

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

TIARA DA COSTA SILVA

**ESTUDO QUÍMICO E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIOLÓGICO DAS FOLHAS
DE *Cassia bakeriana* Craib**

UBERLÂNDIA

2019

TIARA DA COSTA SILVA

**ESTUDO QUÍMICO E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIOLÓGICO DAS FOLHAS
DE *Cassia bakeriana* Craib**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Química.

Área de Concentração: Química Orgânica

Orientador: Prof. Dr. Alberto de Oliveira

Coorientador: Prof.^a Dr.^a Raquel M. F. Sousa

UBERLÂNDIA

2019

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

S586 2019	<p>Silva, Tiara da Costa, 1993- Estudo químico e avaliação do potencial biológico das folhas de <i>Cassia bakeriana</i> Craib [recurso eletrônico] / Tiara da Costa Silva. - 2019.</p> <p>Orientador: Alberto de Oliveira. Coorientadora: Raquel Maria Ferreira de Sousa. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Pós-graduação em Química. Modo de acesso: Internet. Disponível em: http://dx.doi.org/10.14393/ufu.di. 2019.2082 Inclui bibliografia. Inclui ilustrações.</p> <p>1. Química. I. Oliveira, Alberto de , 1979-, (Orient.). II. Sousa, Raquel Maria Ferreira de, 1981-, (Coorient.). III. Universidade Federal de Uberlândia. Pós-graduação em Química. IV. Título.</p>	CDU: 54
--------------	--	---------

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:
Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091
Nelson Marcos Ferreira - CRB6/3074



ATA

Ata da defesa de DISSERTAÇÃO DE MESTRADO junto ao Programa de Pós-Graduação em Química, do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia

Defesa de Dissertação de Mestrado Acadêmico, número 302/PPQUI

Data: 24/05/2019

Discente: Tiara da Costa Silva

Matrícula: 11712QMI010

Título do Trabalho: Estudo químico e avaliação do potencial biológico das folhas de *Cassia bakeriana Craib*

Área de Concentração: Química

Linha de Pesquisa: Química de Produtos Naturais

Projeto de Pesquisa de Vinculação: Prospecção fitoquímica de compostos bioativos de espécies do Cerrado

Às quatorze horas do dia vinte e quatro de maio de dois mil e dezenove, na Sala de Reuniões do Instituto de Química, Bloco 1D, no Campus Santa Mônica, reuniu-se a Banca Examinadora composta pelo Prof. Dr. Celso de Oliveira Rezende Júnior, Universidade Federal de Uberlândia, Prof. Dr. João Henrique Ghilardi Lago, da Universidade Federal do ABC e Prof. Dr. Alberto de Oliveira, professor(a) orientador(a) e presidente da mesa. Iniciando os trabalhos, o(a) presidente da mesa apresentou o(a) candidato(a) e a Banca Examinadora, agradeceu a presença do público e discorreu sobre as normas e critérios para a realização desta sessão, baseadas no Regulamento do Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Uberlândia. Em seguida, o(a) presidente da mesa concedeu a palavra ao(à) candidato(a) para a exposição do seu trabalho e, em sequência, aos examinadores, em ordem sucessiva, para arguir o(a) apresentador(a). A duração da apresentação e o tempo de arguição e resposta deram-se conforme as normas do Programa. Ultimada a arguição, desenvolvida dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu os conceitos finais e aprovou o(a) candidato(a). Por sugestão da Banca Examinadora, o título do trabalho será mantido.

Esta defesa de Dissertação de Mestrado Acadêmico é parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre. O competente diploma será expedido após cumprimento do estabelecido nas normas do Programa, legislação e regulamentação internas da UFU. As correções observadas pelos examinadores deverão ser realizadas no prazo máximo de 30 dias. Nada mais havendo a tratar, deu-se por encerrada a sessão às 17 horas e 06 minutos e lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pela Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Alberto de Oliveira, Professor(a) do Magistério Superior**, em 24/05/2019, às 17:08, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Celso de Oliveira Rezende Júnior, Professor(a) do Magistério Superior**, em 24/05/2019, às 17:09, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Joao Henrique Ghilardi Lago, Usuário Externo**, em 28/05/2019, às 23:34, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1251989** e o código CRC **6AC1828A**.

Referência: Processo nº 23117.041905/2019-46

SEI nº 1251989

*Aos meus pais Carlos e Laura
e minha irmã Nayara*

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo seu favor, que me permitiu realizar esse trabalho.

Ao meu orientador professor Dr. Alberto de Oliveira pela oportunidade em trabalhar nesse projeto, pela confiança, compreensão, disposição e ensinamentos.

A minha coorientadora professora Dra. Raquel M. F. de Sousa pela paciência, disponibilidade, por em ensinar com tanto carinho, pela confiança, compreensão e incentivo.

Aos alunos Diego Godina Prado e Gilberto Arantes Koch que fizeram iniciação científica nesse projeto e contribuíram para a realização desse trabalho.

Ao professor Dr. Luis Carlos Scalon Cunha pela grande contribuição para o trabalho, pelos ensinamentos em relação espectrometria de massas e atividade antifúngica.

Aos professores colaboradores, Dr. Carlos Henrique G. Martins da Universidade de Franca pela realização da atividade antifúngica, Dr. Foued Salmen Spindola do Instituto de Genética e Bioquímica da UFU pela realização da atividade inibitória de α -amilase e o Dr. Dr. Luiz Ricardo Goulart Instituto de Genética e Bioquímica da UFU pelas análises de espectrometria de massas e citotoxicidade.

Ao Me. Allisson Benatti Justino pelas análises de inibição enzimáticas e antiglicação.

Ao Me. Mário pelas análises de espectrometria de massas.

A Dra. Paula de Souza Santos pelas análises de citotoxicidade.

Ao Dr. Flaysner Magayver Portela, técnico do Laboratório de Multiusuários– IQ/UFU, pelas análises de RMN.

A todos os amigos do NuPPEen, alunos de mestrado, doutorado e iniciação científica que me acompanharam durante a realização desse trabalho. Obrigada pelo apoio, companheirismo e auxílio nas atividades de laboratório.

A todos os professores do NUPPEen que contribuíram para realização desse trabalho.

Aos técnicos dos laboratórios do IQ-UFU pela colaboração.

Aos meus pais Carlos e Laura e minha irmã Nayara por serem meus grandes incentivadores e apoiadores.

A todos meus amigos que me acompanharam durante esta caminhada (Juliana, Ana Julia, Emanuel, Karen, Glaucianne, Maynne, Luiz Henrique, Hélbia, Deborah, Rafaela) obrigada pelo apoio, compreensão e incentivo.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pelo apoio financeiro.

Ao Instituto de Química da UFU e ao Programa de Pós-Graduação em Química, que propiciaram a realização deste trabalho.

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

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito.

Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.

(Martin Luther King)

RESUMO

Cassia bakeriana Craib (família Leguminosae) é nativa da Tailândia, mas foi adaptada ao Cerrado. O presente estudo teve como objetivo explorar o potencial antifúngico, antioxidante e antidiabético dos extratos e partições das folhas de *C. bakeriana* Craib bem como, identificar os constituintes químicos das amostras mais ativas. A atividade antifúngica foi realizada pelo método da microdiluição em caldo contra as espécies de *Candida* spp. As partições mais ativas para a *C. glabrata* foi a diclorometano (P-D) e acetato de etila (P-AE) (CIM 93,75 e 187,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente). A avaliação da atividade antioxidante foi realizada pelo método ORAC e DPPH•. O extrato etanólico (EE) e as partições apresentaram elevada atividade antioxidante no método ORAC com resultados superiores ao controle positivo ácido ascórbico ($2498,5 \pm 109,6 \mu\text{mol Trolox}_{\text{eq}}/\text{g}_{\text{amostra}}$). No método DPPH• as partições *n*-butanol (P-B), P-AE e P-D apresentaram maior atividade antioxidante (IC_{50} $21,7 \pm 3,2$; $21,9 \pm 4,3$ e $31,7 \pm 10,9 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente). Em relação à inibição enzimática, o EE apresentou maior inibição da α -amilase (IC_{50} $5,00 \pm 0,85 \mu\text{g mL}^{-1}$). A P-D apresentou maior inibição da α -glicosidase (IC_{50} $359,55 \pm 2,90 \mu\text{g mL}^{-1}$). O EH apresentou elevada inibição da lipase pancreática (IC_{50} $25,26 \pm 8,77 \mu\text{g mL}^{-1}$). No que se refere a capacidade de inibição da glicação, as P-D e P-AE foram as mais ativas (IC_{50} $37,85 \pm 0,49$ e $53,25 \pm 11,24 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente). Através do fracionamento da P-D por CLAE-DAD semi-preparativo, os flavonóides canferol (**XX**) e canferol-3-*O*-ramnosídeo (**XVII**) foram isolados e caracterizados por RMN e EM-IES. Estes compostos apresentaram elevada atividade antioxidante no método ORAC ($4198,0 \pm 42,6$ e $4153,6 \pm 3,8 \mu\text{mol Trolox}_{\text{eq}}/\text{g}_{\text{amostra}}$, respectivamente), mas apenas **XX** foi ativo para o DPPH• (IC_{50} $10,2 \pm 0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$). O composto **XX** apresentou elevada inibição da α -amilase (IC_{50} $1,5 \pm 0,14 \mu\text{g mL}^{-1}$). Os compostos **XX** e **XVII** apresentaram elevada inibição da glicação (IC_{50} $64,16 \pm 1,53$ e $84,27 \pm 11,38 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente). Através da análise CLAE-EM-IES do EE, P-D e P-AE, alguns compostos como ácidos fenólicos, flavonoides, megastigmanos, ácidos graxos e derivados, esfingolipídios, proantocianidinas, cianidina e antraquinonas foram identificados.

PALAVRAS-CHAVE: *Cassia bakeriana*. Antifúngica, Antioxidante, Antidiabéticos, Flavonoides, Ácidos fenólicos, Antraquinona, CLAE-EM-IES.

ABSTRACT

Cassia bakeriana Craib (Leguminosae family) is native from Thailand, but it was adapted in the Cerrado. The present study aimed to evaluate the antifungal, antioxidant and antidiabetic potential of extracts and partitions of *C. bakeriana* Craib leaves as well as to identify the chemical constituents of the most active samples. The antifungal activity was performed by broth microdilution method against *Candida* spp. The most active partitions for *C. glabrata* were dichloromethane (PD) and ethyl acetate (P-AE) (MIC 93.75 and 187.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectively). The evaluation of the antioxidant activity was performed by the ORAC and DPPH• method. The ethanolic extract (EE) and the partitions presented high antioxidant activity in the ORAC method with results superior to the positive ascorbic acid control ($2498.5 \pm 109.6 \mu\text{mol Trolox}_{\text{eq}}/\text{g}_{\text{sample}}$). In the DPPH• method, the *n*-butanol (PB), P-AE and PD partitions showed higher antioxidant activity (IC_{50} 21.7 ± 3.2 , 21.9 ± 4.3 and $31.7 \pm 10.9 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectively). In relation to enzymatic inhibition, the EE showed higher α -amylase inhibition (IC_{50} $5.00 \pm 0.85 \mu\text{g mL}^{-1}$). The P-D showed greater α -glycosidase inhibition (IC_{50} $359.55 \pm 2.90 \mu\text{g mL}^{-1}$). The EH showed high inhibition of pancreatic lipase (IC_{50} $25.26 \pm 8.77 \mu\text{g mL}^{-1}$). In relation to glycation inhibition capacity, P-D and P-AE were also the most active (IC_{50} 37.85 ± 0.49 and $53.25 \pm 11.24 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectively). By fractionation of P-D by semi-preparative CLAE-DAD, the flavonoids canferol (**XX**) and canferol-3-*O*-rhamnoside (**XVII**) were isolated and characterized by NMR and MS-IES. These compounds showed high antioxidant activity in the ORAC method (4198.0 ± 42.6 and $4153.6 \pm 3.8 \mu\text{mol Trolox}_{\text{eq}}/\text{g}_{\text{sample}}$, respectively), but only compound **XX** was active by DPPH• method (IC_{50} $10.2 \pm 0.1 \mu\text{g mL}^{-1}$). The isolated compounds **XX** showed high inhibition of α -amylase (IC_{50} $1.5 \pm 0.14 \mu\text{g mL}^{-1}$). The compounds **XX** and **XVII** showed high inhibition of glycation (IC_{50} 64.16 ± 1.53 and $84.27 \pm 11.38 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectively). Through the HPLC-ESI-MS analysis of EE, Fr-D and Fr-AE, some compounds such as phenolics acid, flavonoids, megastigmane, fatty acids and derivatives, sphingolipids, proanthocyanidins, cyanidin and anthraquinones were identified.

KEYWORDS: *Cassia bakeriana*, Antifungal, Antioxidant, Antidiabetic, Flavonoids, Phenolic acids, Anthraquinone, HPLC-ESI-MS.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Estrutura de fármacos isolados de plantas.	20
Figura 2- Classificação dos fármacos aprovados no período de 1981 a 2014.	21
Figura 3- Estrutura de alguns fármacos aprovados entre 1981 a 2014.	22
Figura 4- Estrutura dos intermediários na formação dos metabólitos especiais.	25
Figura 5- Esquema das rotas envolvidas na biossíntese dos metabólitos especiais e as inter-relações com metabolismo primário.	26
Figura 6- Estrutura de alguns alcaloides e suas respectivas atividades biológicas.	27
Figura 7- Estrutura de alguns terpenos e atividade biológica apresentada.	28
Figura 8- Núcleo fundamental dos flavonoides.	32
Figura 9- Principais classes de flavonoides.	33
Figura 10- Biossíntese das flavanonas.	34
Figura 11- Biossíntese das principais classes de flavonoides.	35
Figura 12- Estrutura de compostos antidiabéticos obtidos de produtos naturais.	41
Figura 13- Estrutura do orlistat.	44
Figura 14- Mecanismo de formação dos produtos de glicação avançada.	46
Figura 15- Estrutura dos inibidores dos produtos de glicação avançada.	46
Figura 16- Estrutura dos compostos isolados das folhas de espécies de <i>Cassia</i>	55
Figura 17- Estruturas dos compostos isolados das folhas de espécies de <i>Cassia</i> . ..	56
Figura 18- Folhas e cascas da <i>Cassia bakeriana</i>	57
Figura 19- Flores da <i>Cassia bakeriana</i>	58
Figura 20- Esquema do preparo do material vegetal.	62
Figura 21- Primeira extração do EH e EE.	63
Figura 22- Procedimento de preparação dos extratos e partições.	63
Figura 23- Perfil cromatográfico da P-D obtido por CLAE-DAD em 366 nm.	68
Figura 24- Perfil do fracionamento da P-D segundo o T_R e ampliação da região 10 a 17 mim.	68
Figura 25- Fluxograma com rendimento obtido das frações da P-D.	69
Figura 26- Cromatogramas de pico base do EE, P-D e P-AE obtidos por CLAE-EM-IES nos modos negativo (-) e positivo (+).	82
Figura 27- Estrutura dos compostos identificados no EE e nas P-D das folhas de <i>C. bakeriana</i>	88
Figura 28- (A) Cromatograma da Fr-D9 obtido por CLAE-DAD em 366nm; (B):	

CCD da Fr-D9.....	89
Figura 29- Estrutura do canferol (XX) isolado na Fr-D9.	90
Figura 30- Espectro UV-Vis do composto isolado da Fr-D9.....	90
Figura 31- (A) (-)-EM-ESI alta resolução da Fr-D9; (B) (-)-EM/EM-ESI 25eV da FR-D9.....	91
Figura 32- Proposta de fragmentação para o canferol (XII).	92
Figura 33- Espectro de RMN ¹ H (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) da Fr-D9 (XII).	94
Figura 34- Mapa de contorno HMBC (DMSO- <i>d</i> ₆) ampliado da região do OH-3.	95
Figura 35- Espectro RMN de ¹ H (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) ampliado na região dos aromáticos.	95
Figura 36- Mapa de contorno HMBC da Fr-D9 e estrutura do canferol (XX) com as respectivas correlações.	96
Figura 37- Espectro de RMN de ¹³ C (100 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) da Fr-D9 (XX).	97
Figura 38- Mapa de contorno HSQC ampliado da Fr-D9 (XX).	98
Figura 39- (A) Cromatograma da Fr-D6 obtido por CLAE-DAD em 266; (B) CCD da Fr-D6.....	99
Figura 40- Estrutura do composto (XVII) isolado da Fr-D6.	99
Figura 41- Espectro UV-Vis do composto isolado da Fr-D9 (XVII).....	100
Figura 42- (A) (-)-EM-ESI alta resolução da Fr-D6; (B) (-)-EM/EM-ESI 20eV da Fr-D6.	101
Figura 43- Proposta de fragmentação para os íons <i>m/z</i> 285 e 284 do composto isolado da Fr-D6 (IX).	101
Figura 44- RMN ¹ H (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) da Fr-D6 (XVII).....	103
Figura 45- RMN ¹ H ampliando da região dos H aromáticos da Fr-D6 (XVII).....	104
Figura 46- Mapa de contorno HSQC ampliado da região do aromáticos da Fr-D6 (IX).	104
Figura 47- Espectro RMN ¹ H (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) ampliado da região glicosídica da Fr-D6 (XVII).	105
Figura 48- Mapa de contorno HSQC ampliado da região glicosídica da Fr-D6 (XVII).	106
Figura 49- Mapa de contorno COSY ampliado da região glicosídica da Fr-D6 (XVII).	107
Figura 50- Espectro de RMN de ¹³ C (100 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) da Fr-D6 (IX).....	108
Figura 51- Mapa de contorno HMQC ampliado da região de correlação entre	

H-1" e o C-3 da Fr-D6 (XVII).....	109
Figura 52- Reação da redução da resazurina.....	111
Figura 53- Formação do radical peroxil e sua e reação com a fluoresceína e a substância antioxidante.....	117
Figura 54- Espectros de absorção UV-VIS do radical DPPH e do composto DPPH-H.....	118
Figura 55- Mecanismo de reação dos compostos fenólicos com DPPH•.....	118
Figura 56- Estruturas de ressonância do radical fenoxila.....	118
Figura 57- Características estruturais que favorecem atividade antioxidante dos flavonoides.....	122
Figura 58- Reação do substrato Gal-G2- α -CNP catalisada pela enzima α -amilase.....	123
Figura 59- Reação do substrato <i>p</i> -NPG catalisado pela enzima α -glicosidase.....	123
Figura 60- Mecanismos de hidrólise da ligação glicosídica. (A) Inversão da configuração; (B) Retenção da configuração.	124
Figura 61- Representação da do <i>p</i> -NBP catalisada pela lipase obtendo-se o <i>p</i> -NP e o ácido butírico.	129

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Principais classes de compostos fenólicos e estrutura básica. (<i>continua</i>)	29
Tabela 2- Espécies de Cassia e seu uso na medicina popular (<i>continua</i>).	48
Tabela 3- Compostos isolados das folhas de espécies de <i>Cassia</i> e suas respectivas atividades biológicas. (<i>continua</i>)	51
Tabela 4- Rendimento obtido dos EH e EE das folhas de <i>C. bakeriana</i>	78
Tabela 5- Rendimento das partições obtidas através da extração líquido-líquido do EE das folhas de <i>C. bakeriana</i>	79
Tabela 6- Prospecção fitoquímica dos extratos e partições das folhas de <i>Cassia bakeriana</i>	80
Tabela 7- Proposta de identificação dos compostos do EE, P-D e P-AE das folhas de <i>C. bakeriana</i> . (<i>continua</i>)	83
Tabela 8- Sinais do RMN de ¹ H da Fr-D9 comparados com o canferol.	96
Tabela 9- Sinais de RMN do ¹³ C, correlação com ¹ H e comparação com o canferol (XX).	98
Tabela 10- Sinais RMN ¹ H da Fr-D6 (IX) comparados com o canferol-3-O-ramnosídeo	107
Tabela 11- Sinais de RMN do ¹³ C, correlação com ¹ H e comparação com o canferol-3-O-ramnosídeo.	110
Tabela 12- Valores de CIM dos extratos e partições da <i>C. bakeriana</i>	111
Tabela 13- CIM de alguns compostos presentes na P-D e P-AE.	114
Tabela 14- Atividade antioxidante apresentada pelos extratos, partições e compostos isolados da <i>C. bakeriana</i> pelos métodos ORAC e DPPH*. .	119
Tabela 15- Percentual de inibição (%) e IC ₅₀ da α-amilase e α-glicosidase apresentado pelos extratos, partições, compostos isolados das folhas de <i>C. bakeriana</i> e controle positivo.	125
Tabela 16- Espécies de <i>Cassia</i> avaliadas contra α-amilase e α-glicosidase.	127
Tabela 17- Percentual de inibição (%) e IC ₅₀ da lipase pancreática apresentado pelos extratos, partições, compostos isolados das folhas de <i>C. bakeriana</i> e controle positivo.	129
Tabela 18- Percentual de inibição (%) e IC ₅₀ da inibição da glicação apresentado pelos extratos, partições, compostos isolados das folhas de <i>C. bakeriana</i> e controle positivo.	131

Tabela 19- Valores de Concentração Citotóxica (CC ₅₀) e Índice de Seletividade (IS) apresentado pelos extratos e partições da <i>C. bakeriana</i>	134
---	-----

LISTA DE ABREVIATURA

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AAPH	2,2'-azobis (2-amidinopropano) di-hidrocloreto
Acetil CoA	Acetilcoenzima A
AGEs	Produtos de glicação avançada
ATCC	<i>"American Type Culture Collection"</i>
BHA	Hidroxianisol butilado
BHT	Hidroxitolueno butilado
BSA	Albumina sérica bovina
CCD	Cromatografia em camada delgada
CIM	Concentração inibitória mínima
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
COSY	Homonuclear correlation spectroscopy
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
EE	Extrato etanólico
EH	Extrato hexânico
EM	Espectrometria de massas
EM/EM	Espectrometria de massas sequencial
EO	Estresse oxidativo
ER	Espécies reativas
ERN	Espécies reativas de nitrogênio
ERO	Espécies reativas de oxigênio
f-AG	Fração enriquecida da enzima α -glicosidase
f-AS	Fração de saliva enriquecida da enzima α -amilase
Gal-G2- α -CNP	α -(2-cloro-4-nitrofenil)- β -1,4-galactopiranosilmaltosídeo
HAT	Transferência de átomos de hidrogênio
HMBC	Heteronuclear multiplebond coherence
HSQC	Heteronuclear single quantum coherence
IGEB-UFU	Laboratório de Nanobiotecnologia do Instituto Biotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia
LaPeMA-UNIFRAN	Laboratório de Pesquisa em Microbiologia Aplicada da Universidade de Franca

LP	Lipase pancreática
MES	2-(N-morfolino)-etanossulfônico
ME	Metabólitos especiais
MOPS	Ácido 3-N-morfolinopropanosulfônico
<i>m/z</i>	Razão massa carga
NP	Difenilboriloxietilamina
OMS	Organização Mundial da Saúde
ORAC	“ <i>Oxygen radical absorbance capacity</i> ”
P-A	Partição aquosa
P-AE	Partição acetato de etila
P-B	Partição <i>n</i> -butanol
PBS	Tampão fosfato-salino
P-D	Partição diclorometano
PEG-4000	Polietilenoglicol 400
PG	Galato de propila
PN	Produtos naturais
<i>p</i> -NPG	4-nitrofenil- α -D-glicopiranosídeo
<i>p</i> -NPP	<i>p</i> -nitrofenil palmitato
PTFE	Politetrafluoetileno
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
SUS	Sistema Único de Saúde
TBHQ	<i>Terc</i> -butilidroquinona
T _R	Tempo de retenção

SUMÁRIO

1.0 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	19
2.0 REFERENCIAL TEÓRICO	24
2.1 METABOLISMO ESPECIAL.....	24
2.1.1 <i>Compostos fenólicos</i>	29
2.2 ATIVIDADES BIOLÓGICAS.....	35
2.2.1 <i>Atividade antifúngica</i>	35
2.2.2 <i>Diabetes e o estresse oxidativo</i>	37
2.2.3 <i>Enzimas α-amilase e α-glicosidase</i>	41
2.2.4 <i>Lipases</i>	42
2.2.5 <i>Produtos de glicação avançada</i>	44
2.3 FAMÍLIA LEGUMINOSAE.....	47
2.4 ASPECTOS QUÍMICOS E BIOLÓGICOS DO GÊNERO <i>Cassia</i>	47
2.5 <i>Cassia bakeriana</i> Craib: ASPECTOS MORFOLÓGICOS, QUÍMICOS E BIOLÓGICOS.....	57
3 OBJETIVOS	59
3.1 OBJETIVO GERAL.....	59
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	59
4 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	60
4.1 INSTRUMENTAÇÃO.....	60
4.2 SOLVENTES E REAGENTES.....	60
4.3 CROMATOGRAFIA.....	61
4.4 COLETA E PREPARO DO MATERIAL VEGETAL.....	61
4.5 PREPARO DOS EXTRATOS E EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO.....	62
4.6 PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA.....	64
4.7 ANÁLISE POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS.....	66
4.8 FRACIONAMENTO DA PARTIÇÃO DICLOROMETANO.....	67

4.9 ANÁLISE DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA	69
4.10 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA	69
4.10.1 <i>Determinação da Concentração Inibitória Mínima</i>	69
4.10.2 <i>Preparo do inóculo</i>	70
4.11 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	71
4.11.1 Método do sequestro do DPPH•	71
4.11.2 <i>Método do sequestro do radical de oxigênio ORAC</i>	72
4.12 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE INIBIÇÃO DAS ENZIMAS α -AMILASE, α -GLICOSIDASE E LIPASE PANCREÁTICA	72
4.12.1 <i>Inibição da atividade da α-amilase</i>	72
4.12.2 <i>Inibição da atividade da α-glicosidase</i>	74
4.12.3 <i>Inibição da atividade da lipase pancreática</i>	75
4.13 DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE DE INIBIÇÃO DA GLICAÇÃO.....	75
4.14 DETERMINAÇÃO DA CITOTOXICIDADE	76
4.15 ANÁLISE ESTATÍSTICA	77
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES	77
5.1 RENDIMENTO DOS EXTRATOS E EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO	77
5.2 PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA.....	79
5.3 IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS PRESENTES NO EE, P-D E PA-AE.....	80
5.3.1 <i>Identificação do composto isolado da Fr-D9 (canferol XX)</i>	89
5.3.2 <i>Identificação do composto isolado da Fr-D6 (canferol-3-O-amnosídeoXVII)</i>	99
5.4 ATIVIDADE ANTIFÚNGICA	110
5.5 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	115
5.6 ATIVIDADE INIBITÓRIA DAS ENZIMAS α -AMILASE E α -GLICOSIDASE.....	122
5.7 ATIVIDADE DE INIBIÇÃO DA LIPASE PANCREÁTICA.....	128
5.8 ATIVIDADE DE INIBIÇÃO DA GLICAÇÃO	131

5.9 ATIVIDADE CITOTÓXICA.....	133
6.0 CONSIDERAÇÕES FINAIS	135
REFERÊNCIAS.....	136
APÊNDICE.....	168

1.0 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

O uso de produtos naturais (metabólitos especiais) para o tratamento de doenças é uma prática que acompanha a história da humanidade por milhares de anos. Os povos antigos mastigavam ervas para aliviar dores ou enrolavam folhas sobre ferimentos para cicatrização, pois o conhecimento da medicina popular era a única fonte medicinal utilizada por esses povos. Mesmo nos dias atuais, com o desenvolvimento do sistema médico e o surgimento de fármacos, para algumas comunidades, as plantas ainda são o único recurso utilizado no tratamento de doenças (MACIEL et al., 2002, VIEGAS JR; BOLZANI; BARREIRO, 2006, JI; LI; ZHANG, 2009, MOHAMMADI; MANSOORI; BARADARAN, 2017, WANGKHEIRAKPAM, 2018).

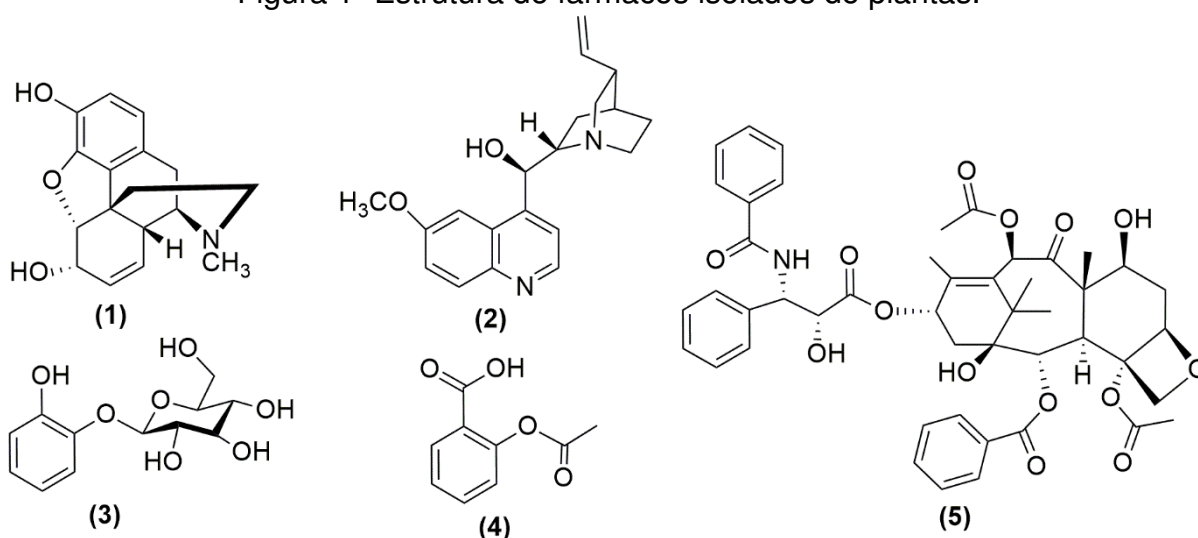
O conhecimento do potencial biológico dessas plantas, que foram passadas ao longo dos anos por diversas gerações, despertou o interesse de pesquisadores que a partir do século XIX desenvolveram diversos estudos sobre o uso e propriedades das plantas medicinais que possibilitou o isolamento de alguns princípios ativos que são utilizados como fármacos nos dias atuais para o tratamento de várias doenças (MONTANARI; BOLZANI, 2001, MAJUMDAR; SOMANI, 2018, DUTTA et al., 2019).

Como exemplos temos a morfina (**1**) isolada do ópio de *Papaver somniferum*, entre os anos de 1803 e 1817. Esse potente alcaloide é utilizado como analgésico para o alívio de dores crônicas agudas e severas (KRISHNAMURTI; RAO, 2016). A quinina (**2**) isolada das cascas de espécies de *Cinchona* em 1820 é um importante fármaco antimalárico (ACHAN et al., 2011). Da casca do salgueiro (*Salix alba*) foi isolado em 1828 a salicina (**3**), que serviu como modelo para a síntese do ácido acetil salicílico (**4**) (aspirina), amplamente utilizado como analgésico mais brando (DIAS; URBAN; ROESSNER, 2012). O taxol (**5**) considerado até hoje o produto natural de maior sucesso, é um potente agente antitumoral isolado no início da década de 1960 das cascas de *Taxus brevifolia* (LI et al., 2017). Na Figura 1 estão representadas as estruturas desses fármacos.

Apesar do sucesso dessas moléculas, no final dos anos 80 e início da década de 1990, muitas empresas farmacêuticas diminuíram a triagem de produtos naturais (PN) para descoberta de novos fármacos. Esse fato foi devido à concorrência entre as indústrias na descoberta de novas classes de fármacos, que passaram a priorizar ensaios rápidos e de alta produtividade. A triagem de PN foi descartada devido às

dificuldades em trabalhar com esses produtos, como acesso, complexidade química e indisponibilidade de ferramentas analíticas nesse período (LAM, 2007, HARVEY, 2008, KHAN, 2018). Entretanto, o progresso científico para compreensão da química dos produtos naturais nas últimas décadas, possibilitou avanços nas metodologias para purificação de compostos, na instrumentação analítica resultando em técnicas hífenadas sofisticadas como CLAE-EM, CLAE-RMN e CLAE-RMN-EM que permitiram maior facilidade na definição e caracterização de estruturas.

Figura 1- Estrutura de fármacos isolados de plantas.



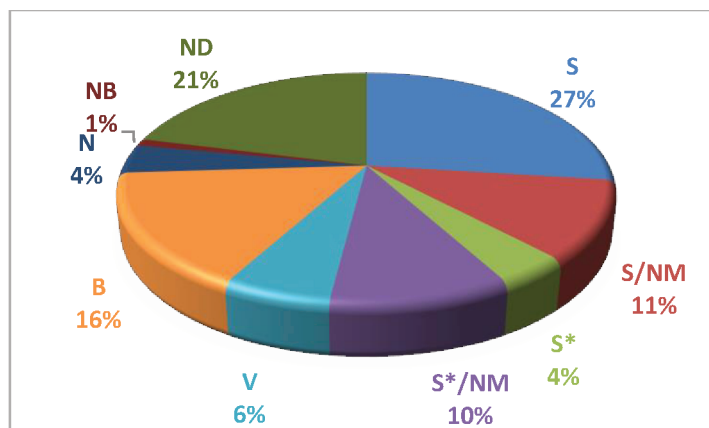
Fonte: a autora.

Além disso, esse progresso possibilitou a compreensão da ação farmacológica e a interdisciplinaridade com outras áreas como a físico-química, medicina e biotecnologia. Com o advento da biologia molecular e da química combinatória que permitem a avaliação das interações de várias moléculas e análogos frente a diversos alvos biológicos, os produtos naturais assumiram um papel importante na descoberta e planejamento de fármacos com diferentes atividades biológicas (JI; LI; ZHANG, 2009, DIAS; URBAN; ROESSNER, 2012, KHAN, 2018).

A importância dos produtos naturais para a descoberta de novos medicamentos é relatada na revisão de Newman e Gragg (2016), a qual mostrou que a maioria dos 1.562 fármacos aprovados pela Food and Drug Administration (FDA) no período de 1981 a 2014 foram inspirados em PN. Esses fármacos foram classificados como: macromolécula biológica (B), produto natural inalterado (N), medicamento botânico (fitoterápicos) (NB), derivado de produto natural com modificação semissintética (ND),

fármaco totalmente sintético (S), fármaco sintético com grupo farmacofórico de produto natural (S*), fármacos que imitam o produto natural (NM) e vacinas (V). Dentro dessa classificação, os fármacos isolados de PN representam 4% do total. Entretanto, 51% dos fármacos (fora os sintéticos, vacinas e macromoléculas biológicas), foram produzidos inspirados em produtos naturais como mostra a Figura 2.

Figura 2- Classificação dos fármacos aprovados no período de 1981 a 2014.



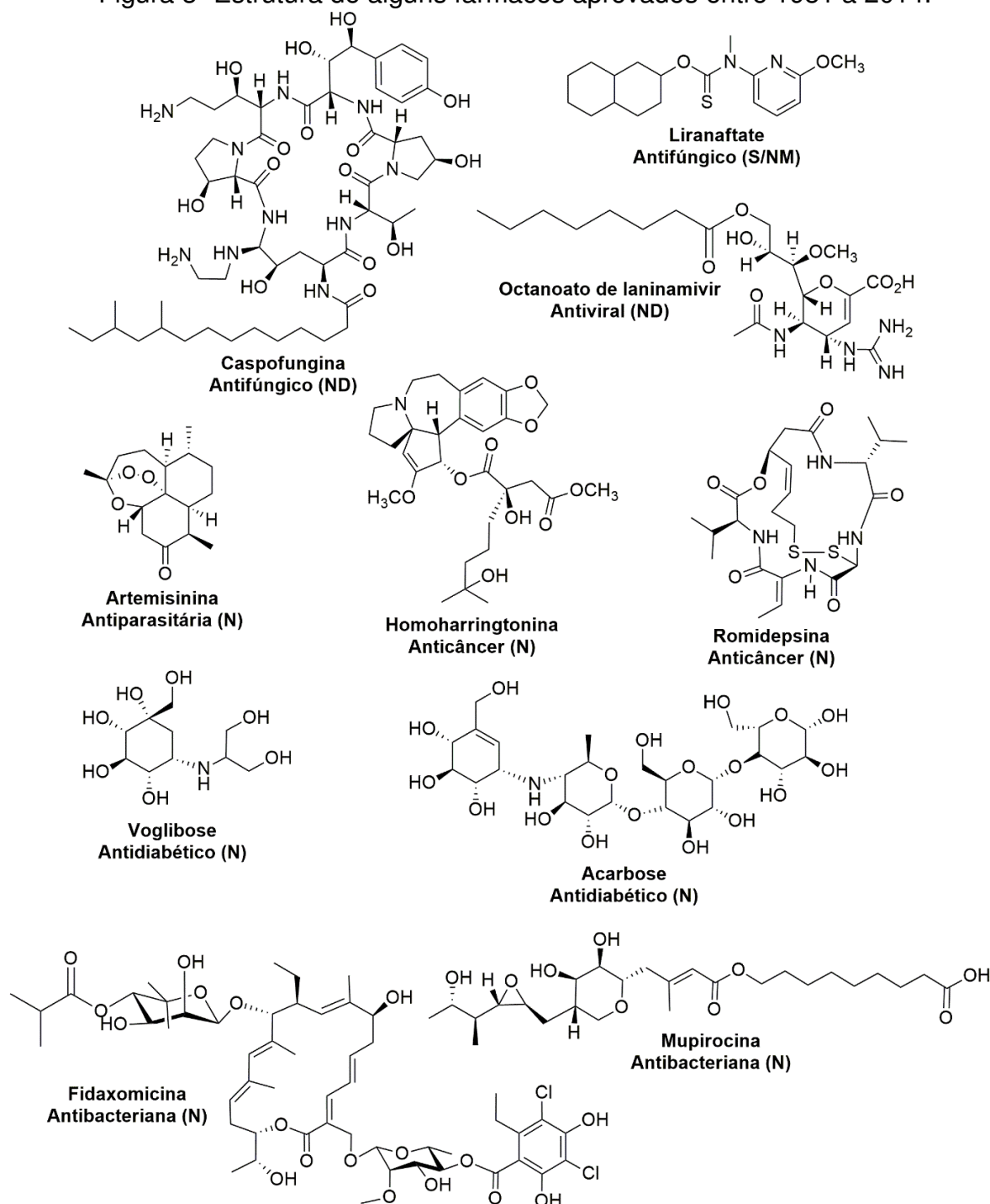
Fonte: adaptado de Newman e Cragg (2016).

Os fármacos desenvolvidos nestes 34 anos tiveram maiores indicações para doenças antibacteriana e anticancerígena, que representam 23% do total de fármacos desenvolvidos. Outras doenças, como as infecciosas (microbianas, parasitárias e viral), hipertensão, diabetes e inflamações tiveram mais de 50 fármacos aprovados cada uma (NEWMAN; CRAGG, 2016). A Figura 3 mostra a estrutura de alguns fármacos isolados de produtos naturais ou derivados e suas respectivas atividades biológicas. Os PN apresentam grandes diversidades e complexidades estruturais que são características importantes para seleção de moléculas bioativas que possam interagir com diferentes alvos biológicos, apesar da dificuldade no isolamento e caracterização (SIMÕES et al., 2017).

O interesse do estudo de plantas medicinais para o descobrimento de novos fármacos também contribuiu para o advento da fitoterapia, uma alternativa que tem crescido entre as opções terapêuticas. Os medicamentos fitoterápicos, ao contrário das plantas medicinais passam por testes de validação, efeitos farmacológicos e análises toxicológicas, além de ser registrado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), o que garante maior segurança para os usuários. Em 2006, o Ministério da Saúde do Brasil disponibilizou opções terapêuticas e preventivas aos

usuários do Sistema Único de Saúde (SUS), entre elas o uso de fitoterápicos e plantas medicinais (FERREIRA et al., 2014). Mesmo com toda a importância dos PN, seja na descoberta de novos fármacos ou para uso como fitoterápicos, menos de 10% da biodiversidade mundial foi avaliada quanto ao potencial biológico e muitos compostos naturais aguardam serem descobertos (DIAS; URBAN; ROESSNER, 2012).

Figura 3- Estrutura de alguns fármacos aprovados entre 1981 a 2014.



Fonte: adaptado de Newman e Gragg (2016).

Devido a esse fato, o Brasil é um país com grande propensão para o estudo de produtos naturais em vista a sua grande biodiversidade. São 8,5 milhões km² territoriais que envolvem diversas zonas climáticas resultando em grandes variações ecológicas com diferentes biomas (Floresta Amazônica, Pantanal, Cerrado, Caatinga, Mata Atlântica e Pampa). A variedade desses biomas se deve a riqueza da flora e fauna que abriga aproximadamente 20% do número total de espécies do planeta (BIODIVERSIDADE, 2018). Apesar da grande biodiversidade brasileira e do significativo número de publicações científicas na área de PN (foram mais de 10 mil publicações de artigos entre 2011 e 2013), o mercado brasileiro de fitoterapia ainda é pouco relevante, representado menos de 5% do mercado mundial fechado em 27 bilhões de dólares em 2014. Entre os fitoterápicos comercializados, apenas um agente fitoterápico brasileiro (Acheflan®), produzido pelo óleo da planta *Cordia verbenacea* com ação analgésica e anti-inflamatória, é encontrado entre os top 20 comercializados no Brasil (DUTRA et al., 2016).

Entre os biomas brasileiros, o Cerrado se destaca devido a sua biodiversidade. Representa 5% da flora e fauna do planeta, sendo uma das savanas mais ricas do mundo. É o segundo maior e ocupa cerca de 25% do território brasileiro, sua área abrange o Distrito Federal e dez estados, sendo eles: Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Tocantins, Maranhão, Bahia, Piauí, Minas Gerais, São Paulo e Paraná (MACHADO et al., 2004, MIRANDA et al., 2009, MINISTÉRIO, 2011).

O Cerrado abriga 11.627 mil espécies e quase a metade são endêmicas. Entretanto esse bioma tem sido rapidamente devastado devido a atividades agrícolas insustentáveis, pecuária e a queima de vegetação para obtenção de carvão vegetal. Apesar da sua importância ambiental, apenas 8,21% da sua área é totalmente protegida por lei, sendo uma das regiões menos protegidas do Brasil (CERRADO, 2017, OBIOMA, 2018). A devastação do Cerrado significa uma grande perda em termos de biodiversidade. Segundo o estudo realizado por Strassburg e outros (2017), o Cerrado já perdeu 46% da sua cobertura nativa e se o cenário tendencial evoluir, nos próximos 30 anos um terço do restante será perdido. Esses dados significam que 1.140 espécies podem desaparecer o que gera uma grande perda para o conhecimento, uma vez que várias plantas medicinais são encontradas nesse local.

Nesse contexto, o presente trabalho estudou a composição química das folhas de *Cassia bakeriana* e avaliou a atividade antifúngica, antioxidante, inibitória das enzimas α -amilase, α -glicosidase, lipase pancreática e inibição da glicação. Não

consta na literatura estudos em relação à composição química das folhas de *C. bakeriana*, foi relatada apenas uma avaliação da atividade antibacteriana contra bactérias da cavidade bucal do extrato e partições (CUNHA et al., 2017). Estudos com diferentes espécies de *Cassia* mostrou o potencial biológico desse gênero que apresentou atividade hepatoprotetora, hipolipidêmica, antimutagênica, antifúngica, antibacteriana, antidiabetes, antiúlcera, antioxidante, laxativa, além de identificar/isolar diversos constituintes químicos (SINGH; SINGH; YADAV, 2013, SUNDARAMOORTHY et al., 2016). A *C. bakeriana* é uma espécie nativa da Tailândia, mas adaptada no Cerrado, outras espécies de *Cassia* como *C. absus*, *C. alata*, *C. angulata*, *C. fastuosa*, *C. ferruginea*, *C. grandis*, *C. obtusifolia*, *C. occidentalis*, são nativas no Brasil e também são encontradas no Cerrado, o que justifica o estudo dessa espécie (SCHEIDEGGER, 2018). Dessa forma, a proposta desse trabalho pode contribuir para a valorização de espécies presentes no Cerrado, através do conhecimento da composição química das folhas de *Cassia bakeriana*, bem como o seu potencial biológico.

2.0 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 METABOLISMO ESPECIAL

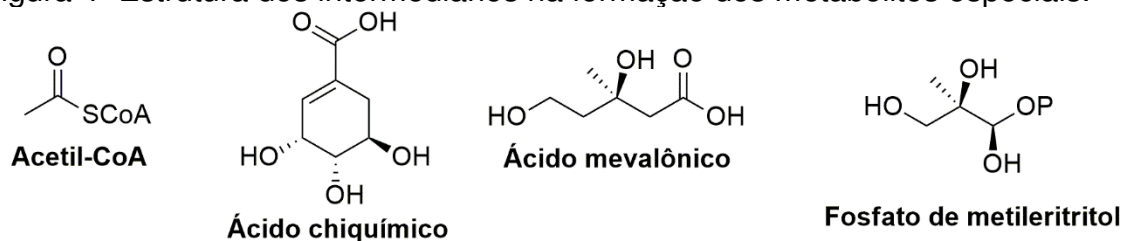
O metabolismo vegetal é um conjunto de reações químicas que resulta em uma variedade de compostos orgânicos denominados metabólicos primários e especiais. Os metabólitos primários estão presentes em todas as plantas e sua formação está relacionada com processos fotossintéticos que produzem ácidos carboxílicos de baixo peso molecular, aminoácidos, nucleotídeos, açúcares e lipídios. Esses compostos são essenciais para o funcionamento dos vegetais bem como seu crescimento e desenvolvimento. Os metabólitos especiais (ME) também chamados de metabólitos secundários, são compostos de baixa massa molecular e não apresentam ações diretas nos processos de fotossíntese, respiração, assimilação de nutrientes, transporte de solutos, síntese de proteínas, carboidratos e lipídios, mas são essenciais no processo de inter-relação da planta com o meio ambiente. O processo de biossíntese dos ME está relacionado com a evolução das espécies, por isso, geralmente apresentam uma distribuição restrita a uma determinada família, gênero

ou espécie e são sintetizados pelas plantas em menor quantidade (TORSSELL, 1997, GARCÍA; CARRIL, 2009, SIMOES et al., 2017).

Os ME são responsáveis pelo sabor dos vegetais e podem apresentar efeitos benéficos e/ou prejudiciais para a saúde de humanos e animais depois de ingeridos. Entretanto esses compostos são muito importantes para a relação das plantas com a natureza, podem servir como atrativos para polinizadores, dispersores e na defesa contra inimigos garantindo a sobrevivência das plantas em seu ecossistema. (VERPOORTE et al., 2000, KROYMANN, 2011).

As principais classes de ME são derivadas dos intermediários acetilcoenzima A (acetil-CoA), ácido chiquímico, ácido mevalônico e fosfato de metileritritol (Figura 4) em suas respectivas vias metabólicas: via do acetato, chiquimato, mevalonato e metileritritol fosfato. Apesar de ser um número pequeno de estruturas, esses compostos sofrem reações catalisadas por enzimas tais como reações de ciclização, eliminação, rearranjo, redução, oxidação e metilação, que dão origem a uma serie de ME com uma grande complexidade de estruturas químicas (GUNATILAKA, 2012).

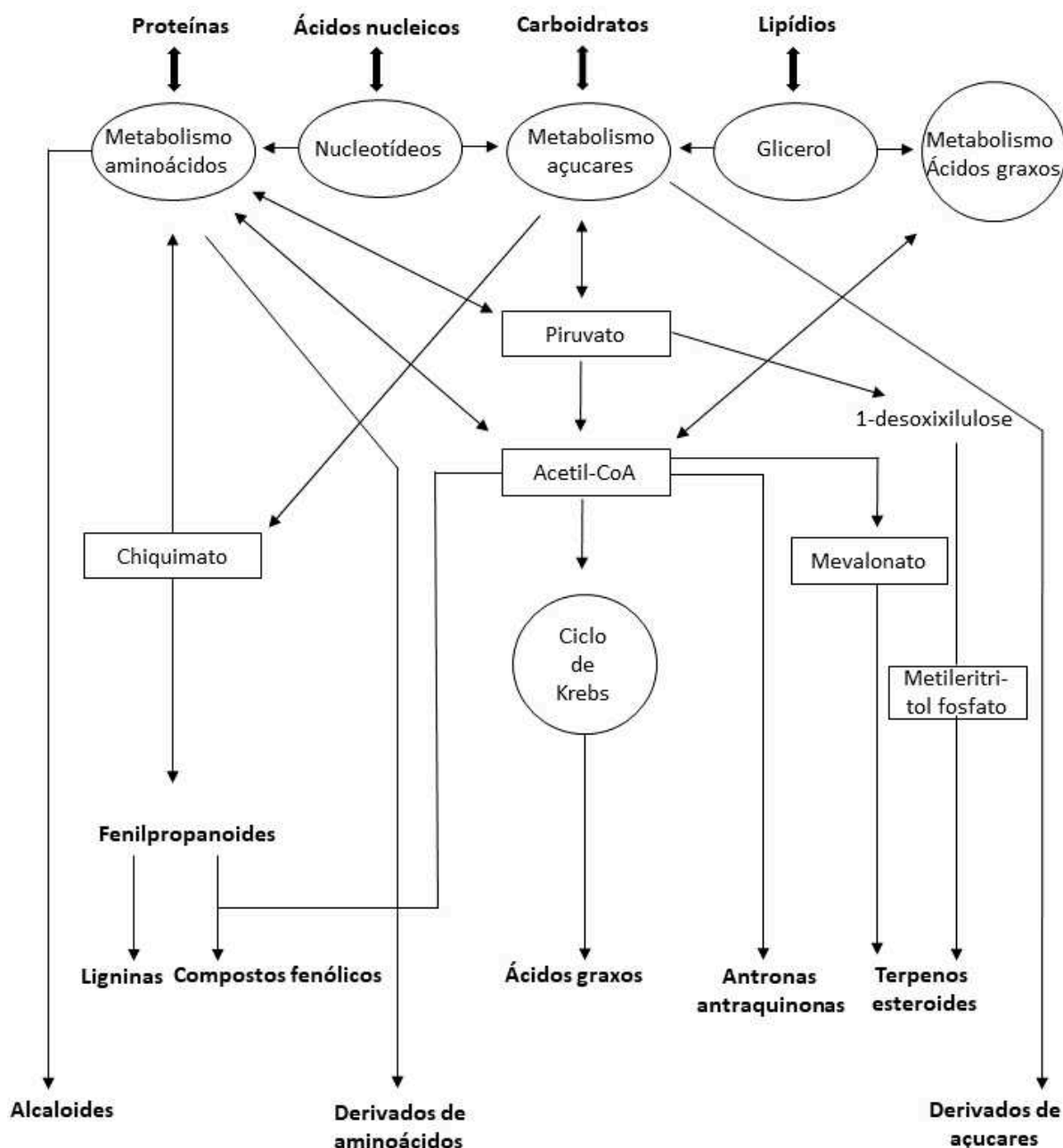
Figura 4- Estrutura dos intermediários na formação dos metabólitos especiais.



Fonte: a autora.

Na via do acetato são produzidos ácidos graxos e compostos fenólicos como antronas e antraquinonas. Na via do chiquimato são produzidos fenilpropanoides, lignanas, ligninas, cumarinas e ácidos fenólicos. Os flavonoides são produzidos em duas vias, a do chiquimato e a via do acetato. Na via do mevalonato e metileritritol fosfato são produzidos terpenos e esteroides. Os alcaloides são produzidos a partir de aminoácidos alifáticos oriundos do ciclo de Krebs e de aminoácidos aromáticos da via do chiquimato (DEWICK, 2012, GUNATILAKA, 2012, SIMÕES et al., 2017). A Figura 5 mostra de forma simplificada, as rotas envolvidas na biossíntese dos metabólitos especiais e as inter-relações com os metabólitos primários.

Figura 5- Esquema das rotas envolvidas na biossíntese dos metabolitos especiais e as inter-relações com metabolismo primário.

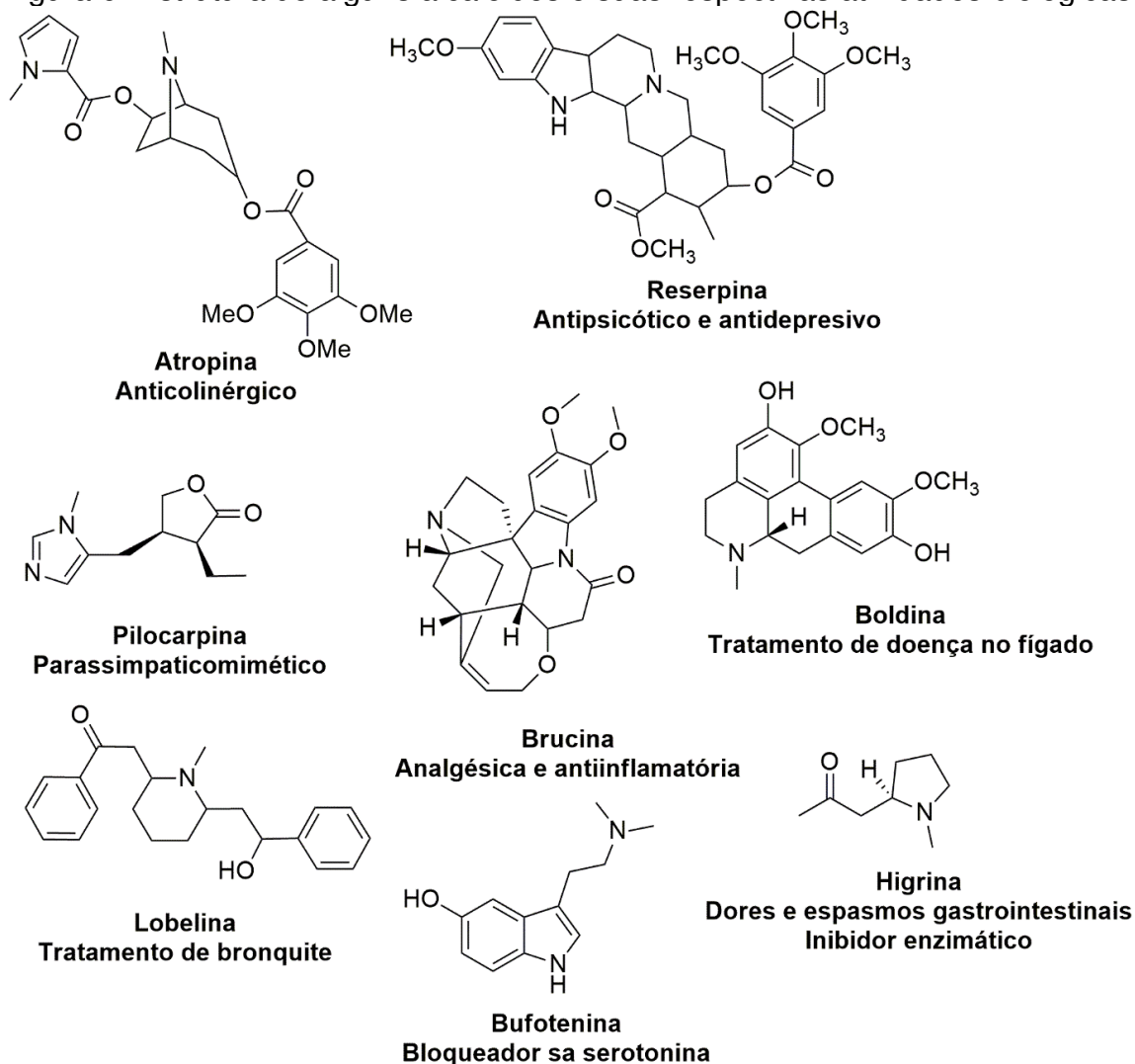


Fonte: adaptado de Simões e outros (2017).

Os alcaloides representam um grupo de mais de 15 mil compostos distribuídos em 20% de espécies de plantas. Essas substâncias possuem nitrogênio em sua estrutura e por isso apresentam caráter básico (TAIZ; ZEIGER, 2004). Esses compostos são derivados de aminoácidos como tirosina, lisina, fenilalanina, ácido antranílico, triptofano, triptamina, ornitina, arginina, histidina. No entanto ainda podem ser derivados de outros precursores como purinas, terpenos e policetídeos.

Dependendo da estrutura do anel, os alcaloides são subdivididos em: pirrolidínico, tropânico, piperidínico, pirrolizidínico, quinolizidínico, isoquinolínico, aporfínico, quinolínico, indólico, alcaloides terpênicos e esteroidais. Uma das principais funções dos alcaloides é na defesa das plantas contra predadores vertebrados, fungos e outras plantas. As estruturas químicas dos alcaloides faz com que eles interajam com diferentes alvos moleculares o que os tornam extremamente ativos, apresentando uma vasta gama de atividades, muitos apresentam características de neurotransmissores e potencial citotóxico (SIMÕES et al., 2017, DEBNATH et al., 2018). A quinina (2) e o taxol (4) (Fig 1, p. 20) são exemplos de alcaloides usados para tratamento da malária e câncer, respectivamente. Na Figura 6 está representada a estrutura de outros alcaloides e suas respectivas atividades biológicas.

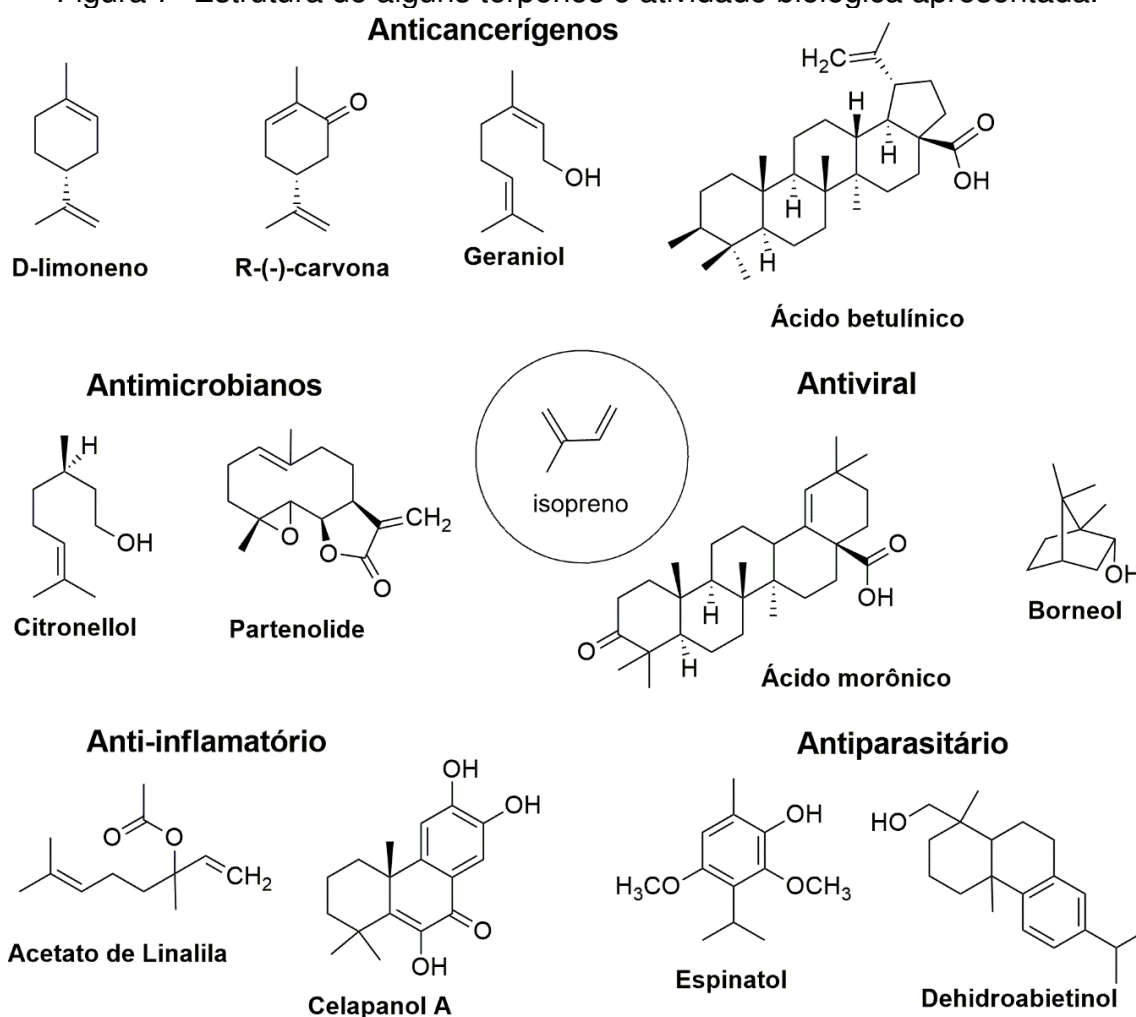
Figura 6- Estrutura de alguns alcaloides e suas respectivas atividades biológicas.



Fonte: adaptado de Debnath e outros (2018).

Os terpenos representam o maior grupo de ME com mais de 27 mil compostos identificados. São classificados de acordo com o número de unidades de isopreno (2-metilbutadieno) (Figura 7) em sua estrutura, assim podem ser: monoterpenos (C_{10}), sesquiterpenos (C_{15}), diterpenos (C_{20}), esteroides e triterpenos (C_{30}) e caratenoides (C_{40}) (VERPOORTE et al., 2000). Os terpenos desenvolvem importantes funções bioquímica nas plantas como na cadeia transportadora de elétrons, componente de membranas, pigmentos fotossintéticos, hormônios, defesa vegetal e atrativos para polinizadores (NCUBE; VAN STADEN, 2015). Esses compostos têm apresentado inúmeras atividades biológicas como anticâncer, antimicrobiana, antiviral, anti-hiperglicêmica, anti-inflamatória, antiparasitária, entre outras, o que tem atraído cada vez mais o interesse biológico (PADUCH et al., 2007). Na Figura 7 está representada a estrutura de alguns terpenos e atividade biológica apresentada.

Figura 7- Estrutura de alguns terpenos e atividade biológica apresentada.



Fonte: adaptado de Paduch e outros (2007).

