006).

Vários são os exemplos de compostos que foram isolados mais recentemente, porém o uso dos vegetais com estes como princípios ativos (metabólitos primários e secundários) já era feito a muitos séculos antes. Um exemplo é a morfina (Figura 1), que possui propriedades +analgésicas. A morfina é o princípio ativo da espécie conhecida popularmente como papoula (*Papaver somniferum*), sendo isolada pela primeira vez em 1805 por Friedrich Sertuner (1783-1841) (HAMILTON; BASKETT, 2000), porém há documentos sumerianos de 5000 a.C que se referem à papoula e tábulas assírias descrevendo suas propriedades (PINTO et al., 2002).

Figura 1- estrutura da morfina.

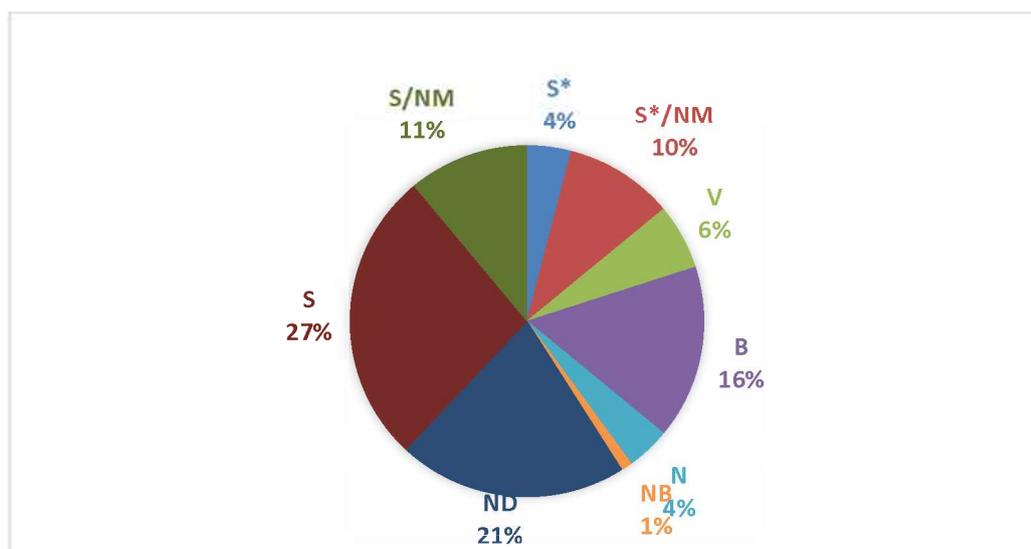


Fonte: o autor.

Com o avanço do entendimento da química do carbono (química orgânica) e com o desenvolvimento de técnicas espectrométricas e cromatográficas ao longo dos anos, tornou-se mais fácil e menos demorado o isolamento e elucidação destes compostos, mesmo quando trata-se de substâncias mais complexas (PINTO et al., 2002).

Assim, a busca por novos compostos isolados de plantas que possuem atividade biológica continua sendo uma importante área de pesquisa nos dias atuais, como é possível perceber no estudo publicado por Newman e Cragg (2016). Esse estudo mostra os fármacos aprovados pela FDA (Food and Drug Administration) de 1981 até o ano de 2014 que foram classificados da seguinte forma: macromoléculas biológicas como proteínas ou peptídeos (B); produto natural sem nenhuma modificação estrutural, mesmo que semi ou totalmente sintético (N); produto natural “botânico” (NB); derivado de produto natural, geralmente com modificação sintética (ND); fármaco puramente sintético (S); produzido de forma totalmente sintética, porém com um grupo farmacóforo vindo de um produto natural (S*); vacinas (V) e produzido com conhecimento baseado em produtos naturais (NM). O gráfico apresentado na Figura 2, mostra que apenas 27% dos fármacos aprovados são de origem puramente sintética e que, 51% são produtos naturais ou inspirados em conhecimento advindos de algum produto natural, além de 6% de vacinas e 16% correspondentes a macromoléculas biológicas.

Figura 2- Origem dos fármacos aprovados pela FDA no período de 1981-2014.



Fonte adaptado de Newman e Cragg, (2016)

Nesse desafio de buscar novos compostos que possam ter alguma atividade biológica, o Brasil apresenta um papel relevante, pois estima-se que cerca de 20% da biodiversidade de plantas do planeta esteja em solo brasileiro (GARCEZ et al., 2016, MACÊDO et al., 2018). Como possui uma vasta extensão territorial e uma vegetação bem heterogênea, o Brasil é subdividido em 6 grandes biomas, sendo eles: Amazônia, Cerrado, Caatinga, Mata atlântica, Pantanal e Pampa (GARCEZ et al., 2016).

O Cerrado é o segundo maior bioma brasileiro em extensão territorial e é reconhecido pela sua grande diversidade biológica, ocupando aproximadamente 23% do território nacional (NETO; MORAIS, 2003). Porém, mesmo com toda essa diversidade de espécies, foi estimado que até o ano de 2010, mais de 50% de sua extensão original já havia sido devastada (GARCEZ et al., 2016), o que demonstra a importância de se intensificar estudos nessa área.

Neste contexto, o intuito deste trabalho foi realizar o estudo dos extratos das folhas da espécie *Cassia bakeriana* Craib. A *C. bakeriana* é conhecida popularmente como cássia-rósea, uma espécie nativa da Tailândia que se desenvolve facilmente no Brasil principalmente nas regiões sul e sudeste (LORENZI, 2003). Em relação aos estudos realizados referentes a esta espécie, consta na literatura o trabalho de Cunha e outros (2017) que avaliou a atividade antibacteriana das folhas e cascas da *C. bakeriana* e a caracterização química das cascas. Entretanto, não há estudos referentes à atividade antifúngica e caracterização de compostos presentes nos extratos das folhas da espécie. Dessa forma, nesse trabalho foi testada a atividade antifúngica frente a três espécies de fungo do gênero *Candida*. Também foi apresentada a identificação dos principais compostos presentes na partição diclorometano.

Não foram encontrados na literatura relatos do uso da *C. bakeriana* como planta medicinal. Porém diversas espécies de *Cassia* são utilizadas na medicina popular e estudos tem comprovado o potencial biológico dessas espécies, bem como identificado e isolados os compostos. Como exemplo temos a *Cassia abbreviata* que teve associada a seus extratos das raízes atividade hepatoprotetora e antioxidante e a *Cassia occidentalis* com atividade antimicrobiana, hepatoprotetora, antimalárica entre outras atividades para extratos de várias partes da planta (YADAV et al., 2010, SOBEH et al., 2018).

2.0 OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Este trabalho tem como objetivo geral, avaliar a atividade antifúngica dos extratos e frações das folhas de *Cassia bakeriana* Craib e identificar as substâncias presentes na fração mais ativa.

2.2 Objetivos específicos

- Realizar o Fracionamento do extrato etanólico por extração líquido-líquido.
- Realizar a prospecção fitoquímica dos extratos e frações;
- Avaliar a atividade antifúngica dos extratos e frações das folhas de *C. bakeriana*;
- Identificar os compostos presentes na fração com maior atividade antifúngica por cromatografia de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas.

3.0 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Metabolismo secundário

O metabolismo é a forma como os seres vivos obtém energia, seja pela conversão da luz solar ou degradando moléculas ricas em nutrientes obtidas do meio ambiente. Também é responsável por converter moléculas ricas em nutrientes em moléculas específicas para cada célula, polimerizar precursores monoméricos em macromoléculas como as proteínas e também sintetizar ou degradar biomoléculas para a realização de funções celulares específicas, como mensageiros intracelulares e pigmentos. Todo esse sistema metabólico é uma atividade altamente coordenada e realizado por vários sistemas multienzimáticos (vias metabólicas) (NELSON; COX, 2014).

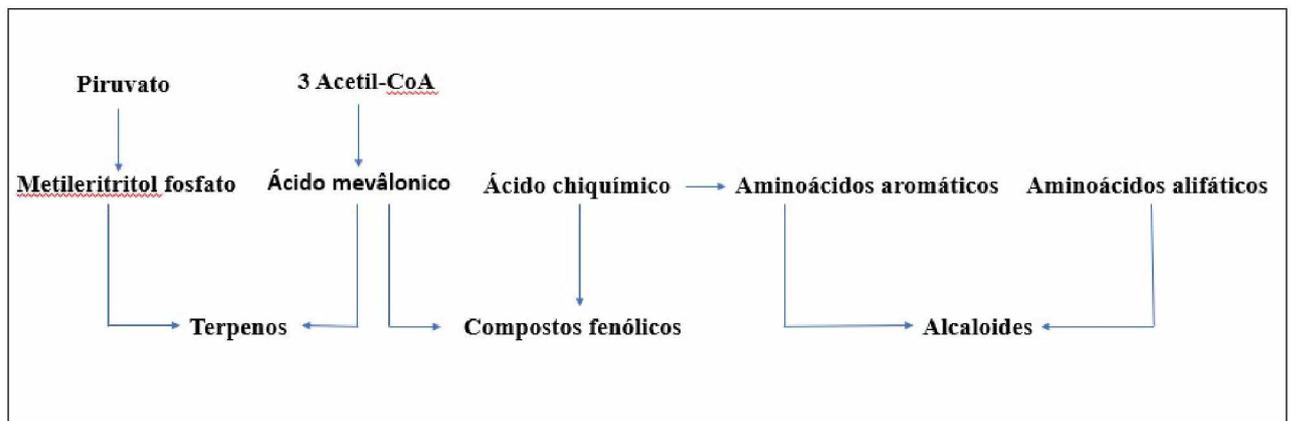
Em organismos vegetais, o metabolismo costuma ser dividido em metabolismo primário (MP) e metabolismo secundário (MS). O MP é o processo metabólico que possui funções essenciais no vegetal, como a fotossíntese e a respiração. Nesse processo se obtém energia, intermediários biossintéticos e também há a conversão de precursores biossintéticos para formação de macromoléculas essenciais para os seres vegetais, como DNA, RNA, proteínas, lipídios e polissacarídeos, sendo esses metabólitos encontrados em todas as espécies vegetais (DEMAIN; FANG, 2000).

Os metabólitos obtidos do MS possuem funções mais específicas e são provenientes de milhões de anos de evolução dos vegetais, por isso não são encontrados igualmente em todas as espécies vegetais, sendo fonte de estudos taxonômicos (SCHÄFER; WINK, 2009, KABERA et al., 2014). Esses metabólitos são utilizados pelas plantas para proteção contra microrganismos, insetos, herbívoros e plantas concorrentes; e também possuem a ação de proteção contra estresse abióticos, como mudanças de temperatura, exposição à radiação UV,

entre outros. Os metabólitos secundários também atuam na comunicação com organismos de interesse, como polinizadores. (SCHÄFER; WINK, 2009, ZAYNAB et al., 2018). Além disso, esses metabólitos são muito utilizados pelo homem, principalmente como medicamentos, drogas relaxantes, aromatizantes, corantes e no desenvolvimento de novos fármacos (KABERA et al., 2014).

Os metabólitos secundários são divididos em três classes de acordo com a via metabólica de origem: terpenos, compostos fenólicos e alcaloides. Os terpenos se originam das rotas do ácido mevalônico ou da rota do metileritritol fosfato (BUCHANAN; GRUISSEM; JONES, 2000, DEWICK, 2002, THOLL, 2015). Os compostos fenólicos vêm das rotas do ácido chiquímico e do ácido mevâlonico e os alcaloides se originam de aminoácidos aromáticos, que são derivados da rota do ácido chiquímico e também são derivados de aminoácidos alifáticos (BUCHANAN; GRUISSEM; JONES, 2000, DEWICK, 2002, ZAYNAB et al., 2018). A Figura 3 mostra uma versão simplificada das principais vias de formação dos metabólitos secundários.

Figura 3- Vias de formação dos metabólitos secundários



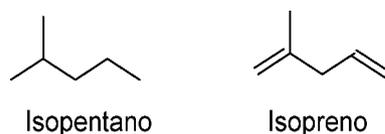
Fonte: adaptado de Dewick (2002) e Buchanacan et al., (2000)

3.1.1 Terpenos

Os terpenos ou terpenoides representam a maior e mais diversa classe de compostos biossintetizados pelas plantas. Todos os terpenos são derivados de fusões de repetitivas cadeias de 5 carbonos, baseadas em um esqueleto de um isopentano (2-metilbutano) (Figura 4). Esses monômeros são geralmente atribuídos a unidades de isopreno (2-metilbuta-1,3-dieno) (Figura 4), pois, a decomposição termal da maioria dos terpenos terem como produto o gás isopreno e, devido a certos ambientes químicos, levarem o gás isopreno a polimerizar em cadeias múltiplas

de 5 carbonos, formando então inúmeros esqueletos de terpenoides. Fato este que dá a denominação de terpenoides para os terpenos (BUCHANAN; GRUISSEM; JONES, 2000, DEWICK, 2002).

Figura 4- estrutura do isopentano e do isopreno.



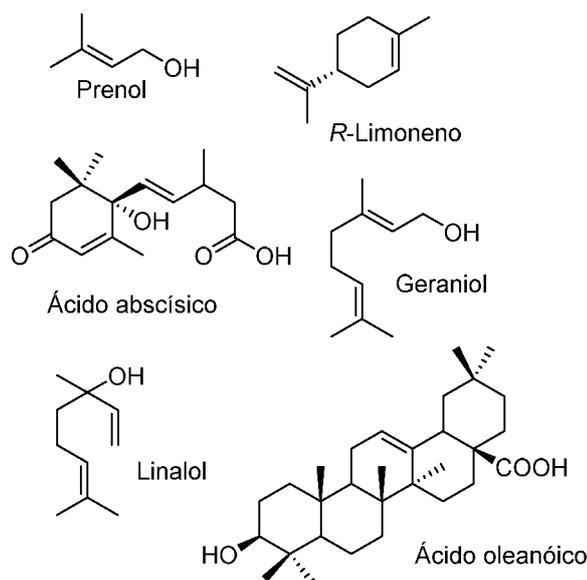
Fonte: o autor

Apesar dos terpenos serem baseados em cadeias de múltiplas estruturas de isopreno, o isopreno não é o precursor biológico dos terpenos, porém a classificação dos terpenos é feita baseada na quantidade de unidades de isoprenos presentes na sua estrutura. A Tabela 1 mostra a classificação para os terpenos e a Figura 5 mostra alguns exemplos de terpenos.