2.1.1 Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos receberam um tópico especial nesse trabalho por ser a principal classe de ME encontrada nas folhas de *C. bakeriana*. Esses compostos são encontrados em todo reino vegetal com mais de 10 mil estruturas identificadas. Estruturalmente apresentam pelo menos um grupo fenol (hidroxila ligada ao anel aromático). Eles podem ser classificados de diferentes maneiras porque são constituídos de estruturas heterogêneas que variam de moléculas simples a compostos altamente polimerizados (KENNEDY; WIGHTMAN, 2011, GIADA, 2013). As principais classes de compostos fenólicos e a estrutura básica são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1- Principais classes de compostos fenólicos e estrutura básica. (continua)

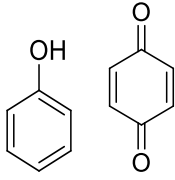
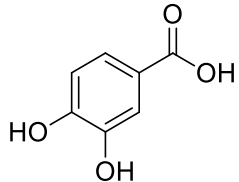
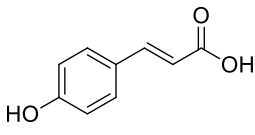
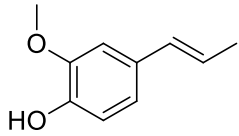
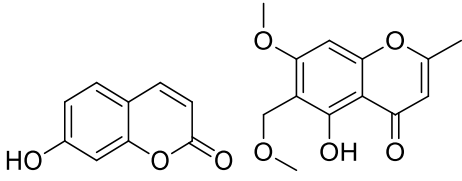
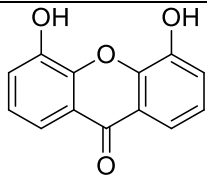
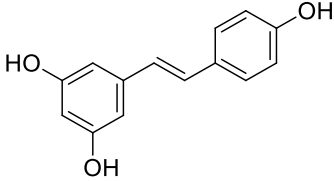
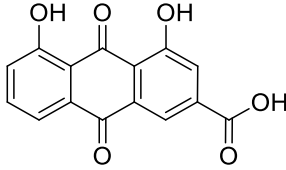
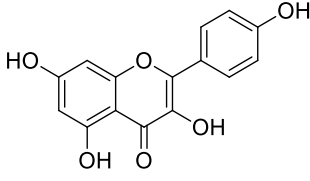
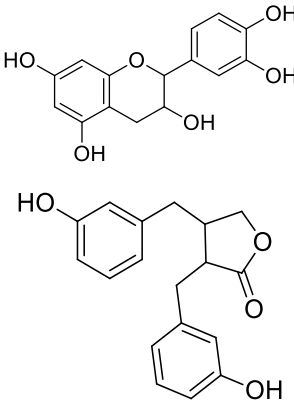
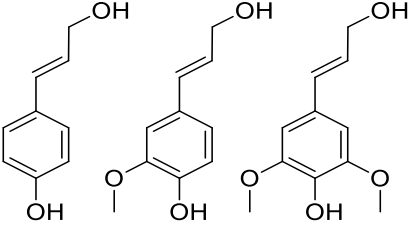
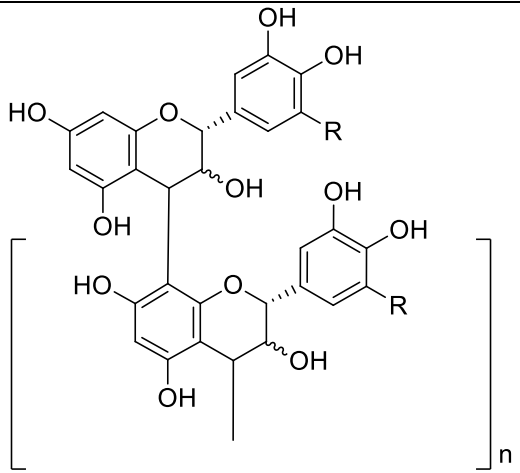
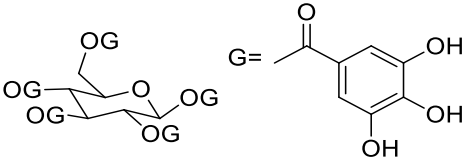
Classe	Esqueleto básico	Estrutura básica
Fenol, Benzoquinona	C ₆	
Ácido fenólico (ácido protocatecuico)	C ₆ -C ₁	
Ácido hidroxicinâmico, (ácido <i>p</i> -cumárico)	C ₆ -C ₃	
Fenilpropeno (isoeugenol)	C ₆ -C ₃	
Cumarina, cromona (7-hidroxicumarina, 6-metoximetilugenina)	C ₆ -C ₃	

Tabela 1- Principais classes de compostos fenólicos e estrutura básica. (*continua*)

Classe	Esqueleto básico	Estrutura básica
Xantonas (1,7-di-hidroxixantona)	$C_6-C_1-C_6$	
Estilbeno (resveratrol)	$C_6-C_2-C_6$	
Antraquinona (reína)	$C_6-C_2-C_6$	
Flavonoides (canferol, catequina)		
Lignanas (enterolactona)	$(C_6-C_3)_2$	
Ligninas (macromoléculas) (álcoois <i>p</i> -cumarílico, coniferílico e sinapílico)	$(C_6-C_3)_n$	

(precursores da formação de ligninas)

Tabela 1- Principais classes de compostos fenólicos e estrutura básica. (*conclusão*)

Classe	Esqueleto básico	Estrutura básica
Taninos condensados	$(C_6-C_3-C_6)_n$	
Taninos hidrolisáveis	(C_6-C_1)	

Fonte: adaptado de Giada (2013).

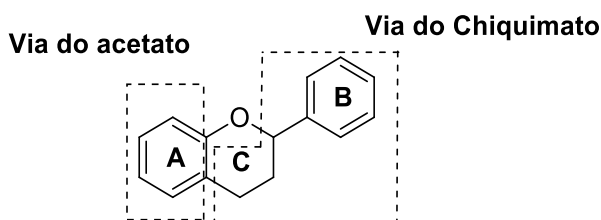
Os compostos fenólicos são cada vez mais reconhecidos por seu impacto no desenvolvimento, reprodução e defesa das plantas. As cumarinas e estilbenos protegem os vegetais contra patógenos bacterianos e fúngicos (CROTEAU; KUTCHAN; LEWIS, 2000). As ligninas são macromoléculas que se depositam nas paredes celulares vegetais conferindo-lhes rigidez. As lignanas e neolignanas são dímeros que exibem propriedades de defesa contra insetos e fungos nos vegetais (SIMÕES et al., 2017). Os taninos também são reconhecidos pela função de inibir herbívoros, pois em altas concentrações os frutos, folhas, sementes e demais partes das plantas tornam-se impalatáveis a uma diversidade de animais (MONTEIRO et al., 2005).

Os flavonoides são responsáveis pela pigmentação de algumas flores, frutos, folhas e sementes. Além disso, atuam nos organismos vegetais atraindo polinizadores e disseminadores de sementes, apresentam funções importantes na fertilidade de algumas espécies, agem como antimicrobianos e protegem as plantas contra a radiação ultravioleta (UV) agindo como filtros protegendo os tecidos contra danos fotossintéticos (HUBER; RODRIGUEZ-AMAYA, 2008, SIMÕES et al., 2017). Vários flavonoides já foram relatados por apresentarem importantes atividades biológicas como antitumoral, anti-inflamatória, antiviral, antioxidante (SANTOS; FARIAS

RODRIGUES, 2017), antibacteriana, antifúngica (CUSHNIE; LAMB, 2005), antidiabética (SARIAN et al., 2017) entre outras, o que torna ainda maior o interesse por esses compostos.

A estrutura dos flavonoides apresenta 15 átomos de carbono em seu núcleo fundamental constituído de duas fenilas ligadas por uma cadeia de três carbonos entre elas e cada unidade é chamada de núcleo A, B e C. O núcleo flavonoídico C e B é derivado da via do chiquimato e o núcleo A é derivado da via do acetato como mostra a Figura 8 (SIMÕES et al., 2017).

Figura 8- Núcleo fundamental dos flavonoides.

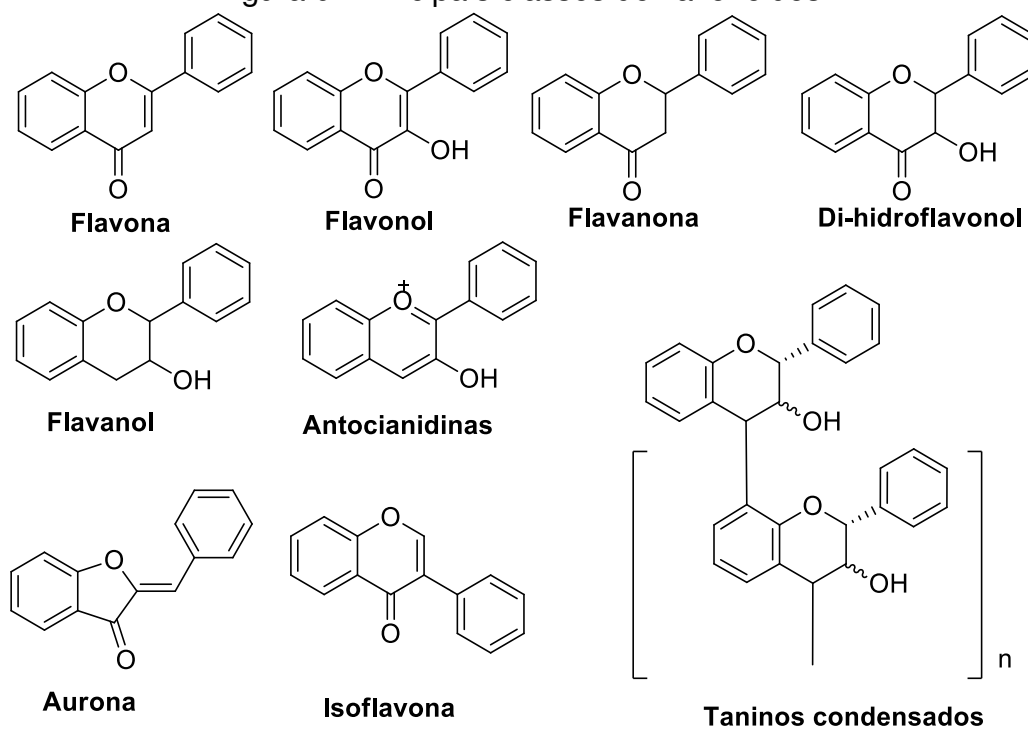


Fonte: a autora

A classificação dos flavonoides é baseada no estado de oxidação dos núcleos A e B e no grau de insaturação do anel C (BALASUNDRAM; SUNDRAM; SAMMAN, 2006, FALCONE FERREYRA; RIUS; CASATI, 2012). Na Figura 9 estão representadas as estruturas básicas das principais classes de flavonoides.

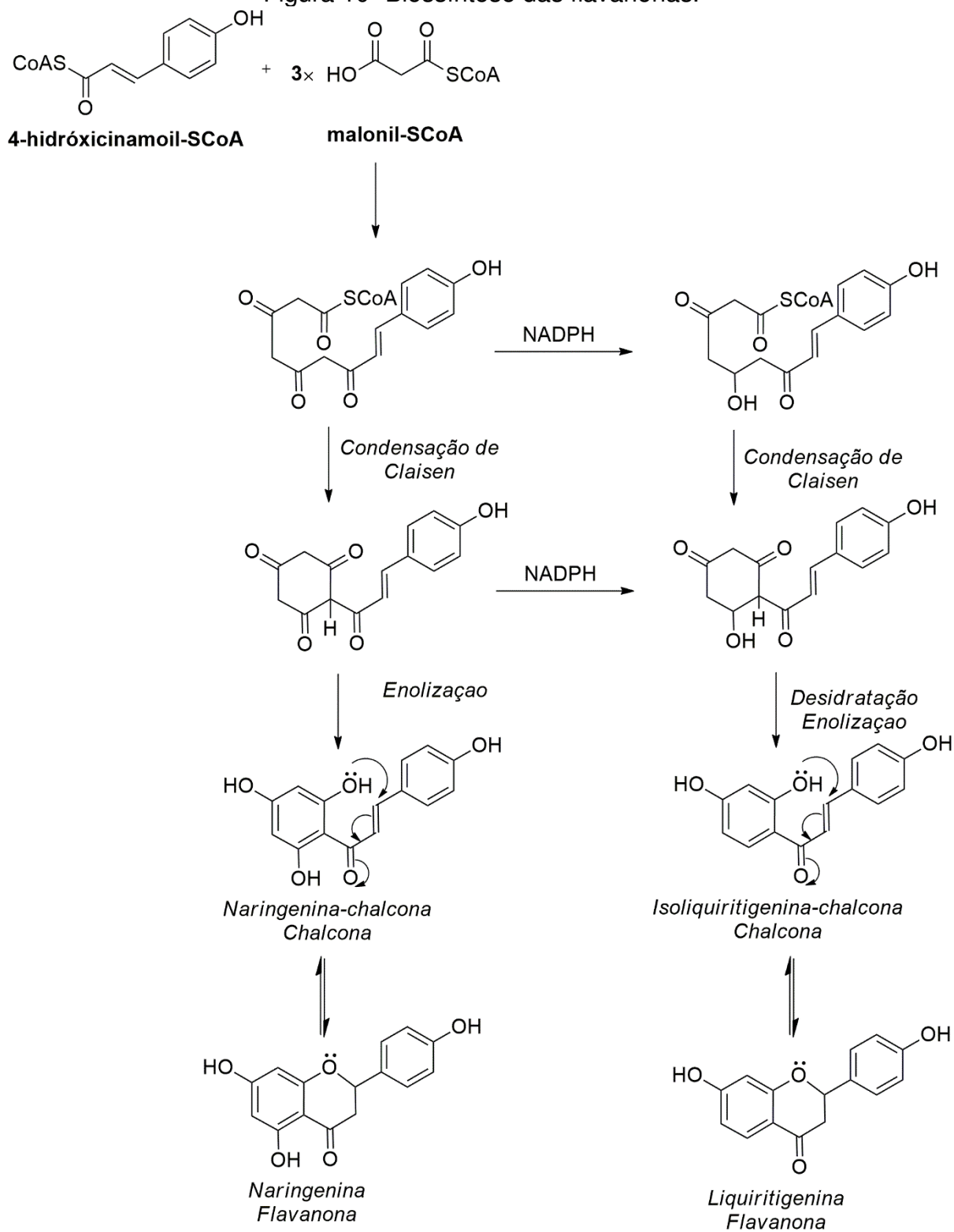
Os flavonoides são metabolitos de origem biossintética mista. Na via do chiquimato é produzido o aminoácido fenilalanina, precursora do ácido cinâmico, o qual é oxidado a 4-hidroxicinamoil-SCoA. Na via do acetato são produzidas as 3 moléculas de malonil-SCoA que reagem com o 4-hidroxicinamoil-SCoA, dando origem a um policetídeo. Esse leva a formação de uma chalcona precursora das flavanonas naringenina e liquiritigenina (Figura 10). A partir dessas flavanonas outros compostos podem ser sintetizados através de reações catalisadas por diferentes enzimas que geram modificações como hidroxilação em qualquer posição dos anéis aromáticos, metilação, glicação e dimerizações resultando as diferentes classes de flavonoides. A Figura 11 mostra alguns flavonoides que são sintetizados a partir da flavanona naringenina.

Figura 9- Principais classes de flavonoides.



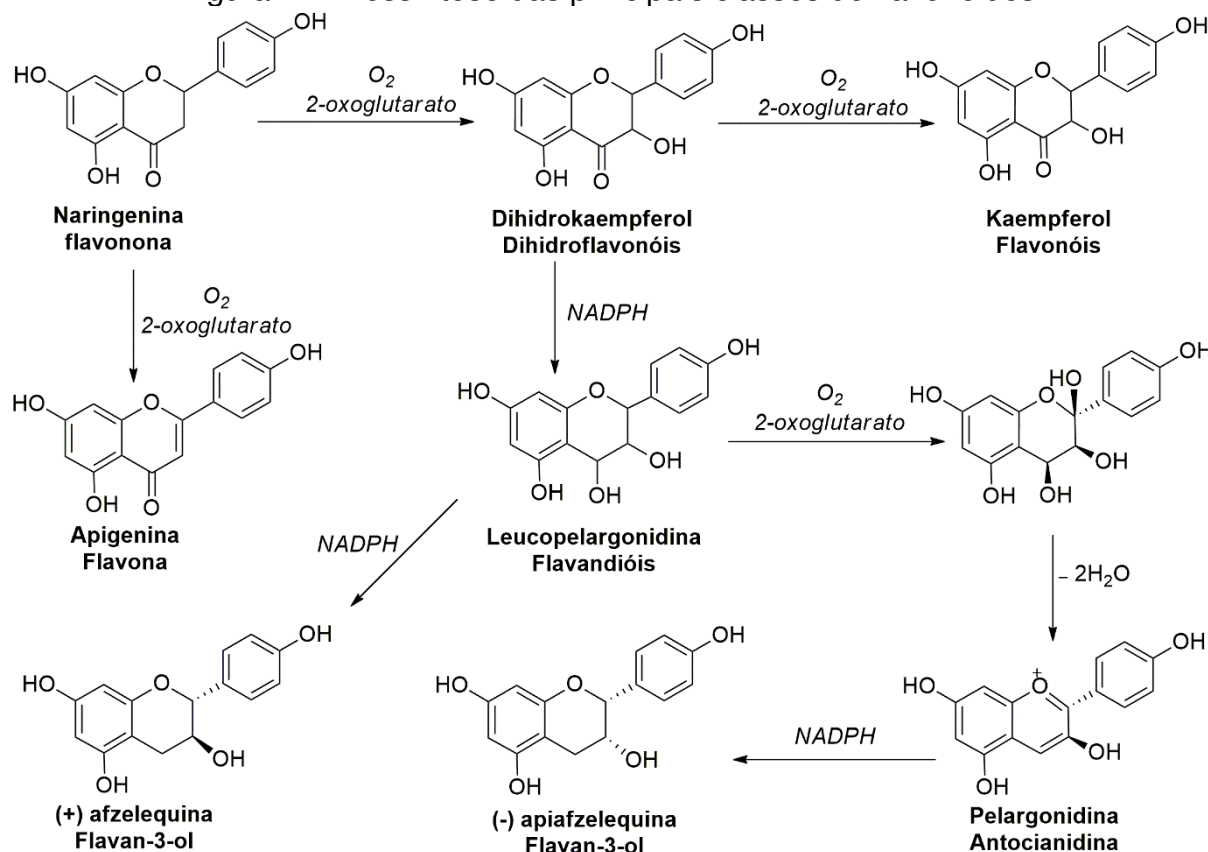
Fonte: adaptado de Falcone e outros (2012).

Figura 10- Biossíntese das flavanonas.



Fonte: adaptado Dewick (2012).

Figura 11- Biossíntese das principais classes de flavonoides.



Fonte: adaptado Dewick (2012).

2.2 ATIVIDADES BIOLÓGICAS

2.2.1 Atividade antifúngica

Os fungos são patógenos que podem causar infecções superficiais que atingem a pele e as unhas dando origem a doenças conhecidas como eczema, pé de atleta, micose, onicomicose, candidíase oral e vaginal. Estas infecções são causadas principalmente por fungos dermatófitos que inclui os gêneros *Trichophyton*, *Microsporum* e *Epidermophyton* e também, podem ser causadas por espécies do gênero *Candida* (BROWN et al., 2012, WHITE et al., 2014).

Os fungos ainda podem causar infecções invasivas que apresentam riscos de saúde maiores, pois causam doenças como fungemia, meningite, pneumonia, condições crônicas graves como aspergilose pulmonar e broncopulmonar alérgica, asma e doença pulmonar obstrutiva (BROWN et al., 2012, PERLIN; RAUTEMAA-RICHARDSON; ALASTRUEY-IZQUIERDO, 2017). As infecções invasivas são

responsáveis pela elevada taxa de mortalidade que excede 50% dos casos. Mais de 90% das mortes relacionadas com fungos pertencem a um dos quatro gêneros: *Cryptococcus*, *Candida*, *Aspergillus* e *Pneumocystis*. Entre estes, o gênero *Candida* representa a segunda maior causa de infecções fúngicas em todo mundo (BROWN et al., 2012). Entre as espécies encontradas em indivíduos saudáveis estão *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. krusei* (SPAMPINATO; LEONARDI, 2013). A *C. albicans* é considerada o patógeno mais comum, geralmente coloniza as regiões da pele, trato respiratório e gastrointestinal, aparelho geniturinário sendo o agente predominante nos casos de infecções fúngicas invasivas (SPAMPINATO; LEONARDI, 2013, YAPAR, 2014). A *C. tropicalis* foi considerada como a segunda em termos de virulência e importância clínica, embora nos últimos anos tenha sido substituída por *C. glabrata*, que também está associada a uma elevada taxa de mortalidade (FIDEL; VAZQUEZ; SOBEL, 1999, ANN CHAI; DENNING; WARN, 2010). A *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. tropicalis* foram às espécies avaliadas nesse trabalho.

Geralmente, as infecções fúngicas invasivas são comuns em pacientes imunocomprometidos com AIDS, em pacientes com câncer passando por quimioterapia ou transplantes de órgão e também podem ser observadas em pacientes saudáveis (PIANALTO; ALSPAUGH, 2016).

O desenvolvimento de fármacos antifúngicos, menos tóxicos e que podem ser usados por diferentes pacientes em várias condições de saúde, tem contribuído para profilaxia e terapia de doenças. Entretanto, o uso preventivo ou de longa duração são alguns fatores que levam o aumento da resistência microbiana aos fármacos. A resistência dos micro-organismos fúngicos é um grande problema, pois reduz as opções de tratamento do paciente (PERLIN; RAUTEMAA-RICHARDSON; ALASTRUEY-IZQUIERDO, 2017), uma vez que existe resistência em diferentes espécies de *Candida* e em todas as classes disponíveis de agentes antifúngicos (MORACE; PERDONI; BORGHI, 2014, PIANALTO; ALSPAUGH, 2016).

Os agentes antifúngicos aprovados são divididos em quatro classes principais, polienos: anfotericina B e nistatina; azóis: fluconazol, itraconazol, voriconazol, posaconazol, isavuconazol; equinocandinas: caspofungina, micafungina, anidulafungina; antimetabólito: 5-fluorocitosina (SPAMPINATO; LEONARDI, 2013, PIANALTO; ALSPAUGH, 2016). Além da resistência antifúngica, esses fármacos estão associados a diversos efeitos colaterais. A anfotericina B (polieno) apresenta nefrotoxicidade devido à ligação fora do alvo das membranas do hospedeiro, muitos

azóis podem promover alterações da condição cardíaca, e a 5-fluorocitosina apresenta toxicidade contra a medula óssea especialmente na presença de insuficiência renal (PIANALTO; ALSPAUGH, 2016). São poucos os agentes antifúngicos disponíveis contra as infecções fúngicas. No período de 2011 a 2014 apenas dois compostos antifúngicos sintéticos foram aprovados, o efinaconazole e o tavaborole. Além disso, as formas atuais de tratamento das infecções fúngicas ainda usam agentes, tais como anfotericina B e griseofulvina que foram lançados em 1958 (NEWMAN; CRAGG, 2016). Desta forma, há a necessidade de estudos que venham contribuir para a descoberta de novos princípios antifúngicos.

Nesse sentido, a atividade antifúngica de produtos naturais tem sido relatada devido à variedade química presente nos vegetais e uso de diferentes espécies na medicina tradicional para tratamentos de infecções causadas por fungos (ZIDA et al., 2016). Diversas espécies do Cerrado foram avaliadas contra *Candida* spp. e apresentaram potencial antifúngico (CORREIA et al., 2016). Compostos fenólicos, flavonoides, cumarinas, quinonas, saponinas, chantonas, alcaloides, polipeptídeos e terpenos isolados de plantas tem mostrado atividade antifúngica contra diferentes espécies de fungos (ARIF et al., 2009).

Uma vez que as infecções causadas por fungos são um problema de saúde mundial, pois afetam 300 milhões de pessoas em todo o mundo (GLOBAL, 2018) e que espécies do gênero *Cassia*, como a *C. fistula*, *C. alata*, *C. tora* apresentaram atividade antifúngica contra diferentes espécies de *Candida* spp. (BHALODIA; SHUKLA, 2011, PAWAR; D'MELLO, 2011, TIMOTHY et al., 2012), torna-se interessante a avaliação da atividade antifúngica da *Cassia bakeriana* em busca de novos antifúngicos potentes e menos tóxicos.

2.2.2 Diabetes e o estresse oxidativo

Os produtos naturais têm sido utilizados no desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento do diabetes. Entre 1981 a 2014 foram lançados 51 fármacos antidiabéticos, sendo que entre eles apenas um é natural, mas 24 são derivados de PN, o que torna importante o estudo de plantas para essa patologia (NEWMAN; CRAGG, 2016).

O diabetes mellitus é um grupo de distúrbios metabólicos caracterizados pelo elevado nível de glicose no sangue (hiperglicemia) e insuficiência na produção ou

ação da insulina produzida pelo pâncreas (MARITIM; SANDERS; WATKINS III, 2003). A prevalência de diabetes está aumentando rapidamente em todo o mundo e de acordo com a International Diabetes Federation (2019a) em 2017 425 milhões de adultos com idades entre 20 e 79 anos foram diagnosticados com a doença. Entre eles, o diabetes tipo 2 representa 90% dos casos e estima-se que em 2045 haverá 629 milhões de pessoas com diabetes no mundo. Os altos níveis de glicose no sangue estão associados a complicações macro e microvascular que leva ao aparecimento de doenças como cardíacas, derrames, cegueira e renais (ASMAT; ABAD; ISMAIL, 2016).

Basicamente, o diabetes é classificado como tipo 1 (dependente de insulina) — causada pela falta de secreção de insulina pelas células β -pancreáticas — e tipo 2 (não dependente de insulina) — causada pela diminuição da sensibilidade dos tecidos a insulina, que também é denominada resistência à insulina. O diabetes tipo 2 é causado por fatores ambientais como obesidade, falta de exercícios físicos, estresse e envelhecimento (OZOUGWU, 2013).

A insulina é uma proteína (hormônio) sintetizada por células beta do pâncreas em resposta a estímulos, principalmente da glicose (ASMAT; ABAD; ISMAIL, 2016). Sempre que é realizada uma refeição há aumento de glicose no sangue que estimula a secreção de insulina resultando no aumento do transporte da glicose, metabolismo e armazenamento pelos músculos e tecidos gordurosos (KANGRALKAR; PATIL; BANDIVADEKAR, 2010). A insulina promove a captação de glicose, reduzindo o nível dela no sangue. Essa captação, é mediada pelo transportador de glicose (GLUT4), uma proteína que permite que a glicose presente no sangue se mova para dentro da célula através da membrana plasmática (SATO, 2014). A resistência à insulina resulta na redução da absorção da glicose pelos tecidos causando a hipoglicemia intracelular e hiperglicemia extracelular. A hipoglicemia intracelular resulta na neoglicogênese que leva a degradação de gorduras ocasionando a cetoacidose diabética. A hiperglicemia extracelular causa coma hiperglicêmico e diurese osmótica que é acompanhada pela perda de água e eletrólitos (OZOUGWU, 2013).

A progressão do diabetes tem sido associada ao estresse oxidativo (EO) que é mediado pela geração de radicais livres induzidos pela hiperglicemia o que contribui para o aumento de complicações da doença. O estresse oxidativo é definido como o excesso de formação de radicais livres ou a remoção insuficiente dessas espécies. Em níveis hiperglicêmicos a formação de espécies radicalares é favorecida. A

autooxidação da glicose gera os radicais hidroxil (OH^{\bullet}), o aumento do metabolismo da glicose resulta na produção dos radicais superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) (JOHANSEN et al., 2005).

Os radicais livres são átomos ou moléculas reativas de curta duração que possuem elétrons desemparelhados na camada de valência. Os radicais livres juntamente com intermediários neutros como H_2O_2 e espécies carregadas como (ONOO^-) são denominadas espécies reativas (ER). As ER são divididas em espécies reativas de oxigênio (ERO) e espécies reativas de nitrogênio (ERN). São exemplos de ER: radical hidroxil (OH^{\bullet}), radicais superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), óxido nítrico (NO^{\bullet}), óxido nitroso (N_2O_3), peroxinitrito (ONOO^-) (BANSAL; BILASPURI, 2011).

As ERO e ERN são produzidas no organismo naturalmente ou por alguma disfunção biológica. Elas podem ser produzidas nas células através de reações enzimáticas e não enzimáticas. Os processos enzimáticos são aqueles envolvidos na cadeia respiratória, a fagocitose, a síntese de prostaglandinas e o sistema do citocromo P450. Por exemplo, o radical superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) é gerado através de vários sistemas celulares de oxidase, como NADPH oxidase, xantina oxidase e peroxidase. Nesse processo ocorre a redução de elétrons do oxigênio (O_2) e oxidação dos substratos (PHAM-HUY; HE; PHAM-HUY, 2008). Na presença de enzimas, como SOD (superóxido dismutase), o H_2O_2 é produzido pela dismutação do ânion ($\text{O}_2^{\bullet-}$). O radical OH^{\bullet} é formado pela reação do $\text{O}_2^{\bullet-}$ com H_2O_2 na presença de Fe^{2+} ou Cu^+ (catalisador), reação que é conhecida como a reação de Fenton (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).

As ER também são produzidas a partir de reações não enzimáticas de oxigênio com compostos orgânicos e reações iniciadas com radiação ionizante. Esse processo pode ocorrer durante a respiração aeróbica nas mitocôndrias. ER podem ser geradas por fatores externos os quais estamos expostos diariamente como a radiação, poluição do ar e da água, produtos químicos, fumaça de cigarros, metais pesados, carne defumada, óleo de cozinha usado e efluentes industriais. Após a penetração no corpo por diferentes vias, estes compostos são decompostos ou metabolizados em radicais livres (PHAM-HUY; HE; PHAM-HUY, 2008).

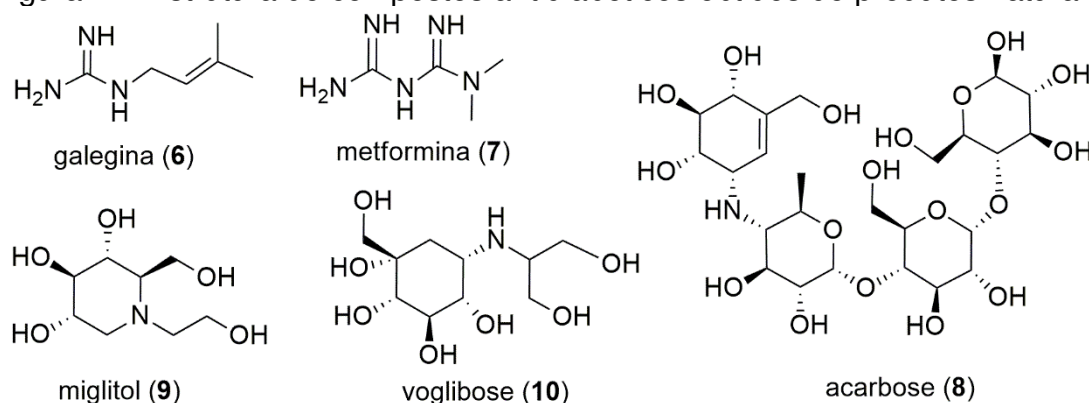
O estresse oxidativo faz com que as células saudáveis do corpo sejam atacadas levando a oxidação do DNA, proteínas e outras macromoléculas. Esse ataque induz uma variedade de doenças crônicas e degenerativa e o processo de envelhecimento. A patogênese de mais de 50 doenças foi associada aos radicais livres, entre elas o

câncer, doenças cardiovasculares, neurológicas, pulmonares, renais, oculares, diabetes, artrite reumatoide, Alzheimer's, Parkinson's, entre outras (PHAM-HUY; HE; PHAM-HUY, 2008, ASMAT; ABAD; ISMAIL, 2016).

Na defesa contra o EO, o organismo conta com os antioxidantes endógenos e exógenos. As enzimas superóxido dismutase, catalase, peroxidase, ascorbato peroxidase e glutathione redutase são os principais antioxidantes endógenos (YANG et al., 2011). Os antioxidantes exógenos são ingeridos através da alimentação e podem ser sintéticos ou naturais. Os sintéticos são amplamente utilizados na indústria alimentícia, farmacêutica e cosmética. Entre os mais utilizados estão o hidroxianisol butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT), galato de propila (PG) e a *terc*-butilididroquinona (TBHQ). Entretanto, estudos tem relatado a possibilidade desses antioxidantes apresentarem efeitos carcinogênicos e tóxicos para o fígado e pâncreas (RAMALHO; JORGE, 2006, YEHYE et al., 2015, TOZETTO et al., 2017). Os antioxidantes naturais incluem vitamina C e E, terpenoides, caratenoides, compostos fenólicos como ácidos fenólicos, flavonoides, cumarinas, lignanas e taninos (AUGUSTYNIAK et al., 2010). Os compostos fenólicos, como flavonoides são amplamente conhecidos principalmente pela capacidade de reduzir a formação e eliminar radicais livres (PIETTA, 2000, PROCHÁZKOVÁ; BOUŠOVÁ; WILHELMOVÁ, 2011). Além disso, estudos tem demonstrado boa relação de compostos fenólicos como agentes antidiabéticos o que torna ainda maior o interesse por esses compostos (LIN et al., 2016).

Ao longo da história, diferentes medicamentos foram utilizados para tratar o diabetes tipo 2, incluindo a insulina, antes do conhecimento sobre o seu mecanismo de ação. Muitos desses medicamentos foram obtidos a partir de plantas ou de micro-organismos. O picnogenol é um extrato aquoso obtido do *Pinus pinasterque* (Pinaceae), rico em polifenóis e apresenta atividade antidiabética. A galegina (6) isolada da *Galega officinalis* L. (Fabaceae) apresenta estrutura semelhante ao antidiabético metformina (7). A acarbose (8), o miglitol (9) e o voglibose (10), são obtidos de micro-organismos. A Figura 12 mostra a estrutura desses compostos (RIOS; FRANCINI; SCHINELLA, 2015).

Figura 12- Estrutura de compostos antidiabéticos obtidos de produtos naturais.



Fonte: a autora.

Dessa forma, torna-se importante o estudo de plantas em busca de compostos que possam auxiliar no controle e tratamento do diabetes mellitus bem como o estresse oxidativo.

2.2.3 Enzimas α -amilase e α -glicosidase

Uma das terapias para o tratamento do diabetes mellitus tipo 2 é através do controle da hiperglicemia pós-prandial. A inibição da absorção da glicose no intestino ou a eliminação nos tecidos é um efeito benéfico para controlar o nível de glicose no sangue pós-prandial (SUBRAMANIAN; ASMAWI; SADIKUN, 2008, THILAGAM et al., 2012). A principal fonte de glicose no sangue é de carboidratos ingeridos na dieta, como o amido, que são hidrolisados pelas enzimas α -glicosidase e α -amilase, de modo a serem absorvidos pelo intestino. Dessa forma, uma opção de tratamento para diabetes mellitus tipo 2 é inibir a atividade dessas enzimas (THILAGAM et al., 2012).

A α -amilase é uma enzima pancreática também encontrada na saliva que catalisa a hidrólise da ligação α -(1,4)-glicosídica no polímero de amido em polímeros de baixo peso molecular como unidades de glicose, maltose e maltotriose (SOUZA; OLIVEIRA, 2010, BOEHLKE; ZIERAU; HANNIG, 2015). A α -glicosidase está presente na mucosa do intestino delgado e também cliva a ligação glicosídica de oligossacarídeos produzindo unidades monossacarídeos de glicose (MELO; CARVALHO, 2006, THAKARE et al., 2017).

A acarbose (8) foi o primeiro inibidor da α -glicosidase a ser comercializado. Esse fármaco foi introduzido no início dos anos 90, sendo um produto natural obtido a partir

da fermentação da bactéria *Actinoplanes* sp. Outros novos agentes foram introduzidos em alguns países como o miglitol (9) e o voglibose (10) (Figura 12 p. 41). Entretanto, esses inibidores podem causar efeitos adversos, como hipoglicemia, problemas hepáticos, acidose láctica e diarreia (KRENTZ; BAILEY, 2005, TUNDIS; LOIZZO; MENICHINI, 2010).

Muitos medicamentos fitoterápicos têm sido recomendados para o tratamento da diabetes atuando como inibidores enzimáticos. As plantas são utilizadas devido sua eficácia, pois podem apresentar menos efeitos colaterais e menor custo (TUNDIS; LOIZZO; MENICHINI, 2010). A atividade inibitória da α -glicosidase foi relatada por diferentes metabolitos especiais, como flavonoides, ácidos fenólicos, taninos, antocianinas, triterpenos, saponinas, fitosteróis e polissacarídeos (DI STEFANO; OLIVIERO; UDENIGWE, 2018).

O extrato de algumas espécies do Cerrado, por exemplo, *Eugenia dysenterica*, *Stryphnodendron adstringens*, *Pouteria caimito*, *Pouteria ramiflora*, e *Pouteria torta* apresentaram elevada inibição das enzimas α -amilase e α -glicosidase (SOUZA et al., 2012). As cascas do fruto de *Annona crassiflora* e as folhas *Annona muricata*, que também são espécies do Cerrado apresentaram resultados promissores na inibição das enzimas α -amilase e α -glicosidase. Foram identificadas em ambas as espécies flavonoides, proantocianidinas, flavonoides glicosilados e ácidos fenólicos, que já tiveram atividades comprovadas (JUSTINO et al., 2016, GOUVEIA et al., 2017, JUSTINO et al., 2018).

Diversas espécies de *Cassia* são amplamente utilizadas na medicina tradicional para o tratamento de diabetes e estudos tem comprovado suas atividades. O extrato da casca do caule de *Cassia abbreviata* inibiu a atividade α -glicosidase (SHAI et al., 2010). O extrato etanólico das sementes de *Cassia angustifolia* e *Cassia auriculata* inibiram a α -amilase e α -glicosidase (NANUMALA; TULASI; SUJITHA, 2005).

2.2.4 Lipases

Outra patologia visitada neste trabalho é a obesidade, que tem prevalecido em países em desenvolvimento devido à industrialização, ingestão de *fast food* e diminuição da atividade física. Segundo a Organização Mundial de Saúde (2019b) em 2016, 1,9 bilhões de adultos com 18 anos ou mais, apresentavam excesso de peso. Destes, mais de 650 milhões eram obesos.

A obesidade é uma doença multifatorial resultante do acúmulo de gordura nos tecidos adiposos devido a uma dieta de ingestão de muitas calorias (JAWED et al., 2018). Estudos mostram que ela está diretamente relacionada com o diabetes mellitus devido à resistência à insulina, que é a perda da sensibilidade à insulina nos tecidos alvos causada pela obesidade. Em indivíduos obesos a quantidade de ácidos graxos não esterificados secretados pelo tecido adiposo leva à hipótese da resistência à insulina e disfunção de células β -pancreáticas (AL-GOBLAN; AL-ALFI; KHAN, 2014, SATOH, 2014). Além do diabetes, outras complicações da doença são relatadas como: problemas cardiovasculares, insuficiência cardíaca, hipertensão, embolia pulmonar, desequilíbrio hipotireoidismo, artrite, entre outras (LUNAGARIYA et al., 2014).

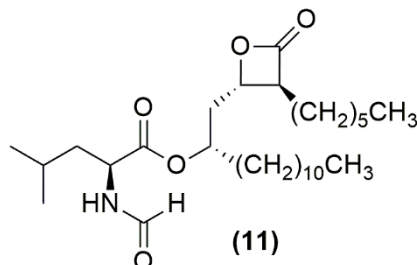
Animais e plantas armazenam triglicerídeos (gordura) como reservatório de energia que podem ser utilizados em momentos de crise energética celular. As lipases são enzimas que hidrolisam ésteres de triglicerídeos para serem absorvidos pelo intestino. Outros tecidos como pulmões, rins, músculos, tecido adiposo e placenta também secretam enzimas lipases (LUNAGARIYA et al., 2014)

A digestão de gorduras no estômago forma uma grande molécula de gordura que sofre emulsificação com sais biliares, para formar pequenas partículas de gordura. Na emulsão, triglicerídeos e diglicerídeos da dieta estão no centro da partícula, seguido por uma mistura de lipídios polares, fosfolipídios, colesterol e ácidos graxos livres que posteriormente estão revestidos com oligossacarídeos, proteínas desnaturadas e sais biliares formando uma estrutura bastante complexa. A lipase pancreática interage com as partículas de emulsão mudando continuamente as suas propriedades físicas. À medida que os produtos se formam durante o processo de hidrólise, deixam a superfície. O processo completo de hidrólise forma micelas que podem ser absorvidos por células do intestino (LUNAGARIYA et al., 2014). Dessa forma, a inibição da lipase pancreática reduz a quantidade de gorduras absorvidas pelo intestino (JAWED et al., 2018).

Entre os fármacos utilizados para o tratamento da obesidade, o orlistat (11) (Figura 13) é um inibidor da lipase pancreática derivado da bactéria *Streptomyces toxytricini*. Um dos seus mecanismos de ação é através da excreção de gordura nas fezes que ocorre após o orlistat se ligar covalentemente no sítio ativo da enzima inativando sua função (AL-SUWAILEM et al., 2006, LUNAGARIYA et al., 2014). Entretanto, o orlistat apresenta efeitos colaterais indesejáveis como fezes líquidas,

urgência fecal, flatulência, cólicas abdominais e deficiências vitamínicas lipossolúveis (KAILA; RAMAN, 2008).

Figura 13- Estrutura do orlistat.



Fonte: a autora.

O sucesso de um composto natural para o tratamento da obesidade influenciou o interesse pela pesquisa de novos inibidores da lipase pancreática que não tenham tantos efeitos colaterais. Muitos extratos de plantas e compostos isolados foram identificados como inibidores da lipase pancreática. A revisão de Lunagariya e outros (2014) mostra vários compostos de diferentes classes de metabolitos especiais como alcaloides, carotenoides, polissacarídeos, polifenóis, saponinas e terpenos isolados de plantas e micro-organismos que apresentaram atividade de inibição da lipase enzimática.

Algumas espécies de *Cassia* apresentaram ser uma fonte de compostos com atividade anti-hiperlipêmica. O extrato das partes aéreas *Cassia auriculata* apresentou potente inibição da lipase enzimática (HABTEMARIAM, 2013). Extrato das flores de *Cassia auriculata*, das folhas de *Cassia siamea* e dos frutos de *Cassia fistula*, também apresentaram atividade anti-hiperlipêmica utilizando modelos de indução hiperglicêmica em ratos (KUMAR; KUMAR; PRAKASH, 2010, VIJAYARAJ et al., 2013, ABID; MAHMOOD; SANTOSH KUMAR, 2016).

2.2.5 Produtos de glicação avançada

Como já mencionado neste trabalho, o diabetes é um distúrbio que a todo o momento coloca a vida dos pacientes em riscos de complicações, sejam elas macrovasculares, que estão relacionadas a doenças coronariana, cardíaca, vasculares periféricas e acidente vascular cerebral ou microvascular, como neuropatia, retinopatia e nefropatia.

Uma das teorias mais importante usadas para explicar como a hiperglicemia crônica acarreta danos celulares aos tecidos levando as complicações da doença é a formação de produtos de glicação avançada AGEs (do inglês, Advanced Glycated End-Products) (BARBOSA; OLIVEIRA; SEARA, 2008).

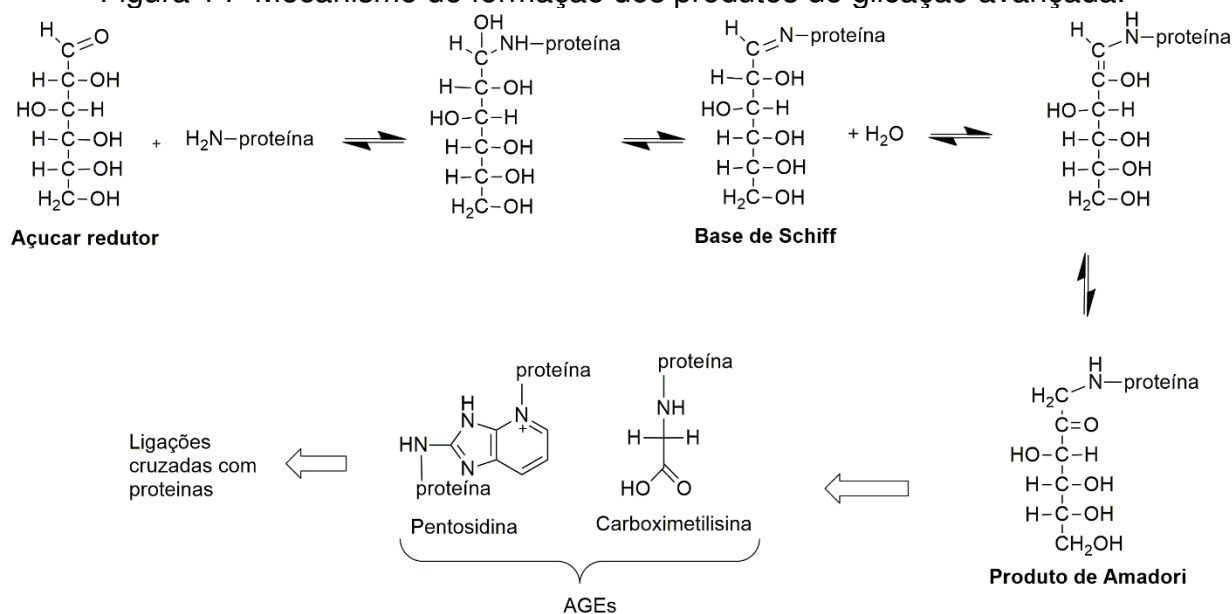
Os AGEs são capazes de modificar as propriedades químicas e funcionais de diferentes estruturas biológicas causando efeitos patológicos. Eles atuam na geração de radicais livres promovendo o estresse oxidativo, na formação de ligações cruzadas com proteínas ou interagindo com receptores celulares, o que contribui para progressão de complicações diabéticas (BARBOSA; OLIVEIRA; SEARA, 2008).

Os AGEs são formados a partir de reações não enzimática de açúcares, como a glicose, com grupos amina presente nas proteínas do DNA, lipídios ou ácidos nucléicos. Essa reação é conhecida como reação de Maillard (Figura 14) e dá origem a uma base instável e reversível, denominada base de Schiff (imina). Essa base pode se reorganizar formando a enamina mais estável que sofre rearranjos formando uma cetoamina, chamada produto de Amadori. O produto de Amadori e a base Schiff, sofrem oxidações subsequentes, reações com metais, lipídios e moléculas de açúcar adicionais produzindo AGEs que pode criar ligações cruzadas com proteínas modificadas. Dois dos AGEs mais comuns são pentosidina e a carboximetilisina (Figura 14) (NIEDOWICZ; DALEKE, 2005, GKOGKOLOU; BÖHM, 2012, KHANGHOLI et al., 2015).

A glicação não enzimática de proteínas em condições elevadas de glicose é acompanhada pela produção de ER como o $O_2^{\cdot-}$. Em condições hiperglicêmicas, as concentrações intracelulares de glicose e seus metabólitos são elevados levando a glicação avançada de proteínas, formando AGEs (KASHIWAGI, 2001).

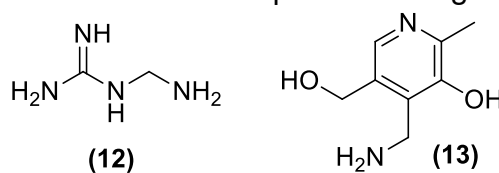
Devido a importância dos AGEs nas complicações do diabetes, inibidores como a aminoguanidina (**12**) e a piridoxamina (**13**) (Figura 15), trabalham para reter intermediários da glicação impedindo a formação de ligações cruzadas (NIEDOWICZ; DALEKE, 2005).

Figura 14- Mecanismo de formação dos produtos de glicação avançada.



Fonte: adaptado Gkogkolou e Böhm (2012) e Khangholi e outros (2015).

Figura 15- Estrutura dos inibidores dos produtos de glicação avançada.



Fonte: a autora.

Apesar dos inibidores utilizados no mercado apresentarem elevada inibição na formação de AGEs, eles podem gerar graves efeitos colaterais, e em contrapartida, muitas plantas têm apresentado atividade anti-AGEs (SHARMA et al., 2015). A revisão Kuerban e outros (2017) mostrou que os extratos de *Punica granatum*, *Camellia sinensis*, *Canarium álbum* e *Annona crassiflora*, foram avaliadas quanto a capacidade de inibição dos AGEs e apresentaram atividade promissora. Além disso, diferentes classes de metabólitos foram associadas à atividade, como os compostos fenólicos, flavonoides, polissacarídeos, carotenoides e ácidos graxos (GKOGKOLOU; BÖHM, 2012, KUERBAN et al., 2017). Esses compostos são reconhecidos por apresentarem atividade antioxidante. Como radicais livres estão envolvidos na formação de AGEs, é de se esperar que esses compostos possam inibir também a formação de AGEs (SHARMA et al., 2015).

O extrato das sementes de *Cassia tora* apresentou atividade inibitória da formação de AGEs (JUNG et al., 2010, KIM et al., 2014). O extrato das flores de *Cassia auriculata* também apresentou potencial de inibição da glicação sendo a atividade atribuída a compostos fenólicos (PERERA; EKANAYAKE; RANAWEERA, 2015). Assim, atividades inibitórias enzimática e dos AGEs apresentada por diferentes espécies do Cerrado e por várias espécies do gênero *Cassia* justificam a avaliação do potencial antioxidante e antidiabético de *Cassia bakeriana*.

2.3 FAMÍLIA LEGUMINOSAE

A espécie estudada neste trabalho pertence à família Leguminosae, sendo a terceira maior família das angiospermas com 751 gêneros e 19.500 espécies (LEWIS et al., 2005 apud TLPWG, 2013). No Brasil existem cerca de 2.726 espécies, sendo 1.507 endêmicas que ocorrem em todas regiões abrangendo todos os biomas (ZAPPI et al., 2015).

Diversas espécies de Leguminosae são cultivadas desde a antiguidade com diversas finalidades, como as lentilhas, ervilhas e feijão que são utilizados na alimentação de humanos, a alfafa, trevos e ervilhacas utilizados na alimentação de animais, soja e amendoim que são plantas oleaginosas e o índigo e pau-brasil utilizados como tintóreas (MIOTTO; LUDTKE; ABRUZZI, 2008).

A família Leguminosae está distribuída em três subfamílias: Caesalpinioideae, Mimosoideae e Papilionoideae. A Caesalpinioideae inclui os gêneros *Cassia* e *Senna* que foram geneticamente divididos, mas apresentam uma classificação genética e química complexa que resultou na identificação de várias espécies de *Senna* anteriormente descritas como *Cassia* e algumas espécies que permaneceram como *Cassia* são chamadas de *Senna* como sinônimo (SELEGATO et al., 2017). As Caesalpinioideae ocorrem em regiões tropicais e subtropicais da América do Sul, África e Sudeste da Ásia sendo algumas árvores de grande porte como cipós e outras na forma de arbustos (LEWIS et al., 2005 apud TLPWG, 2013).

2.4 ASPECTOS QUÍMICOS E BIOLÓGICOS DO GÊNERO *Cassia*

O gênero *Cassia* compreende cerca de 600 espécies que inclui arbustos, árvores e ervas distribuídas em regiões tropicais e subtropicais de todo o mundo (AGARKAR;

JADGE, 1999). Diversas espécies de *Cassia* são utilizadas no Brasil como plantas ornamentais devido à beleza de suas flores, além disso, muitas são usadas na medicina popular para o tratamento de várias doenças, que também já foram relatadas e reconhecidas no sistema tradicional de saúde da Índia (Ayurvedic). Na Tabela 2 estão descritas algumas espécies de *Cassia* e seus respectivos usos medicinais (VIEGAS JUNIOR et al., 2006, SUNDARAMOORTHY et al., 2016).

Tabela 2- Espécies de *Cassia* e seu o uso na medicina popular (continua).

Espécie de <i>Cassia</i>	Uso na medicina popular (Referência)
<i>C. occidentalis</i>	Anemia, doenças no fígado, coceiras, micose, malária, dores de barriga, gripes, febres, infecções gerais, distúrbios hepáticos e do estômago, diurético, tuberculose (DI STASI; HIRUMA-LIMA, 2002)
<i>C. reticulata</i>	Problemas de pele e menstruais, antitérmico, diurético, picada de cobra (DI STASI; HIRUMA-LIMA, 2002)
<i>C. abbreviata</i>	Dor de cabeça, dor de dente, doenças gastrointestinais, vermífugo, doenças venéreas, pneumonia, complicações no útero, malária, laxante (SCHMELZER; GURIB-FAKIM, 2008)
<i>C. tora</i>	Doenças de pele, caspa, constipação, tosse hepatite, febre, hemorroidas (BHALERAO et al., 2013)
<i>C. absus</i>	Tumores, asma, constipações (DAVE; LEDWANI, 2012)
<i>C. fistula</i>	laxante, malária, intoxicação sanguínea, diarreia, lepra, tuberculose, reumatismo, doenças de pele, pedra no rim, vermífugo, úlcera (SCHMELZER; GURIB-FAKIM, 2008, NAGPAL et al., 2011)
<i>C. sieberiana</i>	Úlcera, diarreia, gonorreia, hemorroidas, lepra, disenteria (SCHMELZER; GURIB-FAKIM, 2008)
<i>C. alata</i>	Laxante, febrífuga, micose, herpes, doenças do fígado, problemas gastrointestinais (GRANDI, 2014)
<i>C. sophera</i>	artrite, asma, câncer, diabetes, antidiurético (MONDAL et al., 2013) (MONDAL; RAJALINGAM; MAITY, 2013.)

Através do conhecimento etnofarmacológico de espécies de *Cassia*, diversos estudos biológicos têm sido realizados e o seu potencial comprovado além de possibilitar a identificação dos compostos químicos. Por exemplo, a *C. auriculata* apresentou atividade anti-hiperglicêmica e hipolipidêmica, anticâncer e antiúlsera (GUPTA et al., 2009, PRASANNA et al., 2009, AHMED et al., 2010). A *C. fistula* apresentou atividade antiúlcerosa e larvicida (KARTHIKEYAN; GOBIANAND, 2010, GOVINDARAJAN; SIVAKUMAR; RAJESWARI, 2011). A *C. uniflora* apresentou atividades anti-inflamatória, analgésica e antiúlsera (CHAUDHARI; CHAUDHARI; CHAVAN, 2012). A *C. spectabilis* mostrou-se efetiva contra filmes de *Candida albicans* (TOREY et al., 2016), a *C. siamea* apresentou atividade antidiabética e antilipêmica (KUMAR; KUMAR; PRAKASH, 2010), a *C. alata* apresentou atividade antimicrobiana e atividade antialérgica (KHAN; KIHARA; OMOLOSO, 2001, SINGH et al., 2012), e as *C. alata*, *C. angustifolia* e *C. occidentalis* apresentaram atividade anti-helmíntico (KUNDU; ROY; LYNDEM, 2014).

Em alguns estudos, a atividade exibida pelo extrato das folhas de espécies de *Cassia*, foi atribuída à presença de compostos identificados por técnicas como espectrometria de massas ou análise por CLAE com padrões conhecidos. Em outros estudos a atividade apresentada foi atribuída apenas a classe de metabólitos especiais determinada através de prospecção fitoquímica. Por exemplo, a *C. tora* apresentou atividade antioxidante, anticâncer e antimicrobiana, sendo o extrato rico em polifenóis e ácidos graxos: palmítico, linolênico, margárico e melíssico que foram identificados em maiores quantidades (REJIYA; CIBIN; ABRAHAM, 2009, SHUKLA et al., 2018). A presença das antraquinonas: crisofenol e emodin, os flavonoides: canferol e isoquercetina e o fitosterol: estigmasterol estão associados à prevenção de catarata (SREELAKSHMI; ABRAHAM, 2016). A *C. tora* ainda mostrou-se uma fonte rica de compostos fenólicos com atividade antioxidante e que pode ser usada na prevenção da doença de Alzheimer (CHETHANA et al., 2017). A *C. grandis* inibiu a replicação do vírus da dengue e o *screening* fitoquímico revelou a presença de taninos, polifenóis, triterpenos, esteroides glicosídeos, flavonoides e quinonas (HERNÁNDEZ-CASTRO; DIAZ-CASTILLO; MARTÍNEZ-GUTIERREZ, 2015). A *C. glauca* apresentou atividade antioxidante, antidiabético e hipolipidêmica, sendo identificado e quantificado a presença da rutina, luteolina-7-O-glicosídeo e isoroifolina (VEERAPUR et al., 2017). Da *C. auriculata* que apresentou atividade antiartrítica, foi

identificado em maior quantidade à presença da quercetina e ácido gálico (BANDAWANE et al., 2014).

Antraquinonas glicosiladas foram identificadas e quantificadas em *C. fístula* que apresentou ser uma fonte de compostos com propriedades laxantes (SAKULPANICH; GRITSANAPAN, 2009). A mesma espécie demonstrou atividade antibacteriana e antifúngica e o *screening* fitoquímico revelou a presença de flavonoides, antraquinonas, triterpenos esteroides, cumarinas, saponinas, taninos e alcaloides (BHALODIA; SHUKLA, 2011).

A *C. occidentalis* mostrou-se uma alternativa para o tratamento de asma alérgica, e atividade foi atribuída à presença de antraquinonas (XU et al., 2018). A espécie também demonstrou atividade antioxidante, diurético e não tóxico, sendo identificada a presença de ácidos graxos, antraquinonas, glicosídeos, antracenos, saponinas, taninos, cumarinas, flavonoides, triterpenos, alcaloides (SILVA et al., 2011, NTCHAPDA et al., 2015). A Tabela 3 apresenta alguns compostos isolados dos extratos das folhas de espécies de *Cassia* e a atividade biológica, nas Figuras 16 e 17 estão representadas as estruturas desses compostos.

Os estudos mostraram o enorme potencial biológico apresentado pelas folhas de diferentes espécies de *Cassia*. Esse potencial é devido à presença dos vários compostos bioativos identificados nessas espécies que comprovam sua utilização para várias doenças na medicina popular. A partir dessa breve revisão, foi possível observar que as folhas das espécies são fontes de diferentes classes de metabolitos especiais, principalmente flavonoides e antraquinonas. Dessa forma, torna-se importante o estudo das folhas de *Cassia bakeriana* para o conhecimento da sua composição química e avaliação do seu potencial biológico.

Tabela 3- Compostos isolados das folhas de espécies de *Cassia* e suas respectivas atividades biológicas. (*continua*)

Espécie de <i>Cassia</i>	Compostos isolados	Número do composto	Atividade biológica	Referência
<i>C. alata</i>	canferol 3- <i>O</i> -gentiobioside	(14)	–	(MORIYAMA et al., 2003)
	canferol	(15)	antialérgico	(SINGH et al., 2012)
	reína	(16)	antialérgico	
<i>C. angustifolia</i>	reína	(16)	–	(MEHTA; LADDHA, 2009)
	emodina-8- <i>O</i> -soforosídeo	(17)	–	(KINJO et al., 1994)
	aloe-emodina-8- <i>O</i> -glicosídeo	(18)	–	
	toracrisona-8- <i>O</i> -glicosídeo	(19)	–	
	aloe-emodina-8,8'-di- <i>O</i> -glicosídeo	(20)	–	
	canferol 3- <i>O</i> -gentiobiosídeo	(14)	–	
	quercetina-3- <i>O</i> -gentiobiosídeo	(21)	–	
	isoraminetina-3- <i>O</i> -gentiobiosídeo	(22)	–	
	siringaresinol-3- <i>O</i> -glicosídeo	(23)	–	
<i>C. auriculata</i>	4-(4-clorobenzil)-2,3,4,5,6,7-(hexa-hidro-7-(2-etoxifenil)-benzo[h][1,4,7] triazecin-8 (1H)-ona	(24)	efeito antiproliferativo contra células de	(ESAKKIRAJAN et al., 2014a)
	4-(2,5 diclorobenzil)-2,3,4,5,6,7 hexa-hidro-7-(4-metoxifenil)benzo[h][1,4,7] triazecin-8(1H)-ona	(25)	câncer de cólon	(ESAKKIRAJAN et al., 2014b)

Tabela 3- Compostos isolados das folhas de espécies de *Cassia* e suas respectivas atividades biológicas. (continuação)

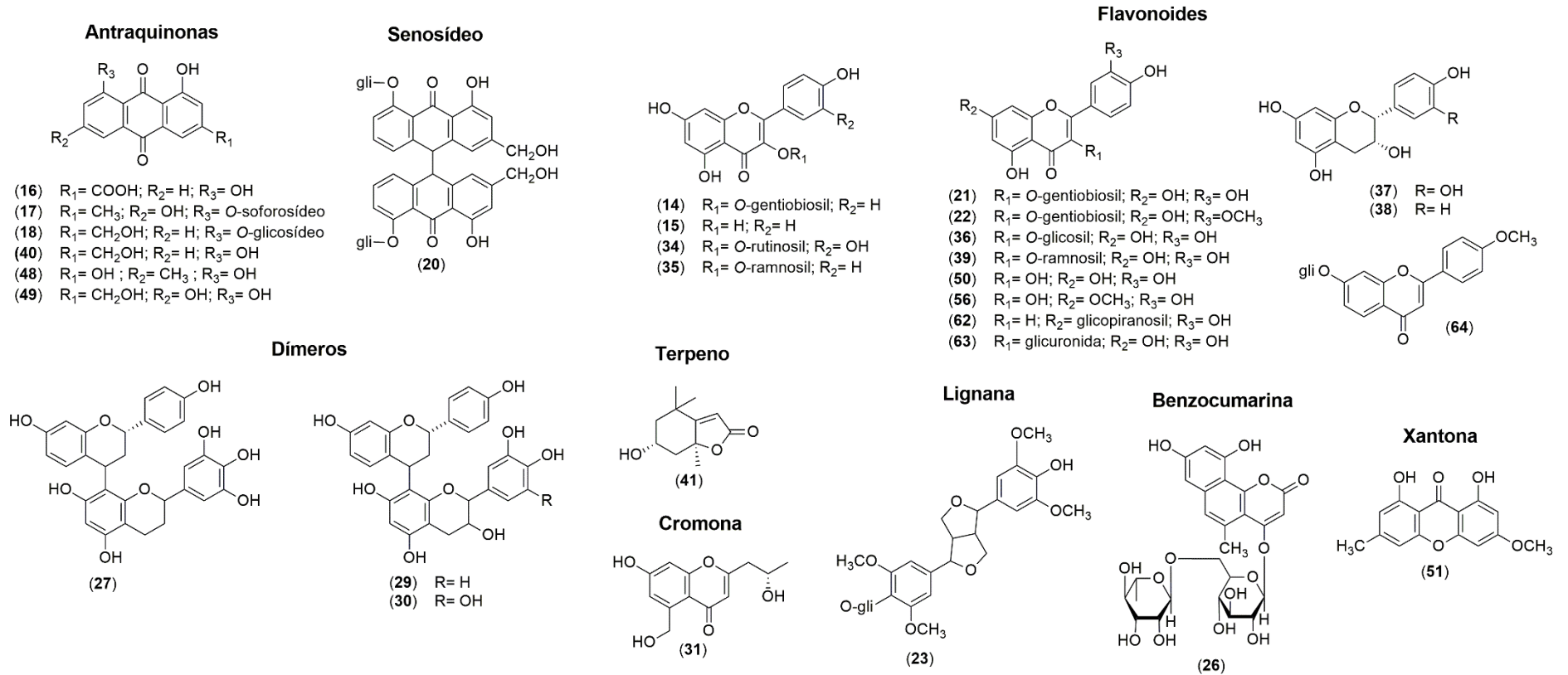
Espécie de <i>Cassia</i>	Compostos isolados	Número do composto	Atividade biológica	Referência
<i>C. auriculata</i>	avaraoside I	(26)	–	(NAKAMURA et al., 2014b)
	avaraol I	(27)	–	
	pseudoemiglabrina	(28)	hepatoprotetora	
	(2S)-7,4'- di-hidroxi flavan- (4 β →8)-catequina	(29)	hepatoprotetora	
	(2S)-7,4'-di-hidroxi flavan-(4 β →8)-galocatequina	(30)	hepatoprotetora	
<i>C. fistula</i>	(2'S)-7-hidroxi-5-hidroximetil-2- (2'-hidroxipropil)-cromona benzil-2 β -O-D-glicopiranosil-3,6-dimetoxibenzoato	(31)	antimicrobiano	(NAGPAL et al., 2011)
		(32)	antimicrobiano	
<i>C. grandis</i>	cassgranon D	(33)	–	(TRINH et al., 2017)
	rutina	(34)	–	
	afzelina	(35)	–	
	quercetina 3-O- β -D-glicosídeo	(36)	–	
	epicatequina	(37)	–	

Tabela 3- Compositos isolados das folhas de espécies de *Cassia* e suas respectivas atividades biológicas. (continuação)

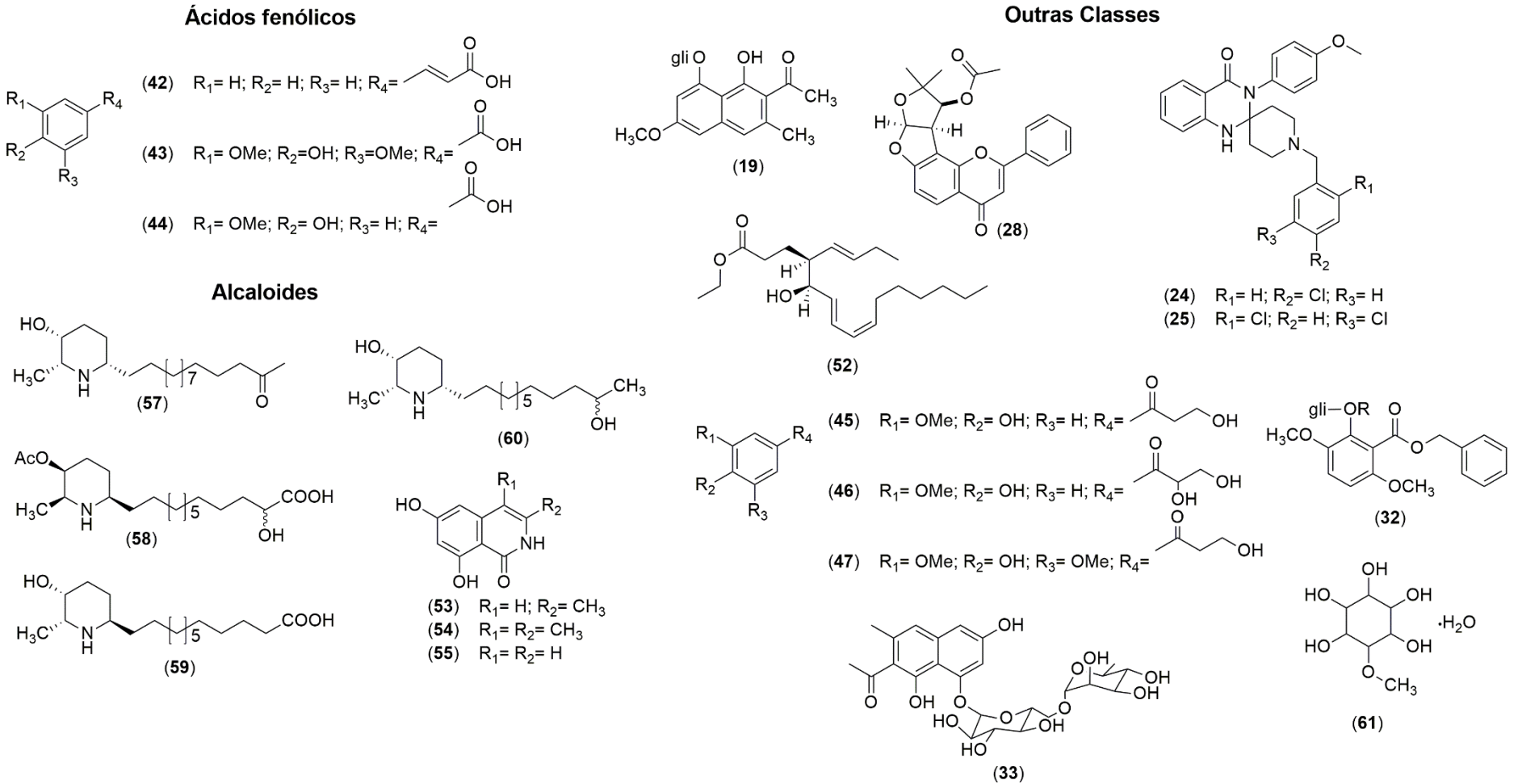
Espécie de <i>Cassia</i>	Compostos isolados	Número do composto	Atividade biológica	Referência	
<i>C. grandis</i>	(-)-epiafzelequina	(38)	–	(TRINH et al., 2017)	
	isoquercetrina	(39)	–		
	aloe-emodina	(40)	–		
<i>C. laevigata</i>	calendina	(41)	–	(JONES et al., 2000)	
	ácido cinâmico	(42)	–		
	ácido seríngico	(43)	–		
	ácido vanílico	(44)	–		
	3-hidroxi-1-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-propan-1-ona	(45)	–		
	2,3-di-hidroxi-1-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-propan-1-ona	(46)	–		
	3-hidroxi-1-(4-hidroxi-3,5-dimetoxifenil)-propan-1-ona	(47)	–		
<i>C. nigricans</i>	emodina	(48)	antimicrobiana	(AYO; AMUPITAN; ZHAO, 2007)	
	citreoerseina	(49)	inseticida		(GEORGES et al., 2008)
	reína	(16)	inseticida		
	luteolina	(50)	inseticida		
<i>C. obtusifolia</i>	1,8-di-hidroxi-3-metoxi-6-metilxantona	(51)	–	(SOB et al., 2008)	

Tabela 3- Compostos isolados das folhas de espécies de *Cassia* e suas respectivas atividades biológicas. (conclusão)

Espécie de <i>Cassia</i>	Compostos isolados	Número do composto	Atividade biológica	Referência
<i>C. obtusifolia</i>	(4R,5S,6E,8Z)-etil-4-((E)-but-1-enil)-5-hidroxi-pentdeca-6,8-dienoato	(52)	–	(SOB et al., 2008)
<i>C. siamea</i>	siamina	(53)	–	(EL-SAYYAD; ROSS; SAYED, 1984)
	3,4-dimetil-6,β-di-hidroxiisoquinolina-1-ona	(54)	–	
	siaminina B	(55)	–	
<i>C. sophera</i>	ramnetina	(56)	anti-inflamatória	(MONDAL; RAJALINGAM; KUMAR MAITY, 2013)
<i>C. spectabilis</i>	(-)-espectralina	(57)	antifúngica	(VIEGAS JUNIOR et al., 2006)
	3-acetil-leptofilina-A	(58)	antifúngica	
	leptofilina-B	(59)	–	
	carnavalina	(60)	–	
<i>C. tora</i>	monohidratado de ononitol	(61)	hepatoprotetora	(DHANASEKARANA; IGNACIMUTHU; AGASTIAN, 2009)
<i>C. tora</i>	luteolina-7-O-β- glicopiranosídeo	(62)	antipsoríase	(VIJAYALAKSHMI; MADHIRA, 2014)
	quercetina-3-O-β-D-glicuronida	(63)	antipsoríase	
	formononetina-7-O-β-glicosídeo	(64)	antipsoríase	

Figura 16- Estrutura dos compostos isolados das folhas de espécies de *Cassia*.

Fonte: a autora

Figura 17- Estruturas dos compostos isolados das folhas de espécies de *Cassia*.

Fonte: a autora

2.5 *Cassia bakeriana* Craib: ASPECTOS MORFOLÓGICOS, QUÍMICOS E BIOLÓGICOS

Cassia bakeriana Craib (Figura 18), espécie estudada nesse trabalho, pertence à família Leguminosae-caesalpioideae. Popularmente conhecida como cássia-rósea e cássia-baqueriana, essa espécie é originária da Tailândia, que possui clima tropical úmido, mas tolera as condições subtropicais de inverno ameno das regiões sul e sudeste do Brasil. É uma árvore coberta de folhas podendo atingir de 12-15 m de altura com tronco robusto, cascas pardo-acinzentada e lisa. Possui ramagem longa recurvada e forte, dando origem a uma copa ampla e arredondada. As folhas possuem forma pinadas com 12-15 pares de folíolos opostos que se perdem na época seca. As flores (Figura 19) são grandes, com cinco pétalas ovaladas e róseas formadas de novembro a janeiro. Os frutos de coloração marrom, são do tipo vagem (legume), não se abrem após a maturação, são lenhosos, cilíndricos, quebradiços, de 20-30 cm de comprimento e sementes castanhas de formato ovalado. A árvore é adequada para uso paisagístico, arborização de largas avenidas, e composição de vegetal de parques e grandes jardins, possui rápido crescimento (LORENZI et al., 2003).

Figura 18- Folhas e cascas da *Cassia bakeriana*.



Fonte: a autora

Figura 19- Flores da *Cassia bakeriana*.

Fonte: a autora

Em relação aos estudos químicos e biológicos de *C. bakeriana*, consta na literatura um estudo realizado por Cunha e outros (2013) em que foi determinada a composição química e avaliada a atividade antimicrobiana e a citotoxicidade do óleo essencial da madeira, cascas e folhas. O óleo essencial das folhas e cascas mostraram elevada atividade antimicrobiana com Concentração Inibitória Mínima (CIM) entre 62,5 e 125 $\mu\text{g ml}^{-1}$ contra microrganismos aeróbios e anaeróbios. O óleo essencial da madeira é rico em ácidos graxos, as cascas e folhas apresentaram álcoois, aldeídos e ácidos graxos como principais componentes. O efeito citotóxico foi maior para óleo da madeira e menor para o das folhas (93 e 153 $\mu\text{g ml}^{-1}$ respectivamente).

Em outro estudo realizado por Cunha e outros (2017), a atividade antimicrobiana do extrato e frações das cascas e folhas de *C. bakeriana* foi avaliada contra bactérias aeróbias e anaeróbias da cavidade bucal. A fração diclorometano das cascas apresentou elevada atividade antibacteriana, o fracionamento bioguiado dessa fração levou o isolamento da antraquinona reína (**16**) (Figura 16 p.55). A reína apresentou elevada atividade contra micro-organismos anaeróbios, com valores de CIM variando entre 3,12 $\mu\text{g ml}^{-1}$ (11,0 μM) e 25 $\mu\text{g ml}^{-1}$ (88,0 μM). O extrato das folhas também apresentou atividade contra alguns micro-organismos, porém sua composição química não foi estudada.

Neste sentido, torna-se importante os estudos químicos das folhas de *C. bakeriana*, uma vez que sua composição ainda não foi relatada e não há dúvidas de que a espécie é promissora na busca de compostos bioativos.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Esse trabalho teve como objetivo geral estudar a composição química, bem como avaliar as atividades antifúngica, antioxidante, inibitória enzimática e antiglicação dos extratos, partições e compostos isolados das folhas de *Cassia bakeriana*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar a coleta, secagem e identificação do material vegetal;
- Preparar o extrato hexânico e etanólico por maceração;
- Fracionar o extrato etanólico por extração líquido-líquido com solventes de polaridades crescentes;
- Avaliar a atividade antifúngica dos extratos e partições pelo método da microdiluição em caldo;
- Avaliar a atividade antioxidante dos extratos e partições pelo método ORAC e DPPH•;
- Avaliar a atividade inibitória das enzimas α -amilase, α -glicosidase e lipase;
- Avaliar a atividade inibitória dos produtos de glicação avançada AGEs;
- Avaliar a atividade citotóxica dos extratos e partições;
- Identificar a composição química dos extratos e partições com as melhores atividades biológicas por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas com ionização por *electrospray*;
- Fracionar os extratos e partições que apresentaram melhores atividades biológicas por técnicas cromatográficas;
- Isolar e caracterizar os componentes químicos;
- Avaliar a atividade biológica dos compostos isolados.

4 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

4.1 INSTRUMENTAÇÃO

- Banho de aquecimento FISATOM modelo 550.
- Balança analítica SHIMADZU modelo AUW220D.
- Balança de luz infravermelha para determinação da umidade Quimis modelo Kett FD-600.
- Evaporador rotatório IKA modelo RV 10.
- Liofilizador TERRONI modelo LS3000.
- Incubadora B.O.D Nova Ética modelo 411/FPD 155L.
- Lavadora ultra-sônica modelo USC-750 Unique.
- Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência Shimadzu®, modelo LC-6AD, composto por: bombas LC-6AD, desgaseificador DGU-20A5R, forno CTO-20A, coletor de frações FRC-10A, auto-injetor SIL-10AF e detectores de arranjo de diodo (DAD) SPD-M20A e evaporativo por espalhamento de luz (ELSD- *evaporative light scattering detector*) LT II.
- Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência Agilent modelo Infinity 1260, acoplado a um Espectrômetro de Massas de alta resolução tipo *Quadropole (Time of Flight)* Q-TOF da marca Agilent® modelo 6520 B com fonte de ionização por electrospray (IES).
- Espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) Bruker modelo Ascend™ 400 Avance III HD (9,4 Tesla).

4.2 SOLVENTES E REAGENTES

- Solventes utilizados para a extração e cromatografia: hexano, etanol, acetato de etila, *n*-butanol, diclorometano e metanol foram de marcas diversas: Synth, Vetec, Merck, Neon. O hexano, etanol e acetato de etila foram destilados para maior grau de pureza.
- Anidrido acético e os ácidos: acético, sulfúrico e fórmico também foram de marcas diversas: Synth, Merck, Vetec.
- Ácido hexacloroplatínico (Vetec)

- Reagentes químicos: nitrato de bismuto (Isofar), iodeto de potássio (Chemicals), difenilboriloxietilamina NP (Sigma-Aldrich). O polietilenoglicol 400 (PEG-400), cloreto de alumínio, sulfato cérico pentahidratado foram da marca Vetec.
- Metanol HPLC foram da Sigma- Aldrich e J. T. Baker.
- Solventes deuterado dimetilsulfóxido e clorofórmio foram da *Combridge Isotope Laboratories*.

4.3 CROMATOGRAFIA

- Cromatografia em Camada Delgada (CCD):
 - Sílica gel 60 com indicador de fluorescência (UV₂₅₄), 0,20 mm de espessura Macherey-Nagel.
- Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)
 - Coluna analítica Phenomenex Lunna C18 (250,0 × 4,6 mm, 5 µm) protegida pela respectiva pré-coluna.
 - Coluna Semipreparativa Phenomenex Luna C18 (250,0 × 10,0 mm, 10 µm).

4.4 COLETA E PREPARO DO MATERIAL VEGETAL

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

Após a coleta, as folhas foram levadas para Núcleo de Pesquisa em Produtos Naturais (NUPPeN) no Instituto de Química da UFU e colocadas em uma incubadora com circulação de ar a 35 °C para secagem. O teor de umidade das folhas foi determinado pelo método gravimétrico através de uma balança de luz infravermelha. Cerca de 1,0 g das folhas foram monitoradas a uma temperatura de 105 °C por 15 mim. As folhas foram retiradas da incubadora quando apresentaram 7,3 % de umidade

e em seguida foram trituradas utilizando um multiprocessador. A Figura 20 mostra o esquema do preparo do material vegetal.

Figura 20- Esquema do preparo do material vegetal.



Fonte: a autora

4.5 PREPARO DOS EXTRATOS E EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO

O extrato das folhas foi obtido através do processo de maceração em que 1 kg das folhas trituradas foram colocadas em contato com o hexano (2,3 L) durante 48 horas a temperatura ambiente. Após decorrido o tempo, o solvente foi filtrado e concentrado utilizando um evaporador rotatório a pressão reduzida e banho a 40 °C. O procedimento foi realizado seis vezes com o solvente hexano e ao final foi obtido o extrato hexânico (EH). Posteriormente, foi obtido o extrato etanólico (EE) sendo adicionado etanol (2,3 L) ao material remanescente da extração em hexano e repetido o mesmo procedimento por seis vezes. Após a remoção dos solventes, o EE foi congelado e liofilizado para remoção de água. A Figura 21 mostra a primeira extração do EH e EE. Em seguida foi realizada a extração líquido-líquido com solventes de polaridade crescente. O EE seco (100 g) foi solubilizado em 600 mL de metanol:água (9:1) e adicionado a um funil de separação onde foram colocados inicialmente diclorometano (250 mL) e a fração orgânica foi extraída por cinco vezes até obter a partição diclorometano (P-D). Em seguida foi obtida a partição acetato de etila (P-AE) adicionando acetato de etila (250 mL) ao funil e seguindo o mesmo procedimento anterior. A fração hidrometanólica submetida ao evaporador rotatório para reduzir o volume e em seguida foi adicionado água (250 mL). Então, uma nova extração líquido-

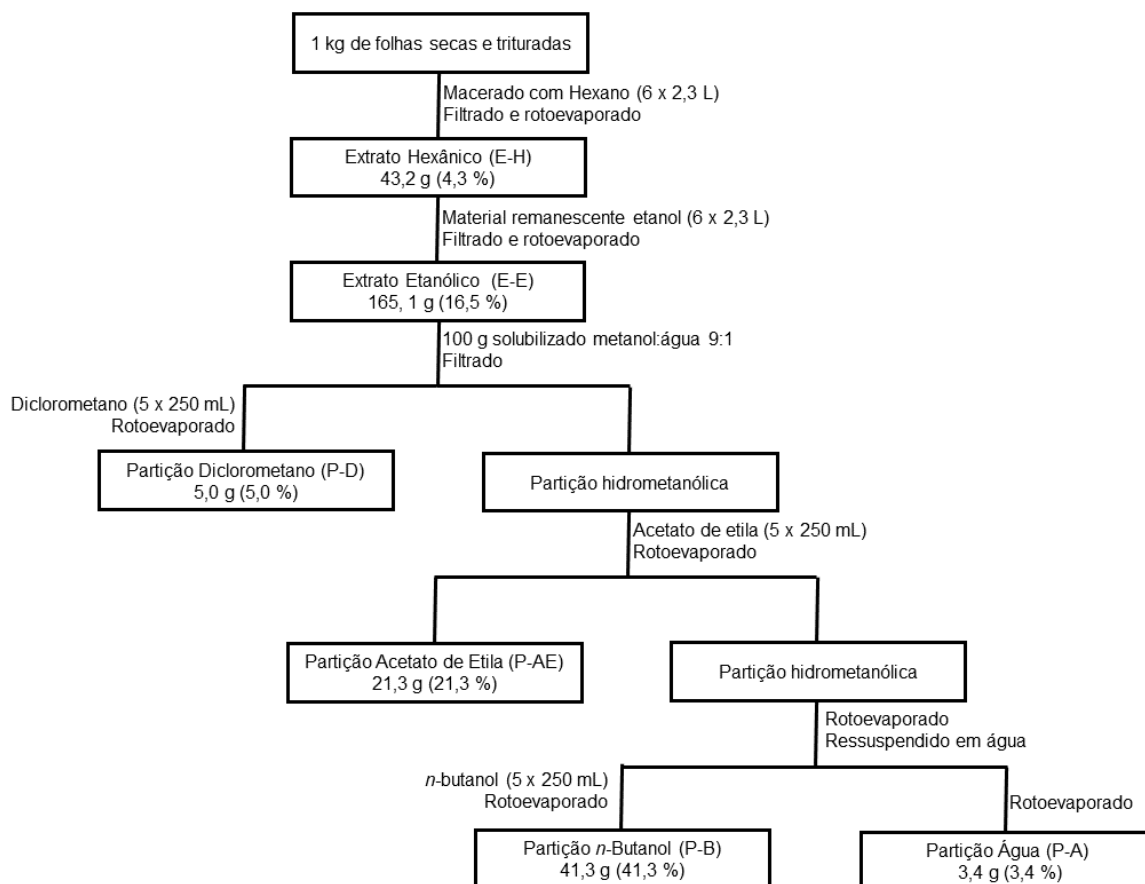
líquido com *n*-butanol foi realizada sendo obtidas as partições *n*-butanol (P-B) e aquosa (P-A). Todas as partições foram concentradas utilizando o evaporador rotatório à pressão reduzida e banho a 40 °C e submetidas à liofilização para remoção de água. O fluxograma na Figura 22 ilustra o procedimento da preparação dos extratos e partição.

Figura 21- Primeira extração do EH e EE.



Fonte: a autora

Figura 22- Procedimento de preparação dos extratos e partições.



Fonte: a autora

4.6 PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA

A prospecção fitoquímica foi realizada para os extratos e partições a fim de identificar as classes de compostos presentes. Os extratos e partições foram solubilizados em metanol com concentração $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ e aplicadas em placas comerciais de (CCD). Foram utilizados 3 sistemas de fases móvel para desenvolvimento das placas cromatográfica. A fase móvel 1 – hexano: acetato de etila (5:1) – foi utilizada para o extrato hexânico, a fase móvel 2 – éter etílico:acetato de etila:ácido fórmico (75: 25:1) – foi utilizada para o EE, P-D, P-AE e P-B, e para a P-A foi utilizado a fase móvel 3 – acetato de etila: metanol (10:3). Em seguida as placas foram reveladas com os reveladores que estão descritos abaixo, estes preparados segundo a metodologia proposta por Wagner (1996).

a) Detecção de alcaloides:

- **Dragendorf**: foi preparada uma solução A, a partir da dissolução de 0,85 g de nitrato de bismuto em 10,0 mL de ácido acético glacial e adicionou-se 40,0 mL de água destilada sob aquecimento; e uma solução B a partir da dissolução de 8,0 g de iodeto de potássio em 30,0 mL de água. As soluções A e B foram misturadas na mesma proporção produzindo uma solução estoque. A solução reveladora foi preparada com 1,0 mL da solução estoque; 2,0 mL de ácido acético glacial e 10,0 mL de água. A placa foi revelada e observada a coloração laranja amarelada na presença de alcaloides.

- **Iodocloroplatinado**: foi preparada uma solução A contendo ácido hexacloroplatínico (IV) 5% em água (m/v) e uma solução B contendo iodeto de potássio 10% em água (m/v). A solução reveladora foi preparada com 1,0 mL da solução A, 9,0 mL da solução B estoque e 10,0 mL de água. A placa foi borrifada e observada a coloração marrom na presença de alcaloides.

b) Detecção de flavonoides:

- **NP/PEG:** foi preparada uma solução A contendo difenilboriloxietilamina (NP) 1% (m v⁻¹) em metanol; e uma solução B contendo polietilenoglicol-4000 (PEG4000) 5% (m v⁻¹) em etanol. A solução reveladora foi preparada com 10,0 mL da solução A e 8 mL da solução B e aplicada na placa. Posteriormente a placa CCD foi observada em câmara de luz UV.

- **Cloreto de alumínio:** foi preparada uma solução contendo AlCl₃ 1% (m v⁻¹) em metanol. A placa CCD foi borrifada com o revelador e observada na câmara de luz UV.

c) Detecção de antraquinonas:

- **KOH (reagente Bornträger):** hidróxido de potássio 5% em etanol. As antraquinonas revelam com coloração vermelhas. Na câmara de luz UV é possível identificar antronas (amarela) e cumarina(azul).

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

- **Sulfato Cérico:** 2,1 g de Ce(SO₄)₂.5H₂O foi dissolvido em 15 mL de H₂SO₄ concentrado e adicionado a 800 mL de água (CHAVES, 1997). Mistura foi aplicada na placa e os compostos revelados apresentaram coloração marrom.

- **Liebermann-Burchard:** foi adicionado 5,0 mL de anidrido acético e 5,0 mL de ácido sulfúrico concentrado a 50,0 mL de etanol absoluto, sob banho de gelo. A placa foi borrifada com a solução e aquecida a 100 °C por 5 a 10 min e os compostos revelados ficaram coloridos na placa.

- **Vanilina Sulfúrica:** foi preparada uma solução A contendo vanilina 1% em etanol (m/v) e uma solução B contendo ácido sulfúrico 5% em etanol (v/v). A placa CCD foi borrifada com a solução A seguida da B e aquecida a 100 °C por 5 a 10 min podendo observar os compostos revelados de diversas cores.

4.7 ANÁLISE POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS

As P-D e P-AE foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência hifenado ao espectrômetro de massas com fonte de ionização por electrospray CLAE-EM-IES, pois foram as frações mais ativas nas análises biológicas. As análises de EM foram realizadas no Laboratório de Nanobiotecnologia do Instituto de Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia (IGEB-UFU) em um cromatógrafo líquido (marca Agilent modelo Infinity 1260) acoplado a um espectrômetro de massas de alta resolução tipo Q-TOF da marca Agilent® modelo 6520 B com fonte de ionização por electrospray (IES). Os parâmetros cromatográficos para análise dos extratos e partições foram: coluna Agilent modelo Poroshell C18 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⁻¹ a uma temperatura de 220 °C e no capilar foi aplicado uma energia de 4,5KV. Para os compostos isolados, uma nova metodologia foi otimizada com os seguintes parâmetros cromatográficos: coluna Agilent modelo Zorbax C18, 2,1 mm de diâmetro interno, 5 cm de comprimento, partículas de 1,8 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 - 15 min); 100% de B (15 - 17 min). Os parâmetros de ionização foram: pressão do nebulizador de 58 psi, gás secante a 8 L min⁻¹ a uma temperatura de 220 °C e no capilar foi aplicado uma energia de 4,5 KVA.

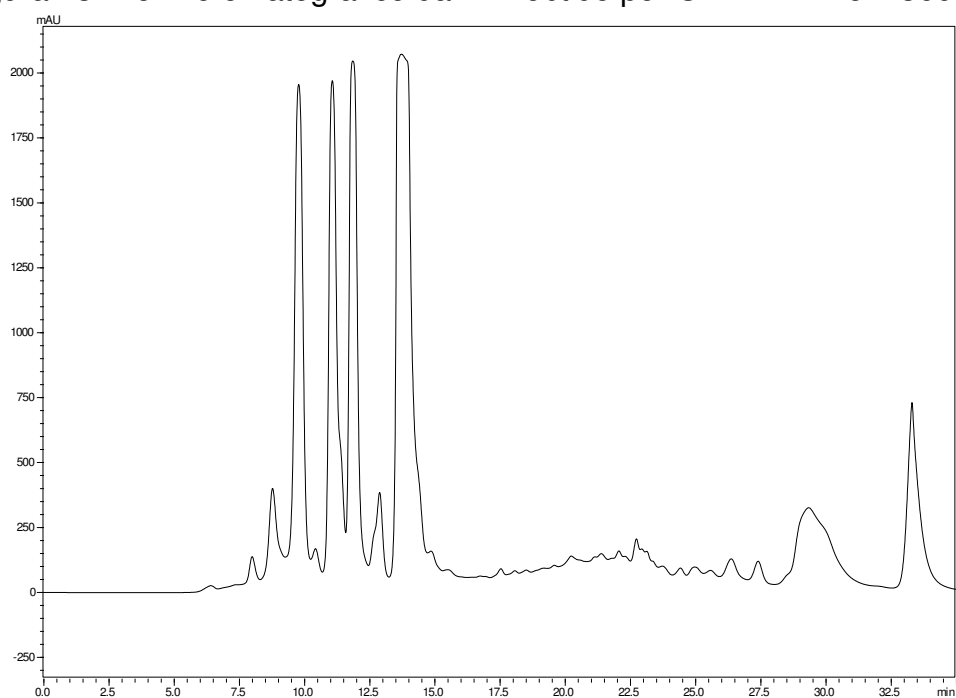
Foi realizada as análises de espectrometria de massas sequencial (EM/EM) em diferentes energias de colisões para os modos positivo e negativo para cada íon molecular. A partir do estudo dos fragmentos e da massa de alta resolução foi possível propor a estrutura dos compostos das amostras bioativas. A 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 exata, erro em ppm (Equação 1), equivalência de instaurações e regra do nitrogênio. As possíveis estruturas foram propostas de acordo com outros trabalhos na literatura, biblioteca Metlin e bancos de dados (Chemspider, Pubchem e Massbank), analisando sistemas de solventes, tempos de retenção e espectro de massas.

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

4.8 FRACIONAMENTO DA PARTIÇÃO DICLOROMETANO

A P-D foi uma das partições que apresentou melhores resultados nos ensaios biológicos e por isso foi submetida ao fracionamento utilizando CLAE-DAD semi-preparativo. A amostra foi solubilizada em metanol HPLC (1 mg mL^{-1}) e filtrada em filtros de seringa com membrana de politetrafluoretileno (PTFE) $0,45 \text{ }\mu\text{m}$. Inicialmente foi utilizada uma coluna analítica para avaliar o perfil cromatográfico da P-D nas seguintes condições: fase móvel A (água deionizada) e fase móvel B (metanol HPLC), a eluição em gradiente iniciou com 60-100% de B (15 mim), 100% de B (10 mim), 100-60% de B (5 mim) e 60% de B (5 mim), fluxo 1 mL mim^{-1} e o volume injetado foi de $50,0 \text{ }\mu\text{L}$, com forno a temperatura de $35 \text{ }^\circ\text{C}$. A partir do perfil cromatográfico da P-D (Figura 23), a amostra (50 mg mL^{-1}) foi submetida ao fracionamento utilizando a coluna semi-preparativa nas mesmas condições do gradiente de solvente da coluna analítica com fluxo de 2 mL mim^{-1} . O isolamento foi realizado através da coleta automatizada na saída do detector com coletor de frações. A válvula foi programada para coletar cada composto de acordo com o seu tempo de retenção (T_R) (Figura 24). As frações 11 e 12 foram agrupadas e renomeada como Fr-D11, a fração 13 foi renomeada como fr-D12, as frações 14 e 15 também foram agrupadas e renomeadas como fr-D14 e as frações 16 e 17 foram renomeadas como Fr-D15 e Fr-D16, respectivamente. Para obter maior quantidade dos compostos isolados foram realizadas 115 injeções de $50 \text{ }\mu\text{L}$ da amostra (50 mg mL^{-1}). Sendo assim a cada coleta foram injetadas $2,5 \text{ mg}$ de amostra na coluna. O fluxograma na Figura 25 mostra o rendimento obtido da fração da P-D.

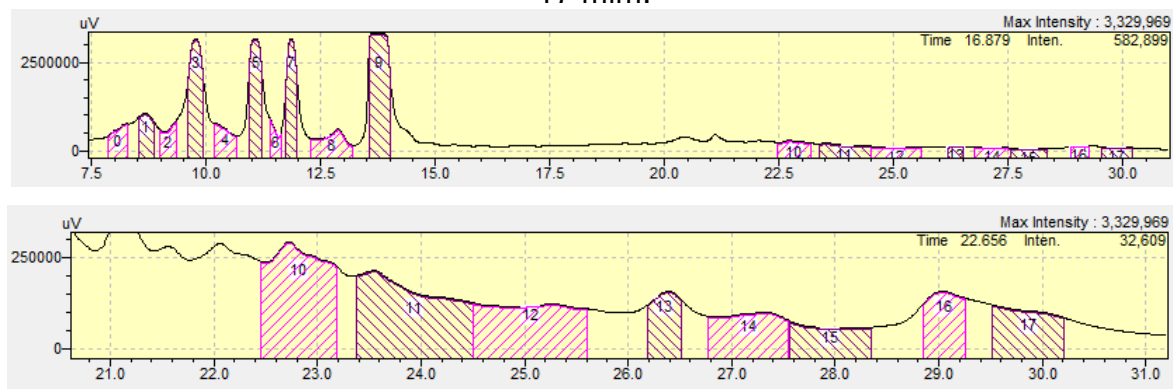
Figura 23- Perfil cromatográfico da P-D obtido por CLAE-DAD em 366 nm.



Condições CLAE: Coluna semi-preparativa C₁₈; gradiente metanol:água 60-100% (15min), 100% de metanol (10 mim), 100-60% de metanol (5 mim) e 60% de metanol (5 mim); fluxo 2mL mL⁻¹; volume de injeção 50 µL.

Fonte: a autora

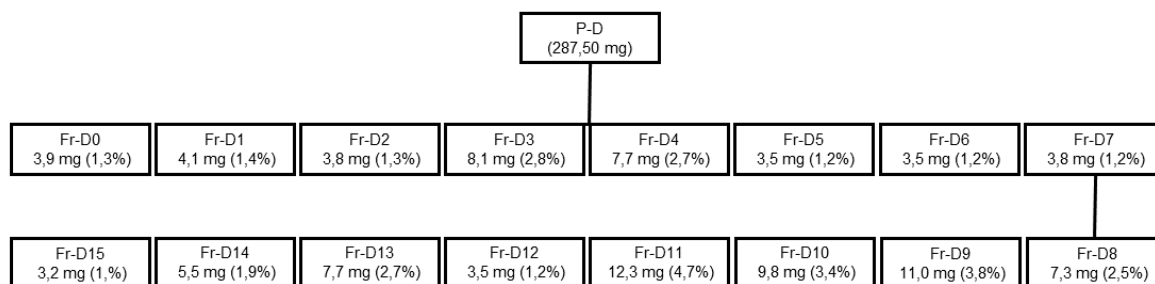
Figura 24- Perfil do fracionamento da P-D segundo o T_R e ampliação da região 10 a 17 mim.



Condições CLAE: Coluna semi-preparativa C₁₈; gradiente metanol:água 60-100% (15min), 100% de metanol (10 mim), 100-60% de metanol (5 mim) e 60% de metanol (5 mim); fluxo 2mL mL⁻¹; volume de injeção 50 µL.

Fonte: a autora

Figura 25- Fluxograma com rendimento obtido das frações da P-D.



Fonte: a autora

4.9 ANÁLISE DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA

Os compostos isolados da P-D foram submetidos a análise por ressonância magnética nuclear (RMN) para identificação estrutural. Os espectros de RMN foram obtidos utilizando o espectrômetro da Bruker Ascend™ 400 Avance III HD (9,4 Tesla), operando a 400 MHz (^1H) e 100 MHz (^{13}C), disponível no Laboratório Multiusuário do Instituto de Química da UFU. Os experimentos foram realizados a 30 °C, utilizando TMS ($\delta_{\text{TMS}} = 0,00$) como padrão interno. As amostras foram solubilizadas em dimetilssulfóxido deuterado e realizado os seguintes experimentos: RMN de ^1H e ^{13}C , os experimentos bidimensionais COSY (*Homonuclear Correlation Spectroscopy*, $^1\text{H} \rightarrow ^1\text{H}$), HSQC (*Heteronuclear Single Quantum Coherence*, $^1\text{H} \rightarrow ^{13}\text{C}$), HMBC (*Heteronuclear Multiplebond Coherence*, $^1\text{H} \rightarrow ^{13}\text{C}$).

4.10 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA

A atividade antifúngica foi determinada utilizando o método da microdiluição em caldo para determinação da concentração inibitória mínima (CIM). As análises foram realizadas no Laboratório de Pesquisa em Microbiologia Aplicada da Universidade de Franca (LaPeMA-UNIFRAN), com a colaboração do professor Dr. Calos Henrique Gomes Martins.

Para tanto, foram utilizadas as seguintes cepas padrão provenientes da “*American Type Culture Collection*” (ATCC): *Candida albicans* (ATCC 28366), *Candida tropicalis* (ATCC 13803) e *Candida glabrata* (ATCC 15126).

4.10.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima

Inicialmente soluções de estoque foram preparadas dissolvendo os extratos e partições em dimetilsulfóxido (DMSO) na concentração de $192000 \mu\text{g mL}^{-1}$. Em seguida, foram realizadas diluições com as soluções de estoque usando o caldo RPMI 1640 (meio de cultura) tamponado em pH 7,2 com ácido 3-N-morfolinopropanosulfônico (MOPS) até a concentração de $12000 \mu\text{g mL}^{-1}$. A determinação da CIM foi realizada em placas de microdiluição com 96 poços, onde foram feitas as diluições seriadas com concentrações de 3000 a $1,46 \mu\text{g mL}^{-1}$ dos extratos e partições. Cada poço recebeu $100,0 \mu\text{L}$ da suspensão do inóculo sendo o volume final de cada poço foi de $200 \mu\text{L}$. 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 1640), do inóculo, dos extratos, partições e do solvente (DMSO) também foram realizados. O controle do solvente foi preparado nas concentrações de 1 % a 5 % em 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 (CLSI., 2008). Após a montagem das microplacas, essas foram incubadas por 48 h a $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$, 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 e partições capaz de inibir o crescimento das leveduras.

4.10.2 Preparo do inóculo

O inóculo foi preparado de acordo com o protocolo de referência CLSI M27-A3 (CLSI., 2008). Inicialmente as leveduras foram cultivadas em placas de petri contendo ágar Sabouraud por 24 horas a $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Com auxílio de alça de platina esterilizada, colônias das leveduras foram transferidas para tubos contendo 2,0 mL de NaCl (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 $6 \times 10^6 \text{ UFC mL}^{-1}$.

Em seguida, foram realizadas diluições em caldo RPMI até que o inóculo atingisse $1,2 \times 10^5$ UFC mL⁻¹.

4.11 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

4.11.1 Método do sequestro do DPPH•

As análises da atividade antioxidante de *C. bakeriana*, foram realizadas no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular do Instituto de Biotecnologia da UFU, com a colaboração do professor Dr. Foued Salmen Espindola. Este procedimento foi realizado segundo a metodologia proposta por Yildirim et al (2001) modificado utilizando o radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH•). Os extratos e partições foram diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO). A reação foi iniciada adicionando 250 µL dos extratos e partições, solubilizados em 750 µL de solução metanólica do radical DPPH (0,06 mmol L⁻¹). A mistura foi incubada a 30° C, na ausência de luz durante 20 min. Através de um espectrofotômetro (Molecular Devices, Menlo Park, CA, EUA), foi possível medir a redução da absorbância da mistura em 517 nm. O controle foi realizado substituindo o extrato e partições por metanol. O branco foi realizado substituindo a solução do radical DPPH por metanol. O ácido ascórbico foi usado como controle positivo. Para calcular a porcentagem de atividade antioxidante (AA) que corresponde a porcentagem dos radicais DPPH eliminados, foi utilizado a Equação 2.

$$\text{Atividade antioxidante (\%)} = \left(\frac{\text{Abs controle} - (\text{Abs amostra} - \text{Abs branco})}{\text{Abs controle}} \right) \times 100 \quad \text{Equação 2}$$

Onde: *Abs controle* é a absorbância da solução metanólica do radical DPPH, *Abs amostra* é a absorbância da mistura (DPPH• + amostra), *Abs branco* é a absorbância da amostra em metanol.

O ensaio foi realizado em duplicata e a concentração inibitória (IC₅₀) do inglês “*inhibitory concentration*” que é a concentração de amostra necessária para sequestrar 50 % do DPPH• foi determinada com diferentes concentrações dos extratos e partições.

4.11.2 Método do sequestro do radical de oxigênio ORAC

O método da capacidade de absorção de radicais de oxigênio (ORAC), do inglês “*Oxygen radical absorbance capacity*”, a análise se baseia na inibição da oxidação induzida pelo radical peroxil, iniciada pela decomposição térmica do composto 2,2'-azobis-(2-amidinopropano) di-hidroclorato (AAPH), sendo utilizada a fluoresceína como sonda fluorescente, e a perda da fluorescência foi avaliada ao longo do tempo, na ausência e presença de compostos antioxidantes (PRIOR et al., 2003). Os extratos e as partições foram solubilizados em DMSO:água (1:1) na concentração de 20 µg mL⁻¹. Todos os reagentes utilizados no ensaio foram preparados em tampão fosfato (75 mmol L⁻¹, pH 7,4). Inicialmente, 25 µL dos extratos e partições foram adicionados a 150 µL de fluoresceína (0,085 mmol L⁻¹) e incubados a temperatura ambiente por 15 mim. Em seguida foram adicionados 30 µL da solução de AAPH para dar início à reação. A intensidade de fluorescência foi medida a 37 °C em um espectrofluorímetro, com excitação (ex) a 485 nm e emissão (em) a 528 nm e foi verificada a cada 1 mim e 30s durante 90 mim. A perda da fluorescência foi medida calculando a área sobre a curva de decaimento da fluorescência da amostra pelo tempo, comparada com uma amostra sem antioxidante. A capacidade antioxidante foi determinada a partir da curva analítica construída com concentrações conhecidas do ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico (Trolox). O branco foi realizado substituindo os extratos e partições por tampão fosfato. O ácido ascórbico foi utilizado como controle positivo. Todas as análises foram realizadas em triplicata e os resultados foram expressos como µmol equivalente de Trolox por grama de amostra.

4.12 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE INIBIÇÃO DAS ENZIMAS α-AMILASE, α-GLICOSIDASE E LIPASE PANCREÁTICA

4.12.1 Inibição da atividade da α-amilase

Os extratos e partições foram avaliados em relação à capacidade de inibir a atividade da α-amilase pelo método cinético (Gal-G2-α-CNP) modificado, utilizando o substrato α-(2-cloro-4-nitrofenil)-β-1,4-galactopiranosilmaltosídeo (Gal-G2-α-CNP) e uma fração de saliva enriquecida da enzima α-amilase (f-AS) (SANTOS et al., 2012, GOUVEIA et al., 2013). Todas as análises enzimáticas e a inibição da glicação (Item

4.13) foram realizadas no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular do Instituto de Biotecnologia da UFU, com a colaboração do professor Dr. Foued Salmen Espindola.

A f-As foi preparada a partir da coleta de saliva humana pelo método de cuspe, em seguida foi armazenada a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 48 h (parecer do comitê de ética n.º 407.597). Posteriormente, a saliva foi descongelada e centrifugada a $12000\text{ }xg$ por 1 min a 20°C . O sobrenadante foi fracionado por coluna de troca iônica em uma coluna de Q-Sepharose utilizando como fase móvel um tampão contendo 50 mmol L^{-1} de Tris-HCl (pH 8,0), 10 mmol L^{-1} de EDTA e 10 mmol L^{-1} de EGTA. O volume de exclusão da coluna de Q-Sepharose foi dialisado em tampão de bicarbonato de amônio (50 mmol L^{-1} , pH 7,0), liofilizado e solubilizado em 50 mmol L^{-1} de tampão ácido 2-(N-morfolino)-etanossulfônico (MES) contendo 5 mmol L^{-1} de cloreto de cálcio 140 mmol L^{-1} de tiocianato de potássio e 300 mmol L^{-1} de cloreto de sódio (pH 6,0).

As amostras dos extratos e partições foram solubilizadas em DMSO:água (1:1) e incubadas com a f-AS (proporção de 1:10) durante 30 min a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. A reação foi iniciada pela adição de $320\text{ }\mu\text{L}$ do substrato GAL-G2- αCNP (12 mmol L^{-1}) e os valores de absorbâncias foram medidos a 405 nm , durante 3 min, com intervalo de 1 min a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. O controle foi realizado substituindo os extratos e partições por tampão MES. A acarbose foi utilizada como controle positivo. Todos os ensaios foram realizados em duplicata e o resultado foi apresentado como porcentagem de inibição da α -amilase, calculado através da Equação 3. As equações 4 e 5 determinam a atividade enzimática em U mL^{-1} e %, respectivamente, e foram utilizadas no cálculo da inibição (Equação 3).

Inibição da α – amilase (%) = 100 – (Atividade da α – amilase em %) Equação 3

$$\text{Atividade da } \alpha \text{ – amilase } \frac{\text{U}}{\text{ml}} = \frac{\left[\frac{(\Delta\text{Abs})}{\text{min}}\right] \cdot V_f \cdot Fd}{\xi \cdot V_s \cdot I} \quad \text{Equação 4}$$

$$\text{Atividade da } \alpha \text{ – amilase (\%)} = \frac{(A \text{ amostra})}{(A \text{ controle})} \cdot 100 \quad \text{Equação 5}$$

Em que: $\Delta\text{Abs}/\text{min} = [\text{Abs}_3 - \text{Abs}_1]/2$ é a diferença de absorvância por minuto (Abs = absorvância; 1 e 3 = minutos); V_f é o volume total da reação ($328\text{ }\mu\text{L}$); V_s é o volume de amostra (extratos, partições e enzima α -amilase, $8\text{ }\mu\text{L}$); Fd é o fator de diluição da saliva (50); ξ é o coeficiente de absorvidade do 2-cloro-*p*-nitrofenol; I

é o comprimento do percurso da luz (0,97); *A controle* é a atividade da α -amilase e *A amostra* é a atividade da α -amilase na presença dos extratos e partições.

O valor da IC_{50} que é a concentração de amostra necessária para inibir 50 % atividade enzimática. Essa foi determinada utilizando as seguintes concentrações de extrato e partições: 30,0; 10,0; 5,5; 3,0; 1,0; 0,55; 0,33; 0,1 mg mL⁻¹. A partir da equação da reta de uma curva analítica do gráfico de porcentagem de inibição *versus* a concentração das amostras, foi possível determinar o IC_{50} .

4.12.2 Inibição da atividade da α -glicosidase

Os extratos e partições foram analisados em relação à capacidade de inibir a atividade da enzima α -glicosidase utilizando o método modificado com o substrato 4-nitrofenil- α -D-glicopiranosídeo (*p*-NPG) e uma fração enriquecida da enzima α -glicosidase (f-AG) (Sigma Aldrich I-1630) (TOMA et al., 2014). Para o preparo da f-AG, 200 mg de pó cetônico de intestino de rato foi homogeneizado em 3 mL de solução aquosa de cloreto de sódio (0,9% m v⁻¹). O homogeneizado foi centrifugado a 12000 *xg* por 30 min e o sobrenadante (f-AG) foi utilizado no ensaio. As amostras dos extratos e partições foram dissolvidas em DMSO:água (1:1) e foram incubadas com a f-AG e 1,5 mmol L⁻¹ de glutathione reduzida diluída em tampão fosfato (50 mmol L⁻¹, pH 6,8) durante 20 min a 37 °C. A reação foi iniciada pela adição do substrato *p*-NPG (4 mmol L⁻¹) em tampão fosfato de sódio (50 mmol L⁻¹, pH 6,8) e os valores de absorbâncias foram medidos a 405 nm, durante 30 min, com intervalo de 5 min, a 37 °C. O controle foi realizado substituindo os extratos e partições por tampão fosfato. A acarbose foi utilizada como controle positivo. Todos os ensaios foram realizados em duplicata para determinação do IC_{50} nas mesmas concentrações utilizadas para o ensaio da α -amilase. O resultado é dado em porcentagem de inibição da α -glicosidase, calculado através da Equação 7.

$$\text{Inibição da } \alpha - \text{glicosidase} = \left(\frac{(\text{ASC controle} - \text{ASC amostra})}{\text{ASC controle}} \right) \cdot 100 \quad \text{Equação 7}$$

Em que: *ASC controle* é a área sob a curva na ausência dos extratos e partições, a *ASC amostra* é a área sob a curva na presença dos extratos e partições.

4.12.3 Inibição da atividade da lipase pancreática

A inibição da atividade da lipase pancreática foi realizada utilizando o método modificado com palmitato de p-nitrofenila (*p*-NPP) como substrato e lipase pancreática suína (tipo II, Sigma Aldrich) (GUPTA; RATHI; GUPTA, 2002). Os extratos e partições foram solubilizados em DMSO:água (1:1) e incubados com 10 g L⁻¹ de lipase pancreática diluído em tampão contendo Tris-HCl (50 mmol L⁻¹, pH 8,0), 10 mmol L⁻¹ de CaCl₂ e 25 mmol L⁻¹ de NaCl por 20 min a 37 ° C. A reação foi iniciada pela adição de 0,8 mmol L⁻¹ substrato de *p*-NPP diluído em 10% de isopropanol e 50 mmol L⁻¹ do tampão Tris-HCl contendo 10 mmol L⁻¹ CaCl₂, 25 mmol L⁻¹ NaCl, 0,5% triton X-100. Os valores de absorbância foram medidos a 410 nm por 30 min a 30 °C. O controle positivo utilizado foi o orlistat (pureza > 98%), o DMSO 5% foi utilizado como um controle negativo. Os resultados foram apresentados em porcentagem de inibição da lipase, calculada de acordo com a Equação 6.

$$\text{Inibição da lipase (\%)} = \left[\frac{(A_{\text{controle}} - A_{\text{amostra}})}{A_{\text{controle}}} \right] \cdot 100 \quad \text{Equação 6}$$

Onde: *A controle* é a área sob a curva na ausência dos extratos e partições, e *A amostra* é a área sob a curva na presença dos extratos e partições.

Todas as análises foram realizadas em duplicata para determinação do IC₅₀ nas mesmas concentrações utilizadas para o ensaio da α-amilase e α-glicosidase.

4.13 DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE DE INIBIÇÃO DA GLICAÇÃO

Os extratos e partições foram diluídos em DMSO:água (1:1) e adicionados a albumina sérica bovina (BSA) (50 mg mL⁻¹) diluída em tampão fosfato (200 mmol L⁻¹, pH 7,4). Em seguida a mistura foi incubada a 37 °C por 72 horas, na ausência de luz. Após esse período, foi adicionado 1,6 mL de ácido tricloroacético 20% (m v⁻¹) em cada tubo. Em seguida foram centrifugados a 10000 *xg* por 10 min e o *pellet* foi ressuscitado em 1,6 mL de tampão fosfato (200 mmol L⁻¹, pH 7,4). A redução da fluorescência específica da BSA quando se liga ao açúcar (frutose) foi avaliada em espectrofluorímetro (350 nm_(ex)/420 nm_(em)) (Perkin-Elmer LS 55, Massachusetts, USA) (SRI HARSHA; LAVELLI; SCARAFONI, 2014). O controle foi realizado

substituindo os extratos e partições por DMSO. O branco foi realizado substituindo a frutose por tampão fosfato (200 mmol L⁻¹, pH 7,4), e os extratos e partições por DMSO. A quercetina foi usada como controle positivo. A porcentagem de inibição da glicação (IG) foi calculada através da Equação 8.

$$IG(\%) = 100 - \left[\frac{(IF \text{ amostra} - IF \text{ branco})}{(IF \text{ controle} - IF \text{ branco})} \cdot 100 \right] \quad \text{Equação 8}$$

Sendo: *IF amostra* a intensidade de fluorescência na presença dos extratos e partições, *IF branco* a intensidade de fluorescência na ausência de frutose e extratos e partições, e *IF controle* a intensidade de fluorescência na ausência de extratos e partições.

Todas as análises foram realizadas em duplicata para determinação da IC₅₀ nas mesmas concentrações utilizadas para os ensaios enzimáticos.

4.14 DETERMINAÇÃO DA CITOTOXICIDADE

O ensaio da atividade citotóxica foi realizado utilizando o método de diluição em microplaca de 96 poços. O meio Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) foi preparado e suplementado com 10 % (v v⁻¹) de soro fetal bovino, L-glutamina (2 mM), D-glicose (4500 mg L⁻¹), bicarbonato de sódio (2000 mg L⁻¹), HEPES (2380 mg L⁻¹), piruvato de sódio (1100 mg L⁻¹), penicilina (60 mg L⁻¹), gentamicina (40 mg L⁻¹) e estreptomicina (10 mg L⁻¹).

A cultura celular Vero ATCC CCL 81 (fibroblastos de rim de macaco verde africano), foi mantida em meio DMEM suplementado a 37 °C em atmosfera úmida com 5% de CO₂. Preparou-se uma solução contendo 1 x 10⁶ células em 10,0 ml de meio DMEM suplementado. As amostras dos extratos e partições foram dissolvidas em metanol e diluídas com DMEM suplementado para formar uma solução estoque de 640 µg mL⁻¹. A concentração final de metanol da solução estoque não excedeu 3% (v v⁻¹). Para permitir que as células aderissem ao fundo do poço da microplaca, 100 µL de solução de células foram transferidas para cada poço e foi incubado por 6 horas a 37 ° C em uma atmosfera úmida com 5% de CO₂ em ar. Posteriormente, o meio de cultura de cada poço foi retirado e as soluções dos extratos e partições foram adicionadas nas concentrações testadas (512 µg mL⁻¹ a 4 µg mL⁻¹). O volume final de cada poço foi de 100 µL e a quantidade de células presentes em cada poço foi de

1×10^4 . Após preparada, a placa foi incubada por 48 horas a 37 °C em atmosfera úmida com 5% de CO₂ em ar. Em seguida, 10 µL de uma solução de resazurina (3 mM) em tampão fosfato-salino (PBS) foi adicionado (ROLÓN et al., 2006). Mais uma vez, a placa foi incubada nas mesmas condições durante 24 horas e os valores de absorbância foram medidos a 595 nm num espectrofotómetro de microplacas. O controle positivo utilizado foi a anfotericina B, o ensaio foi realizado em triplicata.

A viabilidade celular foi calculada com valores de absorbância em relação ao controle de crescimento. Um gráfico dose-resposta com regressão não linear foi construído para o cálculo da concentração citotóxica (CC₅₀) que é a concentração que representa 50% de viabilidade celular (PILLAY et al., 2007). A partir dos valores de CC₅₀ e os valores de IC₅₀ ou CIM obtido nas atividades biológicas, foi possível calcular o índice de seletividade (IS) de cada amostra através da Equação 9 (CASE et al., 2006).

$$IS = \frac{CC_{50} \text{ (amostra)}}{IC_{50} \text{ ou CIM (amostra)}} \quad \text{Equação 9}$$

4.15 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O ensaio da capacidade antioxidante pelo método ORAC foi realizado em triplicata, os demais foram realizados em duplicata e os dados foram expressos como média ± desvio padrão. A diferença entre os dados obtidos, foi avaliada pelo método da Análise de Variância (ANOVA) e pós-teste de comparação múltipla de Bonferroni. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o GraphPad Prism versão 6.0. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 RENDIMENTO DOS EXTRATOS E EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO

Devido à diversidade química dos compostos presentes no material vegetal, o processo de extração é uma etapa importante para conduzir o isolamento dos constituintes. Existem as técnicas tradicionais de extração como: infusão, decocção,

maceração, refluxo e extração em Soxhlet e existem técnicas modernas de extração que são rápidas, seletivas e utilizam menos solventes como: extração líquida pressurizada, por fluídos supercrítico, extração assistida por micro-ondas, extração assistida por ultrassom e extração de campo elétrico pulsado (PANJA, 2017).

Neste trabalho os extratos foram preparados utilizando a extração por maceração que é uma técnica simples, mas que garante a extração dos compostos sem que sua estrutura seja modificada, pois é realizada em temperatura ambiente e pressão atmosférica. O extrato hexânico (EH) foi obtido inicialmente a fim de remover compostos de natureza apolar como as clorofilas. Em seguida foi obtido o extrato etanólico (EE), o qual foi extraído com etanol que apresenta polaridade intermediária com constante dielétrica (24,30), menor que a da água (78,36), permitindo a extração de substâncias com diferentes polaridades (MEDEIROS; KANIS, 2010). A Tabela 4 mostra o rendimento do EH e EE.

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

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

Pode-se observar que o rendimento do EE foi muito maior que do EH, o que pode ser justificado devido a maior polaridade do etanol. No trabalho de Cunha e outros (2017) não foi realizada a extração prévia com hexano, e o extrato etanólico das folhas foi obtido por maceração em 7 dias, repetindo o procedimento 3 vezes. Nessa metodologia, o rendimento obtido do extrato etanólico foi de 8,2 % que é inferior ao rendimento obtido nesse trabalho (16,5 %) em que o processo de maceração foi realizado por 48 h e repetido 6 vezes.

Os resultados obtidos da extração líquido-líquido a partir do EE (100g) encontram-se na Tabela 5.

Tabela 5- Rendimento das partições obtidas através da extração líquido-líquido do EE das folhas de *C. bakeriana*.

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

A P-B foi a que apresentou maior rendimento, sugerindo a presença de compostos mais polares no extrato. O baixo rendimento da P-D pode ser devido a metodologia de extração utilizada em que grande parte dos compostos apolares foram extraídas pelo EH influenciando a composição da P-D.

5.2 PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA

A fim de identificar as classes de metabolitos presentes nos extratos e partições, foi realizada a prospecção fitoquímica. Como pode ser observado na Tabela 6, os extratos e partições apresentaram forte intensidade quando revelados com Liebermann-Buchard, sulfato cérico e vanilina sulfúrica, indicando a possibilidade de presença de terpenos, esteroides, fenóis, açúcares, taninos, flavonoides e saponinas. A presença de flavonoides foi identificada no EE e nas partições. A presença de antraquinona pode ser evidenciada por uma mancha vermelha na P-D. A presença de alcaloides não foi identificada em nenhuma amostra.

Tabela 6- Prospecção fitoquímica dos extratos e partições das folhas de *Cassia bakeriana*.

Amostras	Flavonoides		Alcaloides		Antraqui- nonas, Antronas, cumarinas	Terpenos, esteroi- des, saponinas, açúca- res, fenóis, taninos, flavonoides		
	NP/ PEG	AlCl ₃	Iodocloro- platinado	Dragen- dorff	KOH	Liebermann Buchard	Sulfato Cérico	Vanilina Sulfú- rica
EH	–	–	–	–	–	+++	+++	+++
EE	++	++	–	–	–	+++	+++	+++
P-D	+++	+++	–	–	++	+++	++	+++
P-AE	+++	+++	–	–	–	+++	+++	+++
P-B	++	++	–	–	–	+++	+++	+++
P-A	++	++	–	–	–	+++	++	+++

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

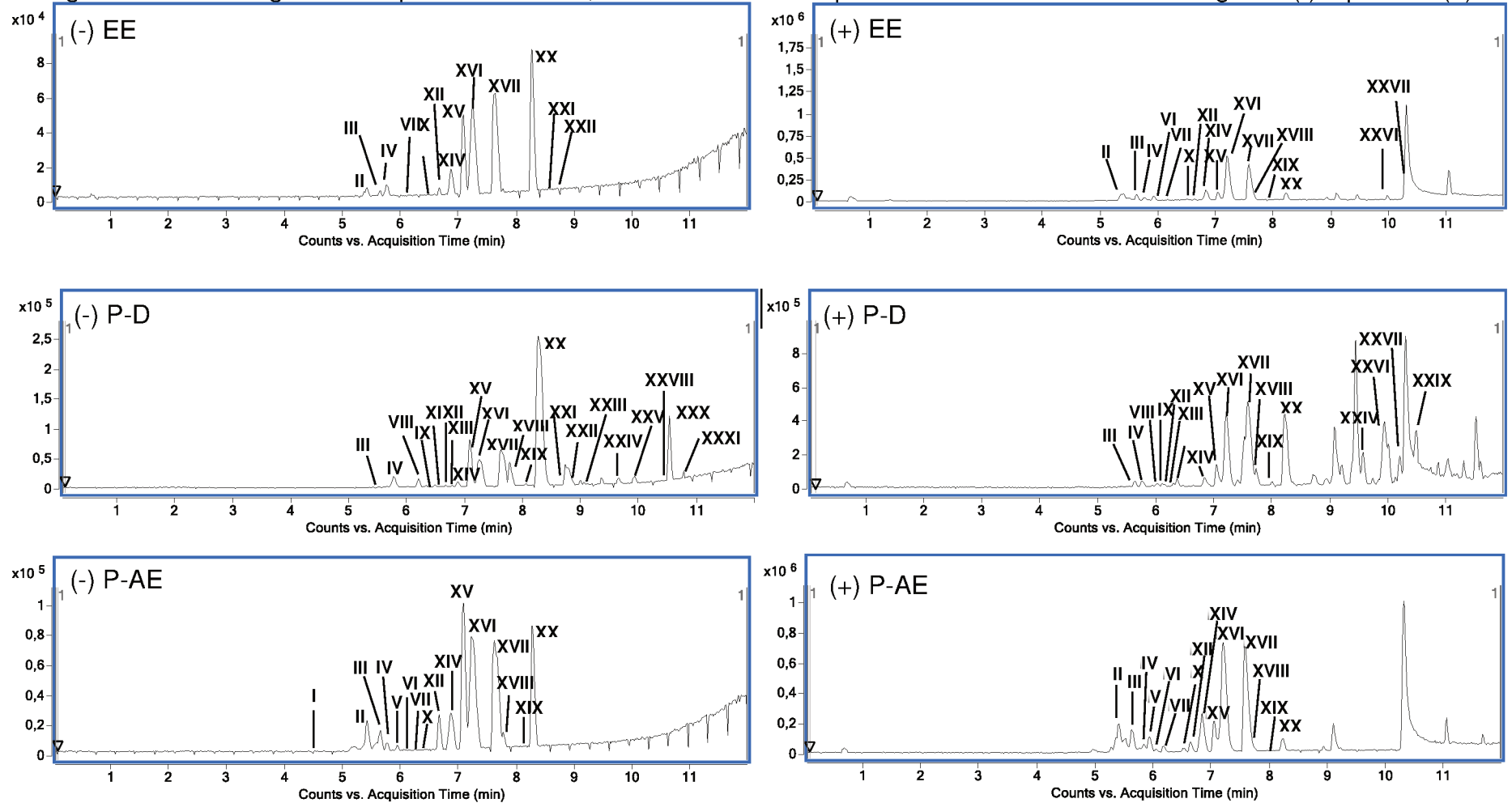
5.3 IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS PRESENTES NO EE, P-D E P-AE.

O EE, P-D e P-AE foram analisadas por CLAE-EM-IES nos modos positivo e negativo para identificação dos constituintes químicos. Essas amostras foram escolhidas por serem as mais ativas nos ensaios biológicos que serão discutidos a partir do tópico 5.4 (p.110). A Figura 26 mostra os cromatogramas de pico base (BPC) obtido do EE, P-D e P-AE nos modos negativo e positivo, e na Tabela 7 encontra-se uma proposta de identificação dos compostos que foi realizada calculando-se a fórmula molecular a partir da massa experimental em alta resolução, o erro em ppm e comparando os espectros de massa EM/EM obtidos, com dados da literatura e da biblioteca online Metlin. Os espectros EM/EM dos compostos encontram-se no Apêndice. As estruturas dos compostos identificados encontram-se na Figura 27.