Tabela 1- Classificação dos terpenos

Terpenos	Unidades de isopreno	Nº de carbonos
Hemiterpenos	1	5
Monoterpenos	2	10
Sesquiterpenos	3	15
Diterpenos	4	20
Triterpenos	6	30
Tetraterpenos	8	40

Figura 5- Exemplos de terpenos



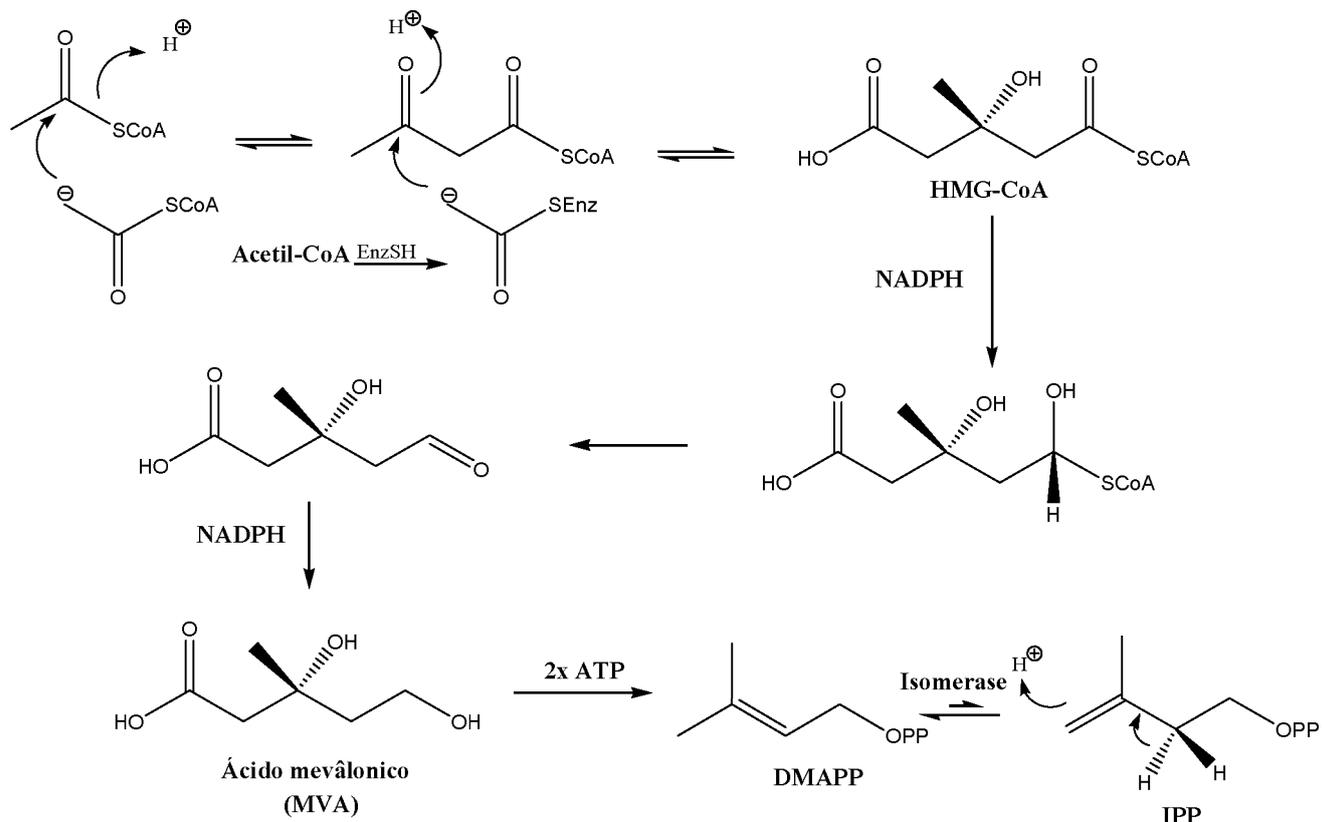
Fonte: o autor.

Os terpenoides possuem algumas importantes funções primárias em plantas, alguns exercem a função de pigmentos fotossintéticos (carotenoides), transportadores de elétrons; exercem funções na glicosilação de proteínas, como lipídios de membranas, entre outras. Terpenos voláteis também auxiliam em interações de mutualismo, na atração de polinizadores, proteção contra predadores, entre outras funções (THOLL, 2015).

Os terpenos podem ser formados por duas rotas biossintéticas, a rota do ácido mevalônico ou a rota do metileritritolfosfato. Ambas as rotas são usadas para a formação dos intermediários na formação dos terpenos que são o isopentenil difosfato (IPP) e o dimetilalil difosfato (DMAPP).

Pela rota do ácido mevalônico, primeiramente três moléculas de acetil-coenzima A são condensadas formando o β -hidroxi- β -metilglutaril-CoA (HMG-CoA). Após sua formação o HMG-CoA sofre duas etapas de redução para a formação do ácido mevalônico, que então sofre sucessíveis fosforilações até a formação do IPP, que na presença de uma isomerase, é convertida para o DMAPP. A combinação de estruturas de IPP e DMAPP através de enzimas levam a formação dos terpenos (BUCHANAN; GRUISSEM; JONES, 2000, DEWICK, 2002). A Figura 6 traz um esquema resumido da rota do ácido mevalônico.

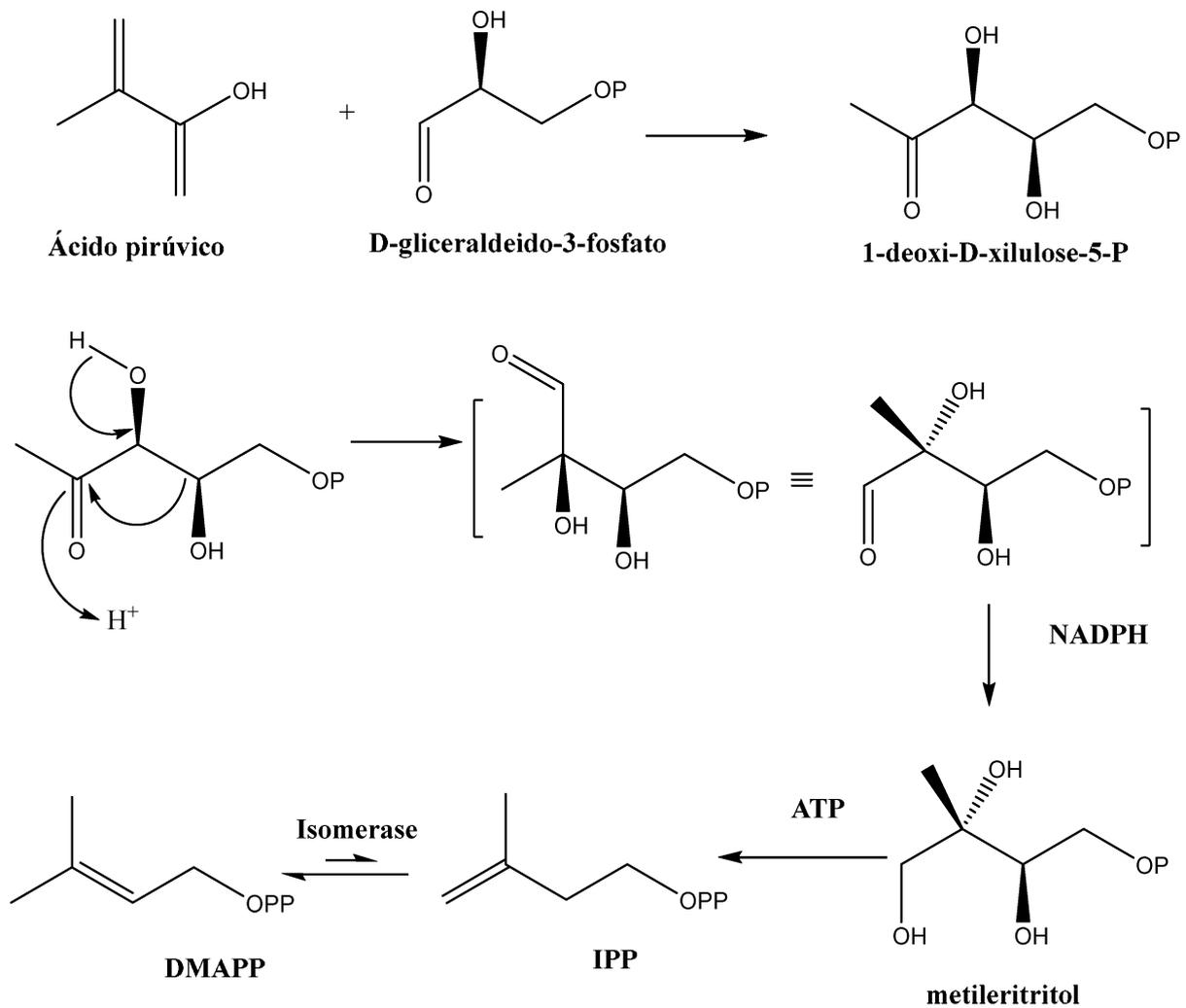
Figura 6- Formação de terpenos via rota do ácido mevânico



Fonte: adaptado de Dewick (2002) e Buchanan et al., (2000)

Outra forma de obtenção do IPP é pela rota do metileritritol fosfato, na qual ocorre a reação entre o ácido pirúvico com uma molécula de D-gliceraldeído-3-fosfato, para a formação do intermediário 1-deoxi-D-xilulose-5-fosfato. Este intermediário passa por uma redução para a formação do metileritritol fosfato, que posteriormente sofre uma fosforilação e então forma o IPP, que também é convertido a DMAPP por uma isomerase (BUCHANAN; GRUISSEM; JONES, 2000, DEWICK, 2002, THOLL, 2015). A Figura 7 traz um esquema resumido da rota do metileritritol fosfato.

Figura 7- Formação de terpenos via rota do metileritritol fosfato.

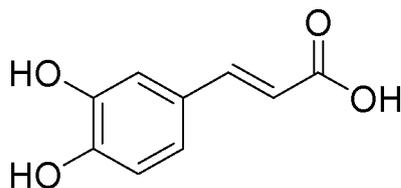


Fonte: adaptado de Buchanan (2000), Dewick (2002) x'e Tholl (2015)

3.1.2 Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos são caracterizados pela presença de pelo menos um grupo hidroxila ligado a um anel aromático como mostrado na Figura 8. Nessa classe encontra-se desde simples fenóis a mais complexos, como lignanas, ligninas, flavonoides, proantocianidinas, entre outros (BUCHANAN; GRUISSEM; JONES, 2000).

Figura 8- Exemplo de composto fenólico: ácido cafeico



Fonte: o autor.

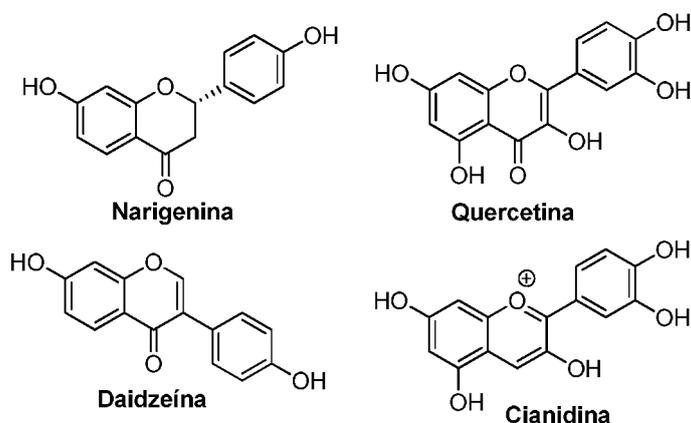
Devido à variedade de compostos presentes nessa classe, os compostos fenólicos possuem diversas funções nas plantas, por exemplo, as ligninas reforçam paredes celulares, flavonoides estão ligados a pigmentos das plantas, cumarinas auxiliam na proteção contra fungos e bactérias, além de várias outras funções (BUCHANAN; GRUISSEM; JONES, 2000).

Os compostos fenólicos são biossintetizados por duas rotas metabólicas, a rota do ácido chiquímico ou a rota do ácido mevânico, sendo a rota do ácido chiquímico a responsável por maior parte dos compostos fenólicos. Na rota do ácido chiquímico são formados ácidos benzoicos e ligninas. Classes como os flavonoides e seus derivados vêm da junção das rotas do ácido chiquímico e da rota do ácido mevânico (BUCHANAN; GRUISSEM; JONES, 2000).

Os flavonoides são um importante grupo de compostos pertencentes ao grupo dos compostos fenólicos, possuindo diversas funções nas plantas. Eles estão ligados à coloração de pétalas com intuito de atrair polinizadores, alguns possuem funções de filtrar radiação UV (ultravioleta), auxiliam na fixação de nitrogênio, e várias outras funções. Flavonoides também estão relacionados a aplicações em relação à saúde humana, tendo muitos compostos já testados frente a atividades antioxidante, antifúngica, antialérgica, antiviral (KABERA et al., 2014, DELMULLE; DE MAESENEIRE; DE MEY, 2018).

Esse grupo inclui uma série de compostos metabolizados por plantas, por exemplo, chalconas, auronas, flavanonas, isoflavonoides, flavanols, antocianinas, entre outros. Alguns exemplos de estruturas pertencentes a estas classes encontram-se na Figura 9.

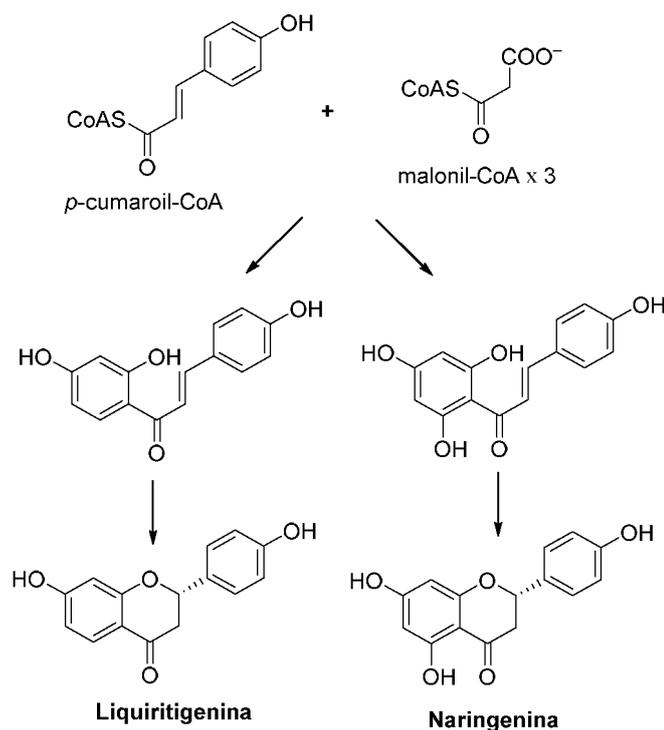
Figura 9- Exemplos de flavonoides.



Fonte: o autor.

Apesar desses vários grupos de compostos diferentes pertencentes a essa classe, todos tem uma rota biossintética inicial em comum. A biossíntese dos flavonoides é uma junção das rotas do ácido chiquímico e da rota do ácido mevalônico. O *p*-cumaroil-CoA condensa-se com 3 moléculas de malonil-CoA, vinda da rota do ácido mevalônico, e a partir desta junção uma série de reações catalisadas por diferentes enzimas levam a formação dos diferentes tipos de flavonoides (BUCHANAN; GRUISSEM; JONES, 2000, KABERA et al., 2014). Um esquema resumido da síntese de alguns desses compostos é apresentado na Figura 10.

Figura 10- Exemplo da biossíntese dos flavonoides liquiritigenina e naringenina.



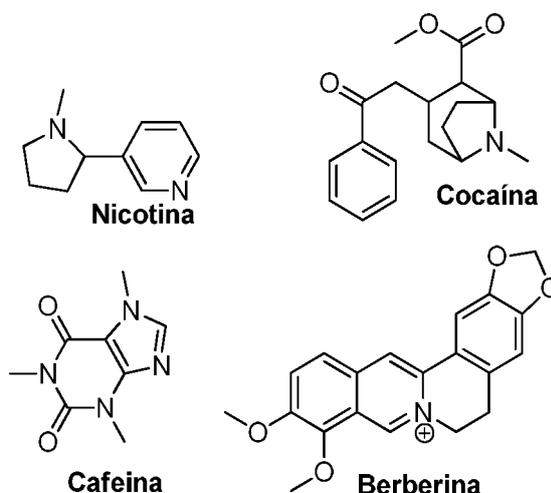
Fonte: adaptado de Buchancan (2000) e Kabera (2014)

3.1.3 Alcaloides

Alcaloides são bases nitrogenadas orgânicas encontrados principalmente em plantas, porém também podem ser encontrados em alguns microrganismos e animais. Assim, são caracterizados pela presença de um ou mais átomos de nitrogênio, que na maioria das vezes são aminas primárias, secundárias ou terciárias, fazendo com que grande parte dos alcaloides possua caráter básico.

Os alcaloides são classificados baseado na estrutura que contém o nitrogênio do composto, por exemplo, pirrolidina, piperidina, quinolina, isoquinolina, etc. Esses compostos geralmente são derivados de aminoácidos e geralmente apresentam na estrutura final o esqueleto do aminoácido precursor, apesar do carbono pertencente ao ácido carboxílico acabar sendo perdido na descarboxilação. Os principais aminoácidos precursores na biossíntese de alcaloides são ornitina, lisina, ácido nicotínico, tirosina, triptofano, ácido antranílico e histidina (BUCHANAN; GRUISSEM; JONES, 2000, DEWICK, 2002, DEBNATH et al., 2018). Alguns exemplos de alcaloides encontram-se na Figura 11.