Observa-se que, alguns compostos identificados na P-D e P-AE e não foram identificados no EE, sugerindo que a presença deles no extrato seja menos evidenciada por ser uma amostra mais complexa com um número maior de compostos, por isso não ionizaram para serem detectados. Após o fracionamento houve a separação desses compostos nas P-D e P-AE que foi maior evidenciada por ser uma amostra com menos compostos. A presença dos ácidos **I** e **IX** foi identificada e quantificada em diferentes partes de cinco espécies de *Cassia* (*C. siamea*, *C. fistula*, *C. occidentalis*, *C. auriculata*, *C. uniflora*) (CHANDRA et al., 2015). Os compostos **II**, **III**, **VI** e **XVII** já foram identificados nas raízes de *C. abbreviata* (SOBEH et al., 2018). O

megastigmano glicosídeo **IV** que foi identificado com um aduto de ácido fórmico e já foi isolado da *C. auriculata* (NAKAMURA et al., 2014a). Os ácido fenólico **XVIII** e **XI**, e o flavonoide **XVIII** foram identificados e quantificados nas folhas de *C. tora* (CHETHANA et al., 2017). Os compostos **VI**, **XVI** e **XX** já foram isolados das folhas de *C. alata* (DUONG et al., 2017). O composto **XIV** foi identificado nas folhas de *C. fistula* (THABIT et al., 2018) e o composto **XV** foi isolado da *C. nodosa* (ILYAS et al., 1995 apud GANAPATY et al., 2002). Os compostos **III**, **IV**, **XIV** e **XVII** também foram isolados das folhas de *C. grandis* (TRINH et al., 2017). A antraquinona **XXIV** já foi isolada das cascas de *C. bakeriana* (CUNHA et al., 2017) e a antraquinona **XXVIII** já foi isolada da *C. nigricans* (AYO; AMUPITAN; ZHAO, 2007). Os esfingolipídios **XXVI** e **XXVII** não foram identificados em espécies de *Cassia* entretanto, uma série de diastereômeros de base esfingóides heterocíclica foram encontradas nas *C. spectabilis* e *C. leptophylla* (PRUETT et al., 2008). Não foram encontrados relatos da ocorrência dos compostos **X**, **XII**, **XIII** e **XIX** em espécies de *Cassia*. Os derivados de ácidos graxos **XXI-XXIII**, **XV**, **XXIX-XXX** também não foram encontrados, mas a ocorrência dessa classe de compostos foi relatada no trabalho de Cunha e outros (2013) na composição do óleo essencial de diferentes partes da *C. bakeriana*. Os ácidos graxos e derivados também já foram identificados nos extratos das espécies: *C. fistula* (BARNABY; REID; WARREN, 2016), *C. tora* (SHUKLA et al., 2018) e *C. abus* (HAMEDDI et al., 2015).

Figura 26- Cromatogramas de pico base do EE, P-D e P-AE obtidos por CLAE-EM-IES nos modos negativo (-) e positivo (+).



Condições CLAE: Coluna C18 (100 mm x 2,1 mm, 2,7 μm); 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).

Fonte: a autora.

Tabela 7- Proposta de identificação dos compostos do EE, P-D e P-AE das folhas de *C. bakeriana*. (continua)

T_R	(m/z) [M - H] ⁻	(m/z) [M + H] ⁺	Erro (ppm) ^d - / +	Fragmentos (m/z) MS/MS - / +	Fórmula molecular	Tentativa de identificação	EE	P-D	P-AE	Referências
4,66	153,0194	–	0,6	10eV: 136, 109 , 108	C ₇ H ₆ O ₄	ácido protocatecuíco (I)			x	(SUN et al., 2007)
5,43	561,1401	563,1562	-0,2/0,5	20eV: 543, 435, 425, 407, 289 , 271, 203, 125/ 20eV: 427, 393, 291, 273, 231, 147, 123, 107	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₁	(epi)afzelequina -(epi)catequina (II)	x		x	(GU et al., 2003, SOUZA et al., 2008, KAJDŽANOSKA; GJAMOVSKI; STEFOVA, 2010, GE et al., 2016)
5,65	289,0715	291,0860	-1,0/-1,0	20eV: 245, 205, 188, 179, 175, 161, 151, 125, 123, 109 /20eV: 259, 228, 233, 219, 207, 180, 161, 147, 139 , 123	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	(±)-(epi) catequina (III)	x	x	x	(SUN et al., 2007, PERESTRELO et al., 2012, PANDEY et al., 2014, ABU-REIDAH et al., 2015b, BEN SAID et al., 2017) Metlin ¹
5,77	431,1924	387,2014	0,2/0,2	20eV: 385, 223, 189, 161, 153 , 149, 125, 119, 113, 101/ 20eV: 373, 255, 223, 207 , 189, 161, 149, 123, 107	C ₁₉ H ₃₀ O ₈	roseosídeo (aduto formiato) (IV)	x	x	x	(SPÍNOLA; PINTO; CASTILHO, 2015)
	465,1376	–	–	20eV: 451, 419, 313, 273 , 255, 229, 171, 137, 103	–	n.i			x	–
5,96	545,1456	547,1598	0,5/-0,2	20eV: 419, 345, 313, 312, 273 , 255, 229, 187, 164, 125, 101/ 20eV: 394, 275, 231, 188, 139, 107	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₀	(epi)afzelequina -(epi)afzelequina (dímero) (V)			x	(GE et al., 2016)
6,06	273,0767	275,0912	-0,4/-0,7	20eV: 255, 229, 205, 187, 169, 137 , 125, 109/ 20eV: 257, 234, 191, 163, 149, 139 , 121, 107	C ₁₅ H ₁₄ O ₅	(epi)afzelequina (VI)	x		x	Metlin
6,19	833,2081	835,2230	0,7/-0,3	20eV: 561, 543, 435, 289 , 271, 245, 164, 125/ 20eV: 563 , 545, 409, 291, 273, 231, 151, 107	C ₄₅ H ₃₈ O ₁₆	epi)afzelequina- (epi)afzelequina -(epi)catequina (VII)	x		x	(GU et al., 2003, SOUZA et al., 2008, GE et al., 2016)
6,20	163,0402	165,0543	0,6/-1,8	10eV: 119 / 10eV: 154, 147 , 135, 120, 109	C ₉ H ₈ O ₃	Ácido <i>p</i> - cumárico (VIII)		x		(SUN et al., 2007, BYSTROM et al., 2008, PLAZONIĆ et al., 2009)

Tabela 7- Proposta de identificação dos compostos do EE, P-D e P-AE das folhas de *C. bakeriana*. (continua)

T _R	(m/z) [M - H] ⁻	(m/z) [M + H] ⁺	Erro (ppm) ^d - / +	Fragmentos (m/z) MS/MS - / +	Fórmula molecular	Tentativa de identificação	EE	P-D	P-AE	Referências
6,34	193,0505	195,0648	-0,5/-2,0	10eV: 178, 149, 134 / 10eV: 177, 153,145, 140, 123, 107	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	ácido ferúlico (IX)		x		(SUN et al., 2007, ABU-REIDAH et al., 2015b, EL-WAKIL et al., 2015, BEN SAID et al., 2017) Metlin
6,36	609,1462	611,1610	0,2/0,5	15eV: 528, 447, 283, 219, 161/ 20eV: 539, 449, 287 , 145	C ₂₇ H ₃₁ O ₁₆	cianina (X)	x		x	(ZHU; ZHANG; LU, 2012, MIZGIER et al., 2016, CHENG et al., 2017) Metlin
6,55	223,0616	–	1,8	10eV: 208, 179, 164 , 149, 138, 121	C ₁₁ H ₁₂ O ₅	ácido sinápico (XI)		x		(SUN et al., 2007) Metlin
6,72	449,1091	451,1234	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 (XII)	x	x	x	(CHEN; LU; ZHAO, 2014, ZHAO et al., 2014, DONG et al., 2017)
6,82	287,0562	289,0709	0,03/0,7	15eV: 259, 243, 201, 177, 151, 125 ,107/ 25eV: 271, 167, 153 ,149,137,121, 109, 107	C ₁₅ H ₁₂ O ₆	deidroxiltaxifolin (eriodictiol) (XIII)		x		(BRITO et al., 2014, ZHAO et al., 2014) Metlin
6,89	463,880	465,1029	-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> - glicosídeo/galac tosídeo (iso- quercetina/hiper osídeo) (XIV)	x	x	x	(KRASTEVA; NIKOLOV, 2008, BRAUNBERGER et al., 2013) Metlin
7,10	433,1150	435,1287	2,3/0,2	20eV: 287, 269 , 259, 179, 152/ 20eV: 289, 271, 243, 153, 129 , 107	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₀	di-hidrokaemp- ferol-3- <i>O</i> - ramnosídeo(em- geletina) (XV)	x	x	x	(ROSSO et al., 2015)
7.22	447,0936	449,1081	0,7/0,6	20eV: 301, 285, 284 , 255, 227,109/ 20eV: 303, 287 , 145, 129	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	canferol- <i>O</i> - glicosídeo/galac tosídeo astraga- lina/trifolina) (XVI)	x	x	x	(PIKULSKI; BRODBELT, 2003, ABU-REIDAH et al., 2015a) Metlin

Tabela 7- Proposta de identificação dos compostos do EE, P-D e P-AE das folhas de *C. bakeriana*. (continua)

T _R	(m/z) [M - H] ⁻	(m/z) [M + H] ⁺	Erro (ppm) ^d - / +	Fragmentos (m/z) MS/MS - / +	Fórmula molecular	Tentativa de identificação	EE	P-D	P-AE	Referências
7,67	431,0992	433,1128	1,8/-0,2	20eV: 285 , 284 , 255, 227/ 20eV: 288, 287 , 129	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	canferol-3- <i>O</i> - ramnosídeo (afzelina) (XVII)	x	x	x	(WOJTANOWSKI; MROCZEK, 2018)
7,7	301,0358	303,0503	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 (XVIII)	x	x	x	(KRASTEVA; NIKOLOV, 2008, WANG et al., 2008, ABU-REIDAH et al., 2015b) Metlin
8,10	315,0515	317,0655	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) (XIX)	x	x	x	(JUSTESEN, 2001, PETROVICIU et al., 2014) Metlin
8,34	285,0407	287,0552	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	canferol (XX)	x	x	x	(SUN et al., 2007, KRASTEVA; NIKOLOV, 2008, WANG et al., 2008, ABU-REIDAH et al., 2015a, PANDEY et al., 2015) Metlin
8,73	-	346,2584	-	20eV: 293, 195, 177, 175, 157, 155 , 149, 125, 109	-	n.i	x	x		-
8,75	227,1285	-	-1,7	10eV: 183 , 165	C ₁₂ H ₂₀ O ₄	ácido traumático (XXI)	x	x		(GÓMEZ-ROMERO; SEGURA- CARRETERO; FERNÁNDEZ- GUTIÉRREZ, 2010) Metlin
8,84	327,2178	-	0,3	20eV: 229, 211, 183, 165, 171 , 151, 127	C ₁₈ H ₃₂ O ₅	ácido tri-hidroxi- octadecadienoí- co (XXII)	x	x		(GÓMEZ-ROMERO; SEGURA- CARRETERO; FERNÁNDEZ- GUTIÉRREZ, 2010)
8,92	-	387,1800	-	15eV: 121, 105	-	n.i	x		x	-
8,94	-	840,3953	-	30eV: 686, 550 , 278, 107	-	n.i	x	x		-
	836,3638	838,3812	-	10eV: 682, 546, 400, 289 , 245, 137/ 30eV: 684, 548, 285	-	n.i	x	x	x	-
9,07	329,2335	-	0,6	20eV: 229, 211, 171 , 139, 100,	C ₁₈ H ₃₄ O ₅	ácido hidroxiocta- decanodioico (XXIII)		x		(GÓMEZ-ROMERO; SEGURA- CARRETERO; FERNÁNDEZ- GUTIÉRREZ, 2010)
9,21	-	822,3854	-	30eV: 668, 548 , 475, 402, 187	-	n.i	x	x	x	-

Tabela 7- Proposta de identificação dos compostos do EE, P-D e P-AE das folhas de *C. bakeriana*. (continua)

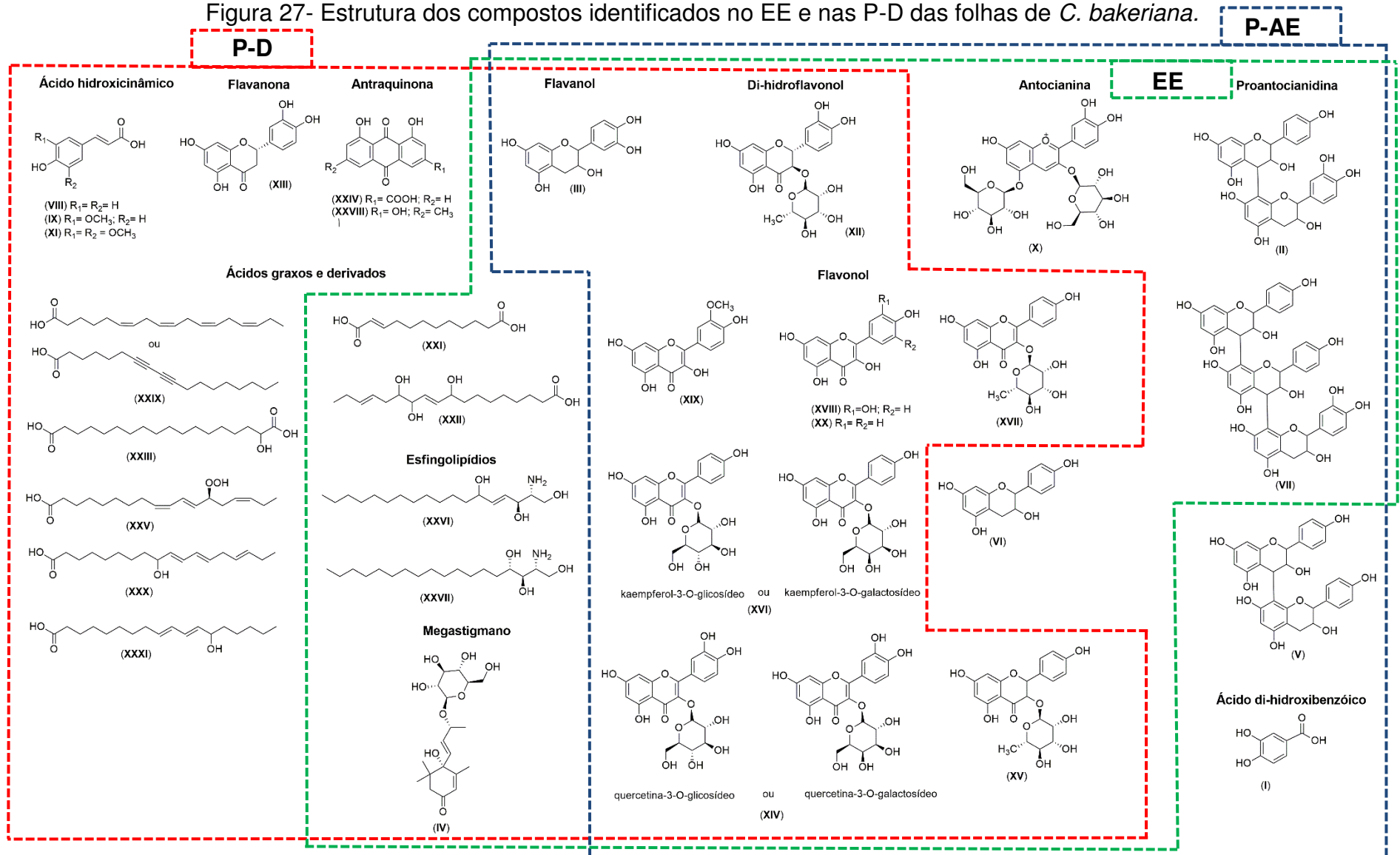
T _R	(m/z) [M - H] ⁻	(m/z) [M + H] ⁺	Erro (ppm) ^d - / +	Fragmentos (m/z) MS/MS - / +	Fórmula molecular	Tentativa de identificação	EE	P-D	P-AE	Referências
9,37	564,2969	566,3142	-	20eV: 301, 289 , 245,161,100 30eV: 414	-	n.i	x	x	x	-
9,57	-	550,3178	-	30eV: 426, 414 , 386, 276, 139,	-	n.i		x		-
9,65	283,0252	285,0397	1,4/1,0	20eV: 239 , 211, 167, 183/ 20eV: 267, 251, 241 , 223, 147, 121	C ₁₅ H ₈ O ₆	reína (XXIV)		x		(CUNHA et al., 2017) Metlin
9,72	-	594,3426		20eV: 561, 442 , 267, 123	-	n.i		x		-
9,95	309,2074	-	1,0	20eV: 291, 247, 211, 197 , 171, 111	C ₁₈ H ₃₀ O ₄	ácido 13(S)- hidroperoxilino- léico (XXV)		x		(ABU-REIDAH et al., 2015b)
9,97	-	316,2849	1,0	20eV: 298, 280 , 250	C ₁₈ H ₃₇ NO ₃	6-hidroxies- fingosina (isômero) (XXVI)	x	x		Metlin
10,19		318,3002	-0,3	20eV: 300, 282 , 252	C ₁₈ H ₃₉ NO ₃	fitoesfingosina (XXVII)	x	x		Metlin
10,32	-	267,1727	-	15eV: 211, 155 , 100	-	n.i	x	x	x	-
10,40	269,0450	-	-1,8	20eV: 255, 241, 225 , 197, 181, 183, 139	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	emodina (XXVIII)		x		(YE et al., 2007, RAFAËLLY et al., 2008, SONG et al., 2008) Metlin
10,51	-	277,2162	0,0	20eV: 107, 121, 135 , 149	C ₁₈ H ₂₈ O ₂	ácido estearidó- nico ou ácido octadecadii- noico (XXIX)		x		Metlin
10,53	293,2125	-	1,0	15eV: 275 , 223, 195, 171,121	C ₁₈ H ₃₀ O ₃	ácido hidroxi- octadecatrieno- ico (XXX)		x		(GÓMEZ-ROMERO; SEGURA-CARRETERO; FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, 2010) Metlin
10,78	295,2275	-	-1,3	15eV: 277 , 195, 171 , 135,113	C ₁₈ H ₃₂ O ₃	ácido 13-hidroxi- 9,11-octadeca- dienoico (XXXI)		x		(GÓMEZ-ROMERO; SEGURA-CARRETERO; FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, 2010, ABU-REIDAH et al., 2015b) Metlin

Tabela 7- Proposta de identificação dos compostos do EE, P-D e P-AE das folhas de *C. bakeriana*. (conclusão)

T _R	(m/z) [M - H] ⁻	(m/z) [M + H] ⁺	Erro (ppm) ^d - / +	Fragmentos (m/z) MS/MS - / +	Fórmula molecular	Tentativa de identificação	EE	P-D	P-AE	Referências
11,00	–	363,2203	–	20eV: 291, 195, 177, 105	–	n.i	x	x	x	–
11,32	–	520,3400	–	20eV: 502, 184,104	–	n.i		x		–
11,52	–	496,3413	–	15eV: 478, 184,104	–	n.i		x		–
11,60	–	536,4159	–	20eV: 501 , 427, 409, 285, 193, 130	–	n.i		x		–

Nota: Tr: Tempo de retenção (min); n.i: não identificado; –: não obtido; x: indicada que o composto está presente na respectiva amostra. ¹Biblioteca online disponível em: https://metlin.scripps.edu/landing_page.php?pgcontent=mainPage

Figura 27- Estrutura dos compostos identificados no EE e nas P-D das folhas de *C. bakeriana*.



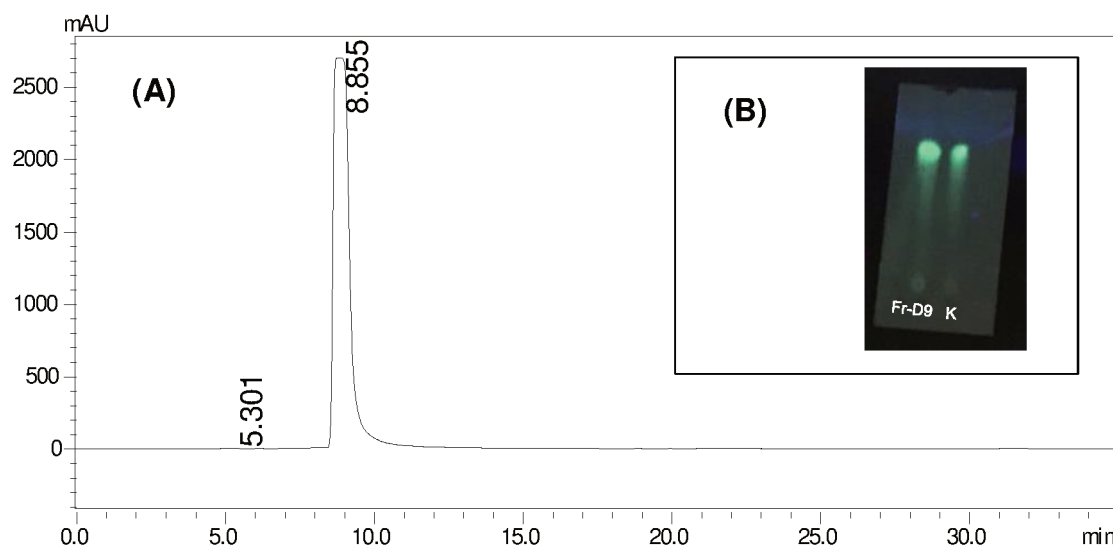
Fonte: a autora

5.3.1 Identificação do composto isolado da Fr-D9 (canferol **XX**)

A P-D foi escolhida para o fracionamento por CLAE semi-preparativo porque ela foi uma das amostras mais promissoras nos ensaios biológicos que serão apresentados a partir do tópico 5.4 (p. 110). O perfil das frações isoladas da P-D foi avaliado por CLAE-DAD-ELSD e aquelas que estavam puras, apresentando apenas um sinal no cromatograma, foram analisadas por CLAE-EM e RMN para caracterização do composto presente, essas frações foram a Fr-D9 e Fr-D6. As demais frações, Fr-D0 a Fr-D5, Fr-D7 e Fr-D8 (Figura 26, p. 82) foram analisadas por CLAE-EM e os espectros mostraram uma mistura de compostos que foram previamente identificados na P-D. As frações Fr-D10 a Fr-D15 apresentaram estarem impuras quando analisadas por CLAE-DAD-ELSD sem possibilidades de tentativa de isolamento de mais algum composto presente na P-D.

Inicialmente foi analisada a Fr-D9, o cromatograma apresentou apenas um sinal intenso em 366 nm com tempo de retenção (T_R) em 8,8 mim (Figura 28-A) que foi atribuído ao composto canferol (**XX**) (Figura 29).

Figura 28- (A) Cromatograma da Fr-D9 obtido por CLAE-DAD em 366nm; (B): CCD da Fr-D9.



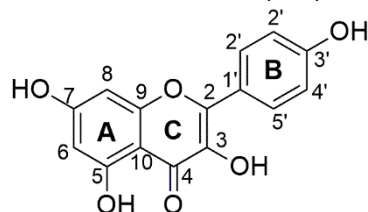
Condições CLAE-DAD: Coluna analítica C₁₈; gradiente metanol:água 60-100% (15mim), 100% de metanol (10 mim), 100-60% de metanol (5 mim) e 60% de metanol (5 mim); fluxo 1mL mim⁻¹; volume de injeção 50 µL.

Fonte: a autora.

A análise por CCD também mostrou apenas uma mancha verde fluorescente em 365 nm com fator de retenção $R_f = 0,73$ quando a cromatoplaça foi eluída no sistema

acetato de etila:metanol (9,5:0,5) e revelada com NP/PEG. O padrão de canferol foi aplicado e eluído junto com a Fr-D9 como mostra a (Figura 28-B).

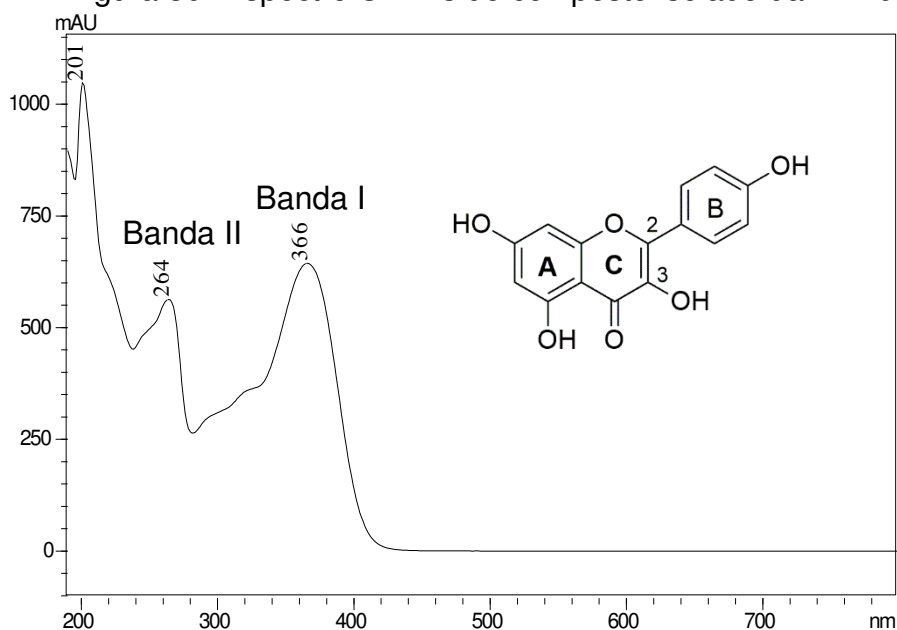
Figura 29- Estrutura do canferol (XX) isolado na Fr-D9.



Fonte: a autora.

Através da CLAE-DAD foi possível obter o perfil do espectro UV-Vis da Fr-D9 (Figura 30) que é característico de flavonoides. Esses compostos apresentam uma banda de absorção máxima em torno de 240-290 nm (Banda II) que é mais afetada pela conjugação do anel A e seu padrão de substituição. Alguns apresentam outra banda de absorbância máxima em torno de 300-550 nm (Banda I) presente em flavonoides onde os anéis B e C são conjugados através da ligação dupla entre C-2-C-3 (VIHAKAS, 2014). O perfil do espectro UV-Vis da Fr-D9 mostrou uma banda em 264 nm e outra em 366 nm evidenciando a presença de um flavonoide conjugado.

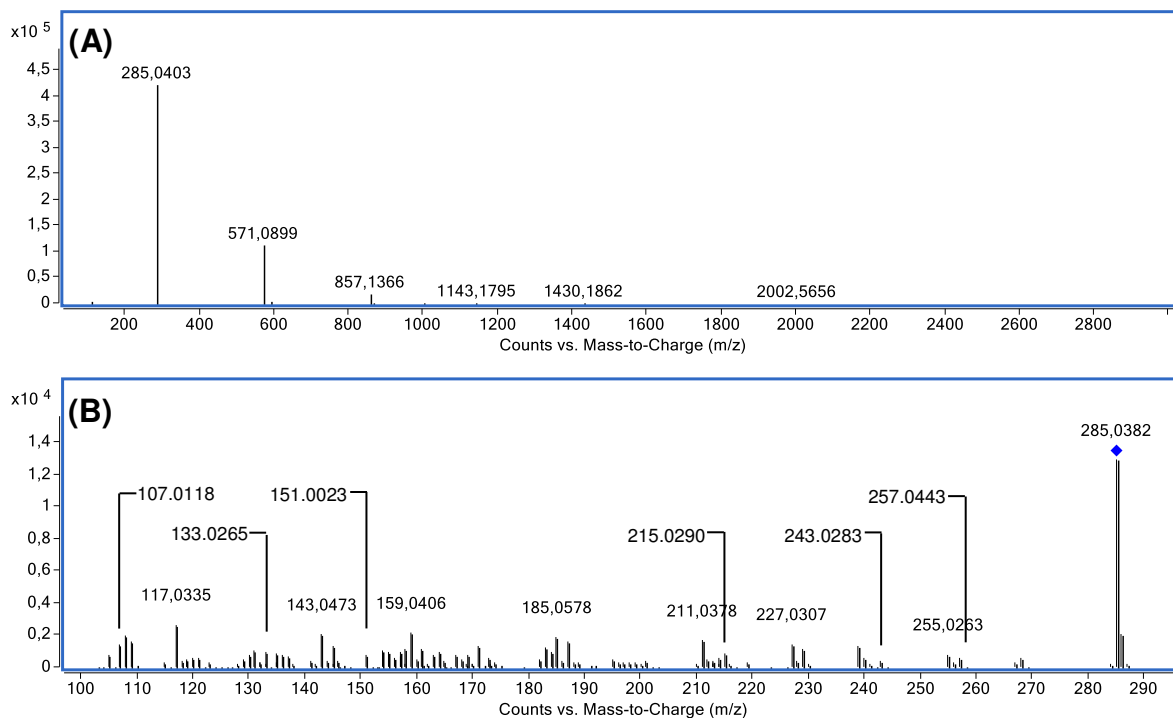
Figura 30- Espectro UV-Vis do composto isolado da Fr-D9.



Fonte: a autora.

A Fr-D9 foi submetida a CLAE-EM-IES em alta resolução no modo negativo. No espectro obtido foi possível verificar o íon molecular do composto isolado m/z 285,0403 (Δ 0,7 ppm, $C_{15}H_{10}O_6$) e o íon m/z 571,0899 referente ao seu respectivo *cluster* (Figura 31-A). Através do massas sequencial do íon m/z 285 $[M - H]^-$ foi possível obter o espectro de massa em 25eV da Fr-D9 (Figura 31-B).

Figura 31- (A) (-)-EM-ESI alta resolução da Fr-D9; (B) (-)-EM/EM-ESI 25eV da FR-D9



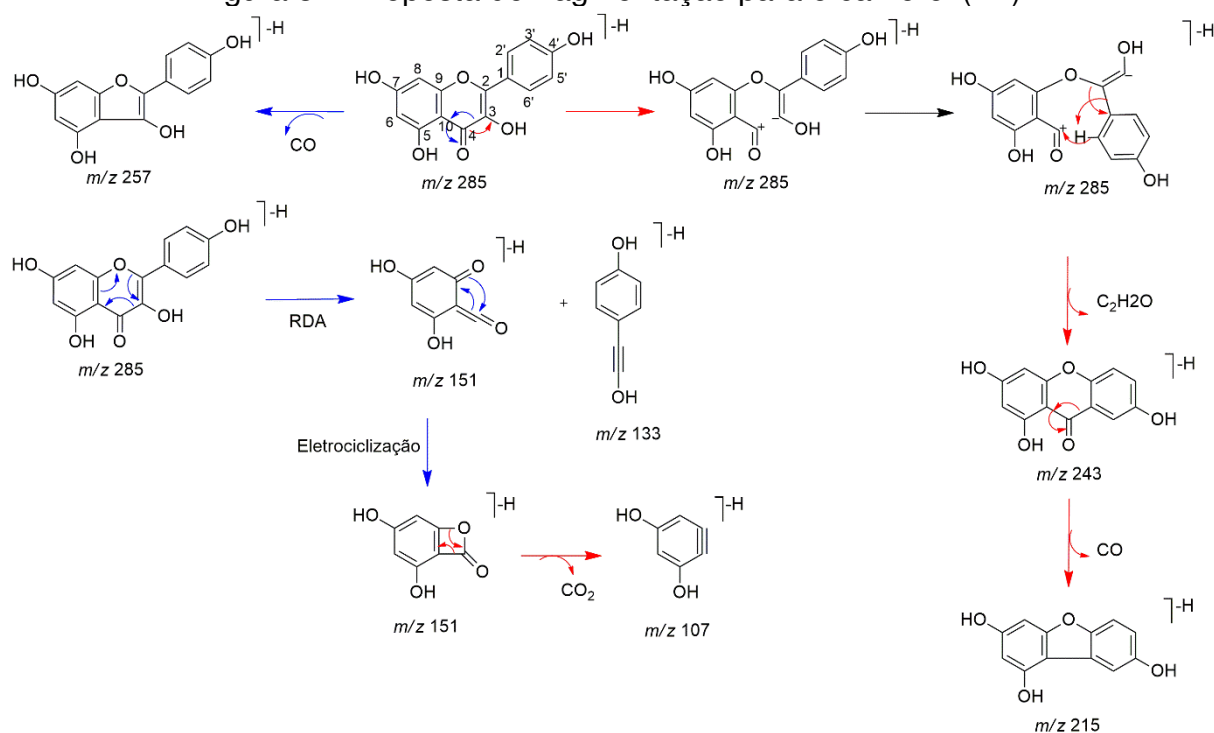
Fonte: a autora

O espectro EM/EM do m/z 285 $[M - H]^-$ apresentou mais de 60 fragmentos com baixa intensidade, que corrobora com espectro do canferol apresentado por March e Miao (2004). Na Figura 32 está representada uma proposta para justificar a formação de alguns desses fragmentos.

O íon fragmento de m/z 257 é formado através da eliminação neutra de 28 u referente ao CO, que ocorre através da clivagem heterolítica da ligação entre C3 e C4. Para formação do fragmento m/z 243, inicialmente ocorre o rompimento da ligação entre C3-C4 que permite abertura do anel C, a ligação simples do C2 pode ser rotacionada obtendo uma conformação espacial favorável para a condensação dos três anéis e eliminação de 42 u referente ao C_2H_2O . O íon fragmento m/z 215 pode ser justificado pela perda de 28u do CO, a partir do fragmento m/z 243 (MARCH; MIAO, 2004). A clivagem do anel C pelo mecanismo retro Diels-Alder (RDA), levou a

formação dos fragmentos de m/z 151, quando a carga negativa estiver no anel A e m/z 133 quando a carga se encontra na hidroxila do anel B. O íon m/z 151 sofre uma eletrociclização formando uma lactona que dá origem ao fragmento m/z 107 (benzino) após a perda de 44 u referente ao CO_2 (FABRE et al., 2001, MCNAB et al., 2009). A estrutura eletrônica do benzino se assemelha a de um alcino fortemente distorcido. A ligação tripla no benzino usa átomos de carbono hibridizado sp^2 e tem uma ligação π formada pela sobreposição p-p e outra ligação π constituída pela sobreposição $\text{sp}^2\text{-sp}^2$, que é fraca e está localizada no plano do anel (MCMURRY, 2005).

Figura 32- Proposta de fragmentação para o canferol (XII).

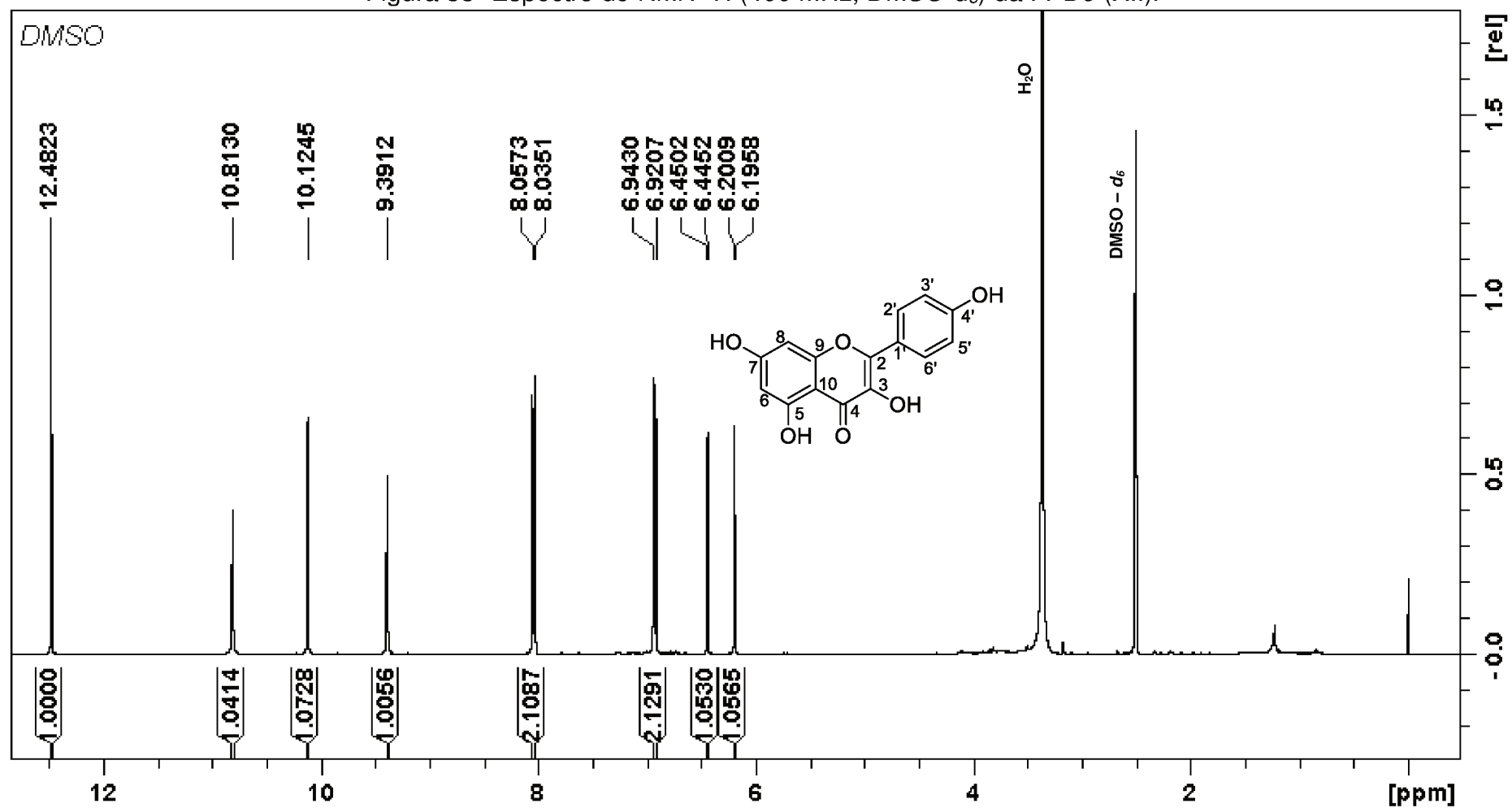


Fonte: a autora.

A Fr-D9, um pó de coloração amarela, foi submetida a análise por RMN, que permitiu identificar os sinais que caracterizaram o composto isolado (11,0 mg) como sendo o canferol (**XX**) (Figura 29, p. 90). O espectro de RMN de ^1H (Figura 33) mostrou 4 sinais de simples referentes aos H das hidroxilas ligadas ao anel aromático. O simpleto com deslocamento químico (δ) em 12,4 é referente ao OH-5 que faz ligação de hidrogênio com o oxigênio da carbonila C-4, por isso é o mais desblindado. O simpleto em δ 9,39 é referente ao OH-3 que é próton mais blindado, pois não entra em ressonância com a carbonila C-4. A partir do mapa de contorno HMBC (Figura 34)

foi possível evidenciar que o OH-3 está correlacionado com o carbono da carbonila C-4, C-3 e C-2. Não foi possível definir pelo experimento HMBC qual dos simpletos em δ 10,81 e δ 10,12 são da OH-7 e OH-4'. Mas pode-se sugerir que o δ 10,12 um pouco mais blindado seja referente ao OH-7 devido à maior densidade de elétrons no anel A, e o δ 10,81 seria da OH-4'.

A ampliação da região do RMN de ^1H na região dos aromáticos mostrou quatro sinais, sendo dois deles integrando para 2 H sugerindo um total de 6 H aromáticos para o composto (**XX**) (Figura 35). O duplete em δ 8,04 com constante de acoplamento $J = 8,9$ Hz é característico do acoplamento em *orto* dos H-2' e H-6'. O duplete em δ 6,93 também apresentou constante de acoplamento em *orto* $J = 8,9$ Hz que é referente aos H-3' e H-5'. Os outros dois dupletos em δ 6,44 e δ 6,19 apresentaram a mesma constante de acoplamento ($J = 2,0$ Hz) referentes ao acoplamento em *meta* dos H-8 e H-6, respectivamente. Através das correlações do mapa de contorno HMBC foi possível atribuir a posição dos H na região dos aromáticos (Figura 36). As correlações entre C-6 e C-9 com o H-8; C-8 e C-5 com H-6 foram importantes para definir a posição do H-8 e H-6. Na Tabela 8 estão representadas as atribuições de deslocamentos químicos dos hidrogênios da Fr-D9 comparados com o canferol (**XX**).

Figura 33- Espectro de RMN ^1H (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) da Fr-D9 (XII).

Nota: Os deslocamentos químicos foram estabelecidos em relação ao padrão interno TMS (δ 0,00). O sinal em δ 3,3 é referente à presença de H_2O na amostra e o sinal em δ 2,5 corresponde à impureza de ^1H em $\text{DMSO-}d_6$.

Fonte: a autora.

Figura 34- Mapa de contorno HMBC (DMSO-d₆) ampliado da região do OH-3.

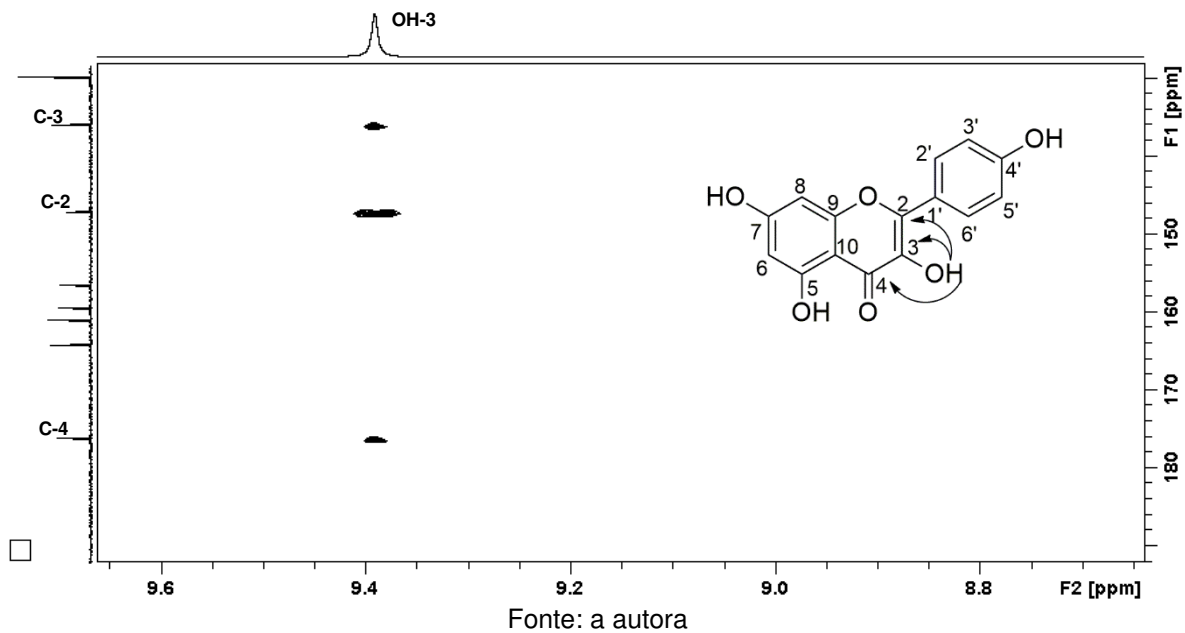


Figura 35- Espectro RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) ampliado na região dos aromáticos.

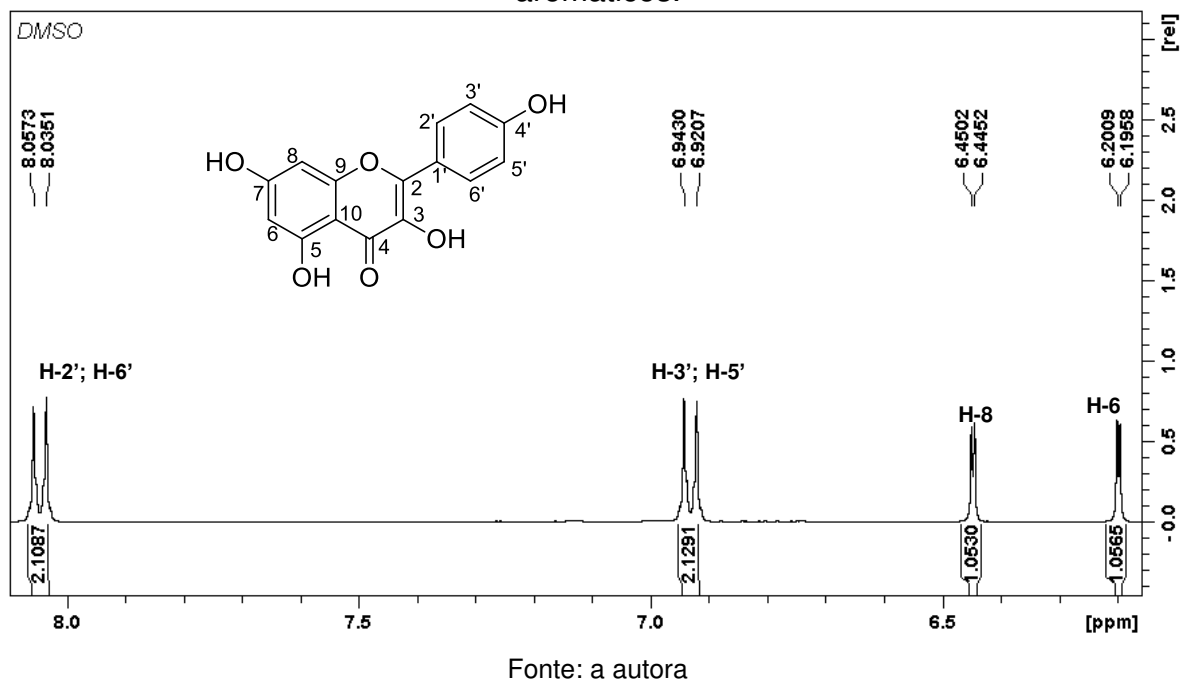
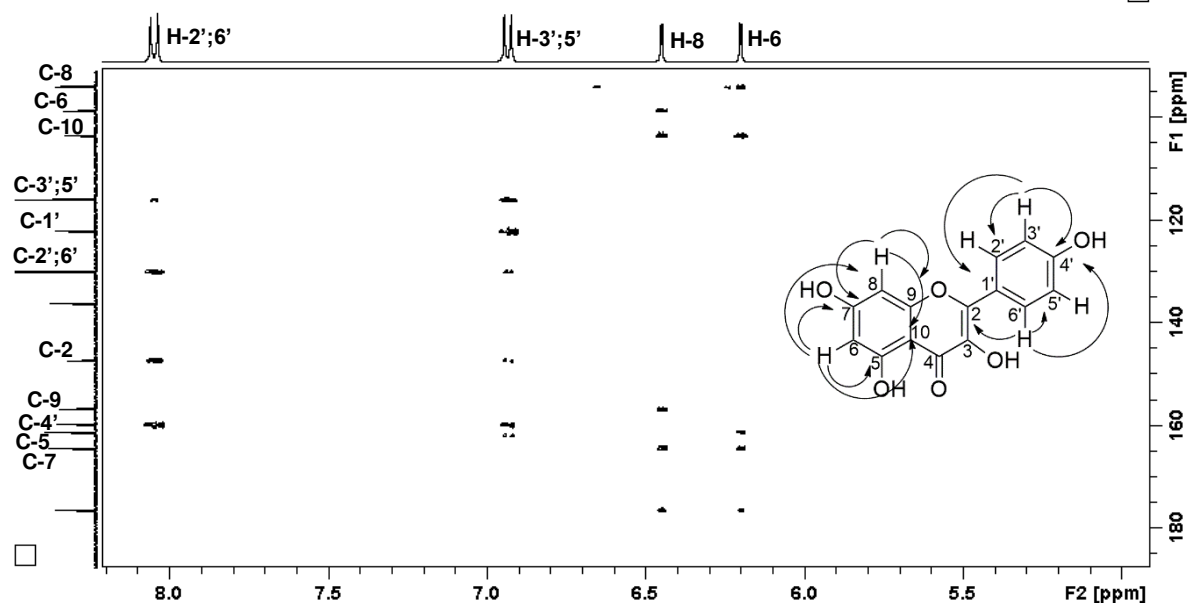


Figura 36- Mapa de contorno HMBC da Fr-D9 e estrutura do canferol (XX) com as respectivas correlações.



Fonte: a autora

Tabela 8- Sinais do RMN de ^1H da Fr-D9 comparados com o canferol.

Posição	RMN ^1H 400 MHz (DMSO- d_6) Fr-D9	(PIZZOLATTI et al., 2003)	(MOURA; VILEGA; SANTOS, 2011) RMN ^1H 500 MHz (DMSO- d_6) canferol
	δ_{H} ; mult ^a (J em Hz)	RMN ^1H 600 MHz (DMSO- d_6) canferol δ_{H} ; mult (J em Hz)	δ_{H} ; mult (J em Hz)
H-6	6,19; d (2,0)	6,27; d (1,9)	6,20; d (2,0)
H-8	6,44; d (2,0)	6,52; d (1,9)	6,44; d (2,0)
H-2';6'	8,04; d (8,9)	8,12; d (8,8)	8,05; d (8,5)
H3';5'	6,93; d (8,9)	6,99; d (8,8)	6,94; d (8,5)
OH-3	9,39; s	-	-
OH-5	12,48; s	-	-
OH-4'	10,81; s (ou 10,12)	12,12 (sl)	-
OH-7	10,12; s (ou 10,81)	-	-

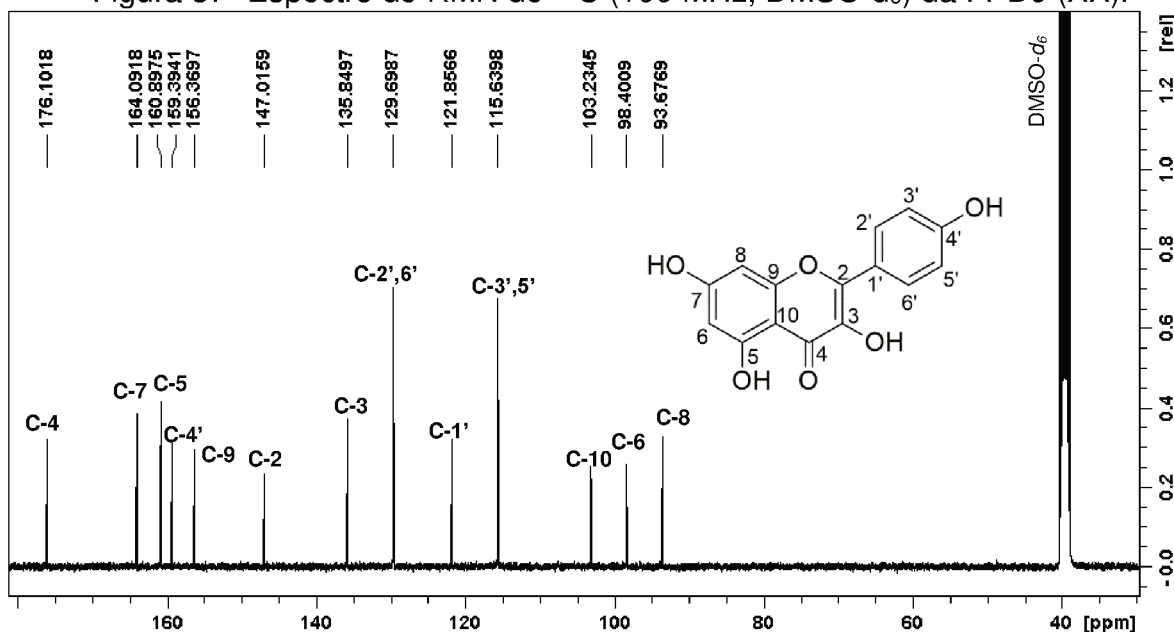
Nota: ^amultiplicidade dos sinais: s = simpleto; sl = simpleto largo; d = dupleto.

O RMN de ^{13}C apresentou 13 sinais, sendo dois de maior intensidade sugerindo a presença de carbonos equivalentes (Figura 37). Através das correlações do mapa de contorto HSQC (Figura 38) foi possível atribuir os hidrogênios e carbonos que estão diretamente ligados. O C-8 em δ 93,67 está correlacionado com H-8 (δ 6,44) e o C-6 em δ 98,40 está correlacionado com H-6 (δ 6,19). O δ 129,69 é referente aos C-2' e

C-6' que estão correlacionados com H-2' e H-6' (δ 8,04) e o δ 115,63 referente aos C-3' e C-5' estão correlacionados com H-3' e H-5' (δ 6,93).

Através do mapa de contorno HMBC (Figura 36, p. 96) foi possível atribuir a posição dos carbonos que não estão diretamente ligados a hidrogênios e assim confirmar que o composto isolado na Fr-D9 é o canferol (**XX**). Na Tabela 9 estão representados os sinais de carbono da Fr-D9, as correlações com os mapas de contorno HSQC e HMBC e a comparação com o composto **XX**.

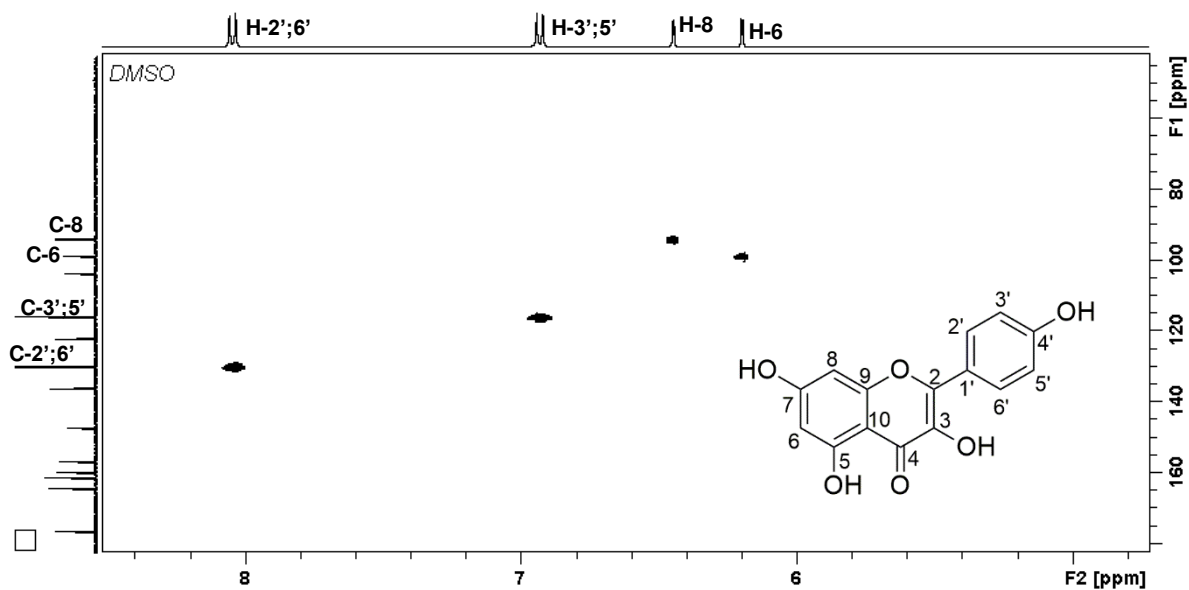
Figura 37- Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) da Fr-D9 (**XX**).



Nota: O sinal em δ 39,7 é referente ao solvente DMSO- d_6 .

Fonte: a autora

Figura 38- Mapa de contorno HSQC ampliado da Fr-D9 (XX).

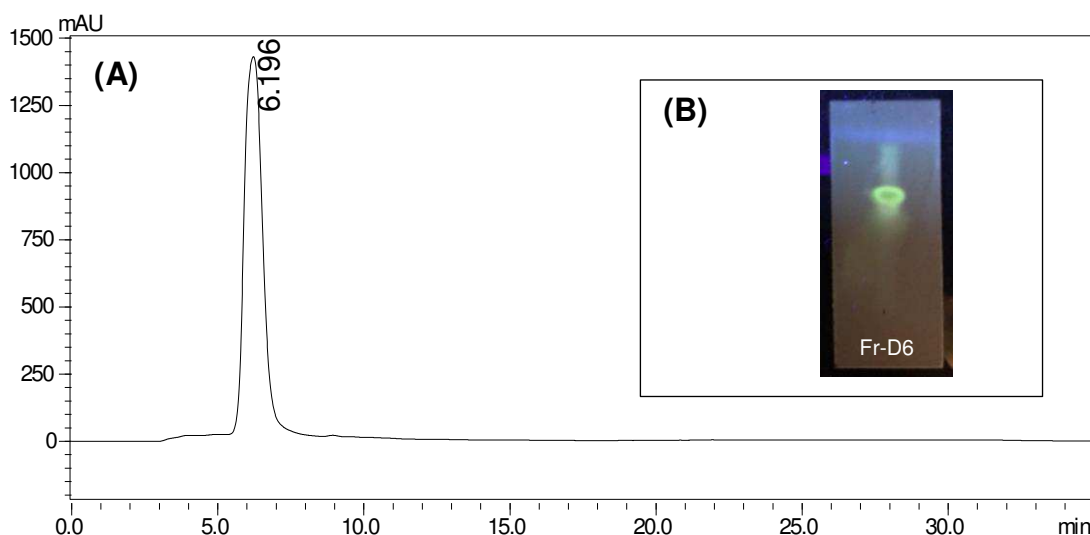
Tabela 9- Sinais de RMN do ^{13}C , correlação com ^1H e comparação com o canferol (XX).

Posição	RMN ^{13}C 100 MHz, (DMSO- d_6) Fr-D9 δ	HSQC	HMBC	(PIZZOLATTI et al., 2003) RMN ^{13}C 150 MHz, (DMSO- d_6) canferol δ	(MOURA; VILEGA; SANTOS, 2011) RMN ^{13}C 125 MHz, (DMSO- d_6) canferol δ
C-2	147,01	-	H-2';6' H-3';5'	147,05	147,2
C-3	135,84	-	-	136,68	-
C-4	176,10	-	H-8;6	176,62	-
C-5	160,89	-	H-6	162,31	-
C-6	98,40	H-6	H-8	99,19	99,9
C-7	164,09	-	H-8;6	165,09	164,2
C-8	93,67	H-8	H-6	94,54	94,0
C-9	156,36	-	H-8	157,83	156,2
C-10	103,23	-	H-6;8	104,16	103,0
C-1'	121,85	-	H-3';5'	123,36	122,0
C-2';6'	129,69	H-2';6'	H-3';5'	130,49	130,0
C-3';5'	115,63	H-3';5'	H-2';6'	116,35	115,0
C-4'	159,39	-	H-2';6' H-3';5'	160,02	159,0

5.3.2 Identificação do composto isolado da Fr-D6 (canferol-3-O-ramnosídeo XVII)

A Fr-D6 também apresentou apenas um sinal intenso com tempo de retenção em 6,19 mim, quando analisada por CLAE-DAD em 266 nm (Figura 39-A), atribuído ao composto canferol-3-O-ramnosídeo (Figura 40). A análise por CCD mostrou apenas uma mancha verde fluorescente em 365 nm com Rf= 0,63 quando a cromatoplaça foi eluída no sistema acetato de etila:metanol:água 100:15:10 e revelada com NP/PEG (Figura 39-B).

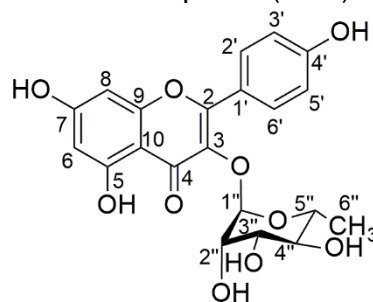
Figura 39- (A) Cromatograma da Fr-D6 obtido por CLAE-DAD em 266; (B) CCD da Fr-D6.



Condições CLAE: Coluna analítica C₁₈; gradiente metanol:água 60-100% (15mim), 100% de metanol (10 mim), 100-60% de metanol (5 mim) e 60% de metanol (5 mim); fluxo 1mL mim⁻¹; volume de injeção 50 μL.

Fonte: a autora.

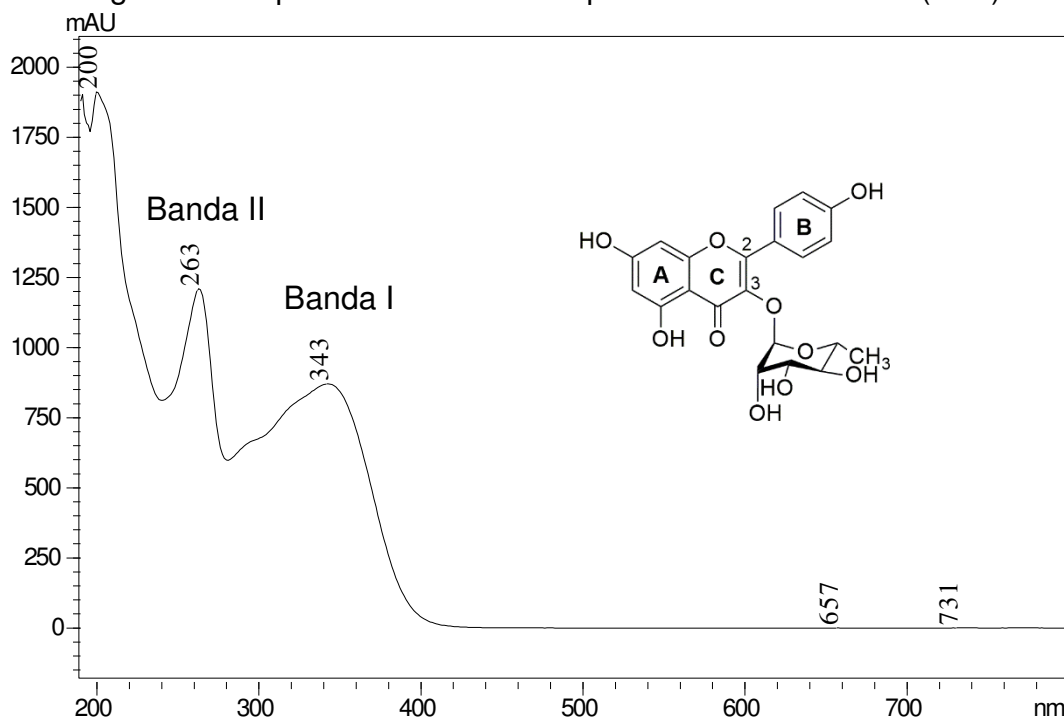
Figura 40- Estrutura do composto (XVII) isolado da Fr-D6.



Fonte: a autora.

O perfil do espectro UV-Vis da Fr-D6 (Figura 41) também apresentou duas bandas de absorção, uma em 263 nm (Banda II) e uma em 343 nm (Banda I) indicando a presença de outro flavonoide, onde os anéis B e C são conjugados através da ligação dupla entre C2-C3.

Figura 41- Espectro UV-Vis do composto isolado da Fr-D9 (XVII).



Fonte: a autora.

O espectro em alta resolução no modo negativo da Fr-D6 (Figura 42-A) mostra o íon molecular do composto isolado m/z 431,0980 e o íon m/z 863,2023 referente ao seu respectivo *cluster*. O composto isolado (3,5 mg) possui coloração amarela escura e foi identificado como canferol-3-*O*-ramnosídeo (**XVII**), também conhecido como afzelina ($C_{21}H_{20}O_{10}$), com erro de -0,93 ppm. Através do EM/EM do íon $[M - H]^-$ m/z 431 foi possível obter o espectro de massas em 20 eV (Figura 42-B). Os íons fragmentos m/z 285 e 284 de maiores intensidades no espectro foram importantes para identificar o glicosídeo e a aglicona. Eles são formados a partir da clivagem heterolítica e homolítica da ligação entre o carbono anomérico C1'' da ramnose e o oxigênio da aglicona respectivamente, (WOJTANOWSKI; MROCZEK, 2018) como mostra a proposta de fragmentação na Figura 43.