Figura 11- Exemplos de alcaloides



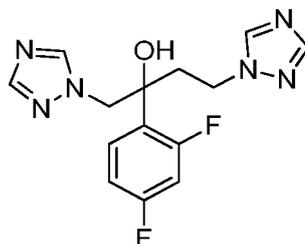
Fonte: o autor

3.2 Atividade antifúngica

Doenças causadas por fungos são normalmente mais ocorrentes em pessoas com baixa imunidade, como crianças e idosos, pacientes que passaram por transplantes, portadores de HIV, diabetes, pacientes com longos tratamentos com antibióticos, entre outros. Estima-se que infecções causadas por fungos atinja em torno de 350 milhões de pessoas em todo mundo, sendo causadoras de aproximadamente 1,5 milhões de mortes por ano (AHMAD et al., 2011, OLIVEIRA et al., 2016, SHARMA; CHOWDHARY, 2017).

Fungos são organismos eucariontes, o que geralmente torna mais difícil o tratamento contra enfermidades causadas por esses microrganismos, do que as causadas por bactérias. Outro fator que também dificulta o tratamento de doenças causadas por fungos é a resistência aos tratamentos utilizados, como o fluconazol (Figura 12). Outros problemas são a toxicidade de algumas substâncias utilizadas em tratamento como alguns azóis e também o fato de algumas substâncias utilizadas serem apenas fungistáticos, e não fungicida. Todos esses fatores justificam a necessidade da busca por novas substâncias para serem usadas contra infecções causadas por fungos (AHMAD et al., 2010, AHMAD et al., 2011, ZUZARTE et al., 2012, SHARMA; CHOWDHARY, 2017).

Figura 12- Estrutura do fluconazol.

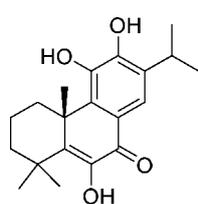


Fonte: o autor.

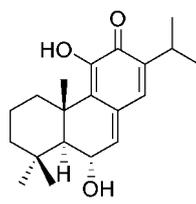
Na busca por novas formas de tratamento frente a enfermidades causadas por fungos, os PN podem ser fontes de pesquisa para novos compostos. A revisão realizada por Zida e outros (2017), mostrou que inúmeros metabólitos secundários de várias espécies de plantas, apresentaram atividade antifúngica contra a espécie *Candida albicans* no período de 1969 a 2015. Neste trabalho foram avaliados um total de 111 artigos publicados com 142 produtos naturais testados, tendo variadas espécies de plantas de diferentes gêneros, originadas de diferentes países do mundo. Isto mostra que as pesquisas com produtos naturais pode ser um caminho viável para encontrar novos compostos com atividade antifúngica.

Outro estudo publicado por Valette e outros (2017) mostrou que os produtos naturais já tiveram suas atividades testadas contra algumas espécies de fungos, sendo a maioria dos compostos terpenos e flavonoides. A figura 13 traz alguns desses compostos e os fungos os quais os mesmos apresentaram atividade.

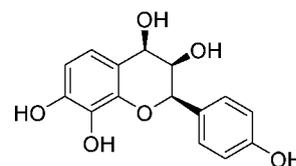
Figuras 13- Compostos naturais com atividade antifúngica



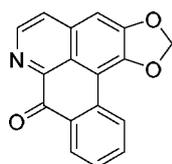
14-deixycoleon



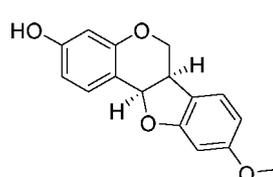
Ferruginol taxodone



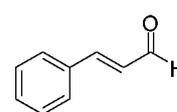
Teracacidina



Liriodenine



Medicarpina

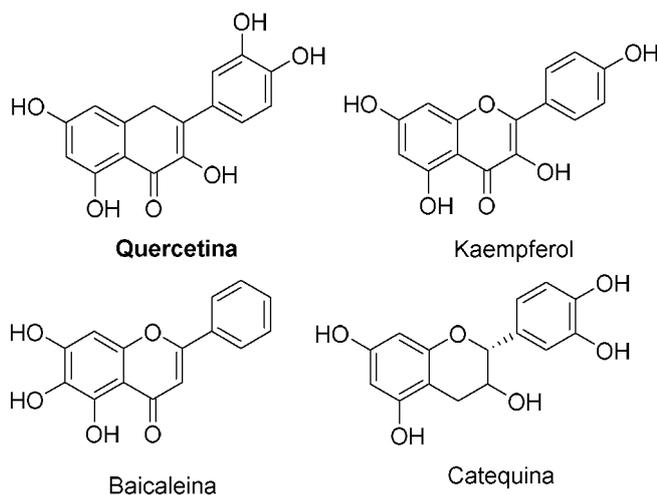


Cinamaldeído

Fonte: o autor.

Um outro estudo realizado por Seleem (2017) mostrou que alguns flavonoides que já foram isolados e mostraram atividade frente ao fungo *Candida albicans*. Alguns desses flavonoides encontram-se na Figura 14.

Figura 14- Flavonoides com atividade antifúngica contra a espécie *Candida albicans*.



Fonte: o autor.

3.3 *Cassia bakeriana*: Aspectos da família e do gênero

O gênero *Cassia* pertence à família Fabaceae que é uma das 3 maiores entre as angiospérmicas. A família compreende cerca de 20000 espécies, distribuídas em aproximadamente 700 gêneros. O gênero *Cassia* é constituído por mais de 600 espécies, incluindo árvores, arbustos e ervas, e estão comumente distribuídas em regiões tropicais e subtropicais ao redor do mundo (VIEGAS JR et al., 2006).

Muitas espécies de *Cassia* são relatadas pelos saberes populares como plantas medicinais para as mais diversas enfermidades. Estudos fitoquímicos e farmacológicos, mostraram que muitas dessas espécies possuem atividade antibacteriana, antifúngica, entre outras atividades (VIEGAS JR et al., 2006).

Uma revisão do gênero *Cassia* feito por Viegas e outros (2006), mostrou diversas atividades biológicas e farmacológicas atribuídas a extratos de várias espécies de *Cassia* que podem ser vistas na Tabela 2. Esse estudo também mostrou algumas espécies de *Cassia* que possuem atividade antifúngica evidenciada, como as espécies *C. fistula*, *C. occidentalis*, *C. holosericea*, *C. purpúrea*, entre outras.

Tabela 2- Espécie de Cassia com atividades biológicas atestadas (VIEGAS JR et al., 2006).

Espécie	Atividade biológica
<i>Cassia abbreviata</i>	Antibacteriana, contra doenças venéreas
<i>Cassia alata</i>	Antifúngica, antimicrobiana
<i>Cassia angustifolia</i>	Antitumoral, anti-inflamatória, antibacteriana
<i>Cassia auriculata</i>	Antibacteriana, antifúngica e antidiabética
<i>Cassia fistula</i>	Antibacteriana, anti-inflamatória, hepatoprotetora, antifúngica, antitumoral e laxativa
<i>Cassia holosericea</i>	Antibacteriana e antifúngica
<i>Cassia nigricans</i>	Anti-úlceras e antidiarreica
<i>Cassia occidentalis</i>	Antibacteriana, antifúngica, antiviral, hepatoprotetora, antimalárica
<i>Cassia purpurea</i>	Antibacteriana e antifúngica
<i>Cassia roxburghii</i>	Antibacteriana e antifúngica
<i>Cassia siamea</i>	Antibacteriana, antifúngica, antiviral e antioxidante
<i>Cassia tora</i>	Hepatoprotetora, citoprotetora, antibacteriana, antifúngica, antimutagênica e anti-inflamatória

Outra revisão mais recente por Yadav e outros (2010), sobre a *Cassia occidentalis*, mostrou diversas atividades biológicas avaliadas dos seus extratos que apresentaram resultados positivos para várias delas, como atividade antibacteriana, antifúngica, antimalárica e anti-inflamatória. Dentre os fungos que a *C. occidentalis* apresentou atividade foi a *Candida albicans*, causador da candidíase. Esse estudo também mostrou uma série de compostos já isolados nessa espécie de *Cassia*, além das composições químicas em cada parte da mesma. A Tabela 3 mostra a composição de cada parte da planta e as respectivas atividades de cada uma delas.

Tabela 3- Composição química e atividades biológicas para a *Cassia occidentalis* (YADAV et al., 2010)

Parte da planta	Composição	Atividade biológica
Folhas	Flavonoides, antraquinonas, taninos, alcaloides, saponinas.	Antibacteriana, antifúngica, hepatoprotetora, antimalárica, anti-inflamatória
Sementes	Antraquinonas, alcaloides, carboidratos, taninos, ácidos graxos.	Antibacteriana
Raízes	Antraquinonas, chantonas.	Antimalárica

Outra espécie bastante estudada na literatura é a *Cassia abbreviata*. No estudo de Leteane e outros (2012), algumas espécies de plantas foram testadas contra o vírus do HIV, entre eles a *C. abbreviatae* e a *C. sieberiana*. Este estudo traz usos medicinais que estas espécies possuem, como uso contra dores abdominais, problemas menstruais e problemas no útero para a *C. abbreviata* e o uso contra diarreia, perda de apetite e perda de peso para a *C. sieberiana*. Neste estudo, ambas espécies de *Cassia* obtiveram resultado positivo contra HIV para os seus extratos etanólico, a *C. abbreviata* para as cascas e raízes e a *C. siberiana* para as cascas. Através do estudo fitoquímico foi possível identificar no extrato de ambas as espécies a presença de antraquinonas, antrocianidinas, polifenóis e taninos.

Os extratos das raízes da *Cassia abbreviata* apresentaram forte atividade antioxidante e também apresentaram boa atividade contra um forte indutor de hepatite. O estudo também apresenta alguns compostos identificados via espectrometria de massas, na sua maioria polifenóis, principalmente proantociadinas (SOBEH et al., 2018).

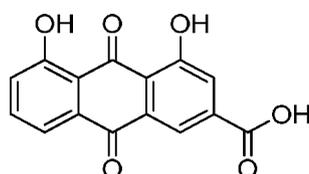
No estudo de Mongalo e outros (2017), algumas espécies de plantas foram testadas contra alguns microrganismos causadores de DST (doença sexualmente transmissível) e contra doenças que geralmente acometem pacientes com HIV, como a candidíase. Os extratos das folhas e vagens de *Cassia abbreviata* apresentaram resultados significativos contra *Candida albicans*.

Em relação à espécie em estudo, a *Cassia bakeriana* Craib é popularmente conhecida como cássia-rósea, uma árvore originária da Tailândia, pertencente à família das *Fabaceae* (*Leguminosae*). É uma árvore frondosa, possui entre 12 a 15 metros de altura, com tronco

robusto e a casca pardo-acinzentada lisa. Por ser uma árvore frondosa e florífera, é muito usada em paisagismo, é uma espécie de clima tropical úmido, mas tolera as condições climáticas das regiões sudeste do Brasil (LORENZI, 2003).

Não possui relatos na literatura do uso da *C. bakeriana* como planta medicinal. Em relação a estudos fitoquímicos e biológicos, no estudo realizado por Cunha e outros (2017), os extratos das cascas e folhas foram testados frente a bactérias bucais, e a partição diclorometano da casca apresentou o melhor resultado que levou o seu fracionamento bioguiado resultando no isolamento da antraquinona reína (figura 15). Neste estudo também foram identificados outros compostos por espectrometria de massas.

Figura 15- Estrutura da reína



Fonte: o autor

A caracterização química do óleo essencial das folhas de *C. bakeriana* também foi realizada no trabalho de Cunha e outros, (2017), mas os extratos ainda não foram estudados. Também não foram encontrados nenhum estudo referente à atividade antifúngica em relação as folhas da *Cassia bakeriana*, o que justifica o estudo proposto nesse trabalho para essa espécie.

4.0 PARTE EXPERIMENTAL

4.1 Materiais e métodos

4.1.1 Instrumentação

- Banho de aquecimento FISATOM modelo 550;
- Balança analítica SHIMADZU modelo AUW220D;

- Balança de luz infravermelha para determinação de umidade Quimis modelo Kelt FD-600;
- Evaporador rotativo IKA modelo RV 10;
- Liofilizador TERRONI modelo LS3000;
- Incubadora B.O.D. Nova Ética modelo 411/FDP 155L;
- Lavadora ultra-sônica modelo USC-750 Unique;
- Cromatógrafo líquido de alta eficiência Agilent modelo Infinity 1260, acoplado a um espectrômetro de massas de alta resolução do tipo Q-TOF (*Quadropole Time of Flight*) da marca Agilent modelo 6520 B fonte de ionização por eletrospray (IES).

4.1.2 Reagentes e solventes

- Os solventes utilizados para a extração e nas cromatografias foram: hexano, etanol, acetato de etila, *n*-butanol, diclorometano e metanol, todos de marcas diversas: Synth, Vetec, Merck e Neon. O hexano, etanol e acetato de etila foram destilados para maior grau de pureza;
- Anidrido acético, ácido sulfúrico, ácido fórmico e ácido acético, todos de marcas diversas: Synth, Merck e Vetec;
- Ácido hexacloroplatínico (Vetec);
- Reagentes químicos: nitrato de bismuto (Isofar), iodeto de potássio (Chemicals), difenilboriloxietilamina NP (Sigma-Aldrich), polietilnoglicol 400 (Vetec), cloreto de alumínio (Vetec), sulfato cérico pentahidratado (Vetec);
- Metanol HPLC foram da Sigma-Aldrich e J. T. Baker.

4.2 Procedimento experimental

4.2.1 Coleta e preparação das amostras vegetais

A coleta das folhas da *Cassia bakeriana* foi realizada na Universidade Federal de Uberlândia (UFU) (18°55'06.6"S 48°15'29.4"W). A espécie já foi identificada em 2009 pelos Professores Dr. Glein Monteiro de Araújo e Dr. Ivan Schiavini no Instituto de Biologia da Universidade Federal de Uberlândia. A exsiccata do espécime foi depositada no Herbário da UFU com número 63584 a qual foi consultada para coleta das folhas.

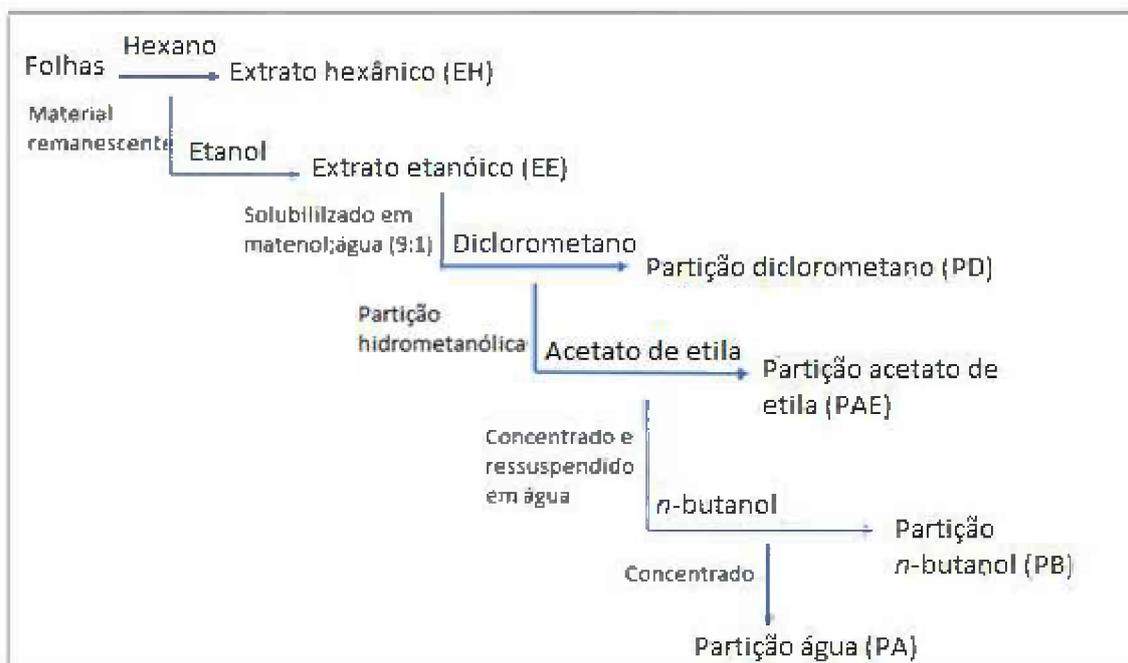
As folhas coletadas foram então colocadas em uma incubadora com recirculação de ar a 35 °C para secagem. O teor de umidade foi monitorado através do método gravimétrico, com uma balança de luz infravermelha. Em torno de 1,0 g das folhas eram monitoradas por cerca de 15 minutos a 105 °C. Após atingir um teor de umidade de 7,3 %, as folhas foram retiradas da incubadora e trituradas utilizando um multiprocessador.

4.2.2 Preparação dos extratos e extração líquido-líquido

Para o preparo dos extratos foi usado o método da maceração e para isso 1 Kg das folhas trituradas foram extraídas com 2,3 L de hexano durante 48 horas à temperatura ambiente, o processo foi repetido 6 vezes. O solvente foi filtrado e o extrato hexânico (EH) foi concentrado com o auxílio de um evaporador rotatório à pressão reduzida com banho de 40 °C. Posteriormente o processo foi repetido com as folhas restantes da extração com hexano, para obtenção do extrato etanólico (EE). Foram adicionadas as folhas 2,3 L de etanol e o processo também foi repetido 6 vezes. Os extratos foram congelados e liofilizados para remoção da água remanescente.

Após o preparo dos extratos foi realizado a extração líquido-líquido a partir do EE, onde 100 g do EE foi solubilizado em uma solução 9:1 de metanol:água (600 mL). O primeiro solvente utilizado foi diclorometano, sendo adicionado 250 mL à solução e, com um funil de separação, foi obtido a partição diclorometano (PD); o processo foi repetido cinco vezes. Posteriormente o procedimento foi repetido com acetato de etila (PAE), para obtenção da sua partição. A solução restante de metanol-água foi então concentrada para redução do volume e água foi adicionado. Em seguida o processo de partição com *n*-butanol foi repetido, sendo obtido no final a partição *n*-butanol (PB) e a aquosa (PA). Todas as partições foram secadas com o auxílio de um evaporador rotativo, congeladas e liofilizadas. Um fluxograma com o procedimento encontra-se na Figura 16.

Figura 16- Fluxograma do processo de preparação dos extratos e partições das folhas da *C. bakeriana*.



Fonte: o autor

4.2.3 Prospecção fitoquímica via cromatografia em camada delgada

A prospecção fitoquímica foi realizada para os extratos e partições em placas cromatográficas em camada delgada (CCD) em sílica gel 60 com indicador de fluorescência (UV₂₅₄), 0,20 mm de espessura (Macherey-Nagel). Para a aplicação foram preparadas soluções dos extratos e partições em metanol com concentração de 1 mg mL⁻¹. Foram utilizadas 3 fases móveis para aplicação nas placas: fase móvel 1–hexano:acetato de etila (5:1), a fase 2– éter etílico:acetato de etila:ácido fórmico (75:25:1), e a fase 3 – etila:metanol (10:3). A fase móvel 1 foi utilizada para o extrato hexânico, a fase móvel 2 para o extrato etanólico e para as partições diclorometano, acetato de etila e n-butanol e, para a partição aquosa, foi utilizada a fase móvel 3. As placas foram reveladas com reveladores que serão descritos abaixo, para identificação das classes de compostos presentes em cada extrato e partição. Todos os reveladores foram preparados seguindo a metodologia proposta por (WAGNER; BLADT, 1996).

Detecção de alcaloides

- Dragendorff: primeiramente foram preparadas duas soluções, solução A e B. A solução A, foi preparada dissolvendo 0,85 g de nitrato de bismuto em 10 mL de ácido acético e seguida adição de 40,0 mL de água destilada sob aquecimento. A solução B foi preparada dissolvendo 8,0 g de iodeto de potássio em 30 mL de água destilada. As soluções foram misturadas em proporções iguais, produzindo uma solução estoque. Desta solução estoque retirou-se 1,0 mL e foram adicionados 2,0 mL de ácido acético glacial e 10 mL de água. A solução foi aplicada sob a placa cromatográfica, e a presença de alcaloides se dá pelo aparecimento de manchas laranja.
- Iodocloroplatinado: foi preparado uma solução 5% ($m v^{-1}$) de ácido hexacloroplatínico (IV) em água e uma solução de 10% ($m v^{-1}$) de iodeto de potássio em água. Em seguida misturou 1,0 mL da solução de ácido hexacloroplatínico, 9,0 mL da solução de iodeto de potássio e 10 mL de água destilada. A solução foi borrifada sob a placa e o aparecimento de manchas na cor marrom indica a presença de alcaloides.

Detecção de flavonoides

- NP/PEG: foi preparado uma solução 1% ($m v^{-1}$) de difenilboriloxietilamina (NP) em metanol e uma solução 5% ($m v^{-1}$) de polietilenoglicol-4000 (PEG4000) em etanol. O revelador foi preparado misturando 10,0 mL da solução de difenilboriloxietilamina em 8 mL da solução de etilenoglicol-4000, a solução foi aplicada sobre a placa cromatográfica e levada à câmara de luz UV.
- Cloreto de alumínio: foi preparado uma solução de cloreto de alumínio 1% ($m v^{-1}$) em metanol. A solução foi borrifada sobre a placa cromatográfica e levada a câmara de luz UV.

Detecção de antraquinonas

- KOH (reagente Bornträger): foi preparado uma solução de KOH 5% ($m v^{-1}$) em etanol. A solução foi aplicada sobre a placa cromatográfica. O aparecimento de coloração vermelha indica a presença de antraquinona. Também é possível identificar na câmara de luz UV antronas (manchas amarelas) e cumarinas (manchas azuis).

Detectores universais: detecção de terpenos, esteroides, saponinas, fenilpropanoides, flavonoides e proantocianidinas

- Sulfato Cérico: foi dissolvido 2,1 g de $Ce(SO_4)_2 \cdot 5H_2O$ em 15,0 mL de H_2SO_4 concentrado e posteriormente adicionado 800 mL de água (CHAVES, 1997). A solução foi aplicada sobre a placa, o aparecimento de manchas marrons indicou a presença de algum composto das classes mencionadas.

- Liebermann-Burchard: foram adicionados 5,0 mL de anidrido acético e 5,0 mL de ácido sulfúrico concentrado a 50 mL de etanol absoluto, sob banho de gelo. A solução foi borrifada sobre a placa e aquecida a 100 °C em torno de 5 a 10 minutos, o aparecimento de manchas coloridas indicam a presença de compostos.

- Vanilina sulfúrica: foi preparado uma solução 1% ($m v^{-1}$) de vanilina em etanol e uma solução 5% ($v v^{-1}$) de ácido sulfúrico em etanol. A placa foi borrifada com a solução A, seguida da solução B e aquecida a 100 °C em torno de 5 a 10 minutos, o aparecimento de manchas coloridas indicam a presença de compostos.

4.2.4 Determinação da atividade antifúngica

Foi usado o método da microdiluição em caldo para determinar a concentração inibitória mínima (CIM). As análises foram realizadas no Laboratório de Pesquisa em Microbiologia Aplicada da Universidade Federal de Franca (LaPeMa-UNIFRAN), com a colaboração do professor Dr. Carlos Henrique Gomes Martins.

As cepas padrão utilizadas no ensaio foram da “American Type Culture collection” (ATCC). As cepas utilizadas foram as seguintes: *Candida albicans* (ATCC 28366), *Candida tropicalis* (ATCC 13803) e *Candida glabrata* (ATCC 15126).

Determinação da Concentração Inibitória Mínima

Inicialmente soluções de estoque foram preparadas dissolvendo os extratos e partições em DMSO na concentração de 192 000,00 $\mu g mL^{-1}$. Em seguida, foram realizadas diluições com as soluções de estoque usando o caldo RPMI tamponado em pH 7,2 com ácido 3-N-morfolinopropanosulfônico (MOPS) até a concentração de 12 000 $\mu g mL^{-1}$. A determinação da CIM foi realizada em placas de microdiluição com 96 poços, onde foram feitas as diluições seriadas com concentrações de 3000 a 1,46 $\mu g mL^{-1}$ dos extratos e partições. O meio de cultura

utilizado foi o caldo RPMI tamponado com MOPS. Cada poço recebeu 100,0 μL da suspensão do inóculo sendo o volume final de cada poço foi de 200 μL . Para o controle positivo (Anfotericina B) foi realizado o mesmo procedimento com concentrações entre 16,0 e 0,031

$\mu\text{g mL}^{-1}$. Controles de esterilidade do meio de cultura (caldo RPMI), do inóculo, dos extratos e partições e do solvente (DMSO) também foram realizados. O controle do solvente foi preparado nas concentrações de 1 % a 5 % em $v v^{-1}$ e não influenciou no crescimento das leveduras. Para validação dos ensaios, o controle positivo anfotericina B foi testado frente às cepas de referência *Candida krusei* (ATCC6258) e *Candida parapsilosis* (ATCC22019) com concentrações entre 0,25 a 2,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Valores de CIM dentro deste intervalo para estas leveduras validam a metodologia e os resultados para as demais leveduras segundo o CLSIM27-A3 (CLINICAL; INSTITUTE, 2008). Após a montagem das microplacas, estas foram incubadas por 48 h a 37 °C, e posteriormente foi determinada a CIM utilizando o revelador resazurina (0,02 % $m v^{-1}$). A leitura foi realizada a partir da mudança de coloração da resazurina que apresenta coloração azul para coloração vermelha se houver crescimento das leveduras. A CIM correspondeu a menor concentração dos extratos/partições capaz de inibir o crescimento das leveduras.

Preparo do inóculo

O inóculo foi preparado de acordo com o protocolo de referência CLSI M27-A3 (CLINICAL; INSTITUTE, 2008). Inicialmente as leveduras foram cultivadas em placas de petri contendo ágar Sabouraud por 24 horas a 37 °C. Com auxílio de alça de platina esterilizada, colônias das leveduras foram transferidas para tubos contendo 2,0 mL de solução salina 0,85 %. O inóculo foi preparado usando método espectrofotométrico (530 nm) e comparado com a escala de McFarland 0,5 para obter o valor de 6×10^6 UFC mL^{-1} . Em seguida, foram realizadas diluições em caldo RPMI até que o inóculo atingisse $5,0 \times 10^5$ UFC mL^{-1} .

4.2.5 Análise por espectrometria de massas

As análises de cromatografia líquida de alta eficiência hifenado ao espectrômetro de massas (CLAE/EM) foram realizadas no Laboratório de Nanobiotecnologia do Instituto de Biotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia (IBTEC-UFU) em um CLAE (marca Agilent modelo Infinity 1260) hifenado ao espectrômetro de massas de alta resolução do tipo Q-TOF da marca Agilent® modelo 6520 B com fonte de ionização por electrospray (IES). Os

parâmetros cromatográficos foram: coluna Agilent modelo Poroshell, 2.1 mm de diâmetro interno, 10 cm de comprimento, partículas de 2,7 µm, a fase móvel: água acidificada com ácido fórmico (0,1% v v⁻¹) (A) e metanol (B), com o gradiente: 2% de B (0 min), 98% de B (0-10 min); 100% de B (10-11 min). Os parâmetros de ionização foram: pressão do nebulizador de 20 psi, gás secante a 8L/min a uma temperatura de 220 °C e no capilar foi aplicado uma energia de 4,5KV.

Para as análises de espectrometria de massas sequencial (EM/EM) em diferentes energias de colisões nos modos negativo e positivo. Com a *m/z* (razão massa carga) obtida nos espectros em alta resolução foi possível propor a identificação dos compostos nas amostras bioativas. A fórmula molecular proposta de cada composto foi selecionada de acordo com uma lista sugerida pelo Software MassHunter® seguindo a mais baixa diferença entre a massa experimental e a massa teórica, erro em ppm do *m/z* em alta resolução de 0 a ± 5%, (Equação 1) equivalência de ligações dupla e regra do nitrogênio. As possíveis estruturas, fragmentos e classe de metabólitos foram propostos de acordo com outros trabalhos na literatura, biblioteca Metlin e bancos de dados (Chempider, Pubchem e Massbank), analisando sistema de solventes, tempos de retenção e espectro de massas, e os espectros de fragmentação nos modos positivo e negativo.

$$E_{ppm} = \left[\frac{\text{massa experimental} - \text{massa exata}}{\text{massa exata}} \right] 10^6 \quad \text{Equação 1}$$

5.0 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Rendimentos dos extratos e extração líquido-líquido

A extração e o fracionamento por extração líquido-líquido são partes importantes em um estudo de química de produtos naturais, pois os extratos serão responsáveis por fornecer as substâncias a serem estudadas e as partições tornam o trabalho de caracterização e possíveis isolamentos mais fáceis, por separar as substâncias de acordo com a afinidade em relação aos solventes utilizados. Assim, um bom rendimento nessas etapas é importante para o andamento do trabalho.

O método utilizado para a extração foi por maceração, o extrato hexânico foi realizado primeiro a fim de se retirar substâncias com caráter apolar como as clorofilas. Posteriormente foi utilizado o etanol que possui polaridade intermediária, possibilitando assim uma extração de mais variadas classes de compostos (MEDEIROS; KANIS, 2010). A Tabela 4 traz os rendimentos obtidos para os extratos.

Tabela 4- Rendimento obtido dos EH e EE das folhas de *Cassia bakeriana*.

Massa das folhas (Kg)	Extrato	Massa obtida de extrato (g)	Rendimento (%)
1,0	Hexânico	43,2	4,3
	Etanólico	165,1	16,5

Como mostrado, o rendimento para o extrato etanólico foi bem maior que para o extrato hexânico, como já era esperado devido as características já mencionadas do etanol.

Os rendimentos das partições obtidas através da extração líquido-líquido a partir de 100 g do extrato etanólico, encontram-se na Tabela 5.

Tabela 5- Rendimento das partições líquido-líquido realizadas a partir do extrato etanólico

Partição	Massa obtida da partição (g)	Rendimento (%)
Diclorometano	5,0	5,0
Acetato de etila	21,3	21,3
<i>n</i> -Butanol	41,3	41,3
Água	3,4	3,4
Total	71,0	71,0
Material particulado no filtro	17,8	17,8

Observa-se que o maior rendimento se deu para os solventes mais polares, tendo o *n*-butanol o maior rendimento, seguido do acetato de etila e, o menor rendimento, para o diclorometano. Isto mostra que a extração etanólica obteve compostos com características mais polares.

5.1 Prospecção fitoquímica

A prospecção fitoquímica teve como objetivo, identificar as classes de compostos presentes nos extratos e partições. A Tabela 6 mostra as classes de compostos identificadas nos extratos e frações da *C. bakeriana*.

Tabela 6 – Prospecção fitoquímica para os extratos e partições das folhas da *Cassia bakeriana*

Amostras	Flavonoides		Alcaloides		Antraqui- nonas, Antronas, cumarinas	Terpenos, esteroi- des, saponinas, açuca- res, fenóis, taninos, flavonoides		
	NP/ PEG	AlCl ₃	Iodocloro- platinado	Dragen- dorff	KOH	Liebermann Buchard	Sulfato Cérico	Vanilina Sufúrica
EH	-	-	-	-	-	+++	+++	+++
EE	++	++	-	-	-	+++	+++	+++
PD	+++	+++	-	-	++	+++	++	+++
PAE	+++	+++	-	-	-	+++	+++	+++
PB	++	++	-	-	-	+++	+++	+++
PA	++	++	-	-	-	+++	++	+++

Nota: Nota: -: não identificado, ++: intenso, +++: muito intenso.

Nenhum dos extratos ou partições apresentaram resultados positivos para os dois reveladores específicos de alcaloides, indicando a ausência de alcaloides nas folhas da *Cassia bakeriana*. Para antraquinonas somente a partição PD apresentou resultado positivo com aparecimento de uma mancha de coloração vermelha sobre a placa. Em relação a flavonoides, todas as partições e o EE apresentaram resultados positivos, com as partições D e AE tendo apresentado maior intensidade ao serem reveladas. O fato do EH não ter a presença de flavonoides se dá pela característica mais polar desses compostos. Em relação aos reveladores universais, todas as frações apresentaram resultado positivo, indicando assim que além da presença dos flavonoides já mencionada, pode também haver outras classes de compostos como terpenos, fenóis, taninos e outros compostos.