Figura 42- (A) (-)-EM-ESI alta resolução da Fr-D6; (B) (-)-EM/EM-ESI 20eV da Fr-D6.

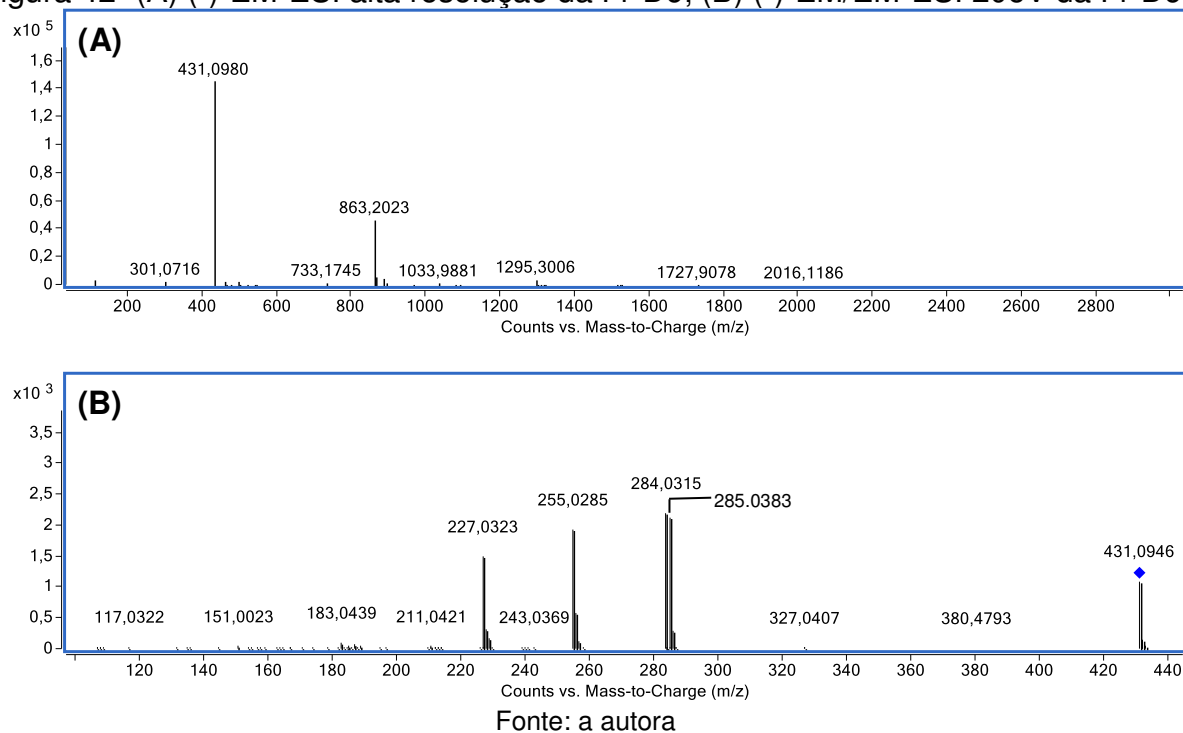
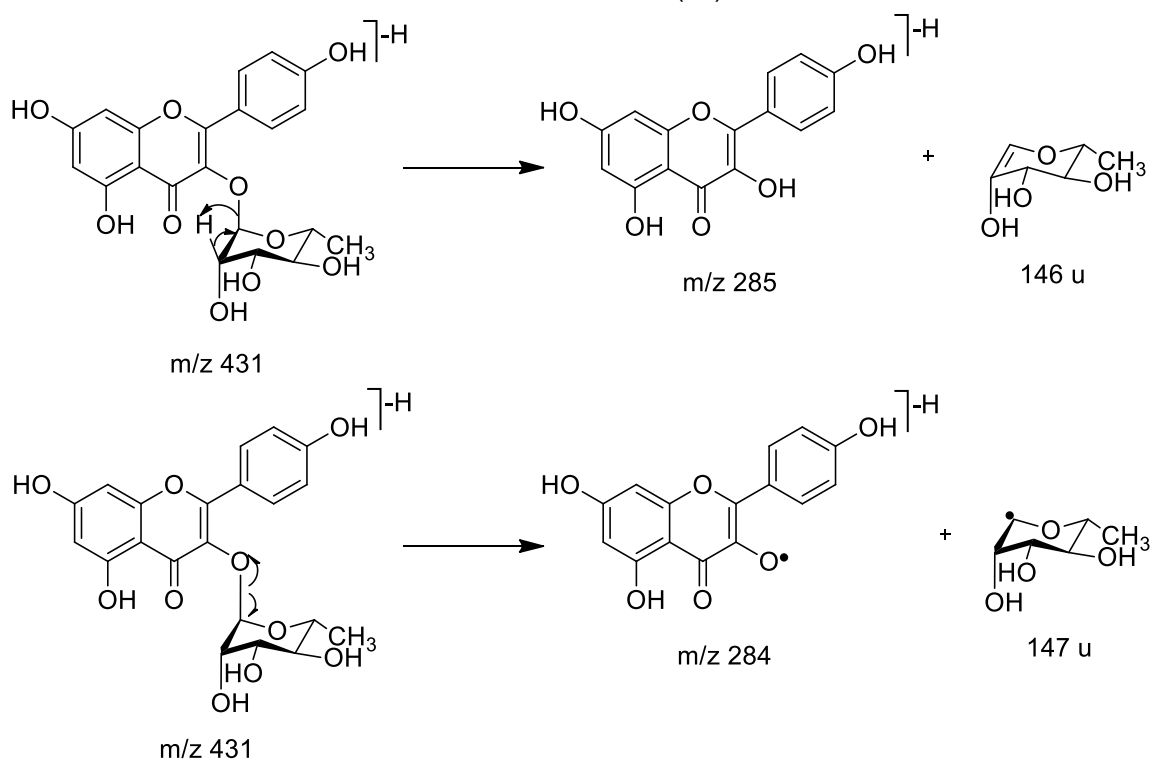
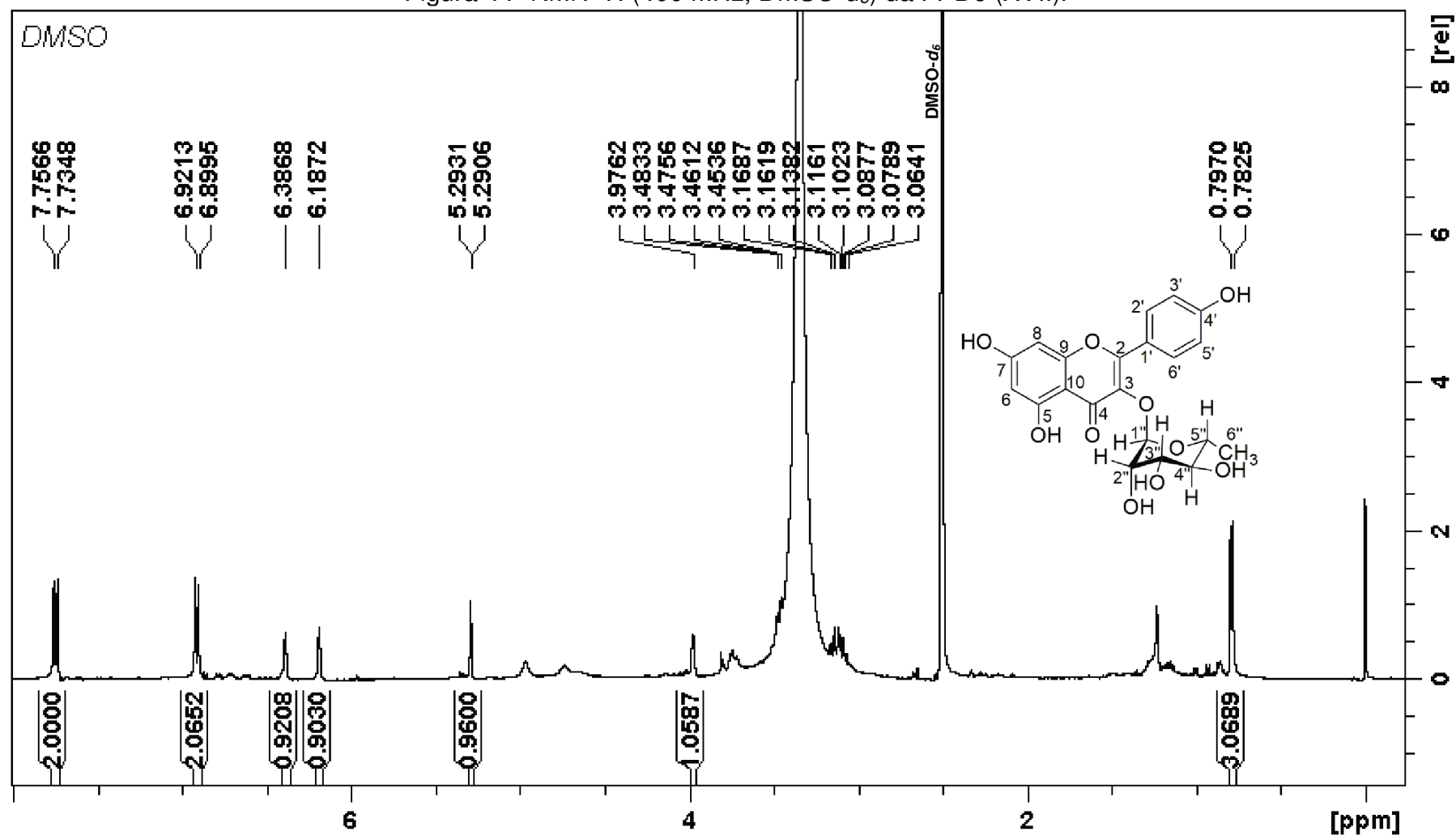


Figura 43- Proposta de fragmentação para os íons m/z 285 e 284 do composto isolado da Fr-D6 (IX).



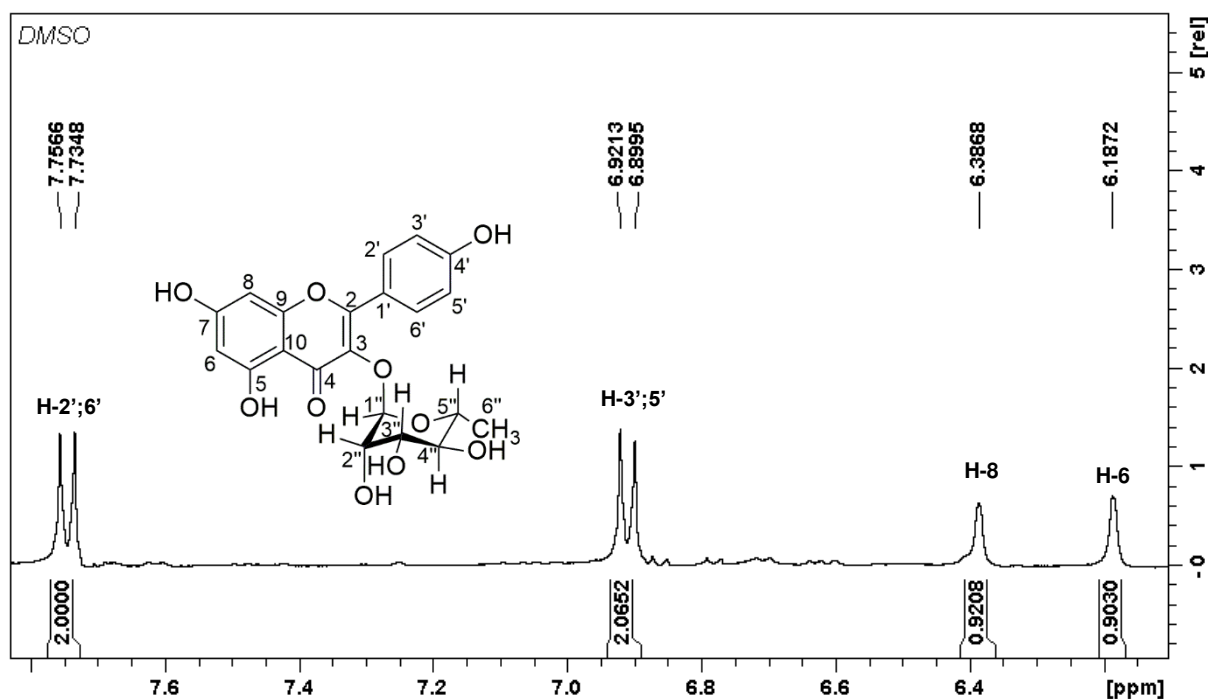
Fonte: a autora.

A análise por RMN da Fr-D6 permitiu identificar os sinais que caracterizaram o composto isolado como sendo canferol-3-*O*-ramnosídeo (**XVII**). O RMN de ^1H (Figura 44) apresentou 4 sinais na região dos aromáticos, como pode ser visto a ampliação na Figura 45. O duplete em δ 7,74, com $J = 8,72$ Hz, é característico do acoplamento em *orto* do H-2' e H-6'. O outro duplete em δ 6,91 com a mesma constante ($J = 8,72$ Hz) é referente ao acoplamento em *orto* dos H-3' e H-5'. Os dois simpletos largos em δ 6,38 e 6,18 são referentes aos H-8 e H-6, respectivamente. A posição dos H foi estabelecida a partir das correlações do mapa de contorno HSQC (Figura 46).

Figura 44- RMN ^1H (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) da Fr-D6 (XVII).

Nota: Os deslocamentos químicos foram estabelecidos em relação ao padrão interno TMS (δ 0,00). O sinal em δ 3,3 é referente a presença de H_2O na amostra e o sinal em δ 2,5 corresponde a impureza de ^1H em $\text{DMSO-}d_6$.

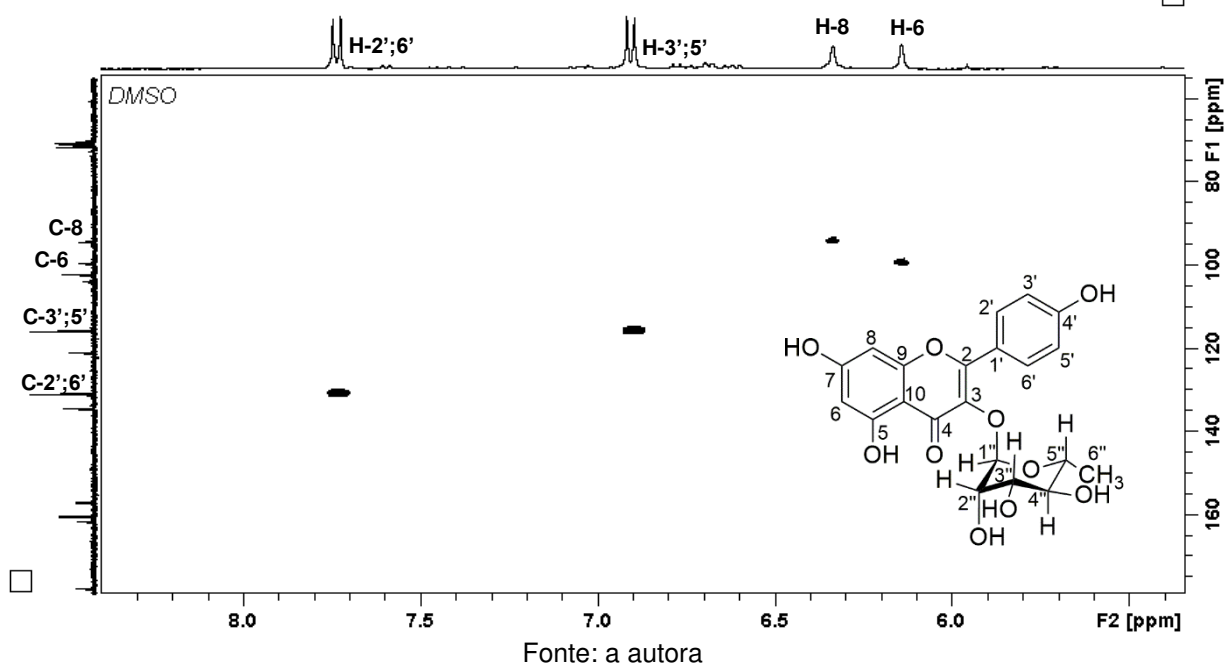
Fonte: a autora.

Figura 45- RMN ^1H ampliando da região dos H aromáticos da Fr-D6 (XVII).

Nota: Os deslocamentos químicos foram estabelecidos em relação ao padrão interno TMS (δ 0,00).

Fonte: a autora

Figura 46- Mapa de contorno HSQC ampliado da região do aromáticos da Fr-D6 (IX).

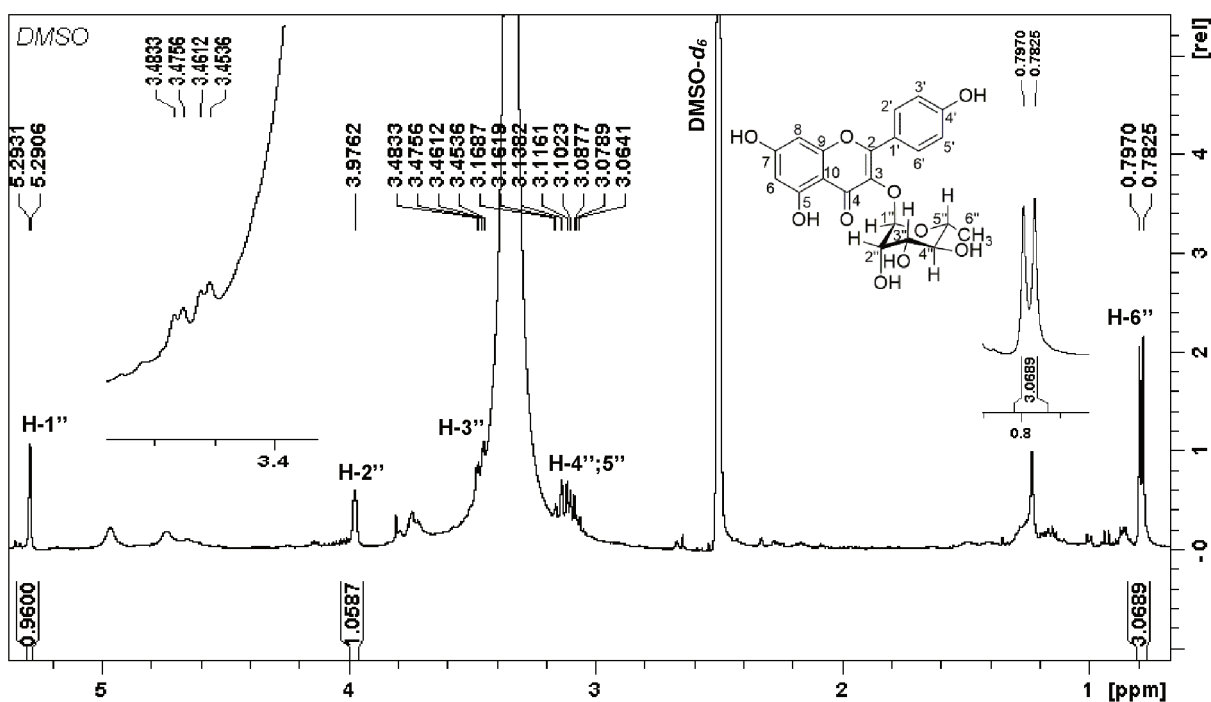


Fonte: a autora

Na Figura 47 mostra o espectro de ^1H ampliado da região glicosídica da Fr-D6. O mapa de contorno HSQC mostrou que o H-1'' está correlacionado com o carbono anomérico C-1'' (Figura 48). O duplete em δ 0,79 ($J = 5,8$ Hz) é característico do H-6''

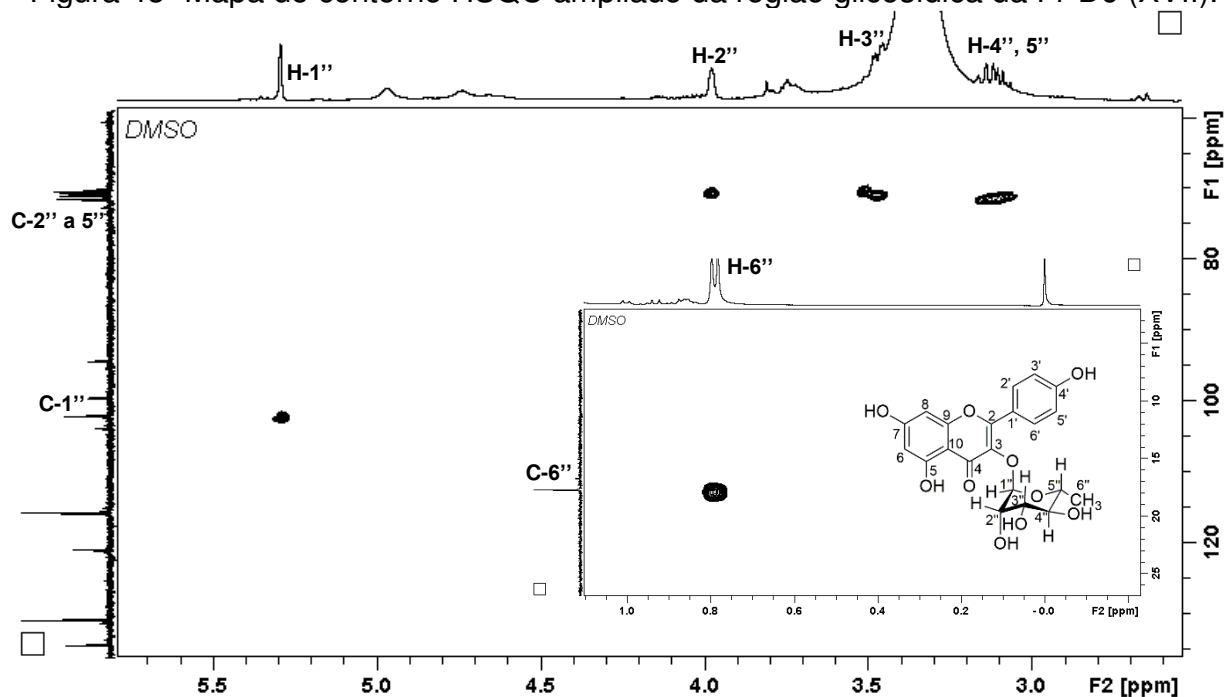
e através do espectro HSQC foi possível observar a correlação H-6'' e C-6'' (Figura 44). O simpleto em δ 3,97 o duplo duplete em δ 3,46 e o multiplete em δ 3,04 – 3,16 estão correlacionados com os carbonos do açúcar, como os sinais são muito próximos, não foi possível atribuir a posição do H ao seu respectivo C apenas pelo espectro do mapa de contorno HSQC (Figura 48).

Figura 47- Espectro RMN ^1H (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) ampliado da região glicosídica da Fr-D6 (XVII).



Fonte: a autora

Figura 48- Mapa de contorno HSQC ampliado da região glicosídica da Fr-D6 (XVII).

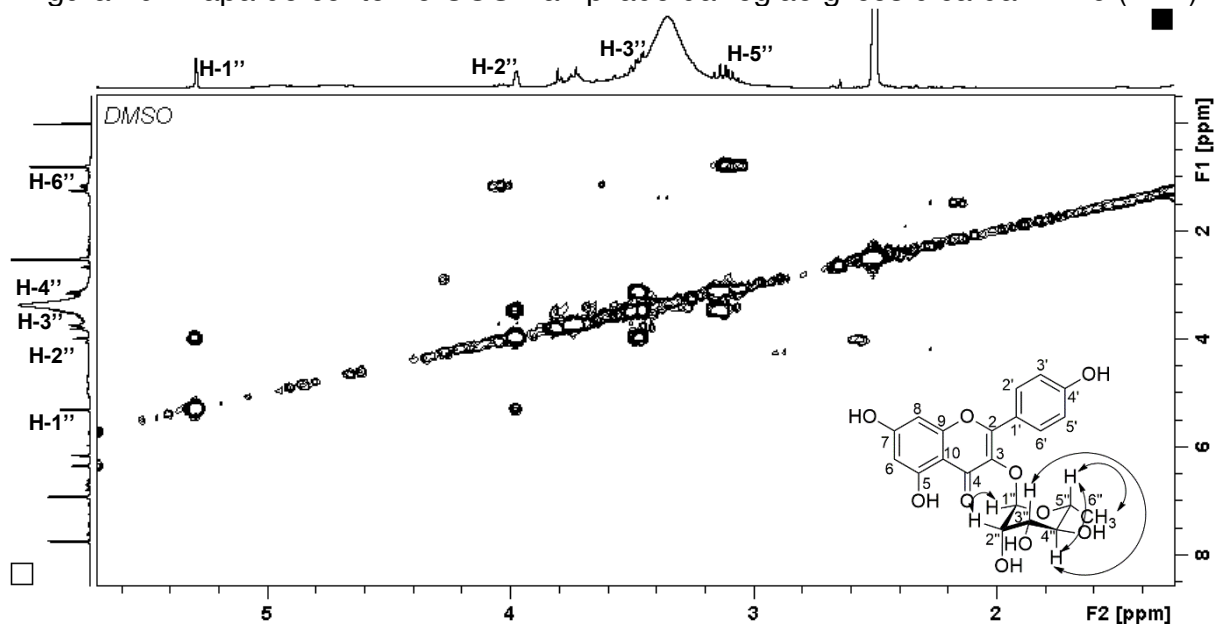


Fonte: a autora.

Através do mapa de contorno COSY foi possível definir a posição dos outros H da região glicosídica (Figura 49). O próton em δ 5,29 ($J = 1,00$ Hz) referente ao H-1'' apresenta esse valor de constante devido ao acoplamento equatorial-equatorial com o H-2''. O H-2'', em δ 3,97 está relacionado com H-3''. O duplo duplete em δ 3,46 ($J = 3,0; 8,8$ Hz) foi atribuído ao H-3'' e está correlacionado com o H-4'' e H-2'', sendo a menor constante de acoplamento referente ao acoplamento axial-equatorial entre H-3'' e H-2'' e a constante maior é referente ao acoplamento diaxial H-3'' e H-4'' (CLAYDEN et al., 2000). Os valores de constante de acoplamento confirmaram configuração do açúcar indicando que o composto isolado é o canferol-3-O- α -L-ramnosídeo (CHENG et al., 2013). Foi possível observar que o H-5'', em δ 3,16 – 3,06, está correlacionado com o H-6''. O sinal em δ 3,3, referente à presença de água na amostra, interferiu nos valores do deslocamento bem como na interpretação da multiplicidade dos sinais na região glicosídica. Entretanto, os espectros apresentados nesse trabalho, corroboram com dados reportados na literatura para a ramnose (ÖZDEN et al., 1998, PIZZOLATTI et al., 2003). Dessa forma, o multiplete em δ 3,16 – 3,06 foi atribuído aos H-4'' e H-5'', e a diferença no valor do deslocamento foi atribuída a interferência do sinal da água. Na Tabela 10 estão as atribuições para os

sinais de ^1H da Fr-D6 (XVII) e a comparação com os sinais do canferol-3-*O*-ramnosídeo já descrito na literatura.

Figura 49- Mapa de contorno COSY ampliado da região glicosídica da Fr-D6 (XVII).



Fonte: a autora.

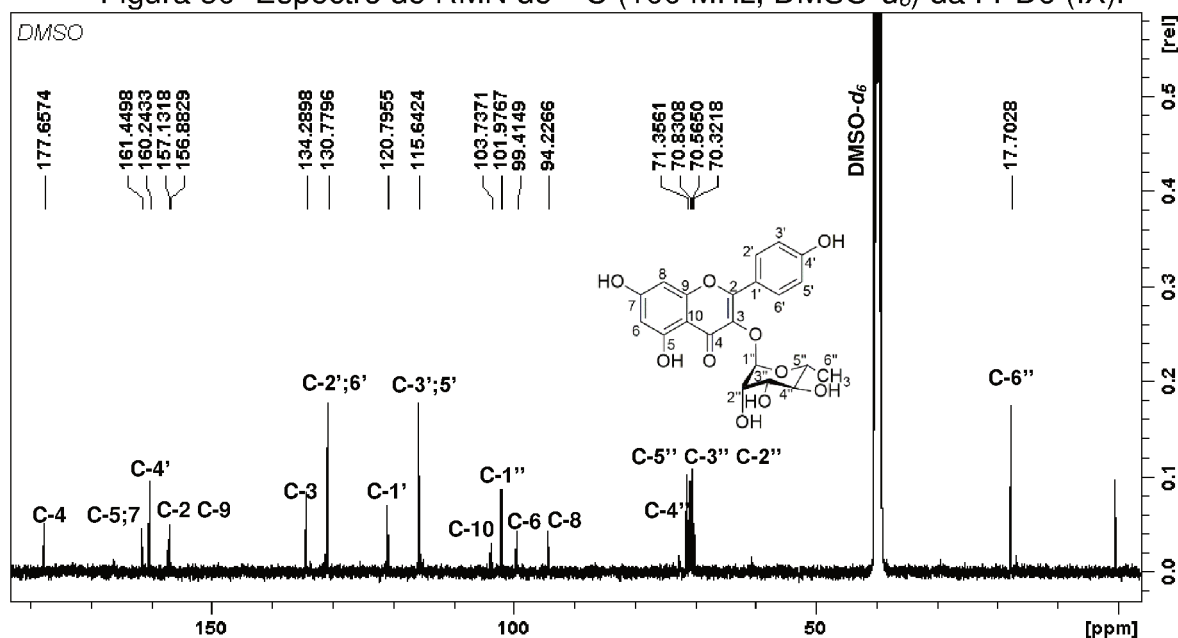
Tabela 10- Sinais RMN ^1H da Fr-D6 (IX) comparados com o canferol-3-*O*-ramnosídeo .

Posição	RMN ^1H 400 MHz (DMSO- d_6) Fr-D6 δ_{H} ; mult ^a (<i>J</i> em Hz)	(RIBEIRO; SILVA; BOLZANI, 2002) RMN ^1H 500 MHz (DMSO- d_6) canferol-3- <i>O</i> -ramnosídeo δ_{H} ; mult (<i>J</i> em Hz)	(CHANG et al., 2009) RMN ^1H 500 MHz (DMSO- d_6) canferol-3- <i>O</i> -ramnosídeo δ_{H} ; mult (<i>J</i> em Hz)	COSY
H-6	6,18; sl	5,88; sl	6,20; d (2,0)	–
H-8	6,38 sl	6,04; sl	6,50; d (2,0)	–
H-2';6'	7,74; d (8,7)	7,66; d (8,5)	7,76; d (7,3)	H3';5'
H3';5'	6,91; d (8,7)	6,86; d (8,5)	6,92; d (7,3)	H-2';6'
H-1''	5,29; d (1,0)	5,27; d (1,0)	5,29; sl	H-2''
H-2''	3,97; sl	3,96; m	-	H-1''; H-3''
H-3''	3,46; dd (3,0; 8,8)	3,48; m	-	H-2''; H-4''
H-4''	3,16 – 3,06 m	3,09; m	-	H-3''
H-5''	3,16 – 3,06 m	3,09; m	-	H-6''
H-6''	0,79; d (5,80)	0,77; d (6,0)	0,80; d (6,0)	H-5''

Nota: ^amultiplicidade dos sinais: s = simpleto; sl = simpleto largo; d = dupleto; dd = duplo dupleto.

O espectro de RMN de ^{13}C (Figura 50) apresentou sinais que permitiram confirmar a estrutura do composto isolado da Fr-D6 (**XVII**). O sinal em δ 161,44 foi atribuído aos C-5 e C-7, assim como no trabalho de Ribeiro e outros (2002). Como a aglicona da Fr-D6 é a mesma da Fr-D9, o mapa de contorno HMBC foi analisado apenas para identificar a posição do açúcar. Foi observada uma correlação entre o H-1'' do carbono anomérico e o C-3 da aglicona (Figura 51). Os sinais atribuídos aos carbonos, as correlações obtidas pelo mapa de contorno HSQC e a comparação com o canferol-3-*O*-ramnosídeo estão representadas na Tabela 11.

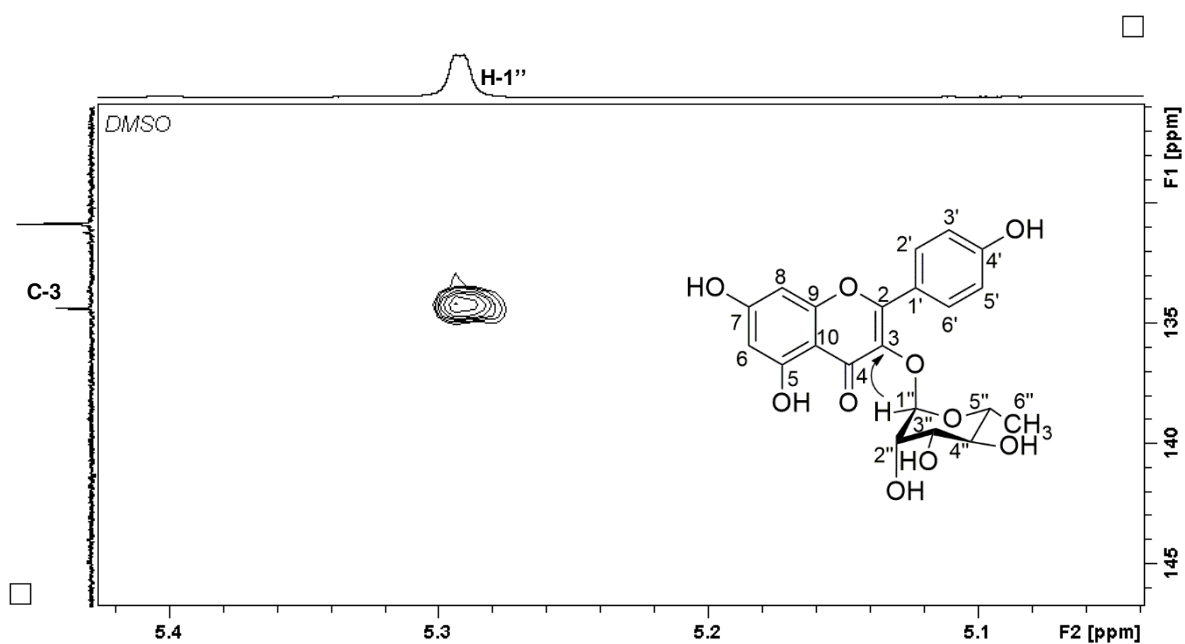
Figura 50- Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) da Fr-D6 (IX).



Nota: o sinal em δ 39,7 é referente ao solvente $\text{DMSO-}d_6$

Fonte: a autora

Figura 51- Mapa de contorno HMQC ampliado da região de correlação entre H-1'' e o C-3 da Fr-D6 (XVII).



Fonte: a autora.

Tabela 11- Sinais de RMN do ^{13}C , correlação com ^1H e comparação com o canferol-3-*O*-ramnosídeo.

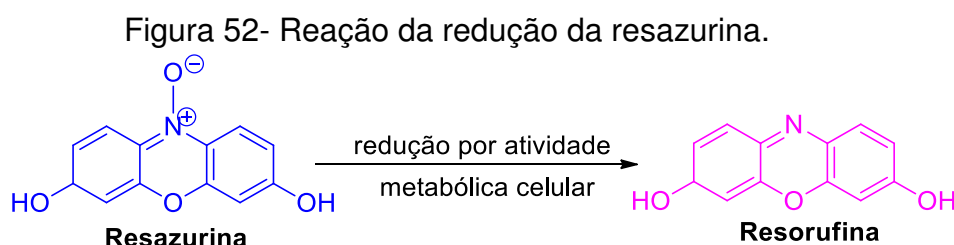
Posição	RMN ^{13}C 100 MHz, (DMSO- d_6) Fr-D6 δ	HSQC	(RIBEIRO; SILVA; BOLZANI, 2002) RMN ^{13}C 125 MHz, (DMSO- d_6) canferol δ	(CHANG et al., 2009) RMN ^{13}C 125 MHz, (DMSO- d_6) canferol δ
C-2	157,13	-	155,5	158,0
C-3	134,28	-	134,0	134,9
C-4	177,65	-	176,0	178,4
C-5	161,44	-	162,0	161,9
C-6	99,41	H-6	100,6	99,4
C-7	161,44	-	162,0	164,1
C-8	94,22	H-8	95,0	94,3
C-9	156,88	-	157,1	157,2
C-10	103,73	-	101,0	104,7
C-1'	120,79	-	120,0	121,7
C-2';6'	130,77	H-2';6'	130,2	131,3
C-3';5'	115,64	H-3';5'	115,4	116,3
C-4'	160,21	-	160,2	160,6
C-1''	101,97	H-1''	101,6	102,5
C-2''	70,32	H-2''	70,1	70,8
C-3''	70,56	H-3''	70,3	71,0
C-4''	71,35	H-4''	70,4	71,8
C-5''	70,83	H-5''	71,2	71,3
C-6''	17,70	H-6''	17,5	18,2

5.4 ATIVIDADE ANTIFÚNGICA

O método da microdiluição em caldo permite determinar o valor da CIM que corresponde a mínima concentração de amostra necessária para inibir o crescimento microbiano. Nesse método, é utilizada a resazurina como agente revelador para facilitar a leitura da viabilidade dos micro-organismos (CASTILHO et al., 2015).

A resazurina é um corante redox que apresenta mudança de coloração na presença de atividade metabólica celular. Na forma oxidada a resazurina não é

fluorescente e apresenta coloração azul, quando é reduzida para resorufina, a forma fluorescente, apresenta coloração rosa (Figura 52) (FAI; GRANT, 2009, VEGA et al., 2012, ELSHIKH et al., 2016).



Fonte: adaptado de Elshikh e outros (2016).

Devido à necessidade de busca por novos compostos ou extratos de plantas ativos que possam ser utilizados no tratamento de infecções causadas por fungos, os extratos e partições foram testados contra espécies de *Candida* que são a segunda maior causa de infecções fúngicas em todo mundo (BROWN et al., 2012). Os resultados da CIM apresentado pelos extratos, partições e a anfotericina B utilizada como controle positivo encontram-se na Tabela 12.

Tabela 12- Valores de CIM dos extratos e partições da *C. bakeriana*.

Amostras	CIM $\mu\text{g mL}^{-1}$		
	<i>Candida albicans</i> ATCC 28366	<i>Candida tropicalis</i> ATCC 13803	<i>Candida glabrata</i> ATCC 15126
EH	>3000	>3000	>3000
EE	>3000	>3000	1500
P-D	375	375	93,75
P-AE	375	750	187,5
P-B	>3000	>3000	1500
P-A	>3000	>3000	>3000
Anfotericina B	0,25	0,25	0,12

Pode-se observar que as partições diclorometano (P-D) e acetato de etila (P-AE) foram as que apresentaram melhores resultados de CIM. A *C. glabrata* foi a espécie menos resistente em ambas partições. Segundo Kuete (2010), a atividade dos extratos de vegetais podem ser considerada como significantes, quando o valor da CIM é inferior a $100 \mu\text{g mL}^{-1}$; moderados para CIM entre 100 a $625 \mu\text{g mL}^{-1}$ e fracos quando CIM é superior a $625 \mu\text{g mL}^{-1}$. Assim, pode-se considerar que a P-D teve significativa atividade contra *C. glabrata* e moderada atividade para as demais

leveduras. A P-AE apresentou fraca atividade contra *C. tropicalis* e moderada atividade para as demais espécies de *Candida*.

Algumas espécies de *Cassia* já foram avaliadas contra diferentes tipos de *Candida*. Um exemplo é a *C. fistula* que foi amplamente estudada. Os extratos metanólico e aquoso das folhas apresentaram fraca atividade antifúngica contra *C. albicans*, ambos com CIM de 1560 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (WAR et al., 2014). Já no trabalho de Oliveira e outros (2016), o extrato etanólico e frações das folhas foram avaliados para as mesmas cepas do presente trabalho, a CIM variou entre 40-320 $\mu\text{g mL}^{-1}$ apresentando atividade de forte a moderada. O extrato metanólico da poupa da fruta e sementes apresentaram atividade moderada contra as mesmas cepas avaliadas nesse trabalho, com valor de CIM 100-150 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e 300-350 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente, sendo identificado a presença da antraquinona reína em ambos extratos (IRSHAD et al., 2011). Segundo Pawar e D' Mello (2011) o extrato metanólico das folhas de *Cassia tora* com CIM de 2000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ contra *C. albicans* foi considerado significativo. Em outros estudos, as espécies *C. fistula* (BHALODIA et al., 2012, SONY et al., 2018), *C. siamea* (PRABHAKAR et al., 2008) e *C. alata* (SOMCHIT et al., 2003) foram avaliadas contra várias espécies de *Candida* utilizando o método da difusão em disco e apresentaram halos de inibição significativos.

Esses resultados mostraram o potencial antifúngico de vários extratos de *Cassia* o que motivou a avaliação da *C. bakeriana* para essa atividade. A atividade antifúngica dos extratos da *C. bakeriana* foi considerada fraca, entretanto, o fracionamento do EE foi importante para concentrar os compostos com potencial antifúngico, o que pronunciou a atividade da P-D e P-AE.

Diferentes metabolitos especiais mostraram bons resultados contra espécies de *Candida* como terpenos, saponinas, alcaloides, ácidos fenólicos, flavonoides, lignanas e taninos (NEGRI et al., 2014, TEODORO et al., 2015, LU et al., 2017).

Em relação aos compostos identificados na P-D e P-AE, estudos na literatura mostra que alguns deles já foram avaliando contra espécies de *Candida*. A Tabela 13 mostra o valor da CIM encontrada na literatura para alguns compostos e as espécies de *Candida* para quais foram avaliados.

Esses resultados mostraram que muitos compostos presentes nas P-D e P-AE são ativos contra *Candida* spp., o que justifica a atividade apresentada por essas partições. Os compostos **XX** e **XVII**, isolados no presente trabalho, não foram avaliados, pois a massa obtida no isolamento foi insuficiente para realizar todos os

ensaios biológicos. Mas, foi possível encontrar alguns estudos relacionados a eles na literatura. Como pode ser visto na Tabela 13, o canferol (**XX**) não apresentou valores de CIM muito promissores (CIM₉₀ 256-512 µg mL⁻¹) quando foi avaliado contra 10 espécies de isolados clínicos de *Candida*. Entretanto, quando ele foi avaliado junto com o fármaco antifúngico fluconazol, apresentaram valores de CIM₉₀ 0,25-32 µg mL⁻¹. Dessa forma, o composto **XX** aumentou o efeito antifúngico do fluconazol que apresenta resistência em espécie de *C. albicans* (SHAO et al., 2016). Em outro trabalho, o canferol (**XX**) apresentou bons resultados quando avaliado contra *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. glabrata* com valores de CIM 31,2 a > 83 µg mL⁻¹ (SALAZAR-ARANDA et al., 2015). Em relação ao composto (**XVII**) foi encontrado resultado bastante promissor, com valor de CIM 16 µg mL⁻¹ contra *C. albicans* (TATSIMO et al., 2012). Dessa forma, pode-se sugerir que os compostos **XX** e **XVII** tenham contribuído para atividade das P-D e P-AE.

Os ácidos fenólicos podem ter contribuído para a atividade antifúngica das partições, uma vez que, a atividade desses compostos contra espécies de *Candida* assim como de extratos ricos nesses compostos tem sido reportada na literatura (GUZMAN, 2014, MARTINS et al., 2015, TEODORO et al., 2015, LU et al., 2017). Com relação ao mecanismo de ação dos ácidos fenólicos, o ácido clorogênico já foi estudado e promoveu alterações na permeabilidade da membrana citoplasmática de *Candida* spp., levando a uma mudança na hidrofobicidade e carga da superfície celular causando vazamento de íons e outros materiais (SANG SUNG; GUN LEE, 2010). Derivados do ácido caféico inibiram a síntese da 1,3-β-D-glucanosintase que é uma enzima essencial para síntese do 1,3-β-glucano da parede celular do fungo (MA et al., 2010).

Tabela 13- CIM de alguns compostos presentes na P-D e P-AE.

Composto	CIM^a µg mL⁻¹	Candida spp.	Referência
Ácido <i>p</i> -cumárico	40	<i>C. albicans</i>	(ŠILER et al., 2014)
Ácido ferúlico	20	<i>C. albicans</i>	(ŠILER et al., 2014)
Ácido ferúlico	40	<i>C. albicans</i>	(CANTURK, 2018)
	20	<i>C. glabrata</i>	
Ácido protocatecuico	500	<i>C. albicans</i>	(PRETTO JULIANA et al., 2004)
Ácido protocatecuico	400	<i>C. tropicalis</i>	
Ácido protocatecuico	156	<i>C. albicans^b</i>	(KUETE et al., 2009)
Ácido sinápico	>250	<i>C. albicans</i>	(LIMA et al., 2016)
	>250	<i>C. glabrata</i>	
	>250	<i>C. tropicalis</i>	
(-)-Catequina	11,72	<i>C. albicans</i>	(OLIVEIRA et al., 2018)
	2,83	<i>C. glabrata</i>	
	187,5	<i>C. tropicalis</i>	
Quercetina	>250	<i>C. albicans</i>	(LIMA et al., 2016)
	>250	<i>C. glabrata</i>	
	>250	<i>C. tropicalis</i>	
Quercetina	>83	<i>C. albicans</i>	(SALAZAR-ARANDA et al., 2015)
	7,8-15,6	<i>C. glabrata^b</i>	
	>83	<i>C. tropicalis^b</i>	
Quercetin-3- O-glicosídeo (isoquercetina) ^c	2,5	<i>C. albicans</i>	(YUN et al., 2015)
Isoquercetina	>250	<i>C. albicans</i>	(LIMA et al., 2016)
Luteolina	>83	<i>C. albicans</i>	(SALAZAR-ARANDA et al., 2015)
	3,9-7,8	<i>C. glabrata^b</i>	
	>83	<i>C. tropicalis^b</i>	
canferol	256-512 ^c	<i>C. albicans^b</i>	(SHAO et al., 2016)
canferol	>83	<i>C. albicans</i>	(SALAZAR-ARANDA et al., 2015)
	>83	<i>C. tropicalis^b</i>	
	31,2	<i>C. glabrata^b</i>	
canferol-3- O-ramnosídeo	16	<i>C. albicans</i>	(TATSIMO et al., 2012)
Reína	50	<i>C. albicans</i>	(AGARWAL et al., 2000)

Note: ^amétodo da microdiluição em caldo; ^bisolados clínicos ^cMIC₉₀.

Os flavonoides em geral, tem apresentado efeito anti-*Candida* e esta atividade em muitos extratos, foi relacionada com a presença desses compostos (MARTINS et al., 2015, LU et al., 2017, SELEEM; PARDI; MURATA, 2017, ZACCHINO et al., 2017).

No trabalho de Oliveira e outros (2018), a fração contendo os glicosídeos quercetina-3-*O*-ramnosídeo, canferol-3-*O*-ramnosídeo, quercetina-3-*O*-(2''-galoil)-ramnosídeo, quercetina-3-*O*-(3''-galoil)-ramnosídeo e o canferol-3-*O*-(2''-galoil)-ramnosídeo apresentou forte inibição da *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. tropicalis* com valores de CIM 5,86, 5,86, 23,43 ($\mu\text{g ml}^{-1}$). Em relação ao mecanismo de ação, assim como o ácido clorogênico, o flavonoide isoquercetina induziu alterações na membrana celular, aumentando a permeabilidade, modificando a concentração de íons dentro e fora da célula, resultando posteriormente na morte celular (YUN et al., 2015). No estudo de Rajasekharan e outros (2015) o canferol e a quercetina quando combinados com butirato de sódio reduziram a formação de biofilmes de *C. tropicalis*. A antraquinona emodina inibiu o crescimento de *C. albicans* em concentrações maiores (15-35 $\mu\text{g ml}^{-1}$) utilizando ensaio calorimétrico (KONG et al., 2009). Os esfingolipídios **XXVI**, **XXVII** também podem ter contribuído para atividade da P-D uma vez que essa classe de composto tem sido considerada um bom alvo para novas drogas antifúngicas (ROLLIN-PINHEIRO et al., 2016)

Outra classe de compostos identificada na P-D de *C. bakeriana*, foram os ácidos graxos e derivados que podem ter contribuído para a atividade antifúngica apresentada pela P-D uma vez que esses compostos têm sido relatados devido a especificidade como antifúngicos (POHL; L F KOCK; THIBANE, 2011). O estudo de Thibane e outros (2012) avaliou o mecanismo de ação de diferentes ácidos graxos saturados, monoinsaturados e poli-insaturados contra biofilmes de *C. albicans* e *C. dubliniensis*, o composto mais eficaz foi o C18:4 n-3 que induziu a morte celular devido a apoptose.

Dessa forma, pode considerar que a *C. bakeriana* é uma fonte de compostos com potencial antifúngico.

5.5 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

O estresse oxidativo tem sido o principal mecanismo na progressão das complicações macro e microvasculares do diabetes. O acúmulo de glicose e ácidos graxos nos músculos, tecidos adiposos e nas células pancreáticas leva ao aumento da produção de espécies reativas. Além disso, a patogênese do diabetes tem sido associada ao estresse oxidativo, uma vez que as espécies reativas provocam

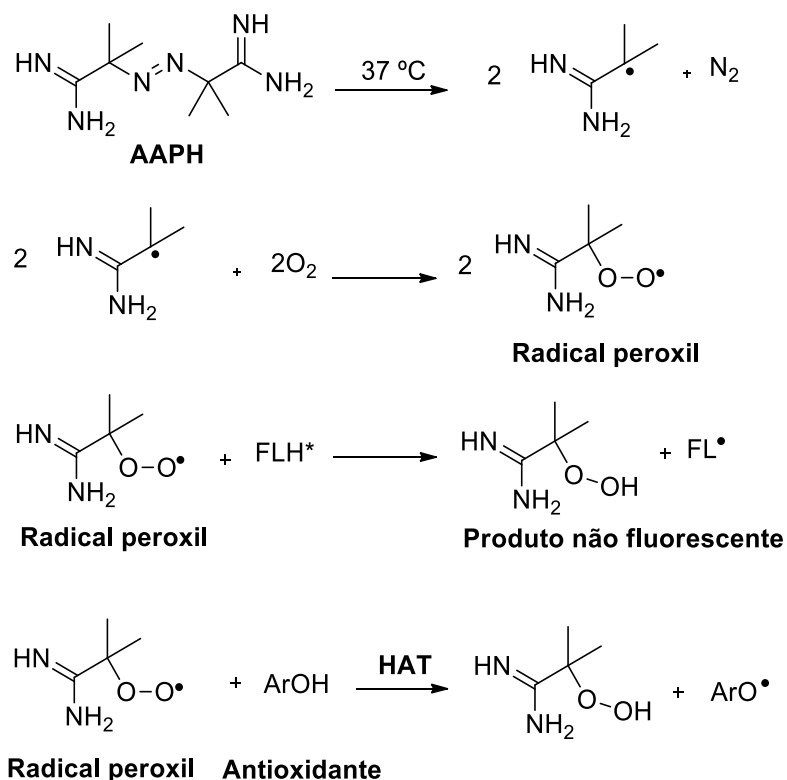
diminuição da sensibilidade à insulina e destrói células produtoras de insulina no pâncreas (JR WRIGHT; SCISM-BACON; GLASS, 2006, YANG et al., 2011, ASMAT; ABAD; ISMAIL, 2016).

Dessa forma, a atividade antioxidante da *C. bakeriana* foi avaliada nesse trabalho, utilizando o método “*Oxygen radical absorbance capacity*” (ORAC) e o método do sequestro do radical DPPH•.

O método ORAC consiste na medida da perda de fluorescência do indicador fluoresceína pela atividade do radical peroxil (ROO•). A decomposição térmica do 2,2'-azobis-(2-amidinopropano) di-hidrocloreto (AAPH) gera um produto com carbono radicalar que reage com oxigênio atmosférico gerando os ROO•, que reagem com o indicador fluoresceína para formar um produto não fluorescente (ALVES et al., 2010, LITESCU et al., 2014). As substâncias antioxidantes presentes na amostra reagem com o radical peroxil inibindo a perda da intensidade da fluoresceína (ALVES et al., 2010).

No método ORAC essa reação ocorre através do mecanismo de transferência de átomos de hidrogênio (HAT) do inglês “*hydrogen atom transfer*” em que o ROO• abstrai um átomo de hidrogênio do antioxidante (ArOH) resultando na formação de um radical antioxidante estável (ArO•) (OU et al., 2002, APAK et al., 2013). A Figura 53 mostra as reações envolvidas no processo de formação do ROO• e sua reação com o indicador fluoresceína e com a substância antioxidante.

Figura 53- Formação do radical peroxil e sua reação com a fluoresceína e a substância antioxidante.

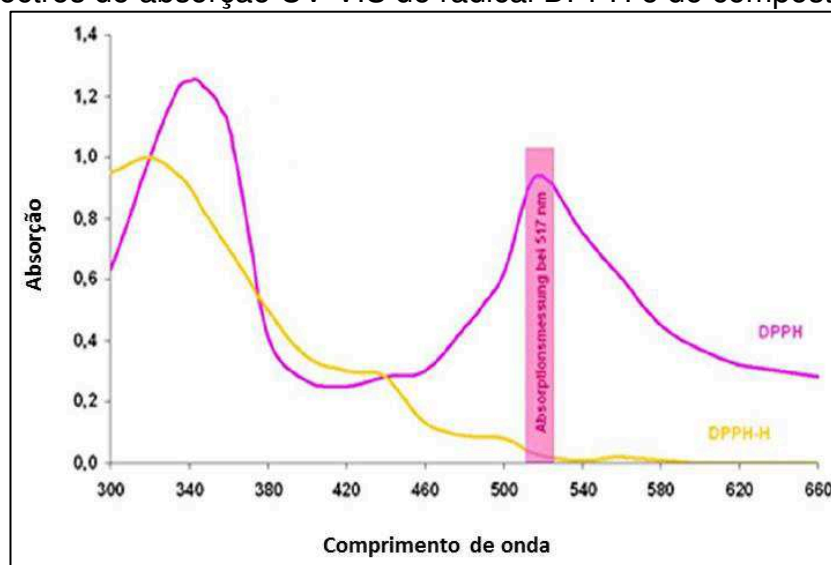


Nota: FLH= fluoresceína; ArOH = fenol
 Fonte: adaptado de Litescou e outros (2014).

O método do sequestro do DPPH•, consiste na avaliação da atividade sequestradora do DPPH• que possui coloração roxa, absorvendo em comprimento de onda de 517 nm. Pela ação de um composto antioxidante, o DPPH• é reduzido formando 2,2-difenilpicrilidrazina (DPPH-H) de coloração amarela e assim, desaparecendo a banda de absorção (Figura 54) (OLIVEIRA et al., 2009).

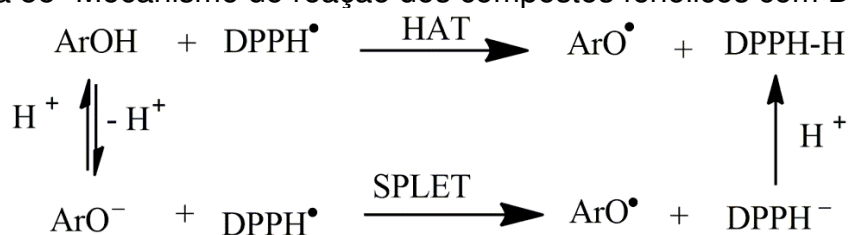
As reações entre o DPPH• e os compostos antioxidantes também podem ocorrer pelo mecanismo de transferência de átomos de hidrogênio (HAT) ou pelo mecanismo de perda sequencial de próton na transferência de elétron (SPLET) do inglês “*sequential próton loss electron transfer*” (Figura 55) (LIU, 2010).

Figura 54- Espectros de absorção UV-VIS do radical DPPH e do composto DPPH-H.



Fonte: adaptado Perez e Aguilar (2013).

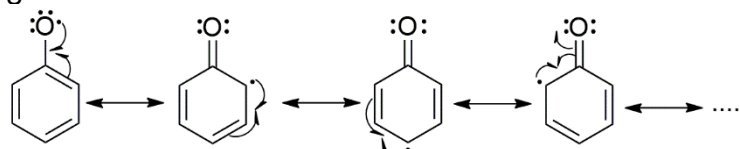
Figura 55- Mecanismo de reação dos compostos fenólicos com DPPH•.



Nota: ArOH = fenol
 Fonte: adaptado Liu, (2010).

A estabilidade dos radicais antioxidantes se deve a deslocalização do radical através das estruturas de ressonância como acontece nos compostos fenólicos. A Figura 56 mostra as estruturas de ressonância do radical fenoxila.

Figura 56- Estruturas de ressonância do radical fenoxila.



Fonte: a autora.

Os resultados da atividade antioxidante da *C. bakeriana* pelo método ORAC foram expressos em μmol de equivalente do antioxidante trolox por grama de

extrato/partição ($\mu\text{mol ET/g}_{\text{amostra}}$) assim, quanto maior o valor maior é a atividade antioxidante. Em relação a atividade antioxidante no método do DPPH•, inicialmente foi calculado o percentual de DPPH• sequestrado (%) e para as amostras que apresentaram percentual superior a 80%, foi calculado a IC₅₀ que é a concentração necessária para sequestrar 50% do DPPH• assim, quanto menor esse valor, maior a atividade antioxidante. Os resultados dos extratos, partições, os compostos isolados **XX** e **XVII** e o controle positivo (ácido ascórbico), encontram-se na Tabela 14.

Tabela 14- Atidade antioxidante apresentada pelos extratos, partições e compostos isolados da *C. bakeriana* pelos métodos ORAC e DPPH•.

Amostra	ORAC	DPPH•	
	($\mu\text{mol ET/g}_{\text{amostra}}$)	(%) sequestro*	(IC ₅₀ $\mu\text{g L}^{-1}$)
EH	1464,9 \pm 320,0 ^a	18,5 \pm 3,0 ^a	–
EE	4360,4 \pm 98,7 ^b	90,1 \pm 0,2 ^{bc}	52,7 \pm 15,1 ^{ab}
P-D	4618,0 \pm 83,4 ^b	87,8 \pm 0,4 ^{be}	31,7 \pm 10,9 ^{abc}
P-AE	4400,4 \pm 89,6 ^b	93,5 \pm 1,1 ^{cd}	21,9 \pm 4,3 ^{abc}
P-B	4305,0 \pm 302,7 ^b	95,3 \pm 1,2 ^d	21,7 \pm 3,2 ^{abc}
P-A	4080,2 \pm 394,5 ^b	85,0 \pm 0,0 ^e	64,6 \pm 23,1 ^a
XX	4198,0 \pm 42,6 ^b	97,8 \pm 0,1 ^d	10,2 \pm 0,1 ^{bc}
XVII	4153,6 \pm 3,8 ^b	21,7 \pm 0,1 ^a	–
Ácido ascórbico	2498,5 \pm 109,6 ^c	97,9 \pm 0,6 ^d	4,1 \pm 1,2 ^c

Nota: *Concentração dos extratos e partições 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para os isolados; – : não obtido; Letras diferentes na mesma coluna apresentaram diferença estatística significativa ($p < 0.05$).

O EH apresentou baixa atividade antioxidante em ambos ensaios, sendo menor que o que o controle positivo (ácido ascórbico) no ensaio ORAC e com baixo percentual de sequestro no ensaio DPPH•. Já o EE e as partições mais polares apresentaram elevada atividade antioxidante, que pode estar atribuída aos compostos fenólicos previamente identificados nessas amostras. No método ORAC o EE, partições e os compostos **XX** e **XVII** apresentaram elevada atividade antioxidante sendo superior ao controle positivo. No ensaio do DPPH•, o EE e as partições apresentaram elevado percentual de sequestro do DPPH•. As P-AE e P-B apresentaram menores valores de IC₅₀ 21.9 \pm 4.3 e 21.7 \pm 3.2 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente. Entretanto esses resultados não apresentaram diferença estatística significante com o EE, P-D e P-A, podendo assim, considera-se que todas essas amostras

apresentaram elevada atividade antioxidante. Em relação aos compostos isolados, o composto **XX** apresentou elevada atividade antioxidante com valor de IC_{50} $10.2 \pm 0.1 \mu\text{g L}^{-1}$. Já o canferol-3-*O*-ramnosídeo (**XVII**) apresentou baixo percentual de sequestro do DPPH• e a IC_{50} não foi determinada. Segundo Procházková e outros (2011), a glicosilação possui efeito supressor na atividade antioxidante, pois a retirada do H em C-3 impede a formação da ligação de hidrogênio com a carbonila C-4 (Figura 57, p. 122). Dessa forma, as agliconas são antioxidantes mais potentes que seus glicosídeos, porém, esse perfil só foi observado no método DPPH•. Esse resultado instigou o interesse pelo estudo mais detalhado de como a glicosilação na posição C-3 afeta a atividade antioxidante do flavonoide, uma vez que o composto **XVII** perdeu apenas um dos seus H necessários para apresentar atividade e teve sua atividade totalmente comprometida, trabalhos futuros serão realizados para melhor compreensão desse resultado.

O método ORAC foi utilizado para avaliar a atividade antioxidante do extrato enriquecido de polifenóis da *Senna reticulata* que pertence à mesma subfamília (Caesalpinioideae) do gênero *Cassia*. A *S. reticulata* apresentou atividade antioxidante inferior ao EE e partições da *C. bakeriana* com $2680,0 \mu\text{mol Etrolox/g}_{\text{extrato}}$. Dentre os compostos identificados no extrato de *S. reticulata*, os quais foram sugeridos como responsáveis pela atividade antioxidante, estão os ácidos *p*-cumárico, ferúlico e protocatecuíco, os flavanol catequina e epicatequina e proantocianidinas que também foram identificados nas partições de *C. bakeriana* (NAVARRO et al., 2017).