5.2 Identificação de compostos na partição diclorometano

A partição diclorometano (PD) foi escolhida para ser estudada neste trabalho, pois apresentou os melhores valores de atividade antifúngica que será discutida posteriormente, seguida pela partição acetato de etila (PAE). Além da melhor atividade antifúngica, na prospecção fitoquímica ambas partições obtiveram resultados parecidos frente a reveladores para flavonoides e para reveladores universais, mas em contrapartida a PD foi a única que apresentou resultado positivo no teste para presença de antraquinonas.

A caracterização dos compostos presentes na PD foi realizada através de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas (CLAE-EM), com sistema de ionização por electrospray (IES). As análises foram feitas em modo positivo e negativo. A Tabela 7 mostra a proposta de identificação dos compostos com seus respectivos valores de m/z , o erro em ppm atribuído para cada compostos. A Figura 17 mostra aos cromatogramas obtidos para os modos negativos (1) e positivo (2) e a figura 18 mostra as estruturas dos compostos identificados para a PD.

Figura 17- Cromatograma da PD nos modos negativo (1) e positivo (2)

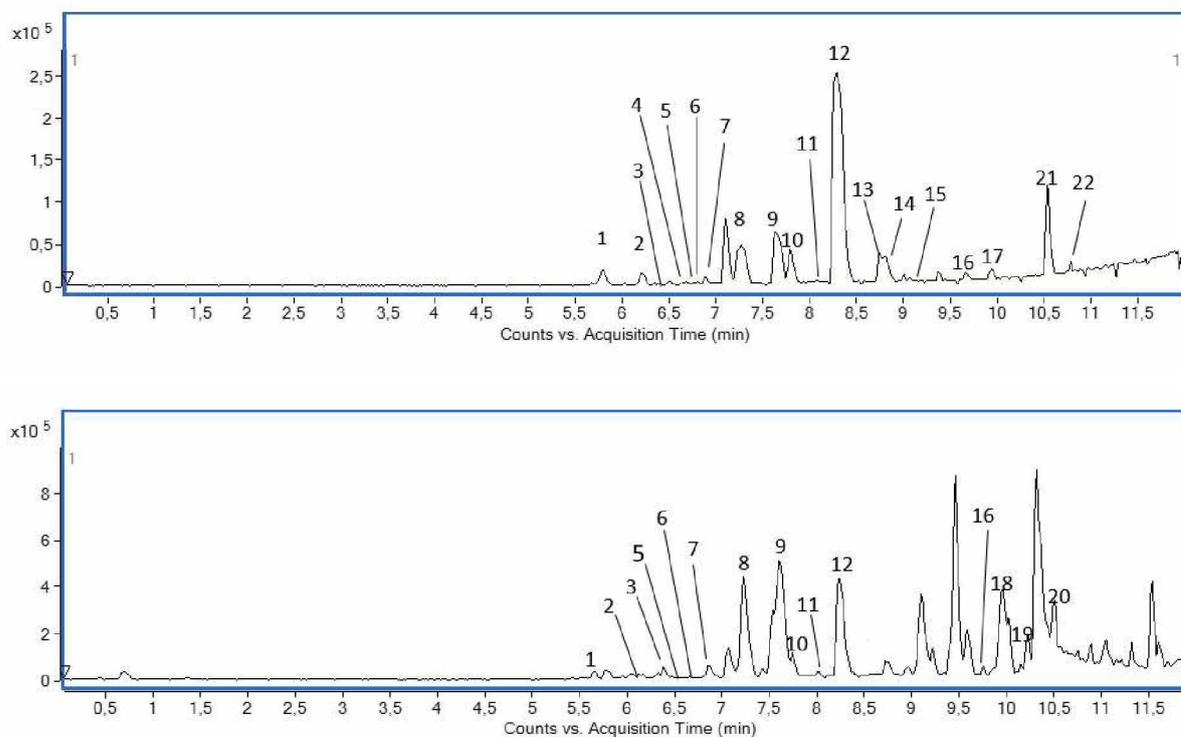


Tabela 7- Proposta de identificação dos compostos da P-D das folhas de *C. bakeriana*. (continua)

Tr	[M – H] ⁻	[M + H] ⁺	Massa exata	Erro (ppm) - / +	Fragmentos EM/EM - / +	Fórmula Molecular	Tentativa de Identificação	Referências
5,65	289,0715	291,0860	289,0718 291,0863	-1,0/ -1,0	20eV: 245, 205, 188,179,175, 164, 151,137, 125, 123, 109 / 20eV: 259, 228, 233, 219, 207, 180, 161, 147, 139 ,123	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	(±)-(epi)catequina (1)	(SUN et al., 2007, PERESTRELO et al., 2012, PANDEY et al., 2014, ABU-REIDAH et al., 2015a, BEN SAID et al., 2017) Metlin ¹
5,75	–	387,2014	–	–	15eV: 371, 349, 311, 255, 207 , 189,149, 107	–	n.i	–
5,77	431,1901	–	–	–	20eV: 385, 223, 189,161, 153 , 149, 125, 119, 113, 101	–	n.i	–
6,20	163,0402	165,0543	163,0401 165,0546	0,6/ -1,8	10eV: 119 / 10eV: 154, 147 , 135, 120, 109	C ₉ H ₈ O ₃	ácido <i>p</i> -cumárico (2)	(SUN et al., 2007, BYSTROM et al., 2008, PLAZONIĆ et al., 2009)
6,34	193,0505	195,0648	193,0506 195,0652	-0,5/ -2,0	10eV: 178, 149, 134 / 10eV: 177, 153,145, 140, 123, 107,	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	ácido ferúlico (3)	(SUN et al., 2007, ABU-REIDAH et al., 2015a, EL-WAKIL et al., 2015, BEN SAID et al., 2017) Metlin
6,55	223,0616	–	223,0612	1,8	10eV: 208, 179, 164 , 149, 138, 121	C ₁₁ H ₁₂ O ₅	ácido sinápico (4)	(SUN et al., 2007) Metlin
6,72	449,1091	451,1234	449,1089 451,1235	0,4/ -0,2	10eV: 405, 357, 303, 285, 195, 179, 151 , 125, 107/ 10eV: 305 , 209,129,	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₁	astilbina (5)	(CHEN; LU; ZHAO, 2014, ZHAO et al., 2014, DONG et al., 2017)

Tabela 7- Proposta de identificação dos compostos da P-D das folhas de *C. bakeriana*. (continua)

Tr	[M - H] ⁻	[M + H] ⁺	Massa exata	Erro (ppm) -/+	Fragmentos EM/EM -/+	Fórmula Molecular	Tentativa de Identificação	Referências
6,82	287,0562	289,0709	287,0561 289,0707	0,03/ 0,7	15eV: 259, 243, 201,177,151, 125 ,107/ 271, 167, 153 ,149,137,121, 109, 107,	C ₁₅ H ₁₂ O ₆	De-hidroxiltaxifolina (eriodictiol) (6)	(BRITO et al., 2014, ZHAO et al., 2014) Metlin
6,89	463,0880	465,1029	463,0882 465,1028	-0,4/ 0,2	20eV: 301, 300 , 271, 255,151,107/ 20eV: 304, 303 , 285, 153, 127, 109,	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	quercetina-3- <i>O</i> -glucosídeo/galactosídeo (isoquercetina/hiperosídeo) (7)	(KRASTEVA; NIKOLOV, 2008, BRAUNBERGER et al., 2013) Metlin
6,96	-	371,2067	371,2064	0,8	10eV: 340, 311,252, 209 , 191, 151, 133, 109,	n.i	-	-
7,10	433,1138	435,1288	433,1140 435,1286	-0,4/ 0,4	10eV: 287, 269,180, 152 ,124, 107/ 10eV: 289 ,147, 129	n.i	-	-
7,22	447,0936	449,1081	447,0933 449,1078	0,7/ 0,6	20eV: 301, 285, 284 , 255, 227,109/ 20eV: 303, 287 , 145, 129	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	kaempferol- <i>O</i> -glicosídeo/galactosídeo (astragalina/trifolina) (8)	(PIKULSKI; BRODBELT, 2003, ABU-REIDAH et al., 2015b) Metlin

Tabela 7- Proposta de identificação dos compostos da P-D das folhas de *C. bakeriana*. (continua)

Tr	[M - H] ⁻	[M + H] ⁺	Massa exata	Erro (ppm) -/+	Fragmentos EM/EM -/+	Fórmula Molecular	Tentativa de Identificação	Referências
7,67	431,0992	433,1128	431,0984 433,1129	1,8/ -0,2	20eV: 285, 284 , 255, 227/ 20eV: 288, 287 , 129	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	kaempferol-3- <i>O</i> -ramnosídeo (afzelina) (9)	(WOJTANOWSKI; MROCZEK, 2018)
7,7	301,0358	303,0503	301,0354 303,0499	1,3/ 1,3	20eV: 273, 245, 151 ,121,107/ 30eV: 257, 229, 201,165, 153 , 137, 121	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	quercetina (10)	(KRASTEVA; NIKOLOV, 2008, WANG et al., 2008, ABU-REIDAH et al., 2015a) Metlin
8,10	315,0515	317,0655	315,0510 317,0656	1,6/ -0,3	10eV: 300 , 271, 255, 151,107/ 15eV: 285, 257, 219 , 175, 109	C ₁₆ H ₁₂ O ₇	quercetina-3-metil éter (isoramnetina) (11)	(JUSTESEN, 2001, PETROVICIU et al., 2014) Metlin
8,34	285,0407	287,0552	285,0405 287,0550	0,7/ 0,7	20eV: 270, 257, 255, 239, 229, 227,213,187, 151,125,107/ 25eV: 259, 241, 213, 185, 165, 153,147, 133, 121	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	kaempferol (12)	(SUN et al., 2007, KRASTEVA; NIKOLOV, 2008, WANG et al., 2008, ABU-REIDAH et al., 2015b, PANDEY et al., 2015) Metlin
8,73	-	346,2584	-	-	20eV: 293, 195, 177, 175, 157, 155 ,149,125, 109	-	n.i	-
8,75	227,1285	-	227,1289	-1,7	10eV: 183 , 165	C ₁₂ H ₂₀ O ₄	ácido traumático (13)	(GÓMEZ-ROMERO; SEGURA-CARRETERO; FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, 2010) Metlin
8,84	327,2178	-	327,2177	0,3	20eV: 229, 211,183, 165, 171 , 151, 127	C ₁₈ H ₃₂ O ₅	ácido trihidroxioctadecadienoico (14)	(GÓMEZ-ROMERO; SEGURA-CARRETERO; FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, 2010)
8,93	-	840,3953	-	-	30eV: 686, 550 , 278, 107	-	n.i	-

Tabela 7- Proposta de identificação dos compostos da P-D das folhas de *C. bakeriana*. (continua)

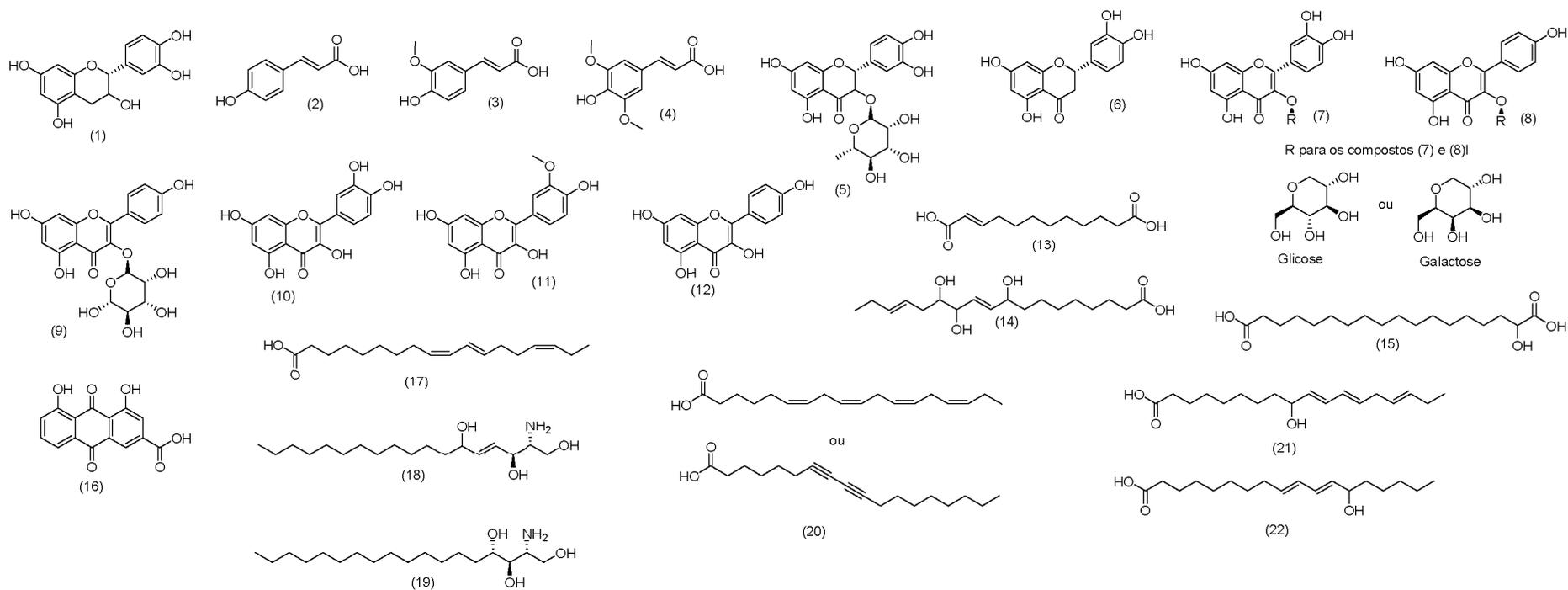
Tr	[M – H] ⁻	[M + H] ⁺	Massa exata	Erro (ppm) -/+	Fragmentos EM/EM -/+	Fórmula Molecular	Tentativa de Identificação	Referências
9,0	836,3638	838,3812	–	–	10eV: 682, 546, 400, 289 , 245,137/ 30eV: 684, 548, 285	–	n.i	–
9,16	329,2335	–	329,2333	0,6	20eV: 229, 211, 171 , 139, 100,	C ₁₈ H ₃₄ O ₅	ácido hidroxiocetadecano-dioico (15)	(GÓMEZ-ROMERO; SEGURA-CARRETERO; FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, 2010)
9,22	–	822,3854	–	–	30eV: 668, 548 , 475, 402,187	–	n.i	–
9,37	564,2969	566,3142	–	–	20eV: 301, 289 , 245,161,100 20eV: 414 , 276,123	–	n.i	–
9,57	–	550,3178	–	–	30eV: 426, 414 , 386, 276, 139,	–	n.i	–
9,65	283,0252	285,0397	283,0248 285,0394	1,4/ 1,0	20eV: 239 , 211, 167, 183/ 20eV: 267, 251, 241 , 223, 147, 121	C ₁₅ H ₈ O ₆	reína (16)	(CUNHA, L. C. S. et al., 2017) Metlin
9,72	–	594,3426	–	–	20eV: 561, 442 , 267, 123	–	n.i	–
9,95	309,2074	–	309,2071	1,0	20eV: 291, 247, 211, 197 , 171, 111	C ₁₈ H ₃₀ O ₄	ácido 13(S)-hidroperoxilinoléico (17)	(ABU-REIDAH et al., 2015a)
9,97	–	316,2849	316,2846	1,0	20eV: 298, 280	–	6-hidroxiesfingosina (isômero) (18)	Metlin
10,19	–	318,3002	318,3003	-0,3	20eV: 300, 282	–	fitoesfingosina (19)	Metlin
10,32	–	267,1727	–	–	15eV: 211, 155	–	n.i	–

Tabela 7- Proposta de identificação dos compostos da P-D das folhas de *C. bakeriana*. (conclusão)

Tr	[M - H] ⁻	[M + H] ⁺	Massa exata	Erro (ppm) -/+	Fragmentos EM/EM -/+	Fórmula Molecular	Tentativa de Identificação	Referências
10,51	-	277,2162	277,2162	0,0	20eV: 107, 121, 135 , 149	-	ácido estearidônico ou ácido octadecadienoico (20)	Metlin
10,53	293,2125	-	293,2122	1,0	15eV: 275 , 223, 195, 171, 121	C ₁₈ H ₃₀ O ₃	ácido hidroxi-octadecatrienoico (21)	(GÓMEZ-ROMERO; SEGURA-CARRETERO; FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, 2010) Metlin
10,78	295,2275	-	295,2279	-1,3	15eV: 277 , 195, 171 , 135, 113	C ₁₈ H ₃₂ O ₃	ácido 13-hidroxi-9,11-octadecadienoico (22)	(GÓMEZ-ROMERO; SEGURA-CARRETERO; FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, 2010, ABU-REIDAH et al., 2015a) Metlin
11,00	-	363,2203	-	-	20eV: 291, 195, 177, 105	-	n.i	-
11,32	-	520,3400	-	-	20eV: 502, 184, 104	-	n.i	-
11,52	-	496,3413	-	-	15eV: 478, 184, 104	-	n.i	-
11,60	-	536,4159	-	-	20eV: 501 , 427, 409, 285, 193, 130	-	n.i	-

Nota: Tr: Tempo de retenção (min); n.i: não identificado; -: não determinado ¹Biblioteca online disponível em: https://metlin.scripps.edu/landing_page.php?pgcontent=mainPage

Figura 18- Estrutura dos compostos identificados na partição diclorometano das folhas da *Cassia bakeriana*.