O método mais utilizado na literatura para avaliar a atividade antioxidante das espécies de *Cassia* foi através do sequestro do DPPH•. Diferentes espécies apresentaram atividade antioxidante por exemplo, o extrato metanólico das folhas de *C. tora* apresentou valor de IC_{50} $86,48 \mu\text{g mL}^{-1}$ e 57,81% de inibição a $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ (CHETHANA et al., 2017). O extrato etanólico das partes aéreas de *C. auriculata* apresentou valor de IC_{50} $38,80 \pm 3,50 \mu\text{g mL}^{-1}$ e o extrato em acetato de etila apresentou valor de IC_{50} $13,65 \pm 0,45 \mu\text{g mL}^{-1}$. O fracionamento do extrato em acetato de etila levou o isolamento dos flavonoides quercetina, luteolina, canferol e canferol-3-*O*-rutinosídeo, os quais apresentaram forte atividade antioxidante (IC_{50} $4,77 \pm 0,53$, $10,75 \pm 0,85$, $17,25 \pm 1,15$ e $28,5 \pm 1,2$) (JUAN-BADATURUGE; HABTEMARIAM; THOMAS, 2011). Esses resultados estão de acordo com os apresentados neste trabalho em que o canferol foi mais ativo que o glicosídeo. Outra espécie de *Cassia*

que teve a atividade antioxidante avaliada pelo método do DPPH• foi a *C. glauca*, o extrato etanólico das folhas, enriquecido com polifenóis apresentou valor de $IC_{50} 23,77 \pm 2,9 \mu\text{g mL}^{-1}$ (VEERAPUR et al., 2017). O extrato das cascas rico em proantocianidinas de *C. abbreviata* também apresentaram elevada atividade antioxidante com valor de $IC_{50} 6.2 \pm 0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ (SOBEH et al., 2018).

Em diversos estudos, a atividade antioxidante de espécies de *Cassia* foi atribuída a presença de compostos fenólicos nos extratos (BHATNAGAR et al., 2010, ARYA et al., 2011, BHALODIA; ACHARYA; SHUKLA, 2011, DESHPANDE; KEWATKAR; PAITHANKAR, 2013, KOLAR et al., 2018).

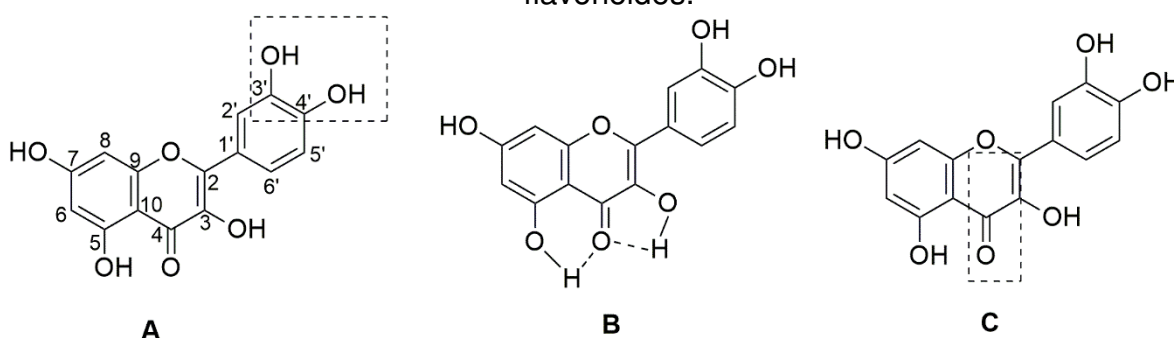
Entre os compostos fenólicos, os ácidos fenólicos têm sido relatados por apresentarem atividade antioxidante, entre eles estão o ácido protocatecuico, ferúlico, *p*-cumárico, gálico, sinápico, caféico e rosmarínico (SOARES, 2002, BREWER, 2011). No trabalho de Kim e outros (2006), o extrato do farelo de trigo rico em ácidos fenólicos apresentou maior atividade antioxidante que os compostos isolados, sendo os mais ativos: ácidos ferúlico, vanílico e seríngico.

Os ácidos hidroxicinâmicos apresentam maior atividade antioxidante que os ácidos hidroxibenzoicos, isso se deve a presença do grupo ($\text{CH}=\text{CHCOOH}$) que garante maior habilidade de estabilizar os radicais por ressonância do que o grupo (COOH) dos ácidos hidroxibenzoicos. A atividade antioxidante dos ácidos fenólicos depende do número e a posição de grupos hidroxila (OH) em relação ao grupo carboxila. Por exemplo, os ácidos monohidrobenzoicos com OH na posição *orto* ou *para* não apresentaram atividade antioxidante, mas o OH na posição *meta* foi ativo. A atividade antioxidante dos ácidos fenólicos aumenta com o aumento do número de OH , como ocorre com o ácido gálico tri-hidroxiado (hidroxibenzoico) (RICE-EVANS; MILLER; PAGANGA, 1996). Na *Cassia bakeriana* foi identificado apenas um ácido hidroxibenzoico, o ácido protocatecuico (**I**) e três ácidos hidroxicinâmicos: (**VII**), (**IX**), (**XI**) (Figura 27 p.88).

Outra classe de compostos fenólicos reportados como antioxidantes são os flavonoides, esses apresentam capacidade de eliminar os radicais livres e quelar íons de metais de transição impedindo a formação de radicais hidroxila através de reações Fenton. Os flavonoides apresentam estrutura favorável para a atividade antioxidante, sendo a principal característica estrutural necessária para a eliminação dos radicais livres, a dupla ligação entre C-2-C-3 conjugada com a carbonila C-4, que fornece a possibilidade de deslocar os elétrons através de ressonância. A presença dos

grupos OH no anel B nas posições C-3' e C-4' ou apenas em uma são determinantes para a AA. As hidroxilações nas posições C-5 e C-7 também contribuem para AA dos flavonoides luteolina, canferol, quercetina e apigenina (PROCHÁZKOVÁ; BOUŠOVÁ; WILHELMOVÁ, 2011, KUMAR; PANDEY, 2013, WANG; LI; BI, 2018). Além disso, a hidroxilação na posição C-3 contribui com a atividade antioxidante devido a possibilidade de formar ligações de hidrogênio como o grupo oxo C-4 (BORS et al., 1990, PIETTA, 2000). A Figura 53 mostra as principais características estruturais dos flavonoides para proporcionar atividade antioxidante.

Figura 57- Características estruturais que favorecem atividade antioxidante dos flavonoides.



Nota: (A) O-di-hidroxi (catecol), (B) ligações de hidrogênio, (C) dupla ligação conjugada com carbonila.

Fonte: adaptado Procházková e outros (2011).

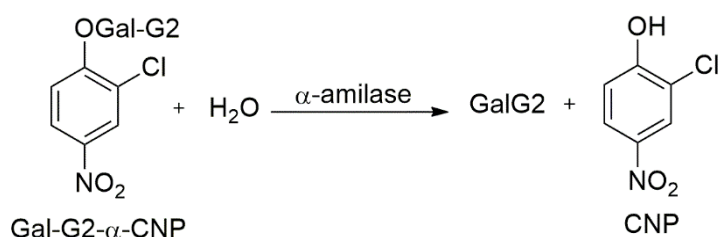
A quercetina (**XVII**), que foi identificada no EE e partições P-D e P-AE é um dos flavonoides antioxidantes mais eficazes, sua estrutura (Figura 27, p.88) apresenta todas as características que favorecem a atividade antioxidante (OZGEN; KILINC; SELAMOGLU, 2016). No estudo de Grzesik e outros (2018) foi avaliada a atividade antioxidante de vários flavonoides, derivados da catequina e alguns ácidos fenólicos. Entre eles, a catequina, (-)-epicatequina galato e (-)-epigallocatequina galato apresentaram melhores atividades nos diferentes ensaios.

Dessa forma pode-se considerar que a atividade antioxidante apresentada pela *C. bakeriana* está relacionada com os compostos isolados **XX** e **XVII** isolado na P-D, mas que existe outros compostos presentes na espécie e que podem ter contribuído para sua atividade.

5.6 ATIVIDADE INIBITÓRIA DAS ENZIMAS α -AMILASE E α -GLICOSIDASE

A inibição enzimática da α -amilase foi determinada através do método cinético em que o substrato Gal-G2- α -CNP na presença da enzima α -amilase é hidrolisado em 2-cloro-4-nitrofenol (CNP) e o galactopiranosilmaltosídeo (Gal-G2), como mostra a reação na Figura 58 (MORISHITA et al., 2000).

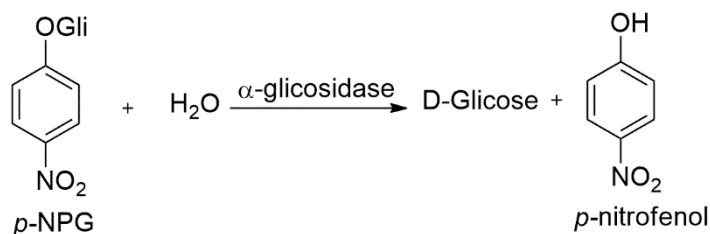
Figura 58- Reação do substrato Gal-G2- α -CNP catalisada pela enzima α -amilase.



Fonte: a autora.

No método utilizado para determinar a inibição enzimática da α -glicosidase, o substrato *p*-NPG é hidrolisado na presença da α -glicosidase, formando D-glicose e *p*-nitrofenol, como mostra a reação na Figura 59 (QURRAT UL et al., 2017).

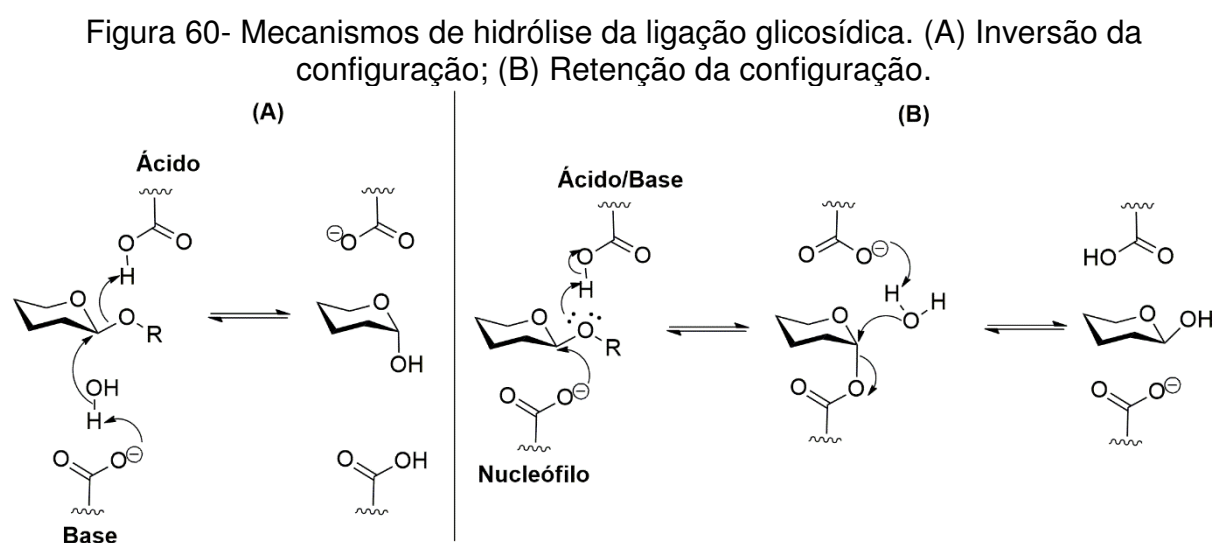
Figura 59- Reação do substrato *p*-NPG catalisado pela enzima α -glicosidase.



Fonte: a autora.

Os mecanismos clássicos de hidrólise da ligação glicosídica promovido pelas enzimas α -amilase e α -glicosidase ocorrem através da inversão ou retenção da configuração do carbono anomérico. No mecanismo de inversão da configuração, o substrato e uma molécula de água são ligados simultaneamente em uma única etapa da reação. Um dos resíduos catalíticos atua como ácido e outro como base, a protonação do oxigênio glicosídico ativa a clivagem da ligação glicosídica que é acompanhada pelo ataque do nucleófilo HO⁻ obtido através da desprotonação da molécula de água pela base residual (Figura 60-A). A retenção da configuração emprega um mecanismo de duplo deslocamento em que um dos resíduos catalíticos

atua como nucleófilo e outro como ácido/base. No primeiro passo o resíduo ácido/base protona o oxigênio glicosídico e concomitantemente ocorre o ataque nucleofílico no carbono anomérico. No segundo passo, o resíduo ácido/base desprotona uma molécula de água e o nucleófilo HO^- ataca o carbono anomérico, eliminando o grupo residual e retendo a configuração inicial (Figura 60-B) (KURIKI; IMANAKA, 1999, GLOSTER; DAVIES, 2010, KALLEMEIJN et al., 2014)



Fonte: adaptado Gloster e Davies (2010).

Os inibidores das hidrolases de glicosídeos apresentam grande importância para o tratamento do diabetes tipo 2. Eles podem retardar a absorção de glicose pelo organismo uma vez que não haverá quebra de ligações glicosídica que formam as unidades de glicose diminuído assim, a hiperglicemia pós-prandial.

Os fármacos utilizados como inibidores das hidrolases glicosídica apresentam efeitos adversos indesejáveis (item 2.2.3 p. 41) tornando necessária a busca de novos agentes para o tratamento do diabetes. Em contrapartida, medicamentos à base de plantas têm sido amplamente utilizados para o tratamento do diabetes e estudos tem investigado a ação e a eficácia de plantas como inibidora das enzimas α -amilase e α -glicosidase (TUNDIS; LOIZZO; MENICHINI, 2010, SOUZA et al., 2012, GAJBHIYE; GANAPATHY; JAISANKAR, 2018).

Dessa forma, a capacidade de inibição da α -amilase e α -glicosidase dos extratos, partições e compostos isolados das folhas de *C. bakeriana* foram avaliadas. Inicialmente foi determinada a porcentagem de inibição das enzimas. As amostras que apresentaram maiores percentuais de inibição foram submetidas novamente ao

ensaio para determinar a IC₅₀. Os resultados do percentual de inibição e a IC₅₀ dos extratos, partições, compostos isolados e controle positivo, encontram-se na Tabela 15.

Tabela 15- Percentual de inibição (%) e IC₅₀ da α-amilase e α-glicosidase apresentado pelos extratos, partições, compostos isolados das folhas de *C. bakeriana* e controle positivo.

Amostras	α-amilase		α-glicosidase	
	% de inibição ¹	IC ₅₀ (μg mL ⁻¹)	% de inibição ²	IC ₅₀ (μg mL ⁻¹)
EH	5,40 ± 3,68 ^{ae}	–	35,59 ± 8,11 ^{ac}	–
EE	92,85 ± 1,06 ^b	5,00 ± 0,85 ^a	54,23 ± 0,92 ^{bc}	442,55 ± 37,83 ^{ab}
P-D	46,05 ± 9,69 ^c	–	57,20 ± 0,73 ^{bc}	359,55 ± 2,90 ^a
P-AE	91,50 ± 0,28 ^b	18,55 ± 0,07 ^b	60,74 ± 4,88 ^{bce}	550,15 ± 52,82 ^{bc}
P-B	93,25 ± 0,07 ^b	21,05 ± 0,64 ^c	57,68 ± 0,31 ^{bce}	607,50 ± 4,24 ^c
P-A	36,50 ± 6,36 ^{ce}	–	46,85 ± 7,93 ^c	–
XX	71,35 ± 1,6 ^d	1,5 ± 0,14 ^d	26,15 ± 2,90 ^a	–
XVII	20,4 ± 3,4 ^e	–	0,50 ± 0,71 ^d	–
Acarbose	99,50 ± 0,71 ^b	0,05 ± 0,01 ^d	74,40 ± 0,85 ^e	3,4 ± 0,6 ^d

Nota: ¹Concentração das amostras foram 1000 μg mL⁻¹ e dos compostos isolados foi 10 μg mL⁻¹; ²Concentração dos extratos e partições foi 625 μg mL⁻¹ e dos compostos isolados foi 25 μg mL⁻¹; – : não obtido; Letras diferentes na mesma coluna apresentaram diferença estatística significativa (p < 0.05).

O EH apresentou baixo percentual de inibição em ambos ensaios. Os resultados mostraram que o EE e as P-AE e P-B apresentaram elevado percentual de inibição da α-amilase, sendo superior a 90%. Em relação a IC₅₀ que corresponde a concentração necessária para inibir 50% da atividade enzimática, o EE apresentou atividade bastante promissora com valor de IC₅₀ 5,0 ± 0,85 μg mL⁻¹ seguido da P-AE e P-B com valores de IC₅₀ 18,55 ± 0,07 e 21,05 ± 0,64 μg mL⁻¹, respectivamente.

No ensaio de inibição da α-glicosidase assim como no controle, as amostras apresentaram menores percentuais de inibição e maiores valores de IC₅₀. Isso se deve ao fato que a enzima utilizada no ensaio não é pura e seria necessário utilizar concentrações maiores de amostra para o cálculo do percentual de inibição. Entretanto, isso implicaria também em um aumento nos valores de IC₅₀. O EE, a PD, P-AE, P-B e P-A não apresentaram diferença estatística significativa no percentual de inibição. Entretanto, a P-D e o EE apresentaram maiores inibição com valores de IC₅₀ 359,55 ± 2,90 e 442,55 ± 37,83 μg mL⁻¹, respectivamente.

A P-D apresentou baixo percentual de inibição a α -amilase, entretanto o canferol (**XX**) isolado dessa partição apresentou elevado percentual de inibição da α -amilase com valor de $IC_{50} 1,5 \pm 0,14 \mu\text{g mL}^{-1}$ o qual não apresentou diferença estatística significativa para o controle positivo (acarbose). A presença de outros compostos na P-D pode ter interferido a atividade do composto **XX**, pois a forma com que as moléculas estão distribuídas e a quantidade na amostra, influencia na inibição do sítio ativo da enzima. Já na P-AE em que o composto **XX** também foi identificado, o mesmo efeito não foi observado. O canferol-3-O-ramnosídeo (**XVII**) apresentou baixo percentual de inibição da α -amilase. No ensaio da α -glicosidase os compostos **XX** e **XVII** também apresentaram baixo percentual de inibição e a IC_{50} não foi determinado. O canferol já foi avaliado em relação a inibição dessas enzimas. No trabalho de Sheng e outros (2018), o canferol (**XX**) apresentou inibição da α -amilase e α -glicosidase, com valores de $IC_{50} 2,33$ e $52,95 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente, sendo melhor inibidor da α -amilase. No trabalho de Peng e outros (2016), o composto **XX** exibiu notável inibição da α -glicosidase com valor de $IC_{50} 11,6 \mu\text{mol L}^{-1}$ sendo superior a acarbose utilizada como controle. A avaliação do mecanismo de ação *in silico*, indicou que o canferol se ligou ao sítio ativo da α -glicosidase por ligações de hidrogênio e forças de Van der Waals, alterando a conformação da enzima e inibindo sua atividade. No trabalho de Phan e outros (2013) o composto **XX** apresentou inibição da α -glicosidase com valor de $IC_{50} 18,6 \mu\text{mol L}^{-1}$. Não foram encontrados estudos avaliando o potencial de inibição das hidrolases glicosídicas para o composto **XVII**.

Diversas espécies de *Cassia* são utilizadas na medicina popular para o tratamento do diabetes. Estudos tem avaliado o potencial de inibição das enzimas α -amilase e α -glicosidase desse gênero. Na Tabela 16 estão representadas algumas espécies de *Cassia* e os resultados apresentados de inibição da α -amilase e α -glicosidase que foram considerados promissores.

Tabela 16- Espécies de *Cassia* avaliadas contra α -amilase e α -glicosidase.

Espécie	Extrato/parte da planta	α -amilase IC ₅₀ ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	α -glicosidase IC ₅₀ ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Referência
<i>C. auriculata</i>	etanólico/ sementes	149,60	134,90	(NANUMALA; TULASI; SUJITHA, 2015)
<i>C. angustifolia</i>	etanólico/ sementes	228,00	170,53	
<i>C. abbreviata</i>	acetona/ casca do caule	–	600,00	(SHAI et al., 2010)
<i>C. auriculata</i>	metanólico/ folhas	–	23,00	(ABESUNDARA; MATSUI; MATSUMOTO, 2004)

Nota: –: não determinado.

Em alguns estudos, foi determinado apenas o percentual de inibição das hidrolases glicosídicas de espécies de *Cassia*. Extratos com diferentes polaridades das folhas de *C. fistula* apresentaram de 10,0 (isopropanolico) a 29,2% (metanólico) de inibição da α -amilase (SUDHA et al., 2011). No estudo de Jyothi e outros (2013) os extratos aquoso e benzênico das folhas da mesma espécie, apresentaram 28 e 58% de inibição da α -amilase, respectivamente. A fração *n*-butanol das sementes de *C. abus* apresentou 70,23% de inibição da α -amilase (HUSSAIN; SHAHID; JAVED, 2016).

A partir desses resultados, pode-se considerar que a *C. bakeriana* apresenta potencial para o tratamento do diabetes, principalmente como inibidora da α -amilase.

Em relação aos compostos identificados no EE, P-D e P-AE da *C. bakeriana* estudos tem demonstrado a relação dos compostos fenólicos como inibidores das hidrolases glicosídicas (SALES et al., 2012, ALI ASGAR, 2013, GAJBHIYE; GANAPATHY; JAISANKAR, 2018, KALITA et al., 2018).

No trabalho de Lo Piparo e outros (2008) a inibição da α -amilase foi avaliada para várias classes de flavonoides, entre os que foram identificados em *C. bakeriana* está a quercetina (IC₅₀ 21,4 $\mu\text{g mL}^{-1}$). No mesmo estudo foi investigado as interações dos flavonoides com a enzima α -amilase em ensaios *in sílico*. Eles mostraram que a potência da inibição está correlacionada com o número de hidroxilas no anel B do flavonoide e que a interação com a enzima ocorre por meio de ligações de hidrogênio entre os grupos hidroxilas e os sítios ativos da enzima. A presença do grupo carbonila na posição C-4 forma um sistema condensado planar com um sistema π conjugado

estável que contribui para o aumento do potencial de inibição enzimático dos flavonoides.

A revisão de Yin e outros (2014) mostrou que vários flavonoides já foram avaliados em relação ao potencial de inibição da α -glicosidase e que esses compostos podem ser eficazes. A quercetina e isoquercitrina apresentaram IC_{50} 8,86 e 240 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente. Outro flavonoide presente nas partições de *C. bakeriana* é a catequina que apresentou inibição da α -amilase e da α -glicosidase com $IC_{50} = 160$ e 31 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente (YILMAZER-MUSA et al., 2012).

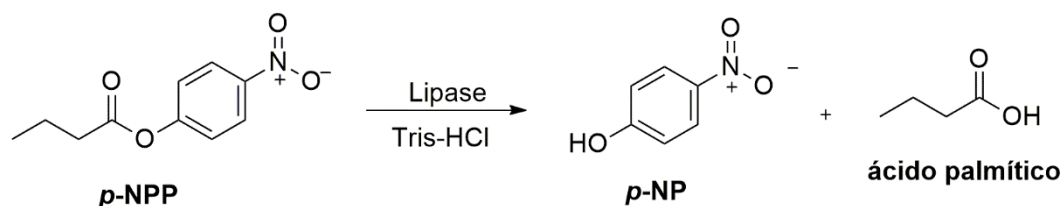
O estudo *in silico* de Rasouli e outros (2017) mostrou que vários flavonoides e ácidos fenólicos podem inibir as enzimas α -amilase e α -glicosidase. A atividade inibitória dos ácidos fenólicos também já foi avaliada *in vitro* (OBOH et al., 2014, YIN et al., 2014) O ácido ferúlico por exemplo inibiu a α -glicosidase $IC_{50} = 450 \mu\text{g mL}^{-1}$ (ADISAKWATTANA et al., 2009).

Dessa forma, sugere-se que esses compostos sejam os responsáveis pela atividade apresentada pela espécie. Embora o canferol (XX) tenha apresentado elevada inibição α -amilase, o EE também apresentou resultado promissor, que pode estar relacionado com o efeito sinérgico entre os compostos. Uma vez que a atividade inibitória de extratos ricos em polifenóis como 3ácidos protocatecuico, caféico, serínico, gálico e elágico, quercetina, canferol, catequina naringerina apigenina, trimeros de catequina e outros é relatada (ANI; NAIDU, 2008, SHOBANA; SREERAMA; MALLESHI, 2009).

5.7 ATIVIDADE DE INIBIÇÃO DA LIPASE PANCREÁTICA

No método utilizado para determinar a capacidade de inibição da lipase pancreática o substrato *p*-NPP é hidrolisado na presença da lipase formando *p*-nitrofenol (*p*-NP) de coloração amarela e o ácido palmítico (Figura 61). A quantidade de *p*-NP liberada é monitorada utilizando um espectrofotômetro (410 nm) sendo essa, influenciada pela extensão da inibição da lipase (SILVA; CARMONA-RIBEIRO; PETRI, 2014, ZAID et al., 2017).

Figura 61- Representação da do *p*-NBP catalisada pela pela lipase obtendo-se o *p*-NP e o ácido butírico.



Fonte: Silva e outros (2014).

Como abordado na seção 2.3.2, a lipase intermedeia à absorção de gorduras pelos tecidos e as células através da hidrólise das ligações dos ésteres em triglicerídeos formando ácidos graxos livres que são absorvidos pelo organismo. Por isso torna-se necessária a busca por novos agentes inibidores da lipase pancreática (LP) a fim de impedir o acúmulo de ácidos graxos que causam obesidade e também estão relacionadas com o diabetes devido resistência à insulina ocasionada pela hiperlipidemia.

Os extratos e partições das folhas de *C. bakeriana* foram avaliados em relação a capacidade de inibição da lipase pancreática. A porcentagem de inibição das enzimas foi determinada e as amostras que apresentaram maiores percentuais de inibição foi determinado a IC₅₀. Os resultados do percentual de inibição e a IC₅₀ dos extratos, partições, compostos isolados e controle positivo, encontram-se na Tabela 17.

Tabela 17- Percentual de inibição (%) e IC₅₀ da lipase pancreática apresentado pelos extratos, partições, compostos isolados das folhas de *C. bakeriana* e controle positivo.

Amostras	Lipase pancreática	
	% de inibição ¹	IC ₅₀ (µg mL ⁻¹)
EH	79,25 ± 9,38 ^{ab}	25,27 ± 8,78 ^a
EE	76,85 ± 14,92 ^{ab}	1309,50 ± 127,99 ^b
P-D	84,15 ± 1,91 ^a	968,60 ± 44,69 ^c
P-AE	76,85 ± 23,83 ^{ab}	393,25 ± 5,30 ^d
P-B	40,35 ± 11,81 ^{bc}	–
P-A	31,20 ± 0,71 ^c	–
XX	12,90 ± 3,11 ^c	–
XVII	21,65 ± 0,92 ^c	–
Orlistat	97,00 ± 4,24 ^a	0,17 ± 0,05 ^a

Nota: ¹Concentração dos extratos e partições foi 2000 µg mL⁻¹ e dos compostos isolados foi 100 µg mL⁻¹; – : não obtido; Letras diferentes na mesma coluna apresentaram diferença estatística significativa (p < 0.05).

A P-D apresentou elevado percentual de inibição da lipase pancreática sem diferença significativa com o percentual de inibição do EH, EE a P-AE e o controle positivo, quando foram avaliadas em alta concentração ($2000 \mu\text{g mL}^{-1}$). Entretanto, no cálculo de IC_{50} , o EH apresentou maior inibição com valor de $\text{IC}_{50} 25,27 \pm 8,78 \mu\text{g mL}^{-1}$ sendo menor que as outras amostras. Estes resultados também podem ser justificados considerando a disposição, distribuição e quantidade das moléculas na amostra que podem influenciar a inibição do sítio ativo da enzima. Cada extrato ou fração tem um comportamento diferente na forma como ele inibe, e isso depende muito dos constituintes da amostra.

Em relação as espécies de *Cassia* já avaliadas, o extrato aquoso das folhas de *C. angustifolia* inibiu a lipase pancreática com valor de $\text{IC}_{50} 810 \mu\text{g mL}^{-1}$ (ADISAKWATTANA et al., 2012). O extrato aquoso rico em taninos das partes aéreas de *C. mimosoide* apresentou $\text{IC}_{50} 100 \mu\text{g mL}^{-1}$ para inibição da lipase pancreática (YAMAMOTO et al., 2000). O extrato diclorometano das folhas da *C. simea* apresentou 42,88% de inibição da LP (MANGAL et al., 2017), já o extrato acetato de etila da raiz da mesma espécie apresentou forte inibição da lipase pancreática (74,3%) e o fracionamento bioguiado levou o isolamento de algumas antraquinonas, entre elas, a cassiamin A apresentou maior inibição da lipase pancreática ($\text{IC}_{50} 41,8 \mu\text{mol L}^{-1}$) (KUMAR et al., 2013).

No trabalho de Habtemariam (2013) o extrato etanólico das partes aéreas da *C. auriculata* apresentou valores muito promissores de inibição da lipase pancreática ($\text{IC}_{50} 6,0 \mu\text{g mL}^{-1}$). O fracionamento do extrato levou o isolamento dos flavonoides canferol-3-*O*-ramnosídeo, quercetina, luteolina, rutina ($\text{IC}_{50} 1,7; 43,9; 76,5; 91 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente) e o canferol que não foi ativo na concentração de $250 \mu\text{M}$. Observa-se que o canferol não apresentou boa atividade de inibição da lipase pancreática nesse estudo, mas que o canferol-3-*O*-ramnosídeo apresentou atividade promissora, o que não corrobora com o resultado apresentado nesse trabalho.

Embora os compostos fenólicos tenham sido bastante reportados na literatura como inibidores da lipase pancreática (BIRARI; BHUTANI, 2007, MOHAMED et al., 2014, PARIKH; PARIKH; KOTHARI, 2014, WOON; TOH, 2014, BUCHHOLZ; MELZIG, 2015, SINGH et al., 2015), os compostos isolados **XX** e **XVII**, as partições ricas em compostos fenólicos e o EE não apresentaram bons resultados de inibição da lipase pancreática. Para maior compreensão da atividade apresentada pelo EH sua composição química será determinada em trabalhos futuros.

Esses estudos demonstraram que o gênero *Cassia* é uma fonte promissora de extratos com compostos que podem ser utilizados para o desenvolvimento de medicamentos para tratamento da obesidade.

5.8 ATIVIDADE DE INIBIÇÃO DA GLICAÇÃO

A capacidade inibitória dos extratos e partições de *C. bakeriana* sobre a glicação da albumina sérica bovina (BSA) foi avaliada devido a necessidade de novos inibidores da glicação que previnem a formação de AGEs, uma vez que eles estão relacionados com as complicações do diabetes, bem como a produção de espécies reativas. A BSA foi escolhida como proteína alvo devido sua disponibilidade e a variedade de sítios que ela pode ser glicada (WAUTIER; GUILLAUSSEAU, 1998).

Os resultados do percentual de inibição e o IC₅₀ dos extratos, partições e compostos isolados das folhas de *C. bakeriana* juntamente com o controle positivo encontram-se na Tabela 18.

Tabela 18- Percentual de inibição (%) e IC₅₀ da inibição da glicação apresentado pelos extratos, partições, compostos isolados das folhas de *C. bakeriana* e controle positivo.

Amostras	Inibição da Glicação	
	% de inibição	IC ₅₀ (μg mL ⁻¹)
EH	10,85 ± 2,75 ^a	–
EE	99,90 ± 0,14 ^b	101,35 ± 2,62 ^{ad}
P-D	91,50 ± 3,54 ^b	37,85 ± 0,49 ^b
P-AE	99,95 ± 0,07 ^b	53,25 ± 11,24 ^{bc}
P-B	91,40 ± 4,38 ^b	115,80 ± 4,38 ^a
P-A	75,15 ± 0,35 ^c	–
XX	45,07 ± 0,94 ^d	64,16 ± 1,53 ^{cd}
XVII	39,01 ± 1,31 ^d	84,27 ± 11,38 ^d
Quercetina	97,50 ± 0,71 ^b	12,30 ± 2,40 ^e

Nota: ¹Concentração dos extratos e partições foi 625 μg mL⁻¹ e dos compostos isolados foi 62,5 μg mL⁻¹; – : não obtido; Letras diferentes na mesma coluna apresentaram diferença estatística significativa (p < 0.05).

Assim como nos ensaios enzimáticos, a IC₅₀ foi determinada para as amostras que apresentaram maior percentual de inibição. Pode-se observar que, com exceção do EH e a P-A, todas as amostras apresentaram elevado percentual de inibição acima de 90%. A P-D e P-AE apresentaram os melhores resultados sem diferença estatística significativa com menores valores de IC₅₀ 37,85 ± 0,49 e 53,25 ± 11,24 μg mL⁻¹,

respectivamente. Em relação aos compostos isolados **XX** e **XVII**, os resultados foram inferiores aos apresentados pelas P-D e P-AE com IC_{50} $64,16 \pm 1,53$ e $84,27 \pm 11,38$ $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente.

Pode-se considerar que os resultados de inibição da glicação apresentado pela *C. bakeriana* são bastante promissores. Outras espécies de *Cassia* já foram avaliadas, por exemplo o extrato aquoso das folhas de *C. alata* apresentou percentual de inibição da glicação de 30,08% ($1000 \mu\text{g mL}^{-1}$) (SOMPONG; ADISAKWATTANA, 2015). A fração *n*-butanol das sementes de *C. absus* apresentou 60,21% de inibição da glicação (HUSSAIN; SHAHID; JAVED, 2016). Os extratos etanólico das folhas e cascas de *C. fistula* apresentaram potencial antiglicação (IC_{50} 500 e $100 \mu\text{g mL}^{-1}$) (DZIB-GUERRA et al., 2016).

Em relação aos compostos identificados na P-D e P-AE, o estudo de Jang e outros mostrou que as antraquinonas emodina e obtusifolina isoladas do extrato das sementes de *C. tora* apresentaram atividade antiglicação ($IC_{50} = 118,0$ e $28,9 \mu\text{M}$ respectivamente) (JANG et al., 2007). A emodina (**XXVIII**) foi identificada na P-D da *C. bakeriana*. A própria quercetina utilizada como controle no ensaio, foi identificada na P-D e P-AE, sugerindo que ela possa ter favorecido a atividade dessas partições.

Estudos tem demonstrado à relação entre capacidade antiglicação e o conteúdo de compostos fenólicos como os ácidos fenólicos e flavonoides presentes nos extratos de plantas (ODJAKOVA et al., 2012, KHANGHOLI et al., 2015, GRZEGORCZYK-KAROLAK et al., 2016).

O ácido ferúlico, por exemplo, pode prevenir a formação de AGEs atuando como agente antioxidante, aglutinando grupos amino, inibindo a auto oxidação do açúcar e a degradação dos produtos de reação de Maillard (SILVÁN et al., 2011). No trabalho de Chen e outros (2016), os ácidos fenólicos: ácido protocatecuico, ácido ferúlico, ácido di-hidroferúlico, ácido *p*-cumárico, ácido *p*-hi-droxibenzoico e ácido salicílico tiveram a atividade inibitória dos AGEs comprovadas.

Diversas classes de flavonoides já foram avaliadas e apresentaram potencial inibitório da formação de AGEs (CHI-HAO; GOW-CHIN, 2005, JUNG et al., 2015, KHANGHOLI et al., 2015, YEH et al., 2017). O canferol apresentou maior percentual de inibição da glicação que os derivados glicosilados e a catequina (YANG et al., 2018). No estudo de Matsuda e outros (2003) a relação da estrutura com a atividade antiglicação de 62 flavonoides foi avaliada, entre os que apresentaram maior que 50%

de inibição estão a quercetina e catequina que foram identificadas na P-D de *C. bakeriana*.

A estrutura desses compostos afeta a atividade antiglicação da seguinte maneira: a hidroxilação nos anéis A e B melhora a atividade enquanto a hidroxilação no anel C diminuiu a atividade; a hidrogenação da dupla C-2-C-3 enfraqueceu pouco a atividade antiglicação; e a glicosilação de hidroxilas diminuiu a atividade embora esses resultados tenham sido contraditórios para alguns flavonoides, nesse trabalho foi possível constatar essa relação em que o glicosídeo **XVII** foi menos ativo que a aglicona **XX**. Em relação à estrutura dos ácidos fenólicos, a presença de múltiplas hidroxilas aumenta a atividade contra a formação de AGEs (XIE; CHEN, 2013).

No que se refere ao mecanismo de ação desses compostos, eles podem controlar o metabolismo da glicose, diminuindo seus níveis no sangue. Podem inibir a aldose redutase impedindo a formação da frutose que é mais reativa que a glicose na formação de AGEs. Atuam como antioxidantes, quelante de metais e aprisionando compostos dicarbonílicos reativos, impedindo a formação de AGEs (KHANGHOLI et al., 2015).

5.9 ATIVIDADE CITOTÓXICA

Os extratos e partições da *Cassia bakeriana* foram avaliados quanto a viabilidade celular em células Vero (ATCC CCL 81). Como pode ser observado na Tabela 19, o EH, EE e as partições P-AE, P-B e P-A não afetaram a viabilidade celular, apresentando concentração citotóxica (CC_{50}) superior a $512 \mu\text{g mL}^{-1}$. A P-D foi a única fração que apresentou alguma citotoxicidade nas concentrações avaliadas (CC_{50} $203,24 \pm 27,23 \mu\text{g mL}^{-1}$). O índice de seletividade (IS) foi calculado de acordo com a Equação 9 (p. 77) para os ensaios antioxidante no método do DPPH[•], inibitório das enzimas α -amilase, α -glicosidade, lipase pancreática, antiglicação e antifúngico (Tabela 20). Resultados de IS maiores que 1 indicam maior seletividade da amostra para a atividade biológica do que citotoxicidade para as células Vero (ALMEIDA et al., 2014). Em relação à atividade antioxidante pelo método DPPH[•], as partições mais ativas P-D, P-AE e P-B apresentaram boa seletividade com valores de $IS > 1$. O mesmo perfil foi observado no ensaio da α -amilase para o EE e as partições P-AE e P-B. No ensaio para inibição da α -glicosidade em que a partição mais ativa foi a P-D,

o índice de seletividade mostrou que a partição é mais citotóxica (IS 0,56). O EH foi mais ativo para a inibição de lipase pancreática e apresentou IS mais ativo do que citotóxico. No ensaio da glicação as partições P-D e P-AE que foram as mais ativas, também apresentaram boa seletividade com valores de IS > 1. Em relação a atividade antifúngica, a P-D, embora tenha apresentada atividade moderada para *C. albicans* e *C. tropicalis*, foi seletiva apenas para *C. glabrata* em que atividade antifúngica foi mais significativa. A P-AE foi mais seletiva para *C. albicans* e *C. glabrata* e mais citotóxica para *C. tropicalis*. De modo geral, os extratos e partições das folhas de *C. bakeriana* evidenciaram maior seletividade para os ensaios avaliados do que citotoxicidade para células Vero.

Tabela 19- Valores de Concentração Citotóxica (CC₅₀) e Índice de Seletividade (IS) apresentado pelos extratos e partições da *C. bakeriana*.

Amostras	CC ₅₀ (µg mL ⁻¹)	Índice de seletividade				
		DPPH*	α-amilase	α-glicosidase	Lipase	Glicação
EH	>512	–	–	–	> 20,3	–
EE	>512	>16,1	> 102,4	> 1,1	> 0,39	> 5,0
P-D	203,24 ± 27,23	6,4	–	0,56	0,21	5,4
P-AE	>512	> 23,4	>27,6	> 0,93	> 1,3	> 9,6
P-B	>512	> 23,6	>24,3	> 0,84	–	> 4,4
P-A	>512	> 7,92	–	–	–	–

Amostras	Índice de seletividade antifúngico		
	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. glabrata</i>
EH	> 0,17	> 0,17	> 0,17
EE	> 0,17	> 0,17	> 0,34
P-D	0,54	0,54	2,16
P-AE	> 1,36	> 0,65	> 2,7
P-B	> 0,17	> 0,17	> 0,34
P-A	> 0,17	> 0,17	> 0,17

Nota: –: não obtido.

6.0 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os extratos e partições das folhas de *C. bakeriana* foram avaliados pela primeira vez em relação a composição química e o potencial biológico. A prospecção fitoquímica apresentou resultado positivo para uma diversidade de compostos fenólicos e os alcaloides não foram detectados.

Através da CLAE-EM-IES foi possível identificar os compostos presentes no EE e nas partições mais ativas para a maioria dos ensaios realizados. Foram identificados ácidos fenólicos, flavonoides, ácidos graxos e derivados, antraquinonas, esfingolipídios, megastigmano, cianina e proantocianidinas.

O fracionamento da P-D por CLAE-DAD levou o isolamento do canferol (**XX**) e seu derivado glicosilado canferol-3-*O*-ramnosídeo (**XVII**), que tiveram suas estruturas confirmadas por CLAE-EM/IES e RMN.

As P-D e P-AE foram as mais ativas contra espécies de *Candida* avaliadas e os resultados foram justificados pelos compostos identificados nas partições, uma vez que a atividade antifúngica de muitos já foi avaliada.

O EE e as partições apresentaram elevada atividade antioxidante no método ORAC e DPPH•, a qual foi justificada pela presença dos compostos fenólicos identificados.

A folhas de *C. bakeriana* apresentou melhor atividade de inibição da enzima α -amilase do que para enzima α -glicosidase. O EE apresentou resultado bastante promissor de inibição da α -amilase ($IC_{50} 5,00 \pm 0,85 \mu\text{g mL}^{-1}$) seguido da P-AE e P-B.

Em relação a inibição da lipase, o EH apresentou boa atividade de inibição com valor de $IC_{50} 25,26 \pm 8,77 \mu\text{g mL}^{-1}$ e sua composição química será identificada em trabalhos futuros.

O EE e as partições apresentaram elevado percentual de inibição da glicação. A P-D foi a que apresentou melhor $IC_{50} 37,85 \pm 0,49 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Os compostos isolados **XX** e **XVII** apresentaram elevada atividade antioxidante pelo método ORAC e no método do DPPH• apenas o composto **XX** foi ativo. O composto **XX** apresentou elevada inibição da α -amilase, entretanto ambos os compostos não inibiram a α -glicosidase e a lipase pancreática. Os compostos **XX** e **XVII** inibiram a glicação, entretanto, os resultados foram inferiores aos apresentados pela P-D e P-AE.

De forma geral, o índice de seletividade indicou que o EE e as partições das folhas de *Cassia bakeriana* são mais seletivos do que citotóxico para células Vero. Assim, os estudos realizados no presente trabalho mostraram que a *C. bakeriana* é uma fonte promissora de compostos com atividades antifúngicas e antidiabéticas.

REFERÊNCIAS

- International Diabetes Federation Diabetes Atlas. [2019a]. Disponível em: <<http://www.diabetesatlas.org/>>. Acesso em: 13 Jan.
- World Health Organization. [2019b]. Disponível em: <<https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>>. Acesso em: 16 Jan.
- ABESUNDARA, K. J. M.; MATSUI, T.; MATSUMOTO, K. α -glucosidase inhibitory activity of some Sri Lanka plant extracts, one of which, *Cassia auriculata*, exerts a strong antihyperglycemic effect in rats comparable to the therapeutic drug acarbose. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 9, p. 2541-2545, 2004 DOI: <https://10.1021/jf035330s>.
- ABID, R.; MAHMOOD, R.; SANTOSH KUMAR, H. S. Hypolipidemic and antioxidant effects of ethanol extract of *Cassia fistula* fruit in hyperlipidemic mice. **Pharmaceutical Biology**, v. 54, n. 12, p. 2822-2829, 2016 DOI: <https://10.1080/13880209.2016.1185445>.
- 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, n., p. 179-191, 2015a DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.06.011>.
- 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, n., p. 74-86, 2015b DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.01.023>.
- ACHAN, J.; TALISUNA, A. O.; ERHART, A.; YEKA, A.; TIBENDERANA, J. K.; BALIRAINÉ, F. N.; ROSENTHAL, P. J.; D'ALESSANDRO, U. Quinine, an old anti-malarial drug in a modern world: role in the treatment of malaria. **Malaria Journal**, v. 10, n., p. 144-144, 2011 DOI: <https://10.1186/1475-2875-10-144>.
- ADISAKWATTANA, S.; CHANTARASINLAPIN, P.; THAMMARAT, H.; YIBCHOK-ANUN, S. A series of cinnamic acid derivatives and their inhibitory activity on intestinal α -glucosidase. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 24, n. 5, p. 1194-1200, 2009 DOI: <https://10.1080/14756360902779326>.
- ADISAKWATTANA, S.; INTRAWANGSO, J.; HEMRID, A.; CHANATHONG, B.; MÄKYNEN, K. Extracts of edible plants inhibit pancreatic lipase, cholesterol esterase and cholesterol micellization, and bind bile acids. **Food Technology and Biotechnology**, v. 50, n. 1, p. 11-16, 2012.
- AGARKAR, S. V.; JUDGE, D. R. Phytochemical and Pharmacological Investigations of Genus *Cassia*: A Review. **Asian Journal of Chemistry**, v. 11, n. 2, p. 259-299, 1999.

AGARWAL, S. K.; SINGH, S. S.; VERMA, S.; KUMAR, S. Antifungal activity of anthraquinone derivatives from *Rheum emodi*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 72, n. 1, p. 43-46, 2000 DOI: [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(00\)00195-1](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(00)00195-1).

AHMED, M. F.; THAYYIL, H.; AHMED, S. R.; IBRAHIM, M. Anti-ulcer activity of *Cassia auriculata* leaf extract. **Pharmacognosy Journal**, v. 2, n. 16, p. 53-57, 2010 DOI: [https://doi.org/10.1016/S0975-3575\(10\)80050-1](https://doi.org/10.1016/S0975-3575(10)80050-1).

AL-GOBLAN, A. S.; AL-ALFI, M. A.; KHAN, M. Z. Mechanism linking diabetes mellitus and obesity. **Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy**, v. 7, n., p. 587-591, 2014 DOI: <https://10.2147/dms0.s67400>.

AL-SUWAILEM, K.; AL-TAMIMI, A. S.; AL-OMAR, M. A.; AL-SUHIBANI, M. S. Safety and Mechanism of Action of Orlistat (Tetrahydrolipstatin) as the First Local Antiobesity Drug. **Journal of Applied Sciences Research**, v., n., p. 1-4, 2006.

ALI ASGAR, M. Anti-Diabetic Potential of Phenolic Compounds: A Review. **International Journal of Food Properties**, v. 16, n. 1, p. 91-103, 2013 DOI: <https://10.1080/10942912.2011.595864>.

ALMEIDA, T. L. D.; MONTEIRO, J. A.; LOPES, G. K. P.; CHIAVELLI, L. U. R.; SANTIN, S. M. D. O.; SILVA, C. C. D.; KAPLUM, V.; SCARIOT, D. B.; NAKAMURA, C. V.; RUIZ, A. L. T. G.; CARVALHO, J. E.; FARIA, R. T. D. et al. Estudo químico e atividades antiproliferativa, tripanocida e leishmanicida de *Maxillaria picta*. **Quimica Nova**, v. 37, n., p. 1151-1157, 2014 DOI: <http://dx.doi.org/10.5935/0100-4042.20140179>.

ALVES, C. Q.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P.; BAHIA, M. V.; AGUIAR, R. M. Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. **Quimica Nova**, v. 33, n., p. 2202-2210, 2010 DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422010001000033>

ANI, V.; NAIDU, K. A. Antihyperglycemic activity of polyphenolic components of black/bitter cumin *Centrathium anthelminticum* (L.) Kuntze seeds. **European Food Research and Technology**, v. 226, n. 4, p. 897-903, 2008 DOI: <https://10.1007/s00217-007-0612-1>.

ANN CHAI, L. Y.; DENNING, D. W.; WARN, P. *Candida tropicalis* in human disease. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 36, n. 4, p. 282-298, 2010 DOI: <https://10.3109/1040841x.2010.489506>.

APAK, R.; GORINSTEIN, S.; BÖHM, V.; SCHAICH KAREN, M.; ÖZYÜREK, M.; GÜÇLÜ, K. Methods of measurement and evaluation of natural antioxidant capacity/activity (IUPAC Technical Report). **Pure and Applied Chemistry**, v. 85, n. 5, p. 957–998, 2013 DOI: <https://10.1351/pac-rep-12-07-15>.

ARIF, T.; BHOSALE, J. D.; KUMAR, N.; MANDAL, T. K.; BENDRE, R. S.; LAVEKAR, G. S.; DABUR, R. Natural products – antifungal agents derived from plants. **Journal of Asian Natural Products Research**, v. 11, n. 7, p. 621-638, 2009 DOI: <https://10.1080/10286020902942350>.

ARYA, V.; YADAV, S.; KUMAR, S.; YADAV, J. P. Antioxidant activity of organic and aqueous leaf extracts of *Cassia occidentalis* L. in relation to their phenolic content. **Natural Product Research**, v. 25, n. 15, p. 1473-1479, 2011 DOI: <https://doi.org/10.1080/14786419.2010.545351>.

ASMAT, U.; ABAD, K.; ISMAIL, K. Diabetes mellitus and oxidative stress—A concise review. **Saudi pharmaceutical journal**, v. 24, n. 5, p. 547-553, 2016 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2015.03.013>.

AUGUSTYNIAK, A.; BARTOSZ, G.; ČIPAK, A.; DUBURS, G.; HORÁKOVÁ, L. U.; ŁUCZAJ, W.; MAJEKOVA, M.; ODYSSEOS, A. D.; RACKOVA, L.; SKRZYDLEWSKA, E.; STEFEK, M.; ŠTROSOVÁ, M. et al. Natural and synthetic antioxidants: An updated overview. **Free Radical Research**, v. 44, n. 10, p. 1216-1262, 2010 DOI: <https://doi.org/10.3109/10715762.2010.508495>.

AYO, R. G.; AMUPITAN, J. O.; ZHAO, Y. Cytotoxicity and antimicrobial studies of 1,6,8-trihydroxy-3-methyl-anthraquinone (emodin) isolated from the leaves of *Cassia nigricans* Vahl. **African Journal of Biotechnology**, v. 6, n. 11, p. 1276-1279, 2007.

BALASUNDRAM, N.; SUNDRAM, K.; SAMMAN, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. **Food Chemistry**, v. 99, n. 1, p. 191-203, 2006 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.07.042>.

BANDAWANE, D. D.; BEAUTIKUMARI, S.; GATE, S. S.; PATEL, A. N. Evaluation of anti-arthritic activity of ethyl acetate fraction of *Cassia auriculata* Linn. leaves. **Biomedicine & Aging Pathology**, v. 4, n. 2, p. 105-115, 2014 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biomaq.2013.10.009>.

BANSAL, A. K.; BILASPURI, G. S. Impacts of Oxidative Stress and Antioxidants on Semen Functions. **Veterinary Medicine International**, v. 2011, n., p. 1-7, 2011 DOI: <https://doi.org/10.4061/2011/686137>.

BARBOSA, J. H. P.; OLIVEIRA, S. L.; SEARA, L. T. E. O papel dos produtos finais da glicação avançada (AGEs) no desencadeamento das complicações vasculares do diabetes. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 52, n., p. 940-950, 2008.

BARNABY, A. G.; REID, R.; WARREN, D. Antioxidant Activity, Total Phenolics and Fatty Acid Profile of *Delonix regia*, *Cassia fistula*, *Spathodea campanulata*, *Senna siamea* and *Tibouchina granulosa*. **Journal of Analytical & Pharmaceutical Research**, v. 3, n. 2, p. 1-7, 2016 DOI: <https://doi.org/10.15406/japlr.2016.03.00056>.

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

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 DOI: <https://10.3390/ijms18030512>.

BHALERAO, S. A.; VERMA, D. R.; TELI, N. C.; GAVANKAR, R. V.; TRIKANNAD, A. A.; SALVI, P. P. Bioactive Constituents, Ethnobotany and Pharmacological perspectives of *Cassia tora* Linn. **International Journal of Bioassays**, v. 2, n. 11, p. 1421-1427, 2013 DOI: 10.21746/ijbio.2013.11.003.

BHALODIA, N. R.; ACHARYA, R. N.; SHUKLA, V. J. Evaluation of *in vitro* Antioxidant Activity of hydroalcoholic seed extracts of *Cassia fistula* linn. **Free Radicals and Antioxidants**, v. 1, n. 1, p. 68-76, 2011 DOI: <https://doi.org/10.5530/ax.2011.1.11>.

BHALODIA, N. R.; NARIYA, P. B.; ACHARYA, R. N.; SHUKLA, V. J. *In vitro* antibacterial and antifungal activities of *Cassia fistula* Linn. fruit pulp extracts. **Ayu**, v. 33, n. 1, p. 123-129, 2012 DOI: <https://10.4103/0974-8520.100329>.

BHALODIA, N. R.; SHUKLA, V. J. Antibacterial and antifungal activities from leaf extracts of *Cassia fistula* L.: An ethnomedicinal plant. **Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research**, v. 2, n. 2, p. 104-109, 2011 DOI: <https://10.4103/2231-4040.82956>.

BHATNAGAR, M.; VIMAL, S.; VYAS, Y.; SHARMA, D.; SHARMA, K. Antioxidant Activity of Fruit Pulp Powder of *Cassia fistula*. **Pharmacognosy Journal**, v. 2, n. 8, p. 219-228, 2010 DOI: [https://doi.org/10.1016/S0975-3575\(10\)80097-5](https://doi.org/10.1016/S0975-3575(10)80097-5).

BIODIVERSIDADE Brasileira. Ministério do Meio Ambiente. [2018]. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/biodiversidade/biodiversidade-brasileira>>. Acesso em: 6 jun. 2018.

BIRARI, R. B.; BHUTANI, K. K. Pancreatic lipase inhibitors from natural sources: unexplored potential. **Drug Discovery Today**, v. 12, n. 19, p. 879-889, 2007 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2007.07.024>.

BOEHLKE, C.; ZIERAU, O.; HANNIG, C. Salivary amylase – The enzyme of unspecialized euryphagous animals. **Archives of Oral Biology**, v. 60, n. 8, p. 1162-1176, 2015 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2015.05.008>.

BORS, W.; HELLER, W.; MICHEL, C.; SARAN, M. Flavonoids as antioxidants: determination of radical-scavenging efficiencies. **Methods in Enzymology**, v. 186, n., p. 343-355, 1990 DOI: [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(90\)86128-I](https://doi.org/10.1016/0076-6879(90)86128-I).

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, n., p. 111-116, 2013 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2013.06.015>.

BREWER, M. S. Natural antioxidants: sources, compounds, mechanisms of action, and potential applications. **Comprehensive reviews in food science and food safety**, v. 10, n. 4, p. 221-247, 2011 DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2011.00156.x>.

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 DOI: <https://10.3390/molecules191117400>.

BROWN, G. D.; DENNING, D. W.; GOW, N. A. R.; LEVITZ, S. M.; NETEA, M. G.; WHITE, T. C. Hidden Killers: Human Fungal Infections. **Science Translational Medicine**, v. 4, n. 165, p. 1-9, 2012 DOI: <https://10.1126/scitranslmed.3004404>.

BUCHHOLZ, T.; MELZIG, M. F. Polyphenolic compounds as pancreatic lipase Inhibitors. **Planta Medica**, v. 81, n. 10, p. 771-783, 2015 DOI: <https://10.1055/s-0035-1546173>.

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 DOI: <https://10.1016/j.foodchem.2008.04.058>.

CANTURK, Z. Evaluation of synergistic anticandidal and apoptotic effects of ferulic acid and caspofungin against *Candida albicans*. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 26, n. 1, p. 439-443, 2018 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2016.12.014>.

CASE, R. J.; FRANZBLAU, S. G.; WANG, Y.; CHO, S. H.; SOEJARTO, D. D.; PAULI, G. F. Ethnopharmacological evaluation of the informant consensus model on anti-tuberculosis claims among the Manus. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 106, n. 1, p. 82-89, 2006 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.12.005>.

CASTILHO, A. L.; CALEFFI-FERRACIOLI, K. R.; CANEZIN, P. H.; DIAS SIQUEIRA, V. L.; DE LIMA SCODRO, R. B.; CARDOSO, R. F. Detection of drug susceptibility in rapidly growing mycobacteria by resazurin broth microdilution assay. **Journal of Microbiological Methods**, v. 111, n., p. 119-121, 2015 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2015.02.007>.

CERRADO the Brazilian savanna. [2017]. Disponível em: http://wwf.panda.org/knowledge_hub/where_we_work/cerrado/>. Acesso em: 7 jun. 2018.

CHANDRA, P.; PANDEY, R.; KUMAR, B.; SRIVASTVA, M.; PANDEY, P.; SARKAR, J.; SINGH, B. P. Quantification of multianalyte by UPLC-QqQLIT-MS/MS and in-vitro anti-proliferative screening in *Cassia* species. **Industrial Crops and Products**, v. 76, n., p. 1133-1141, 2015 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.08.030>.

CHANG, S. W.; KIM, K. H.; LEE, I. K.; CHOI, S. U.; RYU, S. Y.; LEE, K. R. Phytochemical constituents of *Bistorta manshuriensis*. **Natural Product Sciences**, v. 15, n. 4, p. 234-240, 2009.

CHAUDHARI, S. S.; CHAUDHARI, S. R.; CHAVAN, M. J. Analgesic, anti-inflammatory and anti-arthritic activity of *Cassia uniflora* Mill. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 2, n. 1, Supplement, p. S181-S186, 2012 DOI: [https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(12\)60155-5](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(12)60155-5).

CHAVES, M. H. Análise de extratos de plantas por CCD: uma metodologia aplicada à disciplina "química orgânica". **Quimica Nova**, v. 20, n., p. 560-562, 1997.

CHEN, H.; VIRK, M. S.; CHEN, F. Phenolic acids inhibit the formation of advanced glycation end products in food simulation systems depending on their reducing powers and structures. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 67, n. 4, p. 400-411, 2016 DOI: <https://10.3109/09637486.2016.1166187>.

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 DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules190710427>.

CHENG, G.; ZHOU, S.-H.; WEN, R.-D.; XIE, T.-L.; HUANG, Y.; YANG, Y.; GUAN, J.-X.; XIE, L.-J.; ZHANG, J. Anthocyanin characteristics of wines in *Vitis germplasm*s cultivated in southern China. **Food Science and Technology**, v. 38, n. 3, p. 13-521, 2017 DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/1678-457x.37516>.

CHENG, H.-L.; ZHANG, L.-J.; LIANG, Y.-H.; HSU, Y.-W.; LEE, I. J.; LIAW, C.-C.; HWANG, S.-Y.; KUO, Y.-H. Antiinflammatory and Antioxidant Flavonoids and Phenols from *Cardiospermum halicacabum* (Dào Dì Líng). **Journal of traditional and complementary medicine**, v. 3, n. 1, p. 33-40, 2013 DOI: <https://10.4103/2225-4110.106541>.

CHETHANA, K. R.; SENOL, F. S.; ORHAN, I. E.; ANILAKUMAR, K. R.; KERI, R. S. *Cassia tora* Linn.: A boon to Alzheimer's disease for its anti-amyloidogenic and cholinergic activities. **Phytomedicine**, v. 33, n., p. 43-52, 2017 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2017.06.002>.

CHI-HAO, W.; GOW-CHIN, Y. Inhibitory effect of naturally occurring flavonoids on the formation of advanced glycation end products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 8, p. 3167-3173, 2005 DOI: <https://10.1021/jf048550u>.

CLAYDEN, J.; GREEVES, N.; WARREN, S.; WOTHERS, P. **Organic Chemistry**. ed. New York: Oxford University Press, 2000. 825 p.

CLSI. **Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; Approved standard - third edition. CLSI document**. 3. ed. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008. 27 p.

CORREIA, A. F.; SILVEIRA, D.; FONSECA-BAZZO, Y. M.; MAGALHÃES, P. O.; FAGG, C. W.; DA SILVA, E. C.; GOMES, S. M.; GANDOLFI, L.; PRATESI, R.; DE MEDEIROS NÓBREGA, Y. K. Activity of crude extracts from Brazilian cerrado plants against clinically relevant *Candida* species. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 16, n. 1, p. 203, 2016 DOI: <https://10.1186/s12906-016-1164-3>.

CROTEAU, R.; KUTCHAN, T. M.; LEWIS, N. G. Natural products (secondary metabolites). In: BUCHANAN, B. et al. **Biochemistry and molecular biology of plants** Rockville: American Society of Plant Physiologists, 2000. cap. 24, p. 1250-1318.

CUNHA, L.; DE MORAIS, S.; MARTINS, C.; MARTINS, M.; CHANG, R.; AQUINO, F.; DE OLIVEIRA, A.; MORAES, T.; MACHADO, F.; SILVA, C.; NASCIMENTO, E. Chemical Composition, Cytotoxic and Antimicrobial Activity of Essential Oils from *Cassia bakeriana* Craib. against Aerobic and Anaerobic Oral Pathogens. **Molecules**, v. 18, n. 4, p. 4588, 2013 DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules18044588>.

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 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2016.08.002>.

CUSHNIE, T. P. T.; LAMB, A. J. Antimicrobial activity of flavonoids. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 26, n. 5, p. 343-356, 2005 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2005.09.002>.

DAVE, H.; LEDWANI, L. A review on anthraquinones isolated from *Cassia* species and their applications. **Indian Journal of Natural Products and Resources** v. 3, n. 3, p. 291-319, 2012.

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, n., p. 56-72, 2018 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mtchem.2018.05.001>.

DESHPANDE, S.; KEWATKAR, S. M.; PAITHANKAR, V. V. In-vitro antioxidant activity of different fraction of roots of *Cassia auriculata* Linn. **Drug Invention Today**, v. 5, n. 2, p. 164-168, 2013 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.dit.2013.05.006>.

DEWICK, P. M. **Medicinal natural products: a biosynthetic approach** 3. ed. Wiley, 2012. 550 p.

DHANASEKARANA, M.; IGNACIMUTHU, S.; AGASTIAN, P. Potential hepatoprotective activity of ononitol monohydrate isolated from *Cassia tora* L. on carbon tetrachloride induced hepatotoxicity in wistar rats. **Phytomedicine**, v. 16, n. 9, p. 891–895, 2009 DOI: 10.1016/j.phymed.2009.02.006.

DI STASI, L. C.; HIRUMA-LIMA, C. A. **Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica**. 2. ed. São Paulo: UNESP, 2002. 281-284 p.

DI STEFANO, E.; OLIVIERO, T.; UDENIGWE, C. C. Functional significance and structure–activity relationship of food-derived α -glucosidase inhibitors. **Current Opinion in Food Science**, v. 20, n., p. 7-12, 2018 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2018.02.008>.

DIAS, D. A.; URBAN, S.; ROESSNER, U. A Historical Overview of Natural Products in Drug Discovery. **Metabolites**, v. 2, n. 2, p. 303, 2012.

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, n., p. 1-10, 2017 DOI: <https://10.1155/2017/8246420>.

DUONG, P. Q.; DUYEN, N.; QUYEN, P.; TUNG, N.; SON, V.; DINHHUNG, V.; DANGQUANG, L. Isolation and identification of phenolic compounds from the leaf extract of *Cassia alata* L. **Vietnam Journal of Chemistry**, v. 5, n. 55, p. 589-594, 2017 DOI: <https://10.15625/2525-2321.2017-00513>.

DUTRA, R. C.; CAMPOS, M. M.; SANTOS, A. R. S.; CALIXTO, J. B. Medicinal plants in Brazil: Pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. **Pharmacological Research**, v. 112, n., p. 4-29, 2016 DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.phrs.2016.01.021>.