Fonte: o autor.

A prospecção fitoquímica indicava a presença de flavonoides na partição, presença essa que foi confirmada pela espectrometria de massas, sendo identificado alguns flavonoides, como os flavonóis (epi)catequina (**1**) e kaempferol (**12**) e a flavanona de-hidroiltaxifolina (**6**). Também foram identificados alguns flavonoides com açúcares ligados em sua estrutura, como os flavonóis quercetina-3-*O*-glucosídeo/galactosídeo (**7**) e o kaempferol-3-*O*-glucosídeo/galactosídeo (**8**), e a dihidroflavanona astilbina.

Algumas propostas de fragmentação para o kaempferol (**12**) e para o kaempferol-3-*O*-ramnosídeo (**9**) são mostrados abaixo, onde as figuras 19 e 20 apresentam o espectro e as propostas de fragmentação para o kaempferol.

Figura 19- Espectro de fragmentação para o kaempferol (**12**) no modo negativo.

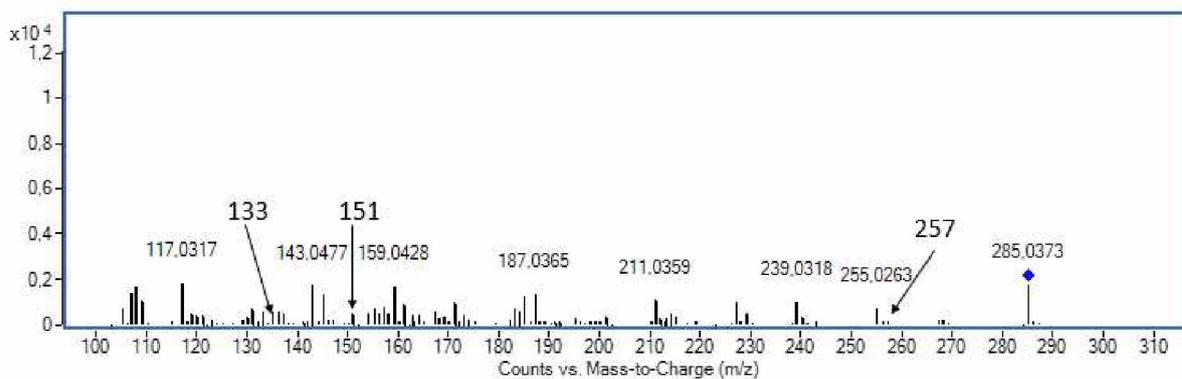
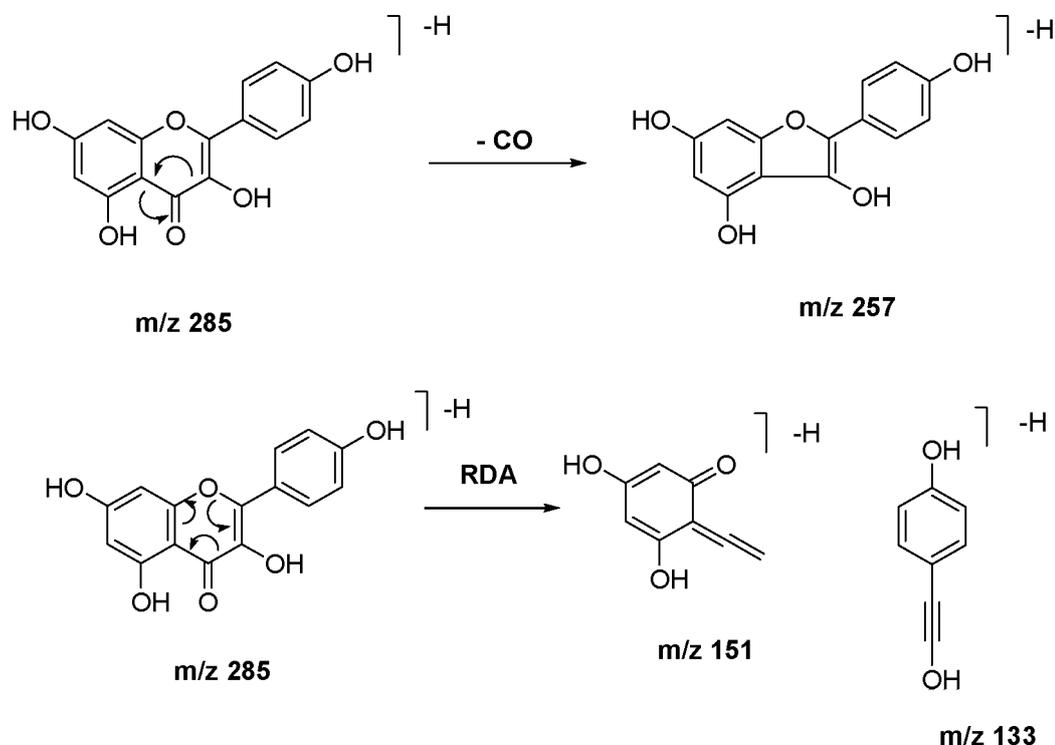


Figura 20- Proposta de mecanismo de fragmentação para o kaempferol (**12**) em modo negativo



Fonte: Adaptado de Demarque, (2016).

A primeira fragmentação mostrada para o kaempferol é referente a perda de 28 u de massas correspondente a molécula CO, formando o íon **m/z 257**. Através da abertura do anel B pelo mecanismo retro Diels-Alder (RDA), obtém-se os íons **m/z 155** quando a carga negativa fica no anel A e o íon **m/z 133** quando a carga se encontra na hidroxila do anel B. (DEMARQUE et al., 2016)

Na Figura 22 é mostrada as propostas de fragmentações do kaempferol-3-*O*-ramnosídeo (**9**). Os dois fragmentos mais intensos para a estrutura foram os íons **m/z 285** e **m/z 284**, ambos correspondem a perda do grupo ramnose. A figura 21 traz o espectro para o kaempferol-3-*O*-ramnosídeo.

Figura 21- Espectro para o kaempferol-3-*O*-ramnosídeo (9) no modo negativo

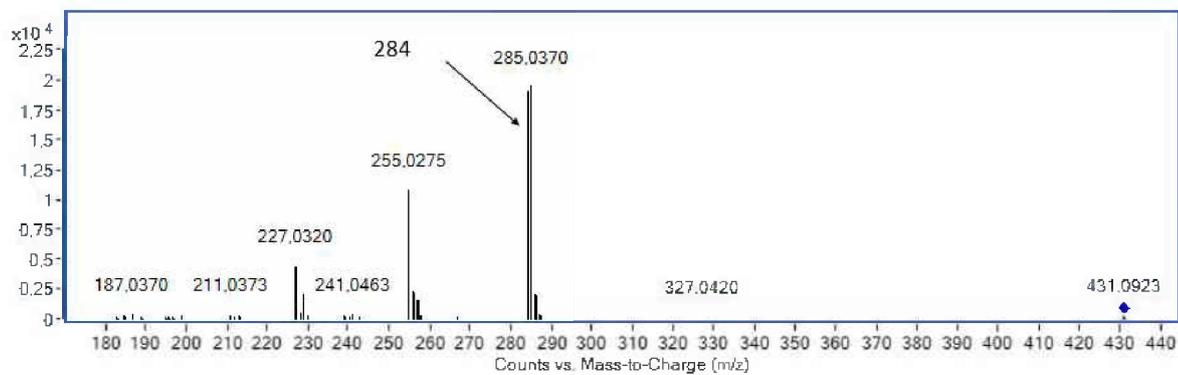
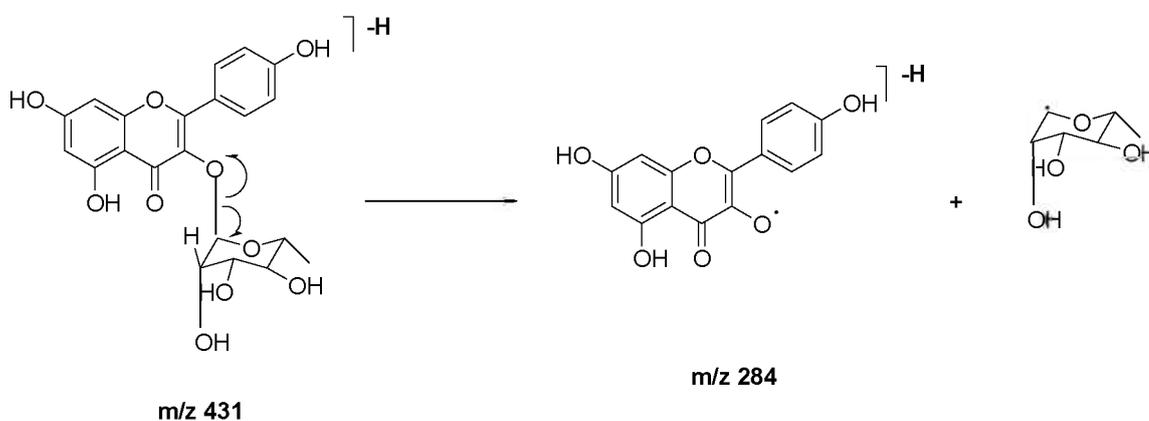
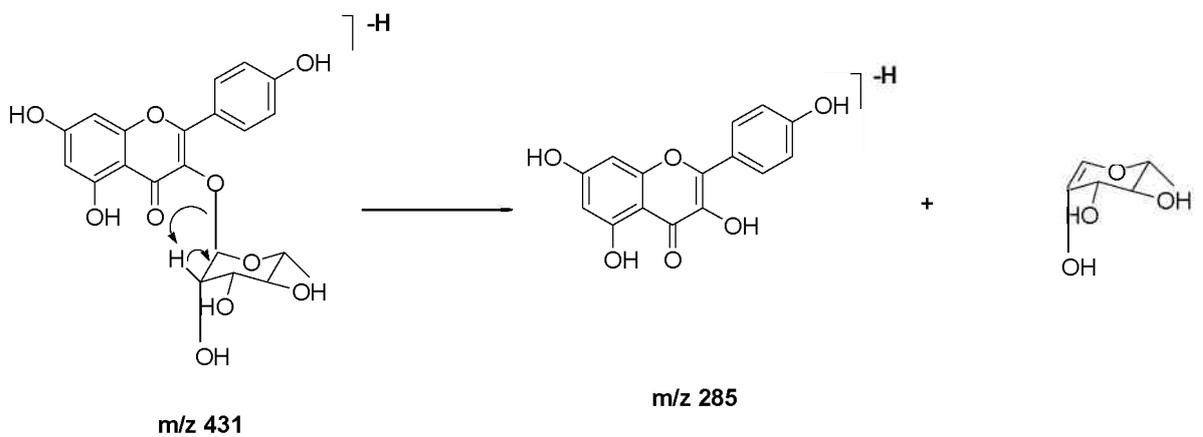


Figura 22: Proposta de mecanismo de fragmentação para o kaempferol-3-*O*-ramnosídeo (9) em modo negativo



Fonte: Adaptado de Demarque, (2016).

Também foram identificados na PD alguns ácidos fenólicos de cadeia pequena, como o ácido *p*-cumárico (**2**) e ácido ferúlico (**3**), e alguns ácidos graxos de cadeias maiores, como tri-hidroxiocetadecadienoico (**14**) e o ácido hidroxiocetadecanodioico (**15**).

Algumas propostas de mecanismos de fragmentação para o ácido *p*-cumárico (**2**) nos modos positivo e negativo encontra-se na figura 25, a figura 23 e 24 traz os espectros nos modos positivo e negativo.

Figura 23- Espectro de fragmentação para o ácido *p*-cumárico (**2**) no modo negativo

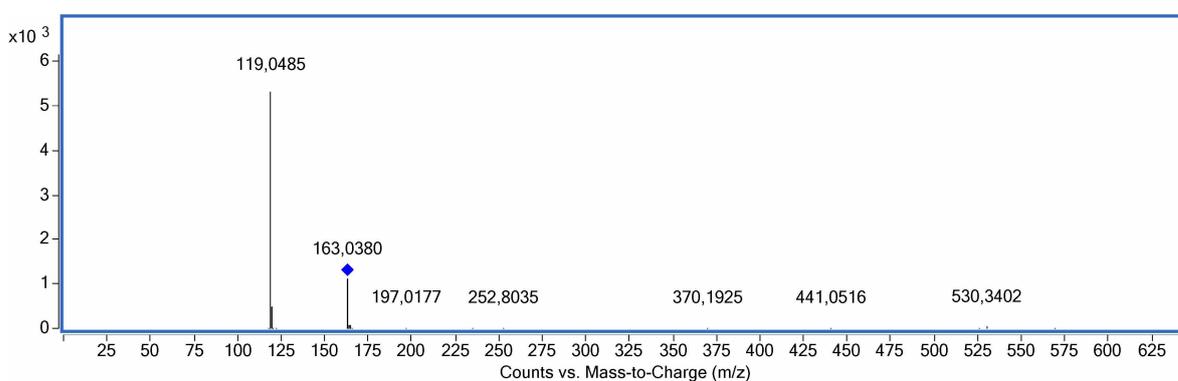


Figura 24- Espectro de fragmentação para o ácido *p*-cumárico (**2**) no modo positivo

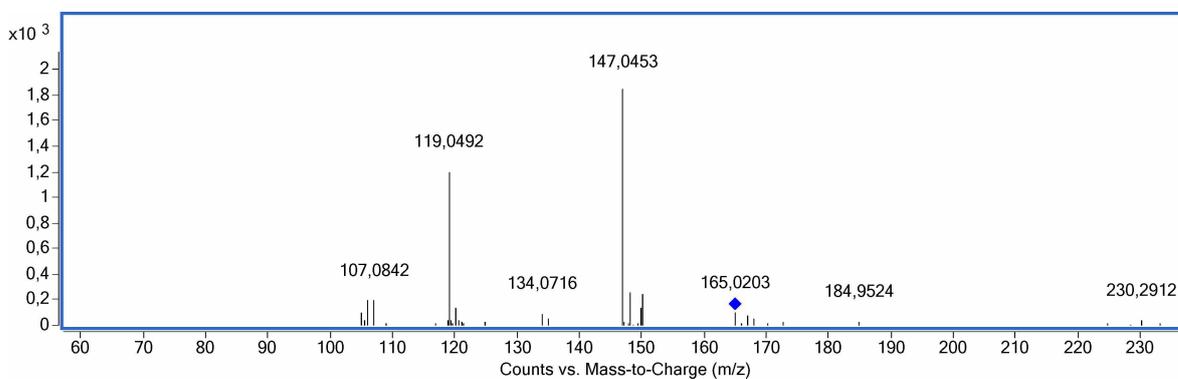
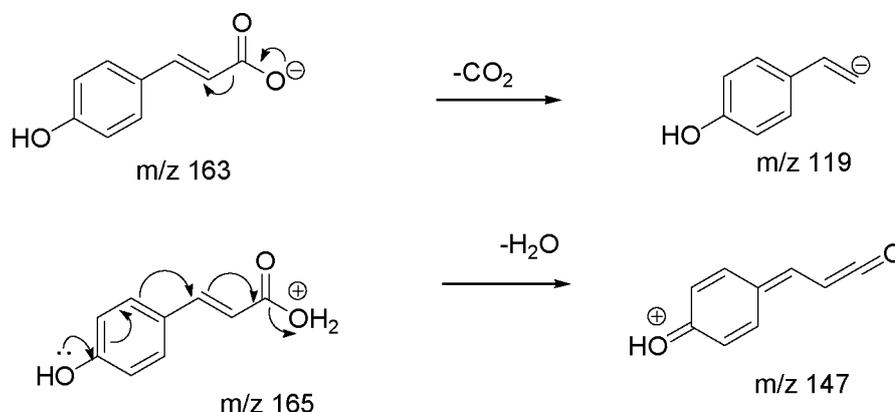


Figura 25: Proposta de mecanismo de fragmentação para o ácido *p*-cumárico (2)



Fonte: Adaptado de Demarque, (2016).