DUTTA, S.; MAHALANOBISH, S.; SAHA, S.; GHOSH, S.; SIL, P. C. Natural products: An upcoming therapeutic approach to cancer. **Food and Chemical Toxicology**, v. 128, n., p. 240-255, 2019 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.04.012>.

DZIB-GUERRA, W. D. C.; ESCALANTE-EROSA, F.; GARCÍA-SOSA, K.; DERBRÉ, S.; BLANCHARD, P.; RICHOMME, P.; PEÑA-RODRÍGUEZ, L. M. Anti-advanced glycation end-product and free radical scavenging activity of plants from the Yucatecan flora. **Pharmacognosy Research**, v. 8, n. 4, p. 276-280, 2016 DOI: <https://10.4103/0974-8490.188883>.

EL-SAYYAD, S. M.; ROSS, S. A.; SAYED, H. M. New Isoquinolone Alkaloids from the Leaves of *Cassia siamea*. **Journal of Natural Products**, v. 47, n. 4, p. 708-710, 1984 DOI: <https://10.1021/np50034a025>.

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.

ELSHIKH, M.; AHMED, S.; FUNSTON, S.; DUNLOP, P.; MCGAW, M.; MARCHANT, R.; BANAT, I. M. Resazurin-based 96-well plate microdilution method for the determination of minimum inhibitory concentration of biosurfactants. **Biotechnology Letters**, v. 38, n., p. 1015-1019, 2016 DOI: <https://10.1007/s10529-016-2079-2>.

ESAKKIRAJAN, M.; PRABHU, N. M.; ARULVASU, C.; BEULAJA, M.; MANIKANDAN, R.; THIAGARAJAN, R.; GOVINDARAJU, K.; PRABHU, D.; DINESH, D.; BABU, G.; DHANASEKARAN, G. Anti-proliferative effect of a compound isolated from *Cassia auriculata* against human colon cancer cell line HCT 15. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 120, n., p. 462-466, 2014a DOI: <https://doi.org/10.1016/j.saa.2013.09.102>.

ESAKKIRAJAN, M.; PRABHU, N. M.; MANIKANDAN, R.; BEULAJA, M.; PRABHU, D.; GOVINDARAJU, K.; THIAGARAJAN, R.; ARULVASU, C.; DHANASEKARAN, G.; DINESH, D.; BABU, G. Apoptosis mediated anti-proliferative effect of compound isolated from *Cassia auriculata* leaves against human colon cancer cell line. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 127, n., p. 484-489, 2014b DOI: <https://doi.org/10.1016/j.saa.2014.02.073>.

FABRE, N.; RUSTAN, I.; DE HOFFMANN, E.; QUETIN-LECLERCQ, J. Determination of flavone, flavonol, and flavanone aglycones by negative ion liquid chromatography electrospray ion trap mass spectrometry. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 12, n. 6, p. 707-715, 2001 DOI: [https://doi.org/10.1016/S1044-0305\(01\)00226-4](https://doi.org/10.1016/S1044-0305(01)00226-4).

FAI, P. B.; GRANT, A. A rapid resazurin bioassay for assessing the toxicity of fungicides. **Chemosphere**, v. 74, n. 9, p. 1165-1170, 2009 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.11.078>.

FALCONE FERREYRA, M. L.; RIUS, S. P.; CASATI, P. Flavonoids: biosynthesis, biological functions, and biotechnological applications. **Frontiers in Plant Science**, v. 3, n., p., 2012 DOI: <https://10.3389/fpls.2012.00222>.

FERREIRA, T. S.; MOREIRA, C. Z.; CÁRIA, N. Z.; VICTORIANO, G.; SILVA JR, W. F.; MAGALHÃES, J. C. Phytotherapy: an introduction to its history, use and application. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 16, n. 2, p. 290-298, 2014 DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-05722014000200019>

FIDEL, P. L.; VAZQUEZ, J. A.; SOBEL, J. D. Candida glabrata: Review of Epidemiology, Pathogenesis, and Clinical Disease with Comparison to *C. albicans*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, n. 1, p. 80-96, 1999.

GAJBHIYE, R. L.; GANAPATHY, A.; JAISANKAR, P. A review of α -glucosidase and α -amylase inhibitors for type 2 diabetes isolated from some important indian medicinal plants. **Annals of Clinical Pharmacology and Therapeutics**, v. 1, n. 1, p. 1-10, 2018.

GANAPATY, S.; THOMAS, P. S.; RAMANA, K. V.; VIDYADHAR, K. N.; CHAKRADHAR, V. A Review of Phytochemical Studies of *Cassia* Species. **Journal of Natual Remedies**, v. 2, n. 2, p. 19, 2002 DOI: <https://10.18311/jnr/2002/141>.

GARCÍA, A. Á.; CARRIL, E. P.-U. Metabolismo secundario de plantas. **REDUCA (Biología)**, v. 2, n. 3, p. 119-145, 2009.

GE, Y.-W.; ZHU, S.; KAZUMA, K.; WEI, S.-L.; YOSHIMATSU, K.; KOMATSU, K. Molecular ion index assisted comprehensive profiling of B-type oligomeric proanthocyanidins in rhubarb by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 408, n. 13, p. 3555-3570, 2016 DOI: <https://10.1007/s00216-016-9433-z>.

GEORGES, K.; JAYAPRAKASAM, B.; DALAVOY, S. S.; NAIR, M. G. Pest-managing activities of plant extracts and anthraquinones from *Cassia nigricans* from Burkina Faso. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 6, p. 2037-2045, 2008 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.02.049>.

GIADA, M. Food phenolic compounds: Main classes, sources and their antioxidant power. In: MORALES-GONZÁLE, J. A. **Oxidative Stress and Chronic Degenerative Diseases—A Role for Antioxidants**, Rijeka: InTech, 2013. cap. 4, p. 87–112.

GKOGKOLOU, P.; BÖHM, M. Advanced glycation end products: key players in skin aging? **Dermato-Endocrinology**, v. 4, n. 3, p. 259-270, 2012 DOI: <https://doi.org/10.4161/derm.22028>.

GLOBAL Action Fund for Fungal Infections. [2018]. Disponível em: <https://www.gaffi.org/>. Acesso em: 8 jun. 2018.

GLOSTER, T. M.; DAVIES, G. J. Glycosidase inhibition: assessing mimicry of the transition state. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 8, n. 2, p. 305-320, 2010 DOI: <https://doi.org/10.1039/b915870g>.

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 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2010.08.002>.

GOUVEIA, N. M.; RODRIGUES, W. F.; SOUSA, R. M. F.; CALÁBRIA, L. K.; MUNDIM, A. V.; MIGUEL, C. B.; OLIVEIRA, C. J. F.; LAZO-CHICA, J. E.; OLIVEIRA, A.; LAGO, J. H. G.; DOS SANTOS, V. B.; LAGO, C. L. et al. Phytochemical characterization of the *Vochysia rufa* (Vochysiaceae) extract and its effects on oxidative stress in the pancreata of streptozotocin-induced diabetic rats. **PloS One**, v. 12, n. 10, p. 1-16, 2017 DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184807>.

GOUVEIA, N. M. D.; ALBUQUERQUE, C. L. D.; ESPINDOLA, L. S.; ESPINDOLA, F. S. *Pouteria ramiflora* extract inhibits salivary amylolytic activity and decreases glycemic level in mice. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 85, n., p. 1141-1148, 2013 DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0001-37652013000300016>.

GOVINDARAJAN, M.; SIVAKUMAR, R.; RAJESWARI, M. Larvicidal efficacy of *Cassia fistula* Linn. leaf extract against *Culex tritaeniorhynchus* Giles and *Anopheles subpictus* Grassi (Diptera:Culicidae). **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v. 1, n. 4, p. 295-298, 2011 DOI: [https://doi.org/10.1016/S2222-1808\(11\)60070-4](https://doi.org/10.1016/S2222-1808(11)60070-4).

GRANDI, T. S. M. **Tratado das plantas medicinais: minerais, nativas e cultivadas**. 1. ed. Belo Horizonte: Adaequatio Estúdio, 2014. 365-367 p.

GRZEGORCZYK-KAROLAK, I.; GOŁĄB, K.; GBUREK, J.; WYSOKIŃSKA, H.; MATKOWSKI, A. Inhibition of advanced glycation end-product formation and antioxidant activity by extracts and polyphenols from *Scutellaria alpina* L. and *S. altissima* L. **Molecules**, v. 21, n. 6, p. 739, 2016 DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules21060739>.

GRZESIK, M.; NAPARŁO, K.; BARTOSZ, G.; SADOWSKA-BARTOSZ, I. Antioxidant properties of catechins: Comparison with other antioxidants. **Food Chemistry**, v. 241, n., p. 480-492, 2018 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.08.117>.

GU, L.; KELM, M. A.; HAMMERSTONE, J. F.; ZHANG, Z.; BEECHER, G.; HOLDEN, J.; HAYTOWITZ, D.; PRIO, R. L. Liquid chromatographic/electrospray ionization mass spectrometric studies of proanthocyanidins in foods. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 38, n. 12, p. 1272-1280, 2003 DOI: <https://doi.org/10.1002/jms.541>.

GUNATILAKA, A. L. Plant natural products In: CIVJAN, N. **Natural products in chemical biology** Wiley 2012. cap. 1, p. 3-29.

GUPTA, N.; RATHI, P.; GUPTA, R. Simplified para-nitrophenyl palmitate assay for lipases and esterases. **Analytical Biochemistry**, v. 311, n. 1, p. 98-99, 2002 DOI: [https://doi.org/10.1016/S0003-2697\(02\)00379-2](https://doi.org/10.1016/S0003-2697(02)00379-2).

GUPTA, S.; SHARMA, S. B.; BANSALB, S. K.; PRABHU, K. M. Antihyperglycemic and hypolipidemic activity of aqueous extract of *Cassia auriculata* L. leaves in experimental diabetes. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 123, n. 3, p. 499-503, 2009 DOI: <https://10.1016/j.jep.2009.02.019>.

GUZMAN, J. Natural Cinnamic Acids, Synthetic Derivatives and Hybrids with Antimicrobial Activity. **Molecules**, v. 19, n. 12, p. 19292, 2014 DOI: <https://10.3390/molecules191219292>

HABTEMARIAM, S. Antihyperlipidemic components of *Cassia auriculata* aerial parts: identification through in vitro studies. **Phytotherapy Research**, v. 27, n. 1, p. 152–155, 2013 DOI: <https://10.1002/ptr.4711>.

HAMEDI, A.; KHOSHNOUD, M.; TANIDEH, N.; ABBASI, F.; FERREIDONNEZHAD, M.; MEHRABANI, D. Reproductive Toxicity of *Cassia Absus* Seeds in Female Rats: Possible Progesteronic Properties of Chaksine and b-Sitosterol. **Pharmaceutical Chemistry Journal**, v. 49, n. 4, p. 268-274, 2015 DOI: <https://10.1007/s11094-015-1268-y>.

HARVEY, A. L. Natural products in drug discovery. **Drug Discovery Today**, v. 13, n. 19, p. 894-901, 2008 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2008.07.004>.

HERNÁNDEZ-CASTRO, C.; DIAZ-CASTILLO, F.; MARTÍNEZ-GUTIERREZ, M. Ethanol extracts of *Cassia grandis* and *Tabernaemontana cymosa* inhibit the in vitro replication of dengue virus serotype 2. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v. 5, n. 2, p. 98-106, 2015 DOI: [https://doi.org/10.1016/S2222-1808\(14\)60635-6](https://doi.org/10.1016/S2222-1808(14)60635-6).

HUBER, L. S.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Flavonóis e flavonas: fontes brasileiras e fatores que influenciam a composição em alimentos. **Alimentos e Nutrição**, v. 19, n. 1, p. 97-108, 2008.

HUSSAIN, F.; SHAHID, M.; JAVED, K. Antioxidant, antiglycation and alpha amylase inhibitory activities of *Cassia absus* seeds. **Current Science Perspectives**, v. 2, n. 1, p. 5-9, 2016.

IRSHAD, M.; SHREAZ, S.; MANZOOR, N.; KHAN, L. A.; RIZVI, M. M. A. Anticandidal activity of *Cassia fistula* and its effect on ergosterol biosynthesis. **Pharmaceutical Biology**, v. 49, n. 7, p. 727-733, 2011 DOI: <https://10.3109/13880209.2010.544318>.

JANG, D. S.; LEE, G. Y.; KIM, Y. S.; LEE, Y. M.; KIM, C.-S.; YOO, J. L.; KIM, J. S. Anthraquinones from the seeds of *Cassia tora* with inhibitory activity on protein glycation and aldose reductase. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 30, n. 11, p. 2207-2210, 2007 DOI: <https://10.1248/bpb.30.2207>.

JAWED, A.; SINGH, G.; KOHLI, S.; SUMERA, A.; HAQUE, S.; PRASAD, R.; PAUL, D. Therapeutic role of lipases and lipase inhibitors derived from natural resources for remedies against metabolic disorders and lifestyle diseases. **South African Journal of Botany**, v., n., p., 2018 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2018.04.004>.

JI, H.-F.; LI, X.-J.; ZHANG, H.-Y. Natural products and drug discovery. Can thousands of years of ancient medical knowledge lead us to new and powerful drug combinations in the fight against cancer and dementia? **EMBO Reports**, v. 10, n. 3, p. 194-200, 2009 DOI: <https://10.1038/embor.2009.12>.

JOHANSEN, J. S.; HARRIS, A. K.; RYCHLY, D. J.; ERGUL, A. Oxidative stress and the use of antioxidants in diabetes: Linking basic science to clinical practice. **Cardiovascular Diabetology**, v. 4, n., p. 1-11, 2005 DOI: <https://10.1186/1475-2840-4-5>.

JONES, L.; BARTHOLOMEW, B.; LATIF, Z.; SARKER, S. D. Constituents of *Cassia laevigata*. **Fitoterapia**, v. 71, n., p. 580-583, 2000.

JR WRIGHT, E.; SCISM-BACON, J. L.; GLASS, L. C. Oxidative stress in type 2 diabetes: the role of fasting and postprandial glycaemia. **International Journal of Clinical Practice**, v. 60, n. 3, p. 308-314, 2006 DOI: <https://10.1111/j.1368-5031.2006.00825.x>.

JUAN-BADATURUGE, M.; HABTEMARIAM, S.; THOMAS, M. J. K. Antioxidant compounds from a South Asian beverage and medicinal plant, *Cassia auriculata*. **Food Chemistry**, v. 125, n. 1, p. 221-225, 2011 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.08.065>.

JUNG, D. H.; KIM, Y. S.; KIM, N. H.; LEE, J.; JANG, D. S.; KIM, J. S. Extract of *Cassiae Semen* and its major compound inhibit S100b-induced TGF- β 1 and fibronectin expression in mouse glomerular mesangial cells. **European Journal of Pharmacology**, v. 641, n. 1, p. 7-14, 2010 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2010.04.061>.

JUNG, H. A.; PARK, J. J.; MIN, B. S.; JUNG, H. J.; ISLAM, M. N.; CHOI, J. S. Inhibition of advanced glycation endproducts formation by Korean thistle, *Cirsium maackii*. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 8, n. 1, p. 1-5, 2015 DOI: [https://doi.org/10.1016/S1995-7645\(14\)60178-4](https://doi.org/10.1016/S1995-7645(14)60178-4).

JUSTESEN, U. Collision-induced fragmentation of deprotonated methoxylated flavonoids, obtained by electrospray ionization mass spectrometry. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 36, n., p. 169-78, 2001 DOI: <https://10.1002/jms.118>.

JUSTINO, A. B.; MIRANDA, N. C.; FRANCO, R. R.; MARTINS, M. M.; SILVA, N. M. D.; ESPINDOLA, F. S. *Annona muricata* Linn. leaf as a source of antioxidant compounds with in vitro antidiabetic and inhibitory potential against α -amylase, α -glucosidase, lipase, non-enzymatic glycation and lipid peroxidation **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 100, n., p. 83-92, 2018 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.01.172>.

JUSTINO, A. B.; PEREIRA, M. N.; VILELA, D. D.; PEIXOTO, L. G.; MARTINS, M. M.; TEIXEIRA, R. R.; MIRANDA, N. C.; SILVA, N. M. D.; SOUSA, R. M. F. D.; OLIVEIRA,

A. D.; ESPINDOLA, F. S. Peel of araticum fruit (*Annona crassiflora* Mart.) as a source of antioxidant compounds with α -amylase, α -glucosidase and glycation inhibitory activities **Bioorganic Chemistry**, v. 69, n., p. 167-182, 2016 DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bioorg.2016.11.001>

JYOTHI, K. S. N.; HEMALATHA, P.; AVANTHI, A.; CHALLA, S. A comparative analysis on the alpha amylase inhibitory potential of six ornamental medicinal plants **Scholars Research Library** v. 3, n. 3, p. 1-6, 2013.

KAILA, B.; RAMAN, M. Obesity: A review of pathogenesis and management strategies. **Canadian Journal of Gastroenterology**, v. 22, n. 1, p. 61-68, 2008.

KAJDŽANOSKA, M.; GJAMOVSKI, V.; STEFOVA, M. HPLC-DAD-ESI-MSⁿ identification of phenolic compounds in cultivated strawberries from Macedonia. **Macedonian Journal of Chemistry and Chemical Engineering**, v. 29, n. 2, p. 14, 2010 DOI: <https://10.20450/mjce.2010.165>.

KALITA, D.; HOLM, D. G.; LABARBERA, D. V.; PETRASH, J. M.; JAYANTY, S. S. Inhibition of α -glucosidase, α -amylase, and aldose reductase by potato polyphenolic compounds. **PloS One**, v. 13, n. 1, p. 1-21, 2018 DOI: <https://10.1371/journal.pone.0191025>.

KALLEMEIJN, W. W.; WITTE, M. D.; WENNEKES, T.; AERTS, J. M. F. G. Chapter 4 - Mechanism-based inhibitors of glycosidases: design and applications. In: HORTON, D. **Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry**, Academic Press, 2014. cap. 4, p. 297-338.

KANGRALKAR, V. A.; PATIL, S. D.; BANDIVADEKAR, R. M. OXIDATIVE STRESS AND DIABETES: A REVIEW. **International Journal of Pharmaceutical Applications**, v. 1, n. 1, p. 38-45, 2010.

KARTHIKEYAN, S.; GOBIANAND, K. Antiulcer activity of ethanol leaf extract of *Cassia fistula*. **Pharmaceutical Biology**, v. 48, n. 8, p. 869–877, 2010 DOI: <https://doi.org/10.3109/13880200903302838>.

KASHIWAGI, A. Complications of Diabetes Mellitus and Oxidative Stress. **Journal of the Japan Medical Association**, v. 44, n. 12, p. 521–528, 2001.

KENNEDY, D. O.; WIGHTMAN, E. L. Herbal Extracts and Phytochemicals: Plant Secondary Metabolites and the Enhancement of Human Brain Function. **Advances in Nutrition**, v. 2, n. 1, p. 32-50, 2011 DOI: <https://10.3945/an.110.000117>.

KHAN, M. R.; KIHARA, M.; OMOLOSO, A. D. Antimicrobial activity of *Cassia alata*. **Fitoterapia**, v. 72, n. 5, p. 561-564, 2001 DOI: [https://doi.org/10.1016/S0367-326X\(00\)00335-X](https://doi.org/10.1016/S0367-326X(00)00335-X).

KHAN, R. A. Natural products chemistry: The emerging trends and prospective goals. **Saudi pharmaceutical journal**, v., n., p., 2018 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2018.02.015>.

KHANGHOLI, S.; ABDUL MAJID, F.; JABBAR, N.; FAREDIAH, A.; AZIZ, R. The mechanisms of inhibition of advanced glycation end products formation through

polyphenols in hyperglycemic condition. **Planta Medica**, v. 82, n. 1/2, p. 32-45, 2015 DOI: <https://doi.org/10.1055/s-0035-1558086>.

KIM, K.-H.; TSAO, R.; YANG, R.; CUI, S. W. Phenolic acid profiles and antioxidant activities of wheat bran extracts and the effect of hydrolysis conditions. **Food Chemistry**, v. 95, n. 3, p. 466-473, 2006 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.01.032>.

KIM, Y. S.; JUNG, D. H.; SOHN, E.; LEE, Y. M.; KIM, C.-S.; KIM, J. S. Extract of *Cassiae semen* attenuates diabetic nephropathy via inhibition of advanced glycation end products accumulation in streptozotocin-induced diabetic rats. **Phytomedicine**, v. 21, n. 5, p. 734-739, 2014 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2013.11.002>.

KINJO, J.; IKEDA, T.; WATANABE, K.; NOHARA, T. An anthraquinone glycoside from *Cassia angustifolia* leaves. **Phytochemistry**, v. 37, n. 6, p. 1685-1687, 1994 DOI: [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)89592-8](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)89592-8).

KOLAR, F. R.; GOGI, C. L.; KHUDAVAND, M. M.; CHOUDHARI, M. S.; PATIL, S. B. Phytochemical and antioxidant properties of some *Cassia* species. **Natural Product Research**, v. 32, n. 11, p. 1324-1328, 2018 DOI: <https://doi.org/10.1080/14786419.2017.1342085>.

KONG, W. J.; WANG, J. B.; JIN, C.; ZHAO, Y. L.; DAI, C. M.; XIAO, X. H.; LI, Z. L. Effect of emodin on *Candida albicans* growth investigated by microcalorimetry combined with chemometric analysis. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 83, n. 6, p. 1183-1190, 2009 DOI: <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2054-0>.

KRASTEVA, I.; NIKOLOV, S. Flavonoids in *Astragalus corniculatus*. **Quimica Nova**, v. 31, n. 1, p. 59-60, 2008 DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422008000100012>.

KRENTZ, A. J.; BAILEY, C. J. Oral Antidiabetic Agents. **Drugs**, v. 65, n. 3, p. 385-411, 2005 DOI: <https://doi.org/10.2165/00003495-200565030-00005>.

KRISHNAMURTI, C.; RAO, S. S. C. C. The isolation of morphine by Serturmer. **Indian Journal of Anaesthesia**, v. 60, n. 11, p. 861-862, 2016 DOI: 10.4103/0019-5049.193696.

KROYMANN, J. Natural diversity and adaptation in plant secondary metabolism. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 14, n. 3, p. 246-251, 2011 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2011.03.021>.

KUERBAN, A.; MOSELHY, S. S.; ALMULAIKY, Y. Q.; RAZVI, S. S.; HASAN, M. N.; ABULNAJA, K. O.; KUMOSANI, T. A.; L-AL-MALKI, A. Natural compounds that inhibit protein glycation: a review for recent findings. **Indo American Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 4, n. 11, p. 4027-4042, 2017 DOI: <http://doi.org/10.5281/zenodo.1045214>.

KUETE, V. Potential of Cameroonian Plants and Derived Products against Microbial Infections: A Review. **Planta Medica**, v. 76, n. 14, p. 1479-1491, 2010 DOI: <https://doi.org/10.1055/s-0030-1250027>.

KUETE, V.; NANA, F.; NGAMENI, B.; MBAVENG, A. T.; KEUMEDJIO, F.; NGADJUI, B. T. Antimicrobial activity of the crude extract, fractions and compounds from stem bark of *Ficus ovata* (Moraceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 124, n. 3, p. 556-561, 2009 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2009.05.003>.

KUMAR, D.; KARMASE, A.; JAGTAP, S.; SHEKHAR, R.; BHUTANI, K. Pancreatic lipase inhibitory activity of cassiamin A, a bianthraquinone from *Cassia siamea*. **Natural Product Communications**, v. 8, n. 0, p. 1-4, 2013.

KUMAR, S.; KUMAR, V.; PRAKASH, O. Antidiabetic and anti-lipemic effects of *Cassia siamea* leaves extract in streptozotocin induced diabetic rats. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 3, n. 11, p. 871-873, 2010 DOI: [https://doi.org/10.1016/S1995-7645\(10\)60209-X](https://doi.org/10.1016/S1995-7645(10)60209-X).

KUMAR, S.; PANDEY, A. K. Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. **The Scientific World Journal**, v. 2013, n., p. 16, 2013 DOI: <https://10.1155/2013/162750>.

KUNDU, S.; ROY, S.; LYNDEM, L. M. Broad spectrum anthelmintic potential of Cassia plants. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 4, n., p. 436-441, 2014 DOI: <https://doi.org/10.12980/APJTB.4.2014C1252>.

KURIKI, T.; IMANAKA, T. The concept of the α -amylase family: Structural similarity and common catalytic mechanism. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 87, n. 5, p. 557-565, 1999 DOI: [https://doi.org/10.1016/S1389-1723\(99\)80114-5](https://doi.org/10.1016/S1389-1723(99)80114-5).

LAM, K. S. New aspects of natural products in drug discovery. **Trends in Microbiology**, v. 15, n. 6, p. 279-289, 2007 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tim.2007.04.001>.

LI, D.; FU, D.; ZHANG, Y.; MA, X.; GAO, L.; WANG, X.; ZHOU, D.; ZHAO, K. Isolation, purification, and Identification of Taxol and Related Taxanes from Taxol-Producing Fungus *Aspergillus niger* subsp. taxi. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 27, n. 8, p. 1379-1385, 2017 DOI: <https://10.4014/jmb.1701.01018>.

LIMA, C. S.; POLAQUINI, C. R.; SANTOS, M. B. D.; GULLO, F. P.; LEITE, F. S.; SCORZONI, L.; BOLZANI, V. D. S.; MENDES-GIANNINI, M. J. S.; FUSCO-ALMEIDA, A. M.; REZENDE, A. A.; REGASINI, L. O. Anti-*Candida* and anti-*Cryptococcus* evaluation of 15 non-alkaloidal compounds from *Pterogyne nitens*. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 6, n. 10, p. 841-845, 2016 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.apjtb.2016.08.003>.

LIN, D.; XIAO, M.; ZHAO, J.; LI, Z.; XING, B.; LI, X.; KONG, M.; LI, L.; ZHANG, Q.; LIU, Y.; CHEN, H.; QIN, W. et al. An Overview of Plant Phenolic Compounds and Their Importance in Human Nutrition and Management of Type 2 Diabetes. **Molecules**, v. 21, n. 10, p. 1374, 2016.

LITESCU, S. C.; EREMIA, S. A. V.; TACHE, A.; VASILESCU, I.; RADU, G.-L. Chapter 25 - The Use of Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) and Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC) Assays in the Assessment of Beverages' Antioxidant Properties. In: PREEDY, V. **Processing and Impact on Antioxidants in Beverages**, San Diego: Academic Press, 2014. cap. 25, p. 245-251.

- LIU, Z.-Q. Chemical Methods To Evaluate Antioxidant Ability. **Chemical Reviews**, v. 110, n. 10, p. 5675-5691, 2010 DOI: <https://10.1021/cr900302x>.
- LO PIPARO, E.; SCHEIB, H.; FREI, N.; WILLIAMSON, G.; GRIGOROV, M.; CHOU, C. J. Flavonoids for Controlling Starch Digestion: Structural Requirements for Inhibiting Human α -Amylase. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 51, n. 12, p. 3555-3561, 2008 DOI: <https://10.1021/jm800115x>.
- LORENZI, H.; SOUZA, H. M. D.; TORRES, M. A. V.; BACHER, L. B. **Árvores exóticas no Brasil: madeiras, ornamentais e aromáticas**. 1. ed. São Paulo: Nova Odessa, Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2003. 368 p.
- LU, M.; LI, T.; WAN, J.; LI, X.; YUAN, L.; SUN, S. Antifungal effects of phytocompounds on *Candida* species alone and in combination with fluconazole. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 49, n. 2, p. 125-136, 2017 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2016.10.021>.
- LUNAGARIYA, N. A.; PATEL, N. K.; JAGTAP, S. C.; BHUTANI, K. K. Inhibitors of pancreatic lipase: state of the art and clinical perspectives. **EXCLI Journal**, v. 13, n., p. 897-921, 2014.
- MA, C.-M.; ABE, T.; KOMIYAMA, T.; WANG, W.; HATTORI, M.; DANESHTALAB, M. Synthesis, anti-fungal and 1,3- β -d-glucan synthase inhibitory activities of caffeic and quinic acid derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 18, n. 19, p. 7009-7014, 2010 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2010.08.022>.
- MACHADO, R. B.; NETO, M. B. R.; PEREIRA, P. G. P.; CALDAS, E. F.; GONÇALVES, D. A.; SANTOS, N. S.; TABOR, K.; STEININGER, M. **Estimativas de perda da área do Cerrado brasileiro**. Brasília 2004. 22 p.
- MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA JR., V. F.; GRYNBERG, N. F.; ECHEVARRIA, A. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25, n., p. 429-438, 2002.
- MAJUMDAR, A. S.; SOMANI, S. J. Chapter 12 - Natural Products in Lifestyle Diseases: In Vitro Screening. In: MANDAL, S. C. et al. **Natural Products and Drug Discovery**, Elsevier, 2018. cap. p. 327-347.
- MANGAL, P.; KHARE, P.; JAGTAP, S.; BISHNOI, M.; KONDEPUDI, K. K.; BHUTANI, K. K. Screening of six Ayurvedic medicinal plants for anti-obesity potential: an investigation on bioactive constituents from *Oroxylum indicum* (L.) Kurz bark. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 197, n., p. 138-146, 2017 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2016.07.070>.
- MARCH, R. E.; MIAO, X.-S. A fragmentation study of kaempferol using electrospray quadrupole time-of-flight mass spectrometry at high mass resolution. **International Journal of Mass Spectrometry**, v. 231, n. 2, p. 157-167, 2004 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijms.2003.10.008>.
- MARITIM, A. C.; SANDERS, R. A.; WATKINS III, J. B. Diabetes, Oxidative Stress, and Antioxidants: A Review. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**, v. 17, n. 1, p. 24-38, 2003 DOI: <https://10.1002/jbt.10058>.

MARTINS, N.; BARROS, L.; HENRIQUES, M.; SILVA, S.; FERREIRA, I. C. F. R. Activity of phenolic compounds from plant origin against *Candida* species. **Industrial Crops and Products**, v. 74, n., p. 648-670, 2015 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.05.067>.

MATSUDA, H.; WANG, T.; MANAGI, H.; YOSHIKAWA, M. Structural requirements of flavonoids for inhibition of protein glycation and radical scavenging activities. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 11, n. 24, p. 5317-5323, 2003 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2003.09.045>.

MCMURRY, J. **Química Orgânica**. 6^a. ed. São Paulo Pioneira Thomson Learning 2005. p.

MCNAB, H.; FERREIRA, E. S. B.; HULME, A. N.; QUYE, A. Negative ion ESI-MS analysis of natural yellow dye flavonoids—An isotopic labelling study. **International Journal of Mass Spectrometry**, v. 284, n. 1, p. 57-65, 2009 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijms.2008.05.039>.

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.

MEHTA, N.; LADDHA, K. S. A Modified Method for Isolation of Rhein from Senna. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 71, n. 2, p. 128-129, 2009 DOI: <https://10.4103/0250-474x.54275>.

MELO, E. B. D.; CARVALHO, I. a e b-glucosidases como alvos moleculares para desenvolvimento de fármacos. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 840-843, 2006 DOI: <https://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422006000400036>

MINISTÉRIO do Meio ambiente. Plano de ação para prevenção e controle do desmatamento e das queimadas no: cerrado. [2011]. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/informma/item/618-ppcerrado>>. Acesso em: 6 jun. 2018.

MIOTTO, S. T. S.; LUDTKE, R.; ABRUZZI, M. L. A. O. A família Leguminosae no Parque Estadual de Itapuã, Viamão, Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 6, n. 3, p. 269-290, 2008.

MIRANDA, H. S.; SATO, M. N.; NETO, W. N.; AIRES, F. S. Fires in the cerrado, the Brazilian savanna. **Tropical Fire Ecology: Climate Change, Land Use, and Ecosystem Dynamics**, Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2009. cap. p. 427-450.

MIZGIER, P.; KUCHARSKA, A. Z.; SOKÓŁ-ŁĘTOWSKA, A.; KOLNIAK-OSTEK, J.; KIDOŃ, M.; FECKA, I. Characterization of phenolic compounds and antioxidant and anti-inflammatory properties of red cabbage and purple carrot extracts. **Journal of Functional Foods**, v. 21, n., p. 133-146, 2016 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.12.004>.

MOHAMED, G. A.; IBRAHIM, S. R. M.; ELKHAYAT, E. S.; EL DINE, R. S. Natural anti-obesity agents. **Bulletin of Faculty of Pharmacy, Cairo University**, v. 52, n. 2, p. 269-284, 2014 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bfopcu.2014.05.001>.

MOHAMMADI, A.; MANSOORI, B.; BARADARAN, B. Regulation of miRNAs by herbal medicine: An emerging field in cancer therapies. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 86, n., p. 262-270, 2017 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.12.023>.

MONDAL, A.; RAJALINGAM, D.; KUMAR MAITY, T. Anti-inflammatory effect of O-methylated flavonol 2-(3,4-dihydroxy-phenyl)-3,5-dihydroxy-7-methoxy-chromen-4-one obtained from *Cassia sophera* Linn in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 147, n. 2, p. 525-529, 2013 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2013.01.021>.

MONDAL, A.; RAJALINGAM, D.; MAITY, T. K. Anti-inflammatory effect of O-methylated flavonol 2-(3,4-dihydroxy-phenyl)-3,5-dihydroxy-7-methoxy-chromen-4-one obtained from *Cassia sophera* Linn in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 147, n. 2, p. 525-529, 2013. DOI: <https://10.1016/j.jep.2013.01.021>.

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

MONTEIRO, J. M.; ALBUQUERQUE, U. P. D.; ARAÚJO, E. D. L.; AMORIM, E. L. C. D. Taninos: uma abordagem da química à ecologia. **Quimica Nova**, v. 28, n., p. 892-896, 2005.

MORACE, G.; PERDONI, F.; BORGHI, E. Antifungal drug resistance in *Candida* species. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 2, n. 4, p. 254-259, 2014 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2014.09.002>.

MORISHITA, Y.; IINUMA, Y.; NAKASHIMA, N.; MAJIMA, K.; MIZUGUCHI, K.; KAWAMURA, Y. Total and pancreatic amylase measured with 2-chloro-4-nitrophenyl-4-O- β -D-galactopyranosylmaltoside. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 46, n. 7, p. 928-933, 2000.

MORIYAMA, H.; IIZUKA, T.; NAGAI, M.; MURATA, Y. HPLC quantification of kaempferol-3-O-gentiobioside in *Cassia alata*. **Fitoterapia**, v. 74, n. 5, p. 425-430, 2003.

MOURA, A. C. D. S.; VILEGA, W.; SANTOS, L. C. D. Identificação de alguns constituintes químicos de *Indigofera hirsuta* Linn. (Fabaceae) por CLAE-IES-EM (TOF) e avaliação da atividade antirradicalar. **Quimica Nova**, v. 34, n., p. 1136-1140, 2011 DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422011000700006>

NAGPAL, M. A.; NAGPAL, N.; RAHAR, S.; SHAH, G.; SWAMI, G.; KAPOOR, R. Phytochemical Investigation of Methanolic Extract of *Cassia fistula* Leaves. **Pharmacognosy Journal**, v. 3, n. 26, p. 61-69, 2011 DOI: <https://doi.org/10.5530/pj.2011.26.11>.

NAKAMURA, S.; XU, F.; NINOMIYA, K.; NAKASHIMA, S.; ODA, Y.; MORIKAWA, T.; MURAOKA, O.; YOSHIKAWA, M.; MATSUDA, H. Chemical Structures and Hepatoprotective Effects of Constituents from *Cassia auriculata* Leaves. **Chemical**

and **Pharmaceutical Bulletin**, v. 62, n. 10, p. 1026-1031, 2014a DOI: <https://10.1248/cpb.c14-00420>.

NAKAMURA, S.; XU, F.; NINOMIYA, K.; NAKASHIMA, S.; ODA, Y.; MORIKAWA, T.; MURAOKA, O.; YOSHIKAWA, M.; MATSUDA, I. Chemical structures and hepatoprotective effects of constituents from *Cassia auriculata* leaves. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 62, n. 10, p. 1026–1031, 2014b.

NANUMALA, S. K.; TULASI, P.; SUJITHA, E. In vitro anti-diabetic activity of seed extracts of *Cassia auriculata* and *Cassia angustifolia*. **European Journal of Experimental Biology**, v. 5, n. 5, p. 12-17, 2005.

NANUMALA, S. K.; TULASI, P.; SUJITHA, E. In vitro anti-diabetic activity of seed extracts of *Cassia auriculata* and *Cassia angustifolia*. **European Journal of Experimental Biology**, v. 5, n. 5, p. 12-17, 2015.

NAVARRO, M.; MOREIRA, I.; ARNAEZ, E.; QUESADA, S.; AZOFEIFA, G.; ALVARADO, D.; MONAGAS, M. J. Proanthocyanidin Characterization, Antioxidant and Cytotoxic Activities of Three Plants Commonly Used in Traditional Medicine in Costa Rica: *Petiveria alliacea* L., *Phyllanthus niruri* L. and *Senna reticulata* Willd. **Plants**, v. 6, n. 4, p. 50, 2017 DOI: <https://10.3390/plants6040050>.

NCUBE, B.; VAN STADEN, J. Tilting Plant Metabolism for Improved Metabolite Biosynthesis and Enhanced Human Benefit. **Molecules**, v. 20, n. 7, p. 12698-12731, 2015 DOI: 10.3390/molecules200712698.

NEGRI, M.; SALCI, T.; SHINOBU-MESQUITA, C.; CAPOCI, I.; SVIDZINSKI, T.; KIOSHIMA, E. Early State Research on Antifungal Natural Products. **Molecules**, v. 19, n. 3, p. 2925-2956, 2014.

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 DOI: <https://10.1021/acs.jnatprod.5b01055>.

NIEDOWICZ, D. M.; DALEKE, D. L. The role of oxidative stress in diabetic complications. **Cell Biochemistry and Biophysics**, v. 43, n. 2, p. 289–330, 2005 DOI: <https://10.1385/CBB:43:2:289>.

NTCHAPDA, F.; BARAMA, J.; AZAMBOU, D. R. K.; ETET, P. F. S.; DIMO, T. Diuretic and antioxidant activities of the aqueous extract of leaves of *Cassia occidentalis* (Linn.) in rats. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 8, n. 9, p. 685–693, 2015 DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.apjtm.2015.07.030>.

OBIOMA Cerrado. [2018]. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/biomas/cerrado.html> >. Acesso em: 7 jun. 2018.

OBOH, G.; AGUNLOYE, O.; ADEFEGHA, A.; AKINYEMI, A.; ADEMILUYI, A. Caffeic and chlorogenic acids inhibit key enzymes linked to type 2 diabetes (in vitro): a comparative study. **Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology**, v. 26, n. 2, p. 165-170, 2014 DOI: <https://10.1515/jbcpp-2013-0141>.

ODJAKOVA, M.; POPOVA, E.; SHARIF, M. A.; MIRONOVA, R. Plant-Derived Agents with Anti-Glycation Activity. INTECH Open Access Publisher, 2012. cap. p. 223-256.

OLIVEIRA, A. C. D.; VALENTIM, I. B.; GOULART, M. O. F.; SILVA, C. A.; BECHARA, E. J. H.; TREVISAN, M. T. S. Fontes vegetais naturais de antioxidantes. **Quimica Nova**, v. 32, n., p. 689-702, 2009.

OLIVEIRA, D. M.; SILVA, T. F. R.; MARTINS, M. M.; MORAIS, S. A. L. D.; CHANG, R.; AQUINO, F. J. T. D.; SILVA, C. V. D.; TEIXEIRA, T. L.; MARTINS, C. H. G.; MORAES, T. S.; CUNHA, L. C. S.; PIVATTO, M. et al. Antifungal and cytotoxicity activities of *Banisteriopsis argyrophylla* leaves. **Journal of Pharmacy and Pharma**, v. 70, n. 11, p. 1541-1552, 2018 DOI: <https://doi.org/10.1111/jphp.12996>.

OLIVEIRA, K. M. S. D.; SILVA, R. S. D.; CAVALCANTE, G. M. Atividade antifúngica de *Cassia fistula* frente a espécies associadas à candidíase vulvovaginal. **Revista Investigação** v. 15, n. 04, p. 108-112, 2016.

OU, B.; HUANG, D.; HAMPSCH-WOODILL, M.; FLANAGAN, J. A.; DEEMER, E. K. Analysis of Antioxidant Activities of Common Vegetables Employing Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) and Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) Assays: A Comparative Study. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 11, p. 3122-3128, 2002 DOI: <https://10.1021/jf0116606>.

ÖZDEN, S.; DÜRÜST, N.; TOKI, K.; SAITO, N.; HONDA, T. Acylated kaempferol glycosides from the flowers of delphinium formosum. **Phytochemistry**, v. 49, n. 1, p. 241-245, 1998 DOI: [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(97\)01044-3](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(97)01044-3).

OZGEN, S.; KILINC, O. K.; SELAMOGLU, Z. Antioxidant Activity of Quercetin: A Mechanistic Review. **Turkish Journal of Agriculture - Food Science and Technology**, v. 4, n. 12, p. 1134-1138, 2016 DOI: <https://10.24925/turjaf.v4i12.1134-1138.1069>.

OZOUGWU, O. **The pathogenesis and pathophysiology of type 1 and type 2 diabetes mellitus**. ed. 2013. 46-57 p.

PADUCH, R.; KANDEFER-SZERSZEN, M.; TRYTEK, M.; FIEDUREK, J. Terpenes: substances useful in human healthcare. **Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis**, v. 55, n. 5, p. 315-327, 2007.

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 of Separation Science**, v. 38, n. 8, p. 1277-1285, 2015 DOI: <https://doi.org/10.1002/jssc.201401297>.

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, n., p. 3610–3618, 2014 DOI: <https://10.1002/jssc.201400853>.

PANJA, P. Green extraction methods of food polyphenols from vegetable materials. **Current Opinion in Food Science**, v., n., p. 1-21, 2017 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2017.11.012>.

PARIKH, N. H.; PARIKH, P. K.; KOTHARI, C. Indigenous plant medicines for health care: treatment of Diabetes mellitus and hyperlipidemia. **Chinese Journal of Natural Medicines**, v. 12, n. 5, p. 335-344, 2014 DOI: [https://doi.org/10.1016/S1875-5364\(14\)60041-8](https://doi.org/10.1016/S1875-5364(14)60041-8).

PAWAR, H. A.; D'MELLO, P. M. Antifungal activity of methanolic extract of *Cassia tora* leaves against *Candida albicans*. **International Journal of Research in Ayurveda and Pharmacy**, v. 2, n. 3, p. 793-796, 2011.

PENG, X.; ZHANG, G.; LIAO, Y.; GONG, D. Inhibitory kinetics and mechanism of kaempferol on α -glucosidase. **Food Chemistry**, v. 190, n., p. 207-215, 2016 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.05.088>.

PERERA, P. R. D.; EKANAYAKE, S.; RANAWEERA, K. K. D. S. Comparison of Antiglycation and Antioxidant Potentials and Total Phenolic Contents of Decoctions from Antidiabetic Plants. **Procedia Chemistry**, v. 16, n., p. 519-524, 2015 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.proche.2015.12.087>.

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 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.04.102>.

PÉREZ, J. A. M.; AGUILAR, T. A. F. Chemistry of Natural Antioxidants and Studies Performed with Different Plants Collected in Mexico. In: MORALES-GONZÁLEZ, J. A. **Oxidative stress and chronic degenerative diseases: a role for antioxidants**, Rijeka: Intech, 2013. cap. 3, p. 59-85.

PERLIN, D. S.; RAUTEMAA-RICHARDSON, R.; ALASTRUEY-IZQUIERDO, A. The global problem of antifungal resistance: prevalence, mechanisms, and management. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 17, n. 12, p. 383-392 2017 DOI: [https://doi.org/10.1016/s1473-3099\(17\)30316-x](https://doi.org/10.1016/s1473-3099(17)30316-x).

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

PHAM-HUY, L. A.; HE, H.; PHAM-HUY, C. Free Radicals, Antioxidants in Disease and Health. **International Journal of Biomedical Science : IJBS**, v. 4, n. 2, p. 89-96, 2008.

PHAN, M. A. T.; WANG, J.; TANG, J.; LEE, Y. Z.; NG, K. Evaluation of α -glucosidase inhibition potential of some flavonoids from *Epimedium brevicornum*. **LWT - Food Science and Technology**, v. 53, n. 2, p. 492-498, 2013 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2013.04.002>.

PIANALTO, K.; ALSPAUGH, J. New Horizons in Antifungal Therapy. **Journal of Fungi**, v. 2, n. 4, p. 1-24, 2016 DOI: <https://doi.org/10.3390/jof2040026>.

PIETTA, P.-G. Flavonoids as Antioxidants. **Journal of Natural Products**, v. 63, n. 7, p. 1035-1042, 2000 DOI: <https://10.1021/np9904509>.

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 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jasms.2003.07.002>.

PILLAY, P.; VLEGAAR, R.; MAHARAJ, V. J.; SMITH, P. J.; LATEGAN, C. A.; CHOUTEAU, F.; CHIBALE, K. Antiplasmodial hirsutinolides from *Vernonia staeheleinoides* and their utilization towards a simplified pharmacophore. **Phytochemistry**, v. 68, n. 8, p. 1200-1205, 2007 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2007.02.019>.

PIZZOLATTI, M. G.; CUNHA JR., A.; SZPOGANICZ, B.; SOUSA, E. D.; BRAZ-FILHO, R.; SCHRIPSEMA, J. Flavonóides glicosilados das folhas e flores de *Bauhinia forficata* (Leguminosae). **Quimica Nova**, v. 26, n., p. 466-469, 2003 DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422003000400003>.

PLAZONIĆ, A.; BUCAR, F.; MALEŠ, Ž.; MORNAR, A.; NIGOVIĆ, B.; KUJUNDŽIĆ, N. Identification and Quantification of Flavonoids and Phenolic Acids in Burr Parsley (*Caucalis platycarpus* L.), Using High-Performance Liquid Chromatography with Diode Array Detection and Electrospray Ionization Mass Spectrometry. **Molecules**, v. 14, n. 7, p. 2466-2490, 2009 DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules14072466>.

POHL, C.; L F KOCK, J.; THIBANE, V. Antifungal free fatty acids: a review. **Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances**, Badajoz: Formatex Research Center, 2011. cap. p. 61-71.

PRABHAKAR, K.; KUMAR, L. S.; RAJENDRAN, S.; CHANDRASEKARAN, M.; BHASKAR, K.; SAJIT KHAN, A. K. Antifungal Activity of Plant Extracts against *Candida* Species from Oral Lesions. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 70, n. 6, p. 801-803, 2008 DOI: <https://doi.org/10.4103/0250-474x.49128>.

PRASANNA, R.; HARISH, C. C.; PICHAJ, R.; SAKTHISEKARAN, D.; GUNASEKARAN, P. Anti-cancer effect of *Cassia auriculata* leaf extract in vitro through cell cycle arrest and induction of apoptosis in human breast and larynx cancer cell lines. **Cell Biology International**, v. 33, n. 2, p. 127-134, 2009 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cellbi.2008.10.006>.

PRETTO JULIANA, B.; CECHINEL-FILHO, V.; NOLDIN VÂNIA, F.; SARTORI MARA, R. K.; ISAIAS DANIELA, E. B.; BELLA CRUZ, A. Antimicrobial Activity of Fractions and Compounds from *Calophyllum brasiliense* (Clusiaceae/Guttiferae). **Zeitschrift für Naturforschung C. A Journal of Biosciences**, v. 59, n. 9-10, p. 657-662, 2004 DOI: <https://doi.org/10.1515/znc-2004-9-1009>.

PRIOR, R. L.; HOANG, H.; GU, L.; WU, X.; BACCHIOCCA, M.; HOWARD, L.; HAMPSCH-WOODILL, M.; HUANG, D.; OU, B.; JACOB, R. Assays for Hydrophilic and Lipophilic Antioxidant Capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORACFL))

of Plasma and Other Biological and Food Samples. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 11, p. 3273-3279, 2003 DOI: <https://doi.org/10.1021/jf0262256>.

PROCHÁZKOVÁ, D.; BOUŠOVÁ, I.; WILHELMOVÁ, N. Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. **Fitoterapia**, v. 82, n. 4, p. 513-523, 2011 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2011.01.018>.

PRUETT, S. T.; BUSHNEV, A.; HAGEDORN, K.; ADIGA, M.; HAYNES, C. A.; SULLARDS, M. C.; LIOTTA, D. C.; MERRILL, A. H., JR. Biodiversity of sphingoid bases ("sphingosines") and related amino alcohols. **Journal of Lipid Research**, v. 49, n. 8, p. 1621-1639, 2008 DOI: <https://doi.org/10.1194/jlr.R800012-JLR200>.

QURRAT UL, A.; ASHIQ, U.; JAMAL, R. A.; SALEEM, M.; MAHROOF-TAHIR, M. Alpha-glucosidase and carbonic anhydrase inhibition studies of Pd(II)-hydrazide complexes. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 10, n. 4, p. 488-499, 2017 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.arabic.2015.02.024>.

RAFAËLLY, L.; HÉRON, S.; NOWIK, W.; TCHAPLA, A. Optimisation of ESI-MS detection for the HPLC of anthraquinone dyes. **Dyes and Pigments**, v. 77, n. 1, p. 191-203, 2008 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2007.05.007>.

RAJASEKHARAN, S. K.; RAMESH, S.; BAKKIYARAJ, D. Synergy of flavonoids with HDAC inhibitor: new approach to target *Candida tropicalis* biofilms. **Journal of Chemotherapy**, v. 27, n. 4, p. 246-249, 2015 DOI: <https://doi.org/10.1179/1973947814y.0000000186>.

RAMALHO, V. C.; JORGE, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. **Química Nova**, v. 29, n., p. 755-760, 2006 DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422006000400023>

RASOULI, H.; HOSSEINI-GHAZVINI, S. M.-B.; ADIBI, H.; KHODARAHMI, R. Differential α -amylase/ α -glucosidase inhibitory activities of plant-derived phenolic compounds: a virtual screening perspective for the treatment of obesity and diabetes. **Food & Function**, v. 8, n. 5, p. 1942-1954, 2017 DOI: <https://doi.org/10.1039/c7fo00220c>.

REJIYA, C. S.; CIBIN, T. R.; ABRAHAM, A. Leaves of *Cassia tora* as a novel cancer therapeutic – An in vitro study. **Toxicology In Vitro**, v. 23, n. 6, p. 1034-1038, 2009 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2009.06.010>.

RIBEIRO, A. B.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. D. S. Antioxidant flavonol glycosides from *Nectandra grandiflora* (Lauraceae). **Eclética Química**, v. 27, n., p. 35-44, 2002 DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-46702002000200004>

RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 20, n. 7, p. 933-956, 1996 DOI: [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(95\)02227-9](https://doi.org/10.1016/0891-5849(95)02227-9).

RIOS, J.-L.; FRANCINI, F.; SCHINELLA, G. Natural Products for the Treatment of Type 2 Diabetes Mellitus. **Planta Medica**, v. 81, n., p. 975–994, 2015 DOI: <https://doi.org/10.1055/s-0035-1546131>.

ROLLIN-PINHEIRO, R.; SINGH, A.; BARRETO-BERGTER, E.; DEL POETA, M. Sphingolipids as targets for treatment of fungal infections. **Future Medicinal Chemistry**, v. 8, n. 12, p. 1469-1484, 2016 DOI: <https://10.4155/fmc-2016-0053>.

ROLÓN, M.; VEGA, C.; ESCARIO, J. A.; GÓMEZ-BARRIO, A. Development of resazurin microtiter assay for drug sensibility testing of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. **Parasitology Research**, v. 99, n. 2, p. 103-107, 2006 DOI: <https://10.1007/s00436-006-0126-y>.

ROSSO, M.; PANIGHEL, A.; VEDOVA, A. D.; GARDIMAN, M.; FLAMINI, R. Characterization of Non-Anthocyanic Flavonoids in Some Hybrid Red Grape Extracts Potentially Interesting for Industrial Uses. **Molecules**, v. 20, n. 10, p. 18095-18106, 2015 DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules201018095>.

SAKULPANICH, A.; GRITSANAPAN, W. Determination of anthraquinone glycoside content in *Cassia fistula* leaf extracts for alternative source of laxative drug. **International Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences** v. 3, n. 1, p. 42-45, 2009.

SALAZAR-ARANDA, R.; GRANADOS-GUZMÁN, G.; PÉREZ-MESEGUER, J.; GONZÁLEZ, G.; DE TORRES, N. Activity of Polyphenolic Compounds against *Candida glabrata*. **Molecules**, v. 20, n. 10, p. 17903-17912, 2015 DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules201017903>.

SALES, P.; MONTEIRO DE SOUZA, P.; SIMEONI, L.; SILVEIRA, D. α -Amylase Inhibitors: a review of raw material and isolated compounds from plant source. **Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences**, v. 15, n. 1, p. 141-183, 2012 DOI: <https://10.18433/j35s3k>.

SANG SUNG, W.; GUN LEE, D. Antifungal action of chlorogenic acid against pathogenic fungi, mediated by membrane disruption. **Pure and Applied Chemistry**, v. 82, n. 1, p. 219-226, 2010 DOI: <https://10.1351/pac-con-09-01-08>.

SANTOS, D. S.; FARIAS RODRIGUES, M. M. Atividades farmacológicas dos flavonoides: um estudo de revisão. **2017**, v. 7, n. 3, p. 7, 2017 DOI: 10.18468/estcien.2017v7n3.p29-35.

SANTOS, S. T. V.; TEIXEIRA, R. R.; FRANCO, D. L.; MADURRO, J. M.; BRITO-MADURRO, A. G.; ESPINDOLA, F. S. Bioelectrode for detection of human salivary amylase. **Materials Science and Engineering: C**, v. 32, n. 3, p. 530-535, 2012 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.msec.2011.12.005>.

SARIAN, M. N.; AHMED, Q. U.; MAT SO'AD, S. Z.; ALHASSAN, A. M.; MURUGESU, S.; PERUMAL, V.; SYED MOHAMAD, S. N. A.; KHATIB, A.; LATIP, J. Antioxidant and Antidiabetic Effects of Flavonoids: A Structure-Activity Relationship Based Study. **Biomed Res Int**, v. 2017, n., p. 1-14, 2017 DOI: <https://10.1155/2017/8386065>.

SATOH, T. Molecular mechanisms for the regulation of insulin-stimulated glucose uptake by small guanosine triphosphatases in skeletal muscle and adipocytes. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, n. 10, p. 18677-18692, 2014 DOI: <https://10.3390/ijms151018677>.

SCHEIDEGGER, N. M. B. R., J. G. *Cassia* in Flora do Brasil 2020 em construção. . [2018]. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB1082520>>. Acesso em: 19 Jul.

SCHMELZER, G. B.; GURIB-FAKIM, A. **Plant Resources of Tropical Africa 11(1). Medicinal Plants 1. PROTA Foundation.** ed. CTA Wageningen, Netherlands: Backhuys, 2008. 144-152 p.

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, n., p. 76-83, 2017 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2016.08.030>.

SELEGATO, D. M.; MONTEIRO, A. F.; VIEIRA, N. C.; CARDOSO, P.; PAVANI, V. D.; BOLZANI, V. S.; CASTRO-GAMBOA, I. Update: Biological and Chemical Aspects of *Senna spectabilis*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 28, n., p. 415-426, 2017 DOI: <http://dx.doi.org/10.21577/0103-5053.20160322>.

SHAI, L. J.; MASOKO, P.; MOKGOTHO, M. P.; MAGANO, S. R.; MOGALE, A. M.; BOADUO, N.; ELOFF, J. N. Yeast alpha glucosidase inhibitory and antioxidant activities of six medicinal plants collected in Phalaborwa, South Africa. **South African Journal of Botany**, v. 76, n. 3, p. 465-470, 2010 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2010.03.002>.

SHAO, J.; ZHANG, M.; WANG, T.; LI, Y.; WANG, C. The roles of CDR1, CDR2, and MDR1 in kaempferol-induced suppression with fluconazole-resistant *Candida albicans*. **Pharmaceutical Biology**, v. 54, n. 6, p. 984-992, 2016 DOI: <https://10.3109/13880209.2015.1091483>.

SHARMA, C.; KAUR, A.; THIND, S. S.; SINGH, B.; RAINA, S. Advanced glycation End-products (AGEs): an emerging concern for processed food industries. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. 12, p. 7561-7576, 2015 DOI: <https://10.1007/s13197-015-1851-y>.

SHENG, Z.; AI, B.; ZHENG, L.; ZHENG, X.; XU, Z.; SHEN, Y.; JIN, Z. Inhibitory activities of kaempferol, galangin, carnosic acid and polydatin against glycation and α -amylase and α -glucosidase enzymes. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 53, n., p. 755–766, 2018 DOI: <https://10.1111/ijfs.13579>.

SHOBANA, S.; SREERAMA, Y. N.; MALLESHI, N. G. Composition and enzyme inhibitory properties of finger millet (*Eleusine coracana* L.) seed coat phenolics: Mode of inhibition of α -glucosidase and pancreatic amylase. **Food Chemistry**, v. 115, n. 4, p. 1268-1273, 2009 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.01.042>.

SHUKLA, S.; HEGDE, S.; KUMAR, A.; CHAUDHARY, G.; TEWARI, S. K.; UPRETI, D. K.; PAL, M. Fatty acid composition and antibacterial potential of *Cassia tora* (leaves and stem) collected from different geographic areas of India. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 26, n. 1, p. 107-111, 2018 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2016.12.010>.

ŠILER, B.; ŽIVKOVIĆ, S.; BANJANAC, T.; CVETKOVIĆ, J.; NESTOROVIĆ ŽIVKOVIĆ, J.; ĆIRIĆ, A.; SOKOVIĆ, M.; MIŠIĆ, D. Centauries as underestimated

food additives: Antioxidant and antimicrobial potential. **Food Chemistry**, v. 147, n., p. 367-376, 2014 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.10.007>.

SILVA, M. G. B.; ARAGÃO, T. P.; VASCONCELOS, C. F. B.; FERREIRA, P. A.; ANDRADE, R. A.; COSTA, I. M. A.; COSTA-SILVA, J. H.; WANDERLEYA, A. G.; LAFAYETTE, S. S. L. Acute and subacute toxicity of *Cassia occidentalis* L. stem and leaf in wistar rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 136, n. 2, p. 341–346, 2011 DOI: 10.1016/j.jep.2011.04.070.

SILVA, R.; CARMONA-RIBEIRO, A.; PETRI, D. Catalytic behavior of lipase immobilized on to congo red and PEG-decorated particles. **Molecules**, v. 19, n. 6, p. 8610-8628, 2014 DOI: <https://10.3390/moléculas19068610>.

SILVÁN, J. M.; ASSAR, S. H.; SREY, C.; DOLORES DEL CASTILLO, M.; AMES, J. M. Control of the Maillard reaction by ferulic acid. **Food Chemistry**, v. 128, n. 1, p. 208-213, 2011 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.03.047>.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia do produto natural ao medicamento**. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017. 486 p.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia do produto natural ao medicamento**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017. 486 p.

SINGH, B.; NADKARNI, J. R.; VISHWAKARMA, R. A.; BHARATE, S. B.; NIVSARKAR, M.; ANANDJIWALA, S. The hydroalcoholic extract of *Cassia alata* (Linn.) leaves and its major compound rhein exhibits antiallergic activity via mast cell stabilization and lipoxygenase inhibition. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 141, n. 1, p. 469-473, 2012 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2012.03.012>.

SINGH, G.; SURESH, S.; BAYINENI, V. K.; KADEPPAGARI, R. K. Lipase inhibitors from plants and their medical applications **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 7, n. 1, p. 1-5, 2015.

SINGH, S.; SINGH, S. K.; YADAV, A. A review on *Cassia* species: pharmacological, traditional and medicinal aspects in various countries. **American Journal of Phytomedicine and Clinical Therapeutics**, v. 1, n. 3, p. 291-312, 2013.

SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de Nutrição**, v. 15, n., p. 71-81, 2002 DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S1415-52732002000100008>

SOB, S. V. T.; WABO, H. K.; TANE, P.; NGADJUI, B. T.; MA, D. A xanthone and a polyketide derivative from the leaves of *Cassia obtusifolia* (Leguminosae). **Tetrahedron**, v. 64, n. 34, p. 7999-8002, 2008 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tet.2008.05.125>.

SOBEH, M.; MAHMOUD, M. F.; ABDELFATTAH, M. A. O.; 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, n., p. 38-47, 2018 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2017.11.007>.

SOMCHIT, M. N.; REEZAL, I.; NUR, I. E.; MUTALIB, A. R. In vitro antimicrobial activity of ethanol and water extracts of *Cassia alata*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 84, n. 1, p. 1-4, 2003 DOI: [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(02\)00146-0](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(02)00146-0).

SOMPONG, W.; ADISAKWATTANA, S. Inhibitory effect of herbal medicines and their trapping abilities against methylglyoxal-derived advanced glycation end-products. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 15, n. 1, p. 394, 2015 DOI: <https://10.1186/s12906-015-0897-8>.

SONG, R.; XU, F.; ZHANG, Z.; LIU, Y.; DONG, H.; TIAN, Y. Structural elucidation of in vitro metabolites of emodin by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Biomedical Chromatography**, v. 22, n., p. 1230–1236, 2008 DOI: <https://10.1002/bmc.1050>.

SONY, P.; KALYANI, M.; JEYAKUMARI, D.; KANNAN, I.; SUKUMAR, R. G. In vitro antifungal activity of *Cassia fistula* extracts against fluconazole resistant strains of *Candida* species from HIV patients. **Journal de Mycologie Médicale**, v. 28, n. 1, p. 193-200, 2018 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2017.07.010>.

SOUZA, L. M.; CIPRIANI, T. R.; IACOMINI, M.; GORIN, P. A. J.; SASSAKI, G. L. HPLC/ESI-MS and NMR analysis of flavonoids and tannins in bioactive extract from leaves of *Maytenus ilicifolia*. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 47, n. 1, p. 59-67, 2008 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2007.12.008>.

SOUZA, P. M.; OLIVEIRA, M. P. Application of microbial α -amylase in industry – A review. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, n. 4, p. 850-861, 2010 DOI: <https://10.1590/s1517-83822010000400004>.

SOUZA, P. M. D.; SALES, P. M. D.; SIMEONI, L. A.; SILVA, E. C.; SILVEIRA, D.; MAGALHÃES, P. D. O. Inhibitory Activity of α -Amylase and α -Glucosidase by Plant Extracts from the Brazilian Cerrado. **Planta Medica**, v. 78, n. 4, p. 393-399, 2012 DOI: <https://10.1055/s-0031-1280404>.

SPAMPINATO, C.; LEONARDI, D. *Candida* Infections, Causes, Targets, and Resistance Mechanisms: Traditional and Alternative Antifungal Agents. **BioMed Research International**, v. 2013, n., p. 1-13, 2013 DOI: 10.1155/2013/204237.