No modo negativo o fragmento com maior intensidade é o m/z 119, correspondente a perda da carbonila do ácido em forma de CO₂ e para o modo positivo, a perda de 18 u de massas através de uma molécula de água formando o íon m/z 147.

A prospecção fitoquímica também foi positiva para antraquinonas, cujo o composto que identificado foi a reína (16) (Figura 18), que já havia sido isolado nas cascas de *C. bakeriana* (CUNHA, L. C. S. et al., 2017). Algumas propostas de mecanismos de fragmentações são apresentadas para a reína (16) na figura 21 e 22.

A Figura 27 corresponde a proposta de fragmentação da reína (16) no modo negativo, onde o primeiro fragmento é correspondente a perda da carbonila em forma de CO₂, gerando o íon m/z 239. Posteriormente ocorre duas perdas consecutivas de 28 u de massas, correspondente a molécula CO, gerando os íons m/z 211 e 183, respectivamente (DEMARQUE et al., 2016, CUNHA, L. et al., 2017). Já no modo positivo (Figura 29), o primeiro fragmento corresponde a perda de uma molécula de água formando o íon m/z 267 e o m/z 241 corresponde a perda da carbonila na forma de CO₂. A figura 26 traz o espectro de fragmentação para a reína no modo negativo.

Figura 26- Espectro de fragmentação para a reína (16) no modo negativo

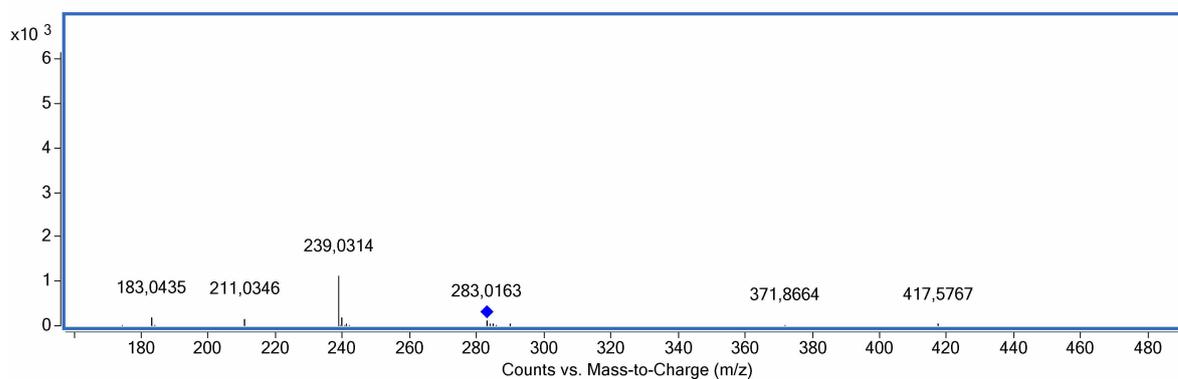
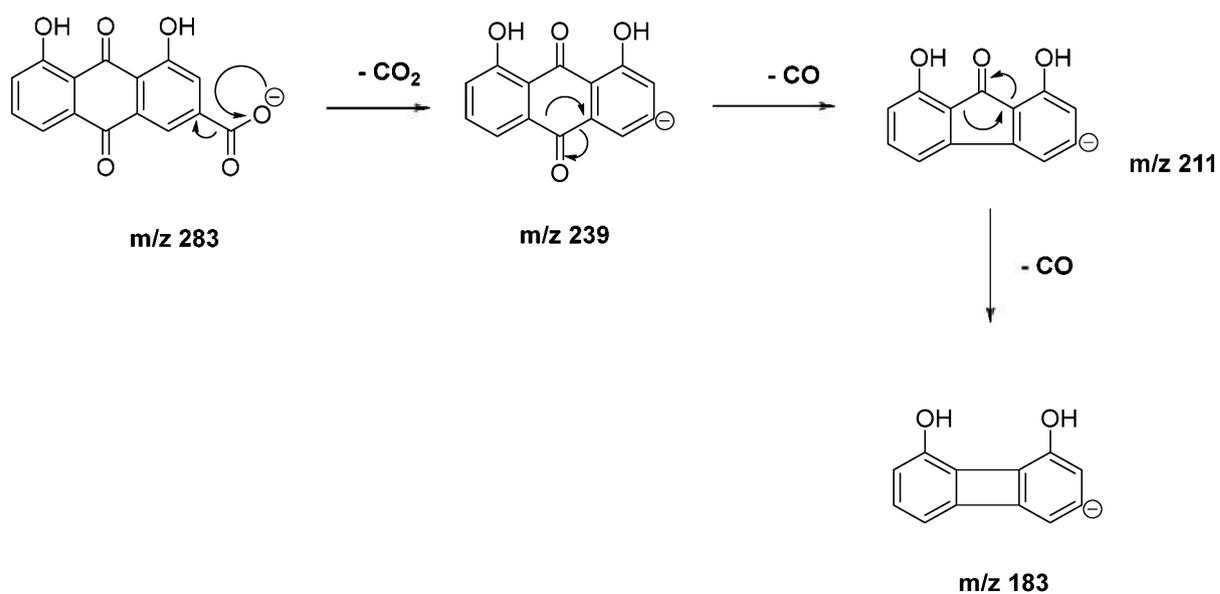


Figura 27: Proposta de mecanismo de fragmentação para a reína (16) no modo negativo.



Fonte: Adaptado de Demarque, (2016) e Cunha, (2017)

Figura 28- Espectro de fragmentação para a reína (16) no modo positivo

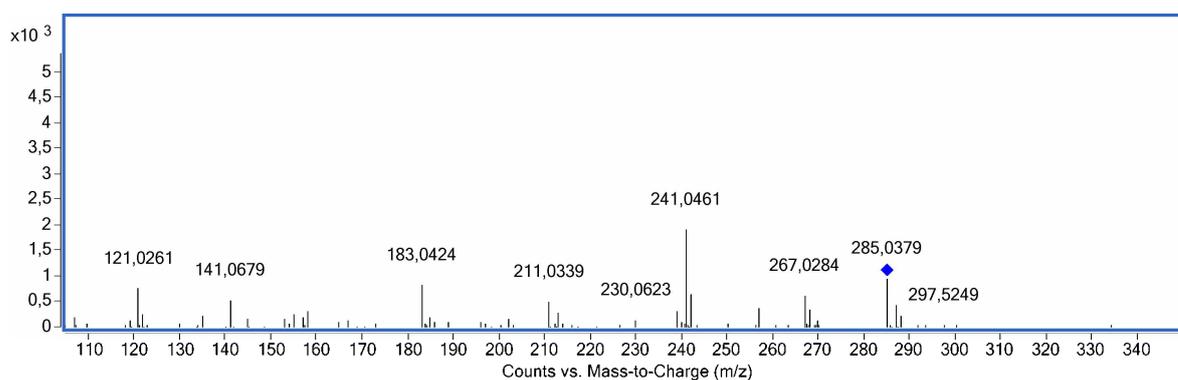
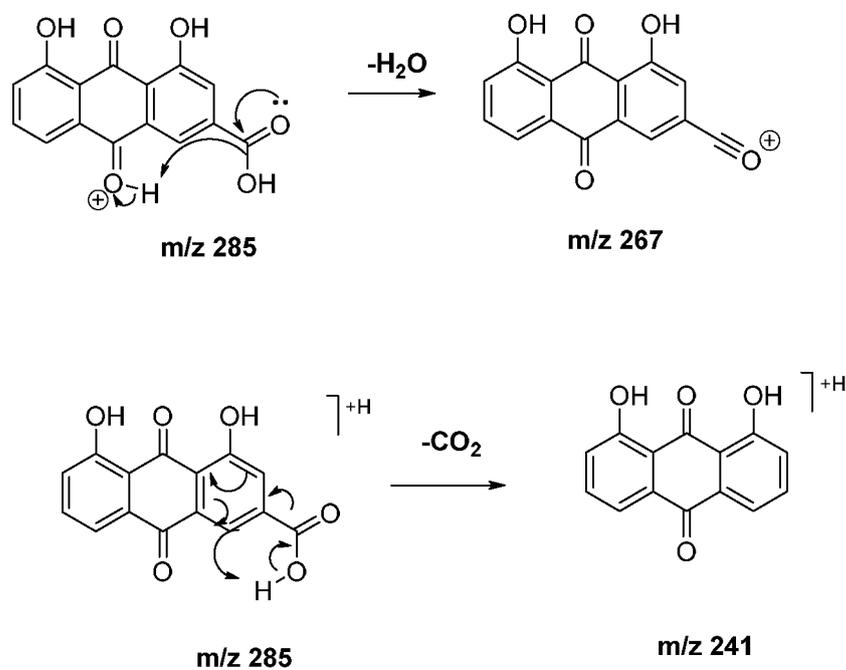


Figura 29: Proposta de mecanismo de fragmentação para a reina (**16**) no modo positivo



Fonte: Adaptado de Demarque, (2016).

5.3 Atividade antifúngica

Neste trabalho a atividade antifúngica foi determinada através da concentração inibitória mínima (CIM). O método utilizado na análise foi o da microdiluição em caldo. Os extratos e partições foram testados frente a três espécies: *Candida albicans*, *Candida tropicalis* e *Candida glabrata*. Os resultados obtidos encontram-se na Tabela 8.

Tabela 8- Valores de CIM dos extratos e partições da *C. bakeriana*.

Amostras	CIM ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		
	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida tropicalis</i>	<i>Candida glabrata</i>
	ATCC 28366	ATCC 13803	ATCC 15126
EH	>3000	>3000	>3000
EE	>3000	>3000	1500
P-D	375	375	93,75
P-AE	375	750	187,5
P-nB	>3000	>3000	1500
P-A	>3000	>3000	>3000

As partições PD e PAE foram as que apresentaram melhores resultados para as três espécies de *Candida* avaliadas, sendo que a *Candida glabrata* foi a espécie menos resistente e a PD apresentou menor CIM que a PAE.

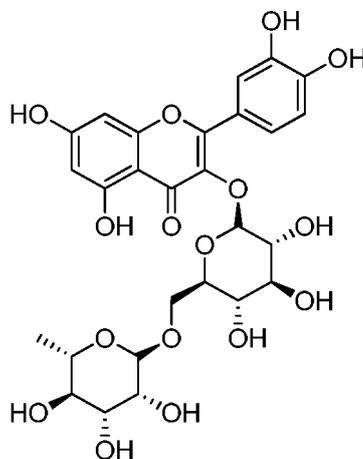
Segundo um estudo publicado por Kuete (2010) para extratos de plantas, um valor de CIM entre 100 e 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ é considerado um bom resultado para atividade antifúngica. Assim PD e PAE tiveram valores considerados como positivos para a espécie *Candida glabrata*, sendo que a PD obteve valores menores que a faixa considerada como boa pra atividade antifúngica.

Essa boa atividade antifúngica encontrada na PD pode ser atribuída a presença de flavonoides encontrados nessa partição, como mostrado no item 4.3. Alguns dos flavonoides identificados nessa partição já tiveram atividade antifúngica testada contra a espécie *Candida albicans*, como a quercetina (**10**), kampeferol (**12**) e a catequina (**1**) (Figura 18 p. X); como já mostrado na seção 2.2. Em outro estudo feito por Martins (2015), mostra que tanto alguns flavonoides, com os já citados kampferol, quercetina e outro flavonoides não identificados nesta partição, também possuem boa atividade frente a espécie *Candida glabrata* que, como já mencionado, foi a que obteve melhor resultado para PD das folhas da *C. bakeriana*.

No estudo de revisão feito por Seleem (2017), também aparecem flavonoides glicosilados, como a rutina (Figura 30) e a quercetina-3-*O*-glucosídeo com atividade antifúngica. Na PD também foram identificados alguns flavonoides glicosilados como

quercetina-3-*O*-glucosídeo/galactosídeo (7) e o kampeferol-*O*-glucosídeo/galactosídeo (8), (Figura 18 p. 45);

Figura 30: Estrutura da rutina.



Fonte: o autor.

No estudo feito por Martins (2015) mostra que ácidos fenólicos que apareceram na PD como o ácido ferrulico (3) ácido *p*-cumárico (2), (Figura 18 p. 45); também apresentam boa atividade frente algumas espécies de *Candida*, estes e outros ácido fenólicos também podem ser responsáveis pela atividade desta partição.

Dessa forma pode-se considerar que a *C. bakeriana* é uma fonte promissora de compostos com atividade antifúngica, entre eles os ácidos fenólicos e flavonoides.

6.0 CONCLUSÃO

Através das extrações por maceração foi possível preparar os extratos hexânico e etanólico das folhas de *C. bakeriana* e com a extração líquido-líquido foi possível obter as partições PD, PAE, PB e PA.

A prospecção fitoquímica dos extratos e frações foi positiva para a presença de flavonoides, compostos fenólicos em geral e antraquinonas. Posteriormente a confirmação foi feita através da CLAE-EM-IES, onde foi possível identificar uma série de compostos, sendo os flavonoides como: kaempferol, (epi)catequina, quercetina e flavonoides glicosilados; ácidos fenólicos como: ácido *p*-cumárico e ácido ferúlico; ácidos graxos como: ácido tri-hidroxi-octadecadienoico e ácido hidroxi-octadecanodióico; e a antraquinona réina.

Sugere-se que os compostos fenólicos identificados, tanto flavonoides quanto ácidos fenólicos, sejam os responsáveis pela atividade antifúngica observada para as três espécies de

Candida, com destaque para a espécie *C. glabrata* que apresentou o menor valor de CIM 93,75 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Como perspectivas futuras, pretende-se fracionar a PD na tentativa de isolar as substâncias que não foram identificadas por CLAE-EM, podendo se tratar de substâncias que ainda não foram não tiveram a atividade biológica testada.

REFERÊNCIAS

- ABU-REIDAH, I. M.; ALI-SHTAYEH, M. S.; JAMOUS, R. M.; ARRÁEZ-ROMÁN, D.; SEGURA-CARRETERO, A. Comprehensive metabolite profiling of *Arum palaestinum* (Araceae) leaves by using liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Food Research International**, v. 70, p. 74-86, 2015a.
- ABU-REIDAH, I. M.; ALI-SHTAYEH, M. S.; JAMOUS, R. M.; ARRÁEZ-ROMÁN, D.; SEGURA-CARRETERO, A. HPLC–DAD–ESI-MS/MS screening of bioactive components from *Rhus coriaria* L. (Sumac) fruits. **Food Chemistry**, v. 166, p. 179-191, 2015b.
- AHMAD, A.; KHAN, A.; KUMAR, P.; BHATT, R.; MANZOOR, N. Antifungal activity of *Coriaria nepalensis* essential oil by disrupting ergosterol biosynthesis and membrane integrity against *Candida*. **Yeast**, v. 28, n. 8, p. 611-617, 2011.
- AHMAD, A.; KHAN, A.; MANZOOR, N.; KHAN, L. A. Evolution of ergosterol biosynthesis inhibitors as fungicidal against *Candida*. **Microbial pathogenesis**, v. 48, n. 1, p. 35-41, 2010.
- BEN SAID, R.; ARAFA I, H.; USAM A, M.; ABDULLAH SULAIMAN, A.-A.; KOWALCZYK, M.; MOLDOCH, J.; OLESZEK, W.; STOCHMAL, A. Tentative Characterization of polyphenolic compounds in the male flowers of *Phoenix dactylifera* by liquid chromatography coupled with mass spectrometry and DFT. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 3, p. 1-18, 2017.
- BRAUNBERGER, C.; ZEHL, M.; CONRAD, J.; FISCHER, S.; ADHAMI, H.-R.; BEIFUSS, U.; KRENN, L. LC–NMR, NMR, and LC–MS identification and LC–DAD quantification of flavonoids and ellagic acid derivatives in *Drosera peltata*. **Journal of Chromatography B**, v. 932, p. 111-116, 2013.
- BRITO, A.; RAMIREZ, J.; ARECHE, C.; SEPÚLVEDA, B.; SIMIRGIOTIS, M. HPLC-UV-MS Profiles of phenolic compounds and antioxidant activity of fruits from three citrus species consumed in northern Chile. **Molecules**, v. 19, n. 11, p. 17400-17421, 2014.
- BUCHANAN, B. B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. L. Biochemistry & molecular biology of plants. **American Society of Plant Physiologists Rockville, MD**, 2000.
- BYSTROM, L. M.; LEWIS, B. A.; BROWN, D. L.; RODRIGUEZ, E.; OBENDORF, R. L. Characterization of phenolics by LC-UV/vis, LC-MS/MS and sugars by GC in *Melicoccus bijugatus* Jacq. ‘Montgomery’ fruits. **Food Chemistry**, v. 111, n. 4, p. 1017-1024, 2008.
- CHAVES, M. H. QUIMICA ORGANICA. **Química Nova**, v. 20, p. 5, 1997.
- CHEN, S.-D.; LU, C.-J.; ZHAO, R.-Z. Qualitative and quantitative analysis of Rhizoma Smilacis glabrae by ultra high performance liquid chromatography coupled with LTQ OrbitrapXL hybrid mass spectrometry. **Molecules**, v. 19, n. 7, p. 10427-10439, 2014.
- CLINICAL; INSTITUTE, L. S. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. **Approved Standard-Third Edition M27-A3**, v. 28, 2008.
- CUNHA, L.; DE MORAIS, S. A.; DE AQUINO, F. J.; CHANG, R.; OLIVEIRA, A. D.; MARTINS, M. M.; MARTINS, C. H.; SOUSA, L. C.; BARROS, T. T.; SILVA, C. V. D. Bioassay-guided fractionation and antimicrobial and cytotoxic activities of *Cassia bakeriana* extracts. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 27, n. 1, p. 91- 98, 2017.

CUNHA, L. C. S.; MORAIS, S. A. L. D.; AQUINO, F. J. T. D.; CHANG, R.; OLIVEIRA, A.; MARTINS, M. M.; MARTINS, C. H. G.; MARTINS, L. C. F. S.; BARROSA, T. T.; SILVA, C. V.; NASCIMENTO, E. A. Bioassay-guided fractionation and antimicrobial and cytotoxic activities of *Cassia bakeriana* extracts. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 27, n. 1, p. 91-98, 2017.

DEBNATH, B.; SINGH, W. S.; DAS, M.; GOSWAMI, S.; SINGH, M. K.; MAITI, D.; MANNA, K. Role of plant alkaloids on human health: A review of biological activities. **Materials Today Chemistry**, v. 9, p. 56-72, 2018.

DELMULLE, T.; DE MAESENEIRE, S. L.; DE MEY, M. Challenges in the microbial production of flavonoids. **Phytochemistry Reviews**, v. 17, n. 2, p. 229-247, 2018.

DEMAIN, A. L.; FANG, A. The natural functions of secondary metabolites. In: (Ed.). History of modern biotechnology I: **Springer**, 2000. p.1-39.

DEMARQUE, D. P.; CROTTI, A. E.; VESSECCHI, R.; LOPES, J. L.; LOPES, N. P. Fragmentation reactions using electrospray ionization mass spectrometry: an important tool for the structural elucidation and characterization of synthetic and natural products. **Natural product reports**, v. 33, n. 3, p. 432-455, 2016.

DEWICK, P. M. Medicinal natural products: a biosynthetic approach. **John Wiley & Sons**, 2002, ISBN 0471496413.

DONG, L.; ZHU, J.; DU, H.; NONG, H.; HE, X.; CHEN, X. Astilbin from *Smilax glabra* Roxb. Attenuates Inflammatory Responses in Complete Freund's Adjuvant-Induced Arthritis Rats. **Evidence Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2017, p. 1-10, 2017.

EL-WAKIL, E. A.; ABDEL-HAMEED, E.-S. S.; EL-SAYED, M. M.; ABDEL-LATEEF, E. E. Identification of the chemical composition of the methanolic extract of *Salix tetrasperma* Roxb. using LC-ESI-MS and evaluation its potential as antioxidant agent. **Der Pharma Chemica**, v. 7, n. 2, p. 168-177, 2015.

GARCEZ, F. R.; GARCEZ, W. S.; YOSHIDA, N. C.; FIGUEIREDO, P. O. A Diversidade dos constituintes químicos da flora de Mato Grosso do Sul e sua relevância como fonte de substâncias bioativas. **Revista Virtual de Química**, v. 8, n. 1, p. 97-129, 2016.

GÓMEZ-ROMERO, M.; SEGURA-CARRETERO, A.; FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, A. Metabolite profiling and quantification of phenolic compounds in methanol extracts of tomato fruit. **Phytochemistry**, v. 71, n.16, p. 1848-1864, 2010.

HAMILTON, G. R.; BASKETT, T. F. In the arms of Morpheus: the development of morphine for postoperative pain relief. **Canadian journal of anesthesia**, v. 47, n. 4, p. 367-374, 2000.

JUSTESEN, U. Collision-induced fragmentation of deprotonated methoxylated flavonoids, obtained by electrospray ionization mass spectrometry. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 36, p. 169-178, 2001.

KABERA, J. N.; SEMANA, E.; MUSSA, A. R.; HE, X. Plant secondary metabolites: biosynthesis, classification, function and pharmacological properties. **J Pharm Pharmacol**, v. 2, p. 377-392, 2014.

KRASTEVA, I.; NIKOLOV, S. Flavonoids in *Astragalus corniculatus*. **Química Nova**, v. 31, n. 1, p. 59-60, 2008.

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

LETEANE, M. M.; NGWENYA, B. N.; MUZILA, M.; NAMUSHE, A.; MWINGA, J.; MUSONDA, R.; MOYO, S.; MENGESTU, Y. B.; ABEGAZ, B. M.; ANDRAE-MAROBELA, K. Old plants newly discovered: *Cassia sieberiana* DC and *Cassia abbreviata* Oliv. Oliv. root extracts inhibit in vitro HIV-1c replication in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) by different modes of action. **Journal of ethnopharmacology**, v. 141, n. 1, p. 48-56, 2012.

LORENZI, H. Árvores exóticas no Brasil: madeiras, ornamentais e aromáticas. **Instituto Plantarum de Estudos da Flora**, 2003, ISBN 8586714194.

MACÊDO, M. J. F.; RIBEIRO, D. A.; DE OLIVEIRA SANTOS, M.; DE MACÊDO, D. G.; MACEDO, J. G. F.; DE ALMEIDA, B. V.; SARAIVA, M. E.; DE LACERDA, M. N. S.; DE ALMEIDA SOUZA, M. M. Fabaceae medicinal flora with therapeutic potential in Savanna areas in the Chapada do Araripe, Northeastern Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 2018.

MARTINS, N.; BARROS, L.; HENRIQUES, M.; SILVA, S.; FERREIRA, I. C. Activity of phenolic compounds from plant origin against *Candida* species. **Industrial Crops and Products**, v. 74, p. 648-670, 2015.

MEDEIROS, J. D.; KANIS, L. A. Avaliação do efeito de polietilenoglicóis no perfil de extratos de *Mikania glomerata* Spreng., Asteraceae, e *Passiflora edulis* Sims, Passifloraceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 5, p. 796-802, 2010.

MONGALO, N.; MCGAW, L.; FINNIE, J.; VAN STADEN, J. Pharmacological properties of extracts from six South African medicinal plants used to treat sexually transmitted infections (STIs) and related infections. **South African journal of botany**, v. 112, p. 290-295, 2017.

NELSON, D. L.; COX, M. M. Princípios de bioquímica de Lehninger. **Artmed Editora**, 2014, ISBN 8582710739.

NETO, G. G.; MORAIS, R. D. Recursos medicinais de espécies do cerrado de Mato Grosso: um estudo bibliográfico. **Acta Botanica Brasilica**, v. 17, n. 4, p. 561-584, 2003.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. **Journal of natural products**, v. 79, n. 3, p. 629-661, 2016.

OLIVEIRA, L.; BATISTA, A.; FERNANDES, F.; SALES, G.; NOGUEIRA, N. Atividade antifúngica e possível mecanismo de ação do óleo essencial de folhas de *Ocimum gratissimum* (Linn.) sobre espécies de *Candida*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 18, n. 2, p. 511-523, 2016.

PANDEY, R.; BAHULEYAN, K.; RAMESHKUMAR; KUMAR, B. Ultra high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry method for the simultaneous determination of multiple bioactive constituents in fruit extracts of *Myristica fragrans* and its marketed polyherbal formulations using a polarity switching technique. **Journal Separation Science**, v. 38, n. 8, p. 1277-1285, 2015.

PANDEY, R.; CHANDRA, P.; RAM ARYA, K.; KUMAR, B. Development and validation of an ultra high performance liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry method for the simultaneous determination of selected flavonoids in *Ginkgo biloba*. **Journal of Separation Science**, v. 37, p. 3610-3618, 2014.

PERESTRELO, R.; LU, Y.; SANTOS, S. A. O.; SILVESTRE, A. J. D.; NETO, C. P.; CÂMARA, J. S.; ROCHA, S. M. Phenolic profile of Sercial and Tinta Negra *Vitis vinifera* L. grape skins by HPLC-

DAD–ESI–MSn: Novel phenolic compounds in *Vitis vinifera* L. grape. **Food Chemistry**, v. 135, n. 1, p. 94-104, 2012.

PETROVICIU, I.; CRETU, I.; VANDEN BERGHE, I.; WOUTERS, J.; MEDVEDOVICI, A.; ALBU, F. **Flavonoid dyes detected in historical textiles from Romanian collections**. v. 11, p. 84-90, 2014.

PIKULSKI, M.; BRODBELT, J. S. Differentiation of flavonoid glycoside isomers by using metal complexation and electrospray ionization mass spectrometry. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 14, n. 12, p. 1437-1453, 2003.

PINTO, A. C.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. D. S.; LOPES, N. P.; EPIFANIO, R. D. A. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Química Nova**, p. 45-61, 2002.

PLAZONIĆ, A.; BUCAR, F.; MALEŠ, Ž.; MORNAR, A.; NIGOVIĆ, B.; KUJUNDŽIĆ, N. Identification and quantification of flavonoids and phenolic acids in Burr Parsley (*Caucalis platycarpos* L.), using high performance liquid chromatography with diode Array detection and electrospray ionization mass spectrometry. **Molecules**, v. 14, n. 7, p. 2466-2490, 2009.

SCHÄFER, H.; WINK, M. Medicinally important secondary metabolites in recombinant microorganisms or plants: progress in alkaloid biosynthesis. **Biotechnology Journal: Healthcare Nutrition Technology**, v. 4, n. 12, p. 1684-1703, 2009.

SELEEM, D.; PARDI, V.; MURATA, R. M. Review of flavonoids: a diverse group of natural compounds with anti-*Candida albicans* activity in vitro. **Archives of oral biology**, v. 76, p. 76-83, 2017.

SHARMA, C.; CHOWDHARY, A. Molecular bases of antifungal resistance in filamentous fungi. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 50, n. 5, p. 607-616, 2017.

SOBEH, M.; MAHMOUD, M. F.; ABDELFATTAH, M. A.; CHENG, H.; EL-SHAZLY, A. M.; WINK, M. A proanthocyanidin-rich extract from *Cassia abbreviata* exhibits antioxidant and hepatoprotective activities in vivo. **Journal of ethnopharmacology**, v. 213, p. 38-47, 2018.

SUN, J.; LIANG, F.; BIN, Y.; LI, P.; DUAN, C. Screening Non-colored Phenolics in Red Wines using Liquid Chromatography/Ultraviolet and Mass Spectrometry/Mass Spectrometry Libraries. **Molecules**, v. 12, n. 3, p. 679-693, 2007.

THOLL, D. Biosynthesis and biological functions of terpenoids in plants. In: (Ed.). **Biotechnology of isoprenoids**: Springer, 2015. p.63-106.

VALETTE, N.; PERROT, T.; SORMANI, R.; GELHAYE, E.; MOREL-ROUHIER, M. Antifungal activities of wood extractives. **Fungal Biology Reviews**, v. 31, n. 3, p. 113-123, 2017.

VIEGAS JR, C.; BOLZANI, V. D. S.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, p. 326-337, 2006.

VIEGAS JR, C.; DE REZENDE, A.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, I. C.-G. E. V.; SILVA, D.; BARREIRO, E. J.; DE MIRANDA, A. L. P.; ALEXANDRE-MOREIRA, M. S.; YOUNG, M. C. M. Aspectos químicos, biológicos e etnofarmacológicos do gênero *Cassia*. **Química Nova**, p. 1279-1286, 2006.

WAGNER, H.; BLADT, S. Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas. **Springer Science & Business Media**, 1996, ISBN 3540586768.

WANG, Y.; YANG, L.; HE, Y.-Q.; WANG, C.-H.; WELBECK, E. W.; BLIGH, S. W. A.; WANG, Z.-T. Characterization of fifty-one flavonoids in a Chinese herbal prescription Longdan Xiegan Decoction

by high-performance liquid chromatography coupled to electrospray ionization tandem mass spectrometry and photodiode array detection. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 22, n. 12, p. 1767-1778, 2008.

WOJTANOWSKI, K. K.; MROCZEK, T. Study of a complex secondary metabolites with potent anti-radical activity by two dimensional TLC/HPLC coupled to electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry and bioautography. **Analytica Chimica Acta**, v. 1029, p. 104-115, 2018.

YADAV, J.; ARYA, V.; YADAV, S.; PANGHAL, M.; KUMAR, S.; DHANKHAR, S. *Cassia occidentalis* L.: A review on its ethnobotany, phytochemical and pharmacological profile. **Fitoterapia**, v. 81, n. 4, p. 223-230, 2010.

ZAYNAB, M.; FATIMA, M.; ABBAS, S.; SHARIF, Y.; UMAIR, M.; ZAFAR, M. H.; BAHADAR, K. Role of secondary metabolites in plant defense against pathogens. **Microbial pathogenesis**, 2018.

ZHAO, M.; XU, J.; QIAN, D.; GUO, J.; JIANG, S.; SHANG, E.-X.; DUAN, J.-A. Identification of astilbin metabolites produced by human intestinal bacteria using UPLC-Q-TOF/MS. **Biomedical Chromatography**, v. 28, n. 7, p. 1024-1029, 2014.

ZIDA, A.; BAMBA, S.; YACOUBA, A.; OUEDRAOGO-TRAORE, R.; GUIGUEMDÉ, R. Anti-*Candida albicans* natural products, sources of new antifungal drugs: A review. **Journal de mycologie medicale**, v. 27, n. 1, p. 1-19, 2017.

ZUZARTE, M.; VALE-SILVA, L.; GONÇALVES, M.; CAVALEIRO, C.; VAZ, S.; CANHOTO, J.; PINTO, E.; SALGUEIRO, L. Antifungal activity of phenolic-rich *Lavandula multifida* L. essential oil. **European journal of clinical microbiology & infectious diseases**, v. 31, n. 7, p. 1359-1366, 2012.