SPÍNOLA, V.; PINTO, J.; CASTILHO, P. C. Identification and quantification of phenolic compounds of selected fruits from Madeira Island by HPLC-DAD–ESI-MSn and screening for their antioxidant activity. **Food Chemistry**, v. 173, n., p. 14-30, 2015 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.09.163>.

SREELAKSHMI, V.; ABRAHAM, A. Polyphenols of *Cassia tora* leaves prevents lenticular apoptosis and modulates cataract pathology in Sprague-Dawley rat pups. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 81, n., p. 371-378, 2016 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.04.018>.

SRI HARSHA, P. S. C.; LAVELLI, V.; SCARAFONI, A. Protective ability of phenolics from white grape vinification by-products against structural damage of bovine serum albumin induced by glycation. **Food Chemistry**, v. 156, n., p. 220-226, 2014 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.01.104>.

STRASSBURG, B. B. N.; BROOKS, T.; FELTRAN-BARBIERI, R.; IRIBARREM, A.; CROUZEILLES, R.; LOYOLA, R.; LATAWIEC, A. E.; OLIVEIRA FILHO, F. J. B.; SCARAMUZZA, C. A. D. M.; SCARANO, F. R.; SOARES-FILHO, B.; BALMFORD, A. Moment of truth for the Cerrado hotspot. **Nature Ecology & Evolution**, v. 1, n., p. 0099, 2017 DOI: <https://10.1038/s41559-017-0099>

SUBRAMANIAN, R.; ASMAWI, M.; SADIKUN, A. In vitro α -glucosidase and α -amylase enzyme inhibitory effects of *Andrographis paniculata* extract and andrographolide. **Acta Biochimica Polonica**, v. 55, n. 2, p. 391-398, 2008.

SUDHA, P.; ZINJARDE, S. S.; BHARGAVA, S. Y.; KUMAR, A. R. Potent α -amylase inhibitory activity of Indian Ayurvedic medicinal plants. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 11, n. 5, p. 1-10, 2011 DOI: <https://10.1186/1472-6882-11-5>.

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 DOI: <https://doi.org/10.3390/12030679>.

SUNDARAMOORTHY, S.; GUNASEKARAN, S.; ARUNACHALAM, S.; SATHIAVELU, M. A Phytopharmacological Review on *Cassia* Species. **Journal Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 8, n. 5, p. 260-264, 2016.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 643 p.

TATSIMO, S. J. N.; TAMOKOU, J. D. D.; HAVYARIMANA, L.; CSUPOR, D.; FORGO, P.; HOHMANN, J.; KUIATE, J.-R.; TANE, P. Antimicrobial and antioxidant activity of kaempferol rhamnoside derivatives from *Bryophyllum pinnatum*. **BMC Research Notes**, v. 5, n. 158, p. 158-158, 2012 DOI: <https://10.1186/1756-0500-5-158>.

TEODORO, G. R.; ELLEPOLA, K.; SENEVIRATNE, C. J.; KOGA-ITO, C. Y. Potential Use of Phenolic Acids as Anti-*Candida* Agents: A Review. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n., p. 1420, 2015 DOI: <https://10.3389/fmicb.2015.01420>.

THABIT, S.; HANDOUSSA, H.; ROXO, M.; EL SAYED, N. S.; CESTARI DE AZEVEDO, B.; WINK, M. Evaluation of antioxidant and neuroprotective activities of *Cassia fistula* (L.) using the *Caenorhabditis elegans* model. **PeerJ**, v. 6, n., p. 1-33, 2018 DOI: <https://10.7717/peerj.5159>.

THAKARE, V.; SHENDE, S. S.; SHIRURE, P. A.; SWAMI, O. C. Role of conventional oral antidiabetic drugs in management of type 2 diabetes mellitus. **International Journal of Research in Medical Sciences**, v. 5, n. 3, p. 749-758, 2017 DOI: <https://dx.doi.org/10.18203/2320-6012.ijrms20170619>.

THIBANE, V. S.; ELLS, R.; HUGO, A.; ALBERTYN, J.; VAN RENSBURG, W. J. J.; VAN WYK, P. W. J.; KOCK, J. L. F.; POHL, C. H. Polyunsaturated fatty acids cause apoptosis in *C. albicans* and *C. dubliniensis* biofilms. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1820, n. 10, p. 1463-1468, 2012 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2012.05.004>.

THILAGAM, E.; PARIMALADEVI, B.; KUMARAPPAN, C.; MANDAL, S. C. α -Glucosidase and α -amylase inhibitory activity of *Senna surattensis*. **Journal of Acupuncture and Meridian Studies**, v. 6, n. 1, p. 24-30, 2012 DOI: <https://dx.doi.org/10.1016/j.jams.2012.10.005>.

TIMOTHY, S. Y.; WAZIS, C. H.; ADATI, R. G.; MASPALMA, I. D. Antifungal Activity of Aqueous and Ethanolic Leaf Extracts of *Cassia Alata* Linn. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 2, n. 7, p. 182-185, 2012 DOI: <https://10.7324/JAPS.2012.2728>.

TLPWG [The Legume Phylogeny Working Group]. Legume phylogeny and classification in the 21st century: Progress, prospects and lessons for other species-rich clades. **Taxon**, v. 62, n. 2, p. 217-248, 2013 DOI: <https://10.12705/622.8>.

TOMA, A.; MAKONNEN, E.; MEKONNEN, Y.; DEBELLA, A.; ADISKWAATTANA, S. Intestinal α -glucosidase and some pancreatic enzymes inhibitory effect of hydroalcoholic extract of *Moringa stenopetala* leaves. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 14, n. 180, p. 1-5, 2014 DOI: <https://10.1186/1472-6882-14-180>.

TOREY, A.; VIJAYARATHNA, S.; JOTHY, S. L.; GOTHAI, S.; CHEN, Y.; LATHA, L.; KANWAR, J. R.; DHARMARAJ, S.; SASIDHARAN, S. Exploration of the anticandidal mechanism of *Cassia spectabilis* in debilitating candidiasis. **Journal of traditional and complementary medicine**, v. 6, n. 1, p. 97-104, 2016 DOI: <https://10.1016/j.jtcme.2014.11.017>.

TORSSELL, K. B. G. **Natural product chemistry: A mechanistic, biosynthetic and ecological approach**. 2. ed. Apotekarsocieteten 1997. 480 p.

TOZETTO, J. T.; TOZETTO, A. T.; HOSHINO, B. T.; ANDRIGHETTI, C. R.; RIBEIRO, E. B.; CAVALHEIRO, L.; FERRARINI, S. R. Extract of *Punica granatum* L.: An Alternative to BHT as an antioxidant in smissolid emulsified systems. **Quimica Nova**, v. 40, n. 1, p. 97-104, 2017 DOI: <http://dx.doi.org/10.21577/0100-4042.20160160>

TRINH, P. T. N.; LUAN, N. Q.; TRI, M. D.; KHANH, V. D.; AN, N. H.; MINH, P. N.; AN, P. N.; THUY, N. T. L.; PHUNG, N. K. P.; DUNG, L. T. New naphthalene derivative from the leaves of *Cassia grandis* L. **Natural Product Research**, v. 31, n. 15, p. 1733-1738., 2017 DOI: <https://10.1080/14786419.2017.1290615>

TUNDIS, R.; LOIZZO, M. R.; MENICHINI, F. Natural Products as alpha-Amylase and alpha-Glucosidase Inhibitors and their Hypoglycaemic Potential in the Treatment of Diabetes: An Update. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 10, n. 4, p. 315-331, 2010 DOI: <https://doi.org/10.2174/138955710791331007>.

VEERAPUR, V. P.; PRATAP, V.; THIPPESWAMY, B. S.; MARIETTA, P.; BANSAL, P.; KULKARNI, P. V.; KULKARNI, V. H. Polyphenolic enriched extract of *Cassia glauca* Lamk, improves streptozotocin-induced type-1 diabetes linked with partial insulin resistance in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 198, n., p. 489-498, 2017 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2017.01.025>.

VEGA, B.; LIBERTI, D.; HARMON, P. F.; DEWDNEY, M. M. A Rapid Resazurin-Based Microtiter Assay to Evaluate QoI Sensitivity for *Alternaria alternata* Isolates

and Their Molecular Characterization. **Plant Disease**, v. 96, n. 9, p. 1262-1270, 2012 DOI: <https://10.1094/pdis-12-11-1037-re>.

VERPOORTE, R.; HEIJDEN, R.; J. G. TEN HOOPEN, H.; MEMELINK, J. **Metabolic engineering of plant secondary metabolism**. ed. Springer Science+Business Media Dordrecht, 2000. 286 p.

VIEGAS JR, C.; BOLZANI, V. D. S.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Quimica Nova**, v. 29, n., p. 326-337, 2006.

VIEGAS JUNIOR, C.; REZENDE, A. D.; SILVA, D. H. S.; CASTRO-GAMBÔA, I.; BOLZANI, V. D. S.; BARREIRO, E. J.; MIRANDA, A. L. P. D.; ALEXANDRE-MOREIRA, M. S.; YOUNG, M. C. M. Aspectos químicos, biológicos e etnofarmacológicos do gênero *Cassia*. **Quimica Nova**, v. 29, n. 6, p. 1279-1286, 2006 DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422006000600025>

VIHAKAS, M. **Flavonoids and other phenolic compounds: characterization and interactions with lepidopteran and sawfly larvae** 2014. 78 f. (Doutorado) - Department of Chemistry, University of Turku Finlândia,

VIJAYALAKSHMI, A.; MADHIRA, G. Anti-psoriatic activity of flavonoids from *Cassia tora* leaves using the rat ultraviolet B ray photodermatitis model. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 24, n. 3, p. 322-329, 2014 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2014.07.010>.

VIJAYARAJ, P.; MUTHUKUMAR, K.; SABARIRAJAN, J.; NACHIAPPAN, V. Antihyperlipidemic activity of *Cassia auriculata* flowers in triton WR 1339 induced hyperlipidemic rats. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 65, n. 1-2, p. 135-141, 2013 DOI: <https://10.1016/j.etp.2011.07.001>.

WAGNER, H. B., S. **Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas**. ed. Berlin: Springer, 1996. 384 p. p.

WANG, T.-Y.; LI, Q.; BI, K.-S. Bioactive flavonoids in medicinal plants: Structure, activity and biological fate. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 13, n. 1, p. 12-23, 2018 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ajps.2017.08.004>.

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 DOI: <https://doi.org/10.1002/rcm.3536>.

WANGKHEIRAKPAM, S. Chapter 2 - Traditional and Folk Medicine as a Target for Drug Discovery. In: MANDAL, S. C. et al. **Natural Products and Drug Discovery**, Elsevier, 2018. cap. p. 29-56.

WAR, I. R.; GANIE, S. A.; AGNIHOTRI, R. K.; SHARMA, B.; MAHAJAN, S.; SHARMA, R. Antifungal activity of *Cassia fistula* Linn. against some pathogenic fungi. **International Journal of Phytomedicine** v. 6, n. 2, p. 182-187, 2014.

WAUTIER, J.-L.; GUILLAUSSEAU, P.-J. Diabetes, advanced glycation endproducts and vascular disease. **Vascular Medicine**, v. 3, n. 2, p. 131-137, 1998 DOI: <https://10.1177/1358836x9800300207>.

WHITE, T. C.; FINDLEY, K.; DAWSON, T. L., JR.; SCHEYNIUS, A.; BOEKHOUT, T.; CUOMO, C. A.; XU, J.; SAUNDERS, C. W. Fungi on the skin: dermatophytes and Malassezia. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 4, n. 8, p. a019802, 2014 DOI: <https://10.1101/cshperspect.a019802>.

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, n., p. 104-115, 2018 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2018.03.066>.

WOON, E. C. Y.; TOH, J. D. W. Antiobesity effects of natural products from an epigenetic perspective. In: ATTA UR, R. **Studies in Natural Products Chemistry**, Elsevier, 2014. cap. 6, p. 161-193.

XIE, Y.; CHEN, X. Structures required of polyphenols for inhibiting advanced glycation end products formation. **Bentham Science Publishers**, v. 14, n. 4, p. 414-431, 2013 DOI: <https://10.2174/1389200211314040005>.

XU, W.; HU, M.; ZHANG, Q.; YU, J.; SU, W. Effects of anthraquinones from *Cassia occidentalis* L. on ovalbumin-induced airways inflammation in a mouse model of allergic asthma. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 221, n., p. 1–9, 2018 DOI: 10.1016/j.jep.2018.04.012.

YAMAMOTO, M.; SHIMURA, S.; ITOH, Y.; OHSAKA, T.; EGAWA, M.; INOUE, S. Anti-obesity effects of lipase inhibitor CT-II, an extract from edible herbs, Nomame Herba, on rats fed a high-fat diet. **International Journal of Obesity**, v. 24, n., p. 758-764, 2000 DOI: <https://10.1038/sj.ijo.0801222>.

YANG, H.; JIN, X.; LAM, C. W. K.; YAN, S.-K. Oxidative stress and diabetes mellitus. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 49, n. 11, p. 1773-1782, 2011 DOI: <https://10.1515/CCLM.2011.250>.

YANG, R.; WANG, W.-X.; CHEN, H.-J.; HE, Z.-C.; JIA, A.-Q. The inhibition of advanced glycation end-products by five fractions and three main flavonoids from *Camellia nitidissima* Chi flowers. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 26, n. 1, p. 252-259, 2018 DOI: <https://10.1016/j.jfda.2017.03.007>.

YAPAR, N. Epidemiology and risk factors for invasive candidiasis. **Therapeutics and Clinical Risk Management**, v. 10, n., p. 95-105, 2014 DOI: 10.2147/tcrm.s40160.

YE, M.; HAN, J.; CHEN, H.; ZHENG, J.; GUO, D. Analysis of Phenolic Compounds in Rhubarbs Using Liquid Chromatography Coupled with Electrospray Ionization Mass Spectrometry. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 18, n. 1, p. 82-91, 2007 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jasms.2006.08.009>.

YEH, W.-J.; HSIA, S.-M.; LEE, W.-H.; WU, C.-H. Polyphenols with antiglycation activity and mechanisms of action: a review of recent findings. **Journal of Food and**

Drug Analysis, v. 25, n. 1, p. 84-92, 2017 DOI:
<https://doi.org/10.1016/j.jfda.2016.10.017>.

YEHYE, W. A.; RAHMAN, N. A.; ARIFFIN, A.; ABD HAMID, S. B.; ALHADI, A. A.; KADIR, F. A.; YAEGHOABI, M. Understanding the chemistry behind the antioxidant activities of butylated hydroxytoluene (BHT): A review. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 101, n., p. 295-312, 2015 DOI:
<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.06.026>.

YILDIRIM, A.; MAVI, A.; KARA, A. A. Determination of Antioxidant and Antimicrobial Activities of *Rumex crispus* L. Extracts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 8, p. 4083-4089, 2001 DOI: <https://10.1021/jf0103572>.

YILMAZER-MUSA, M.; GRIFFITH, A. M.; MICHELS, A. J.; SCHNEIDER, E.; FREI, B. Grape seed and tea extracts and catechin 3-gallates are potent inhibitors of α -amylase and α -glucosidase activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 36, p. 8924-8929, 2012 DOI: <https://10.1021/jf301147n>.

YIN, Z.; ZHANG, W.; FENG, F.; ZHANG, Y.; KANG, W. α -glucosidase inhibitors isolated from medicinal plants. **Food Science and Human Wellness**, v. 3, n. 3, p. 136-174, 2014 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fshw.2014.11.003>.

YUN, J.; LEE, H.; KO, H. J.; WOO, E.-R.; LEE, D. G. Fungicidal effect of isoquercitrin via inducing membrane disturbance. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 1848, n. 2, p. 695-701, 2015 DOI:
<https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2014.11.019>.

ZACCHINO, S. A.; BUTASSI, E.; LIBERTO, M. D.; RAIMONDI, M.; POSTIGO, A.; SORTINO, M. Plant phenolics and terpenoids as adjuvants of antibacterial and antifungal drugs. **Phytomedicine**, v. 37, n., p. 27-48, 2017 DOI:
<https://doi.org/10.1016/j.phymed.2017.10.018>.

ZAID, A. N.; ZOHUD, N.; E'LAYAN, B.; ABURADI, T.; JARADAT, N.; ALI, I.; HUSSEIN, F.; GHANEM, M.; QADDOMI, A.; ABU ZAAROR, Y. Pharmacodynamic testing and new validated HPLC method to assess the interchangeability between multi-source orlistat capsules. **Drug Design, Development and Therapy**, v. 11, n., p. 3291-3298, 2017 DOI: <https://10.2147/dddt.s138926>.

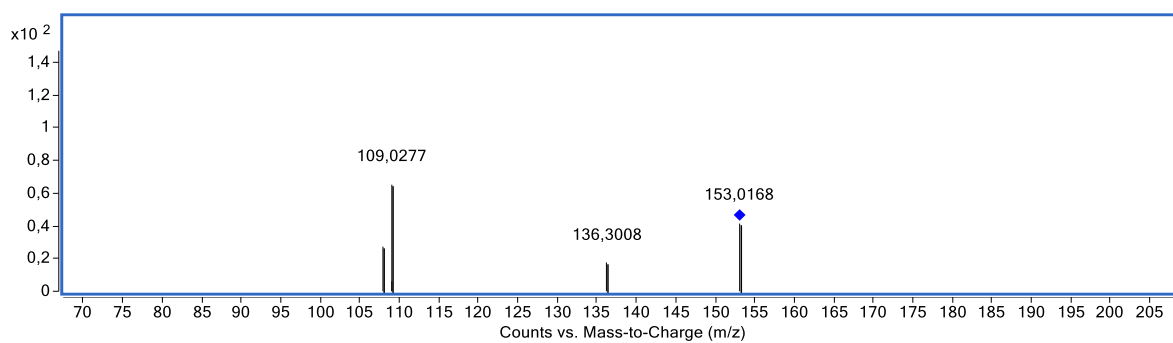
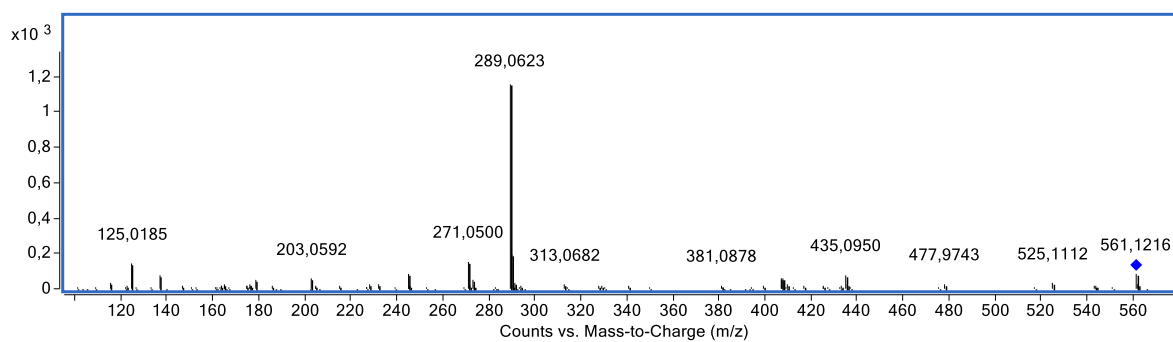
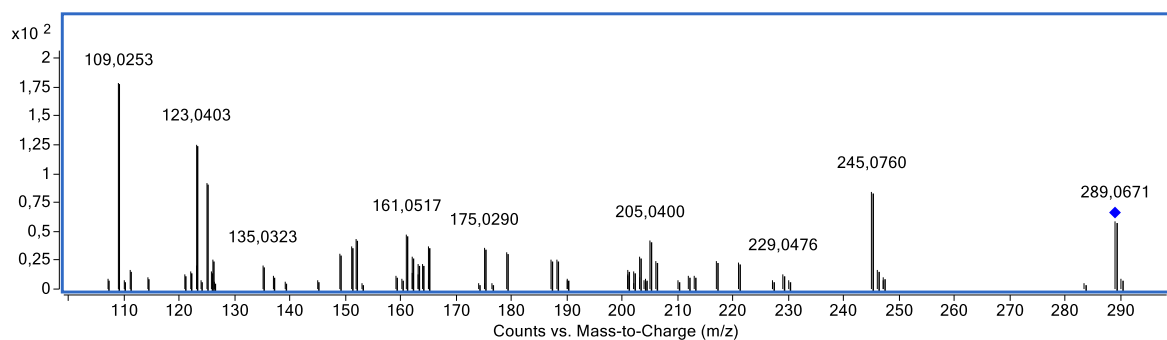
ZAPPI, D. C.; FILARDI, F. L. R.; LEITMAN, P.; SOUZA, V. C.; WALTER, B. M. T.; PIRANI, J. R.; MORIM, M. P.; QUEIROZ, L. P.; CAVALCANTI, T. B.; MANSANO, V. F.; FORZZA, R. C.; ABREU, M. C. et al. Growing knowledge: an overview of Seed Plant diversity in Brazil. **Rodriguésia**, v. 66, n., p. 1085-1113, 2015.

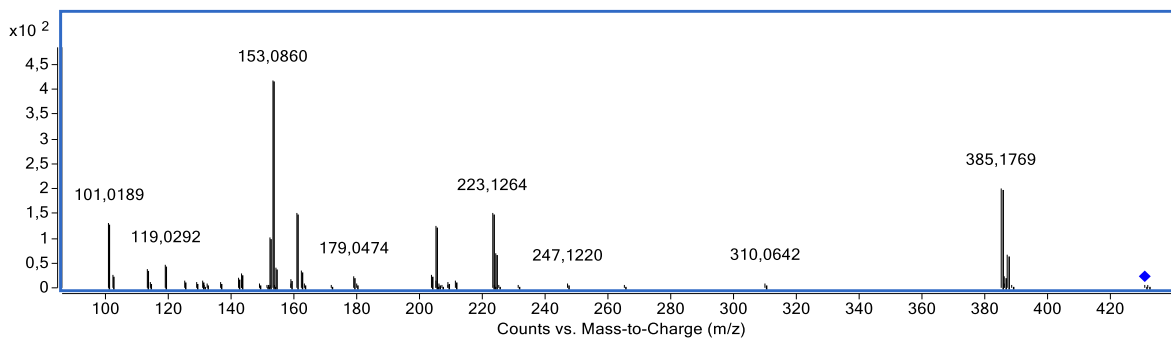
ZHAO, M.; XU, J.; QIAN, D.; GUO, J.; JIANG, S.; SHANG, E.-X.; DUAN, J.-A. Identification of astilbin metabolites produced by human intestinal bacteria using UPLC-Q-TOF/MS. **Biomedical Chromatography**, v. 28, n. 7, p. 1024-1029, 2014 DOI: <https://doi.org/10.1002/bmc.3111>.

ZHU, L.; ZHANG, Y.; LU, J. Phenolic contents and compositions in skins of red wine grape cultivars among various genetic backgrounds and originations. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, n. 3, p. 3492-3510, 2012 DOI:
<https://10.3390/ijms13033492>.

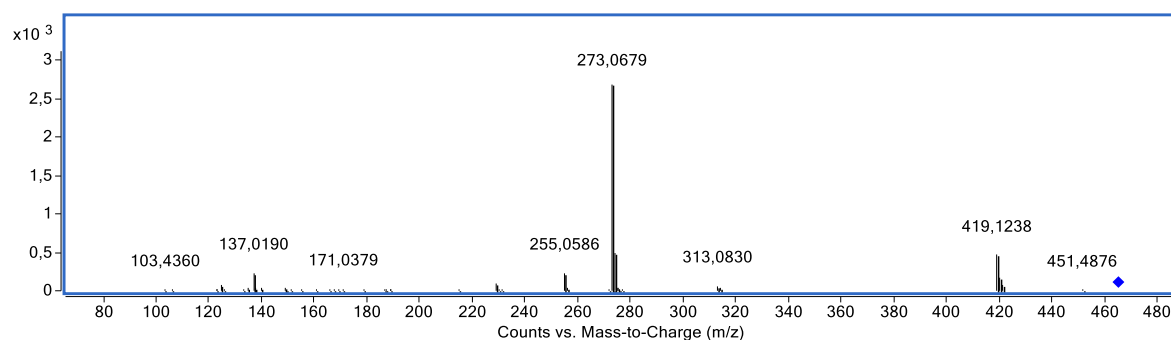
ZIDA, A.; BAMBA, S.; YACOUBA, A.; OUEDRAOGO-TRAORE, R.; GUIGUEMDÉ, R. T. Anti-*Candida albicans* natural products, sources of new antifungal drugs: A review. **Journal de Mycologie Médicale**, v. 27, n. 1, p. 1-19, 2016 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2016.10.002>.

APÊNDICE

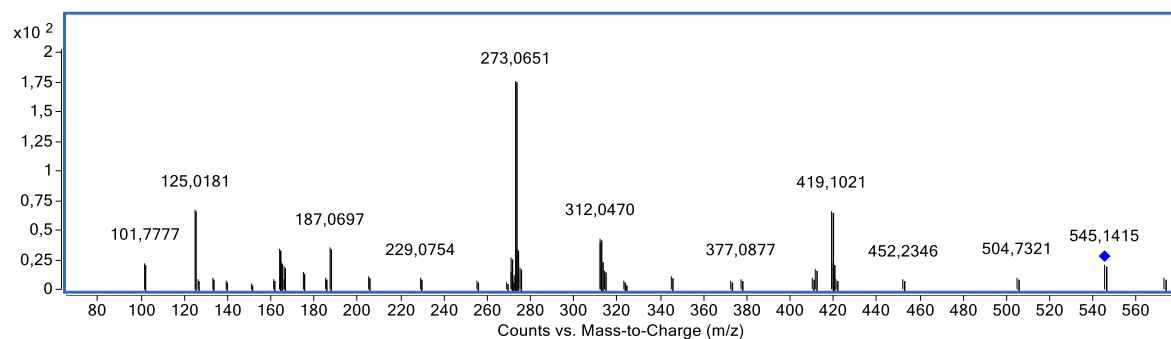
Espectro EM/EM do composto I, $[M - H]^-$ 153,0194 obtido da P-AE.Espectro EM/EM do composto II, $[M - H]^-$ 561,1401 obtido da P-AE.Espectro EM/EM do composto III, $[M - H]^-$ 289,0715 obtido da P-D.



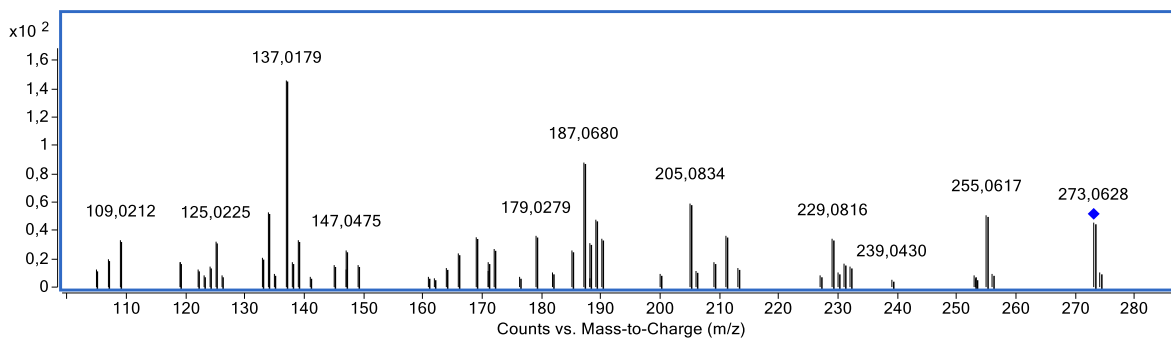
Espectro EM/EM do composto IV, $[M - H]^-$ 431,1924 obtido da P-D.



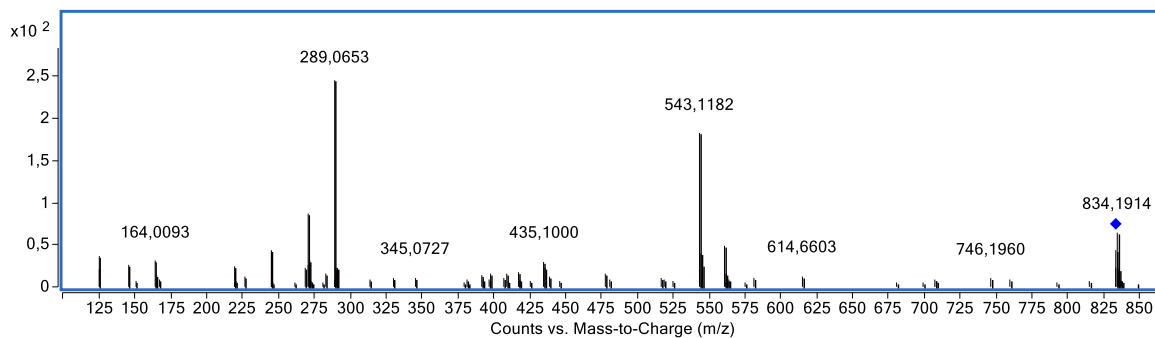
Espectro EM/EM do composto $[M - H]^-$ 465,1376 obtido da P-AE.



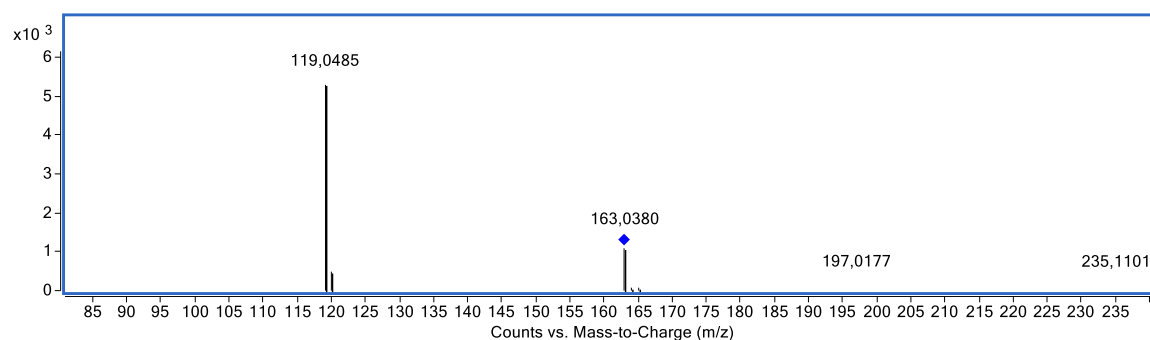
Espectro EM/EM do composto V, $[M - H]^-$ 545,1456 obtido da P-AE.



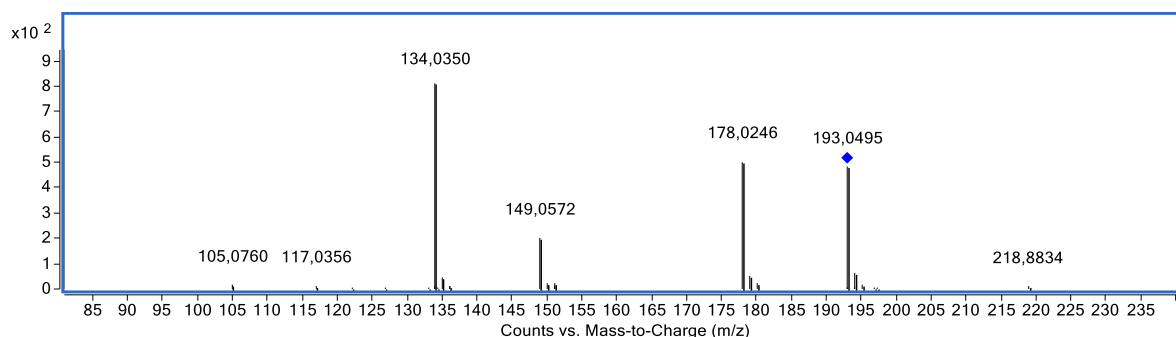
Espectro EM/EM do composto VI, $[M - H]^-$ 273,0767 obtido da P-AE.



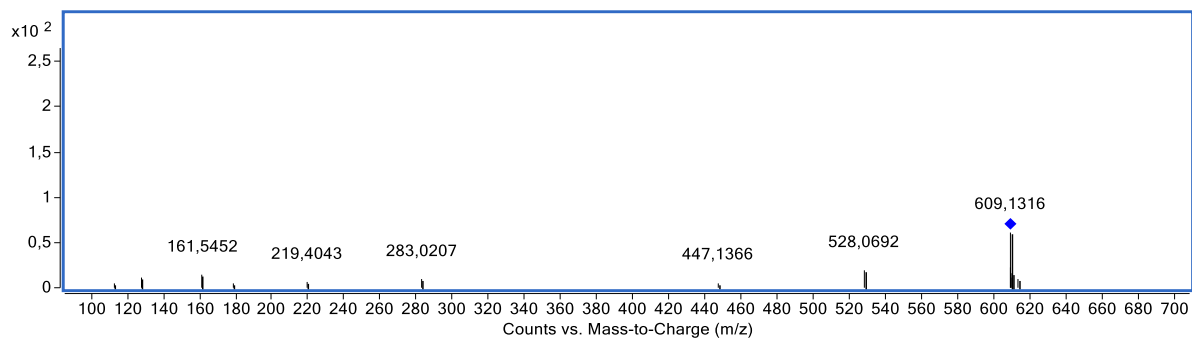
Espectro EM/EM do composto VII, $[M - H]^-$ 833,2081 obtido da P-AE.



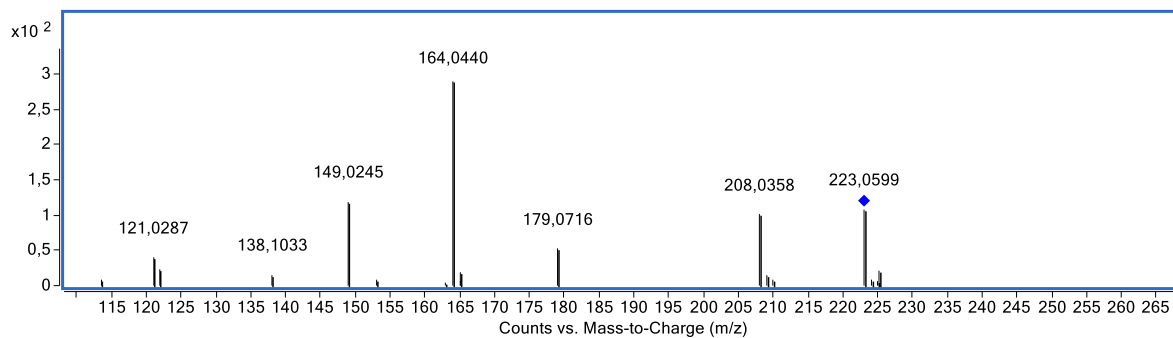
Espectro EM/EM do composto VIII, $[M - H]^-$ 163,0402 obtido da P-D.



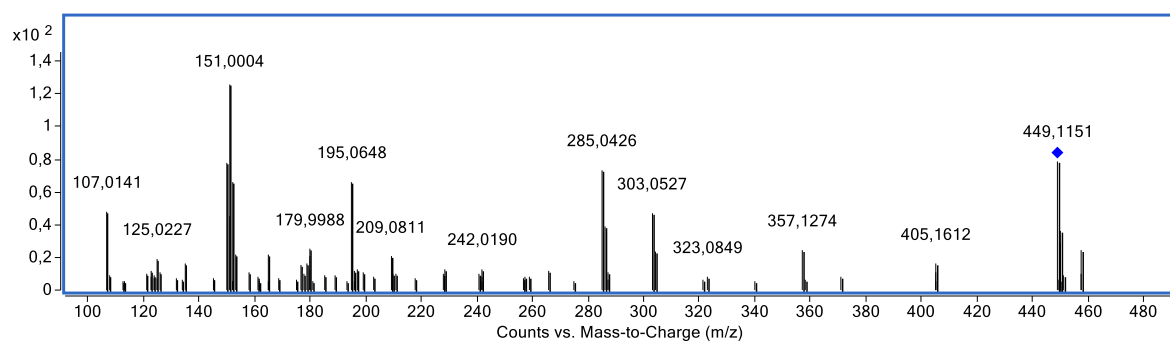
Espectro EM/EM do composto IX, $[M - H]^-$ 193,0505 obtido da P-D.



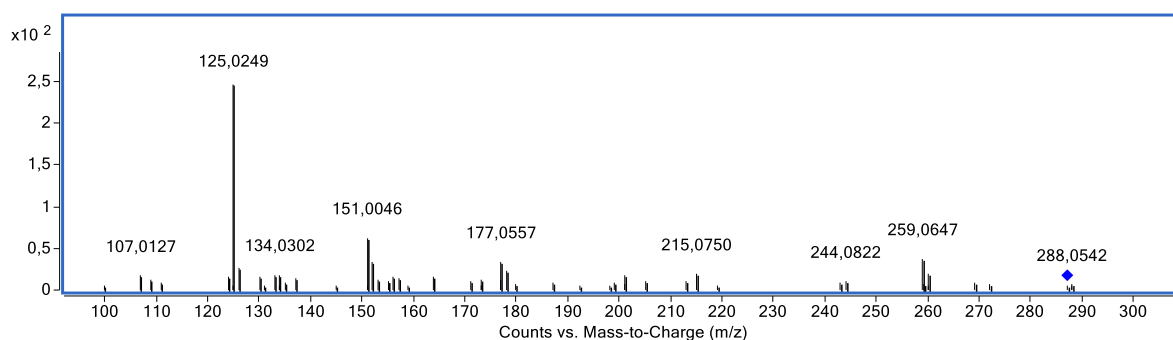
Espectro EM/EM do composto X, $[M - H]^-$ 609,1462 obtido da P-AE.



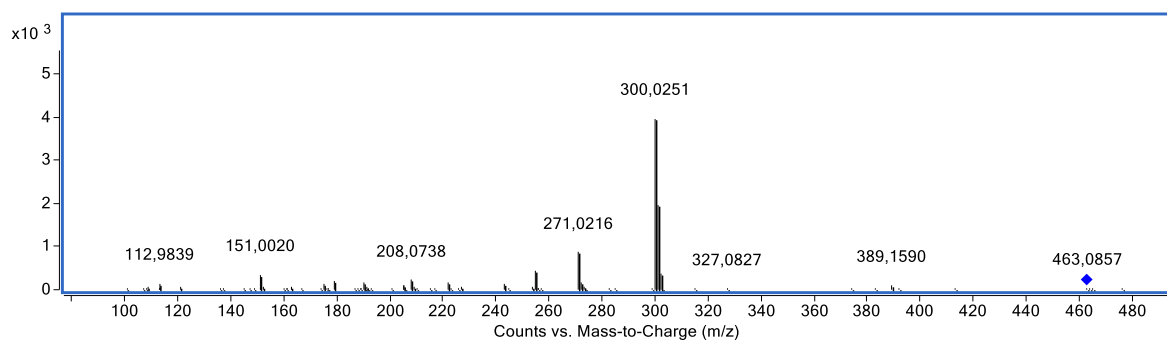
Espectro EM/EM do composto XI, $[M - H]^-$ 223,0616 obtido da P-D.



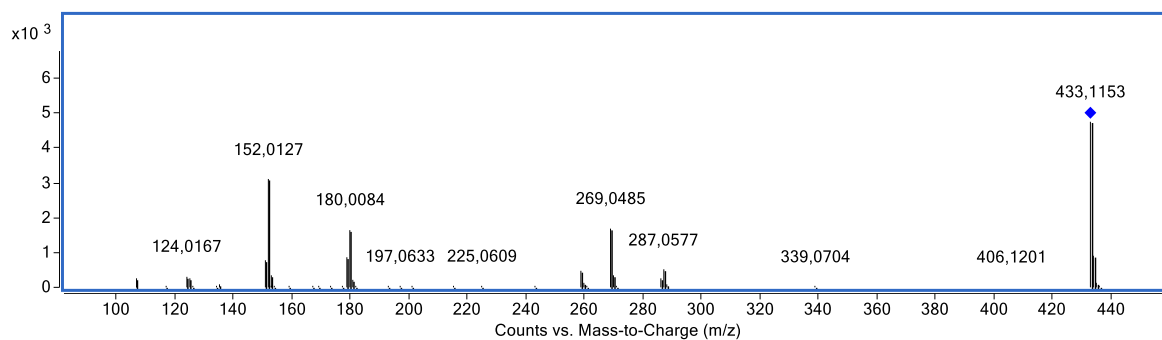
Espectro EM/EM do composto XII, $[M - H]^-$ 449,1091 obtido da P-D.



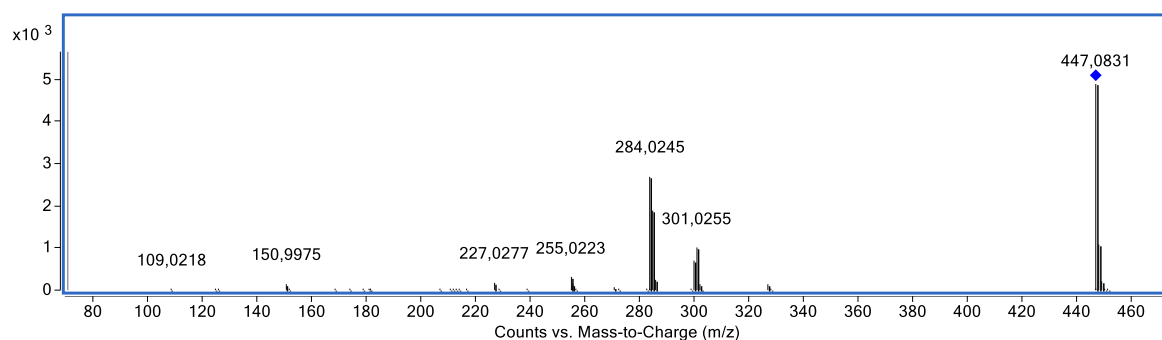
Espectro EM/EM do composto XIII, $[M - H]^-$ 287,0562 obtido da P-D.



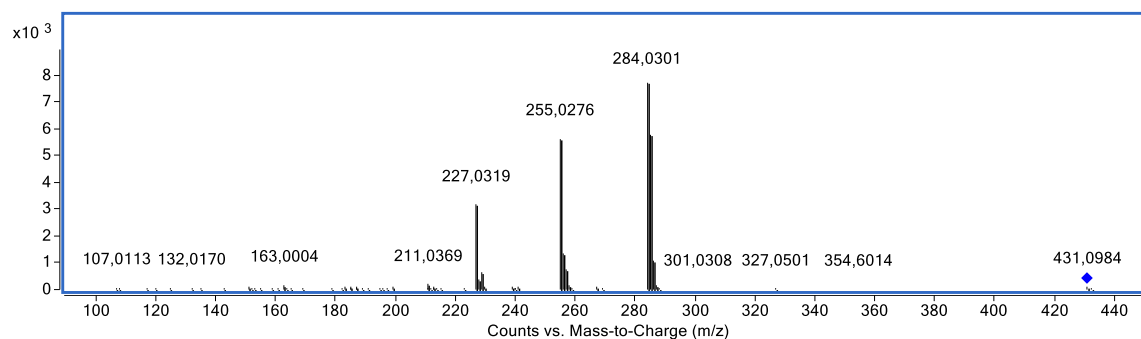
Espectro EM/EM do composto XIV, $[M - H]^-$ 463,880 obtido da P-D.



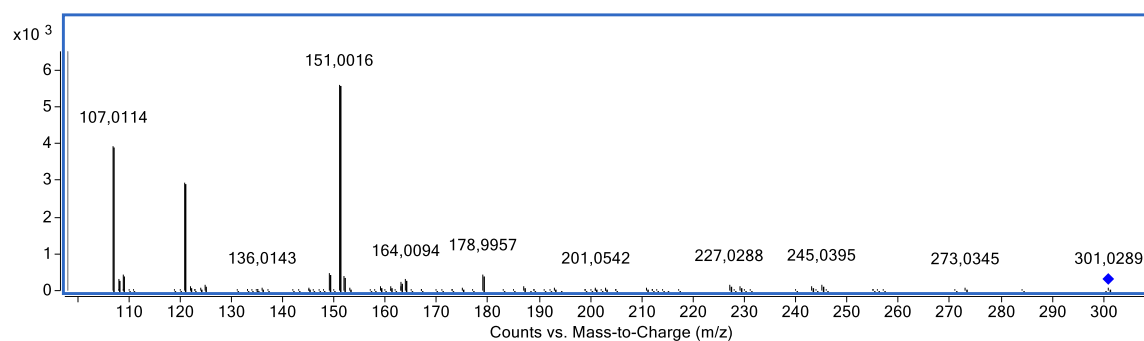
Espectro EM/EM do composto XV, $[M - H]^-$ 433,1150 obtido da P-D.



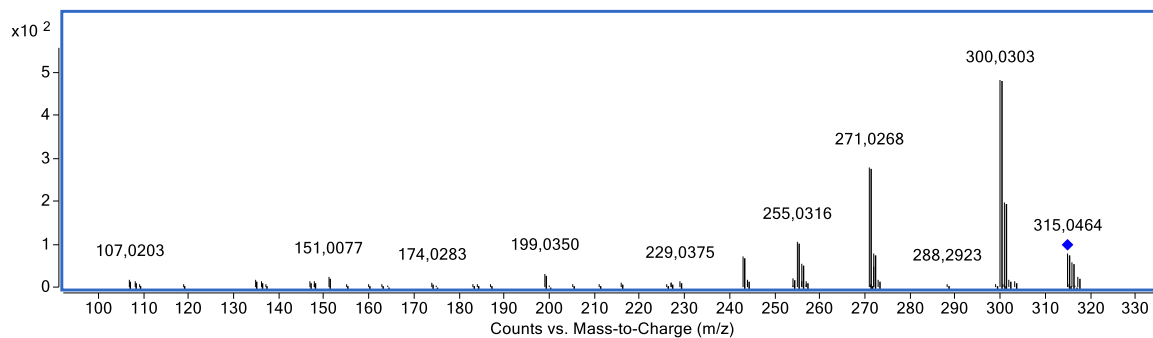
Espectro EM/EM do composto XVI, $[M - H]^-$ 447,0936 obtido da P-D.



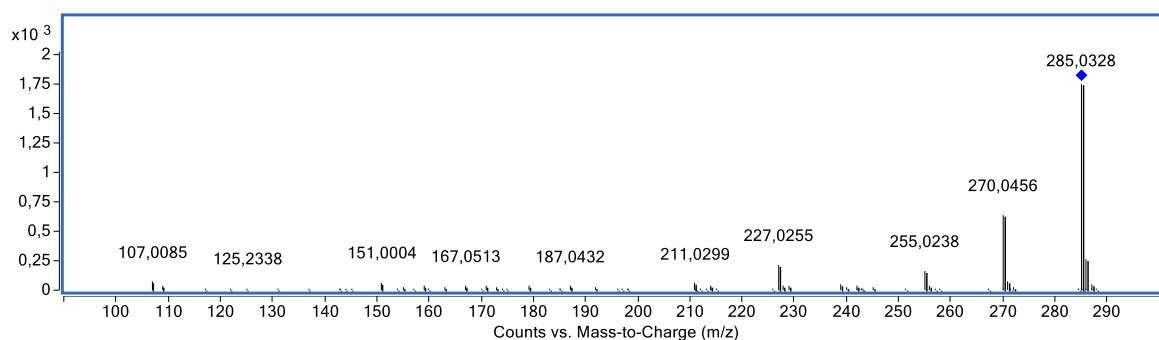
Espectro EM/EM do composto XVII, $[M - H]^-$ 431,0992 obtido da P-D.



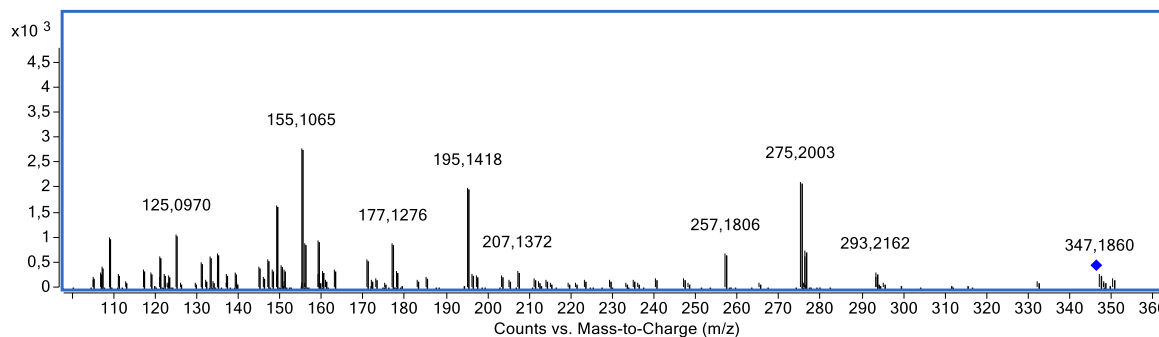
Espectro EM/EM do composto XVIII, $[M - H]^-$ 301,0358 obtido da P-D.



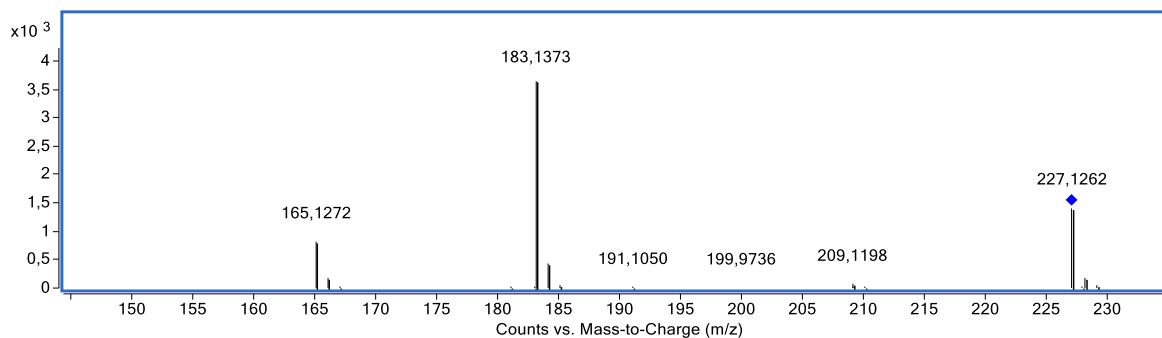
Espectro EM/EM do composto XIX, $[M - H]^-$ 315,0515 obtido da P-D.



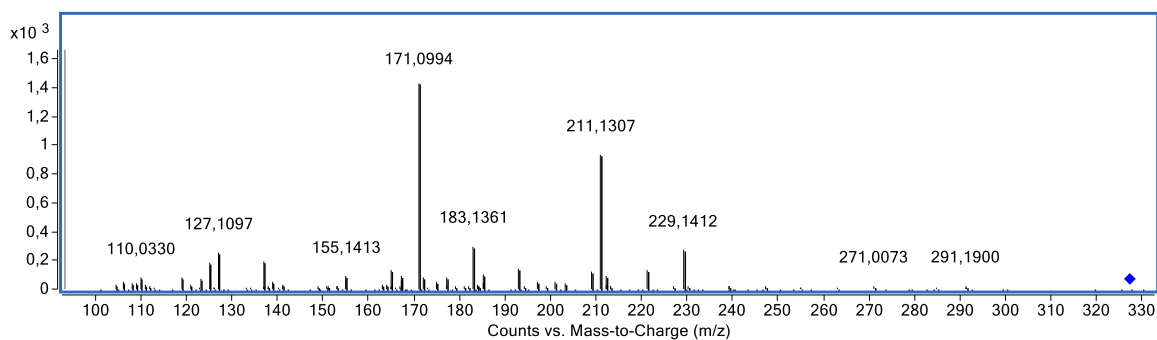
Espectro EM/EM do composto XX, $[M - H]^-$ 285,0407 obtido da P-D.



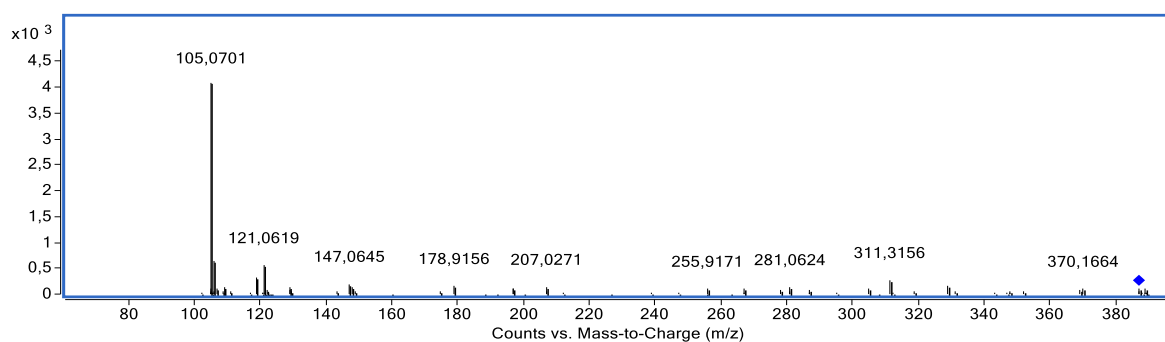
Espectro EM/EM do composto XX, $[M + H]^+$ 346,2584 obtido da P-D.



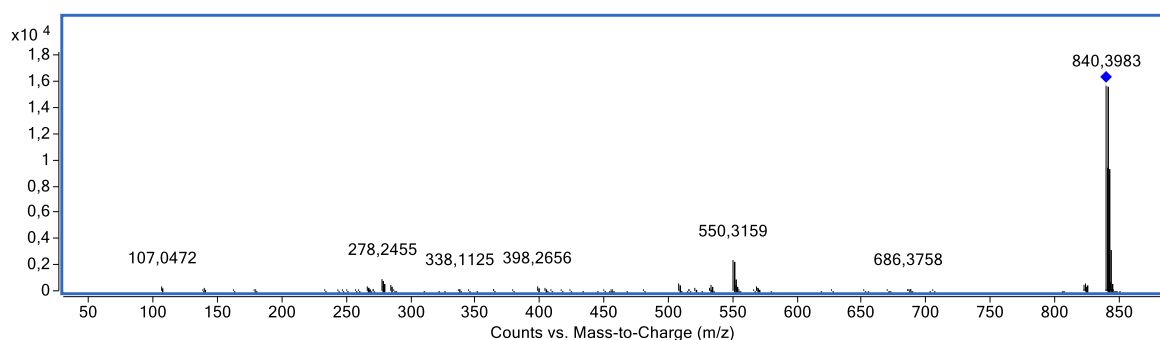
Espectro EM/EM do composto XXI, $[M - H]^-$ 227,1285 obtido da P-D.



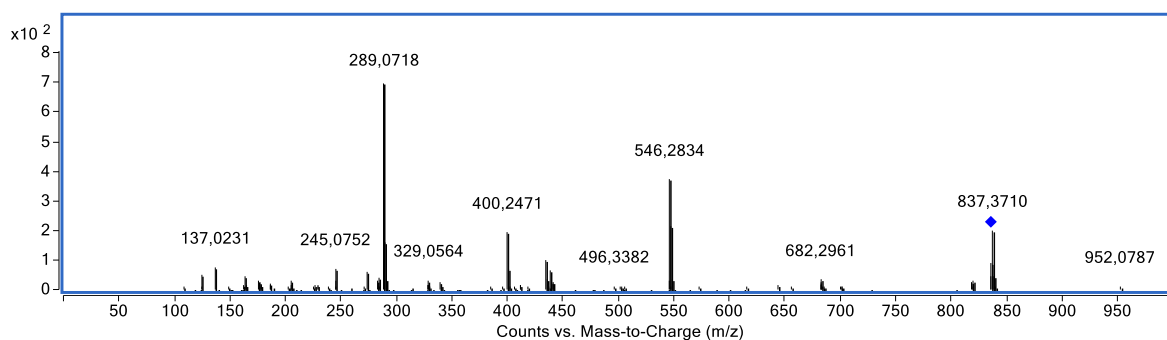
Espectro EM/EM do composto XXII, $[M - H]^-$ 327,2178 obtido da P-D.



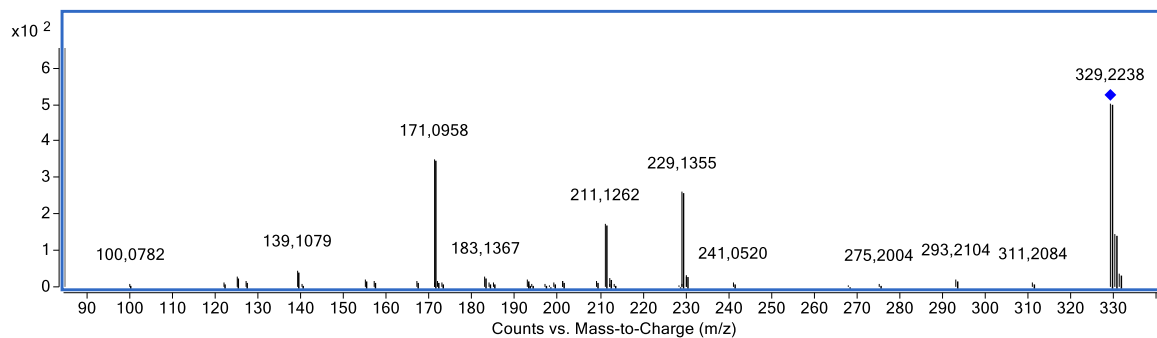
Espectro EM/EM do composto $[M + H]^+$ 387,1800 obtido da P-AE.



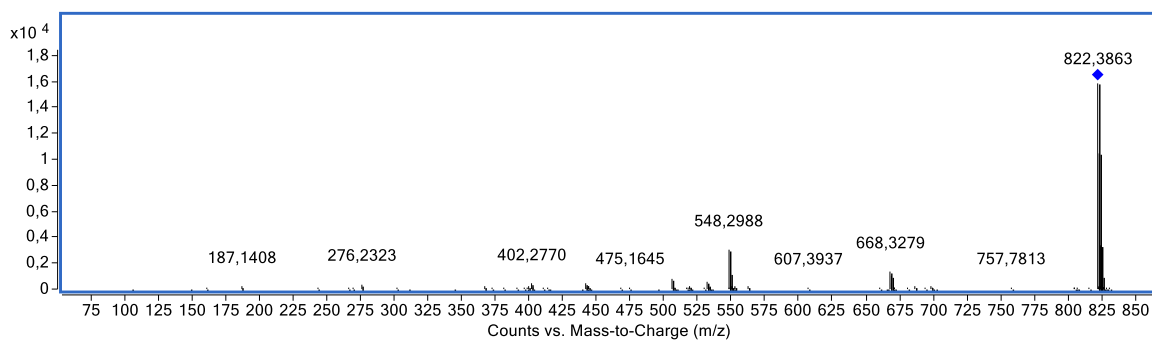
Espectro EM/EM do composto $[M + H]^+$ 840,3953 obtido da P-D.



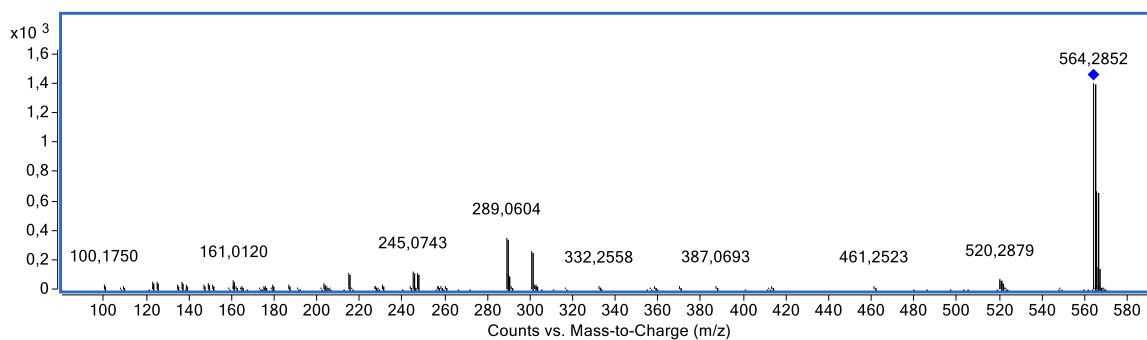
Espectro EM/EM do composto $[M + H]^+$ 836,3638 obtido da P-D.



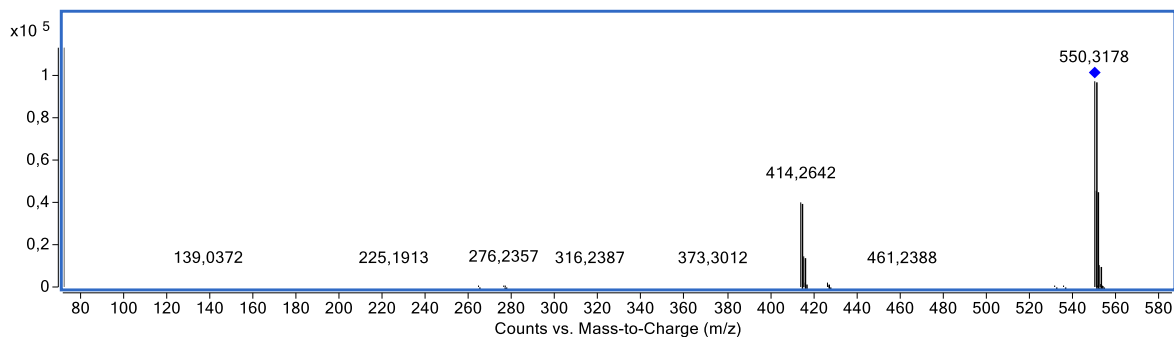
Espectro EM/EM do composto XXIII, $[M - H]^-$ 329,2335 obtido da P-D.



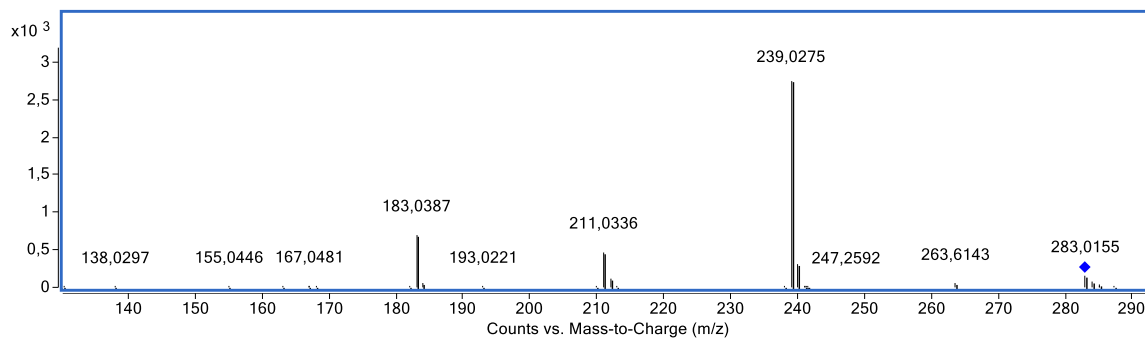
Espectro EM/EM do composto $[M + H]^+$ 822,3854 obtido da P-D.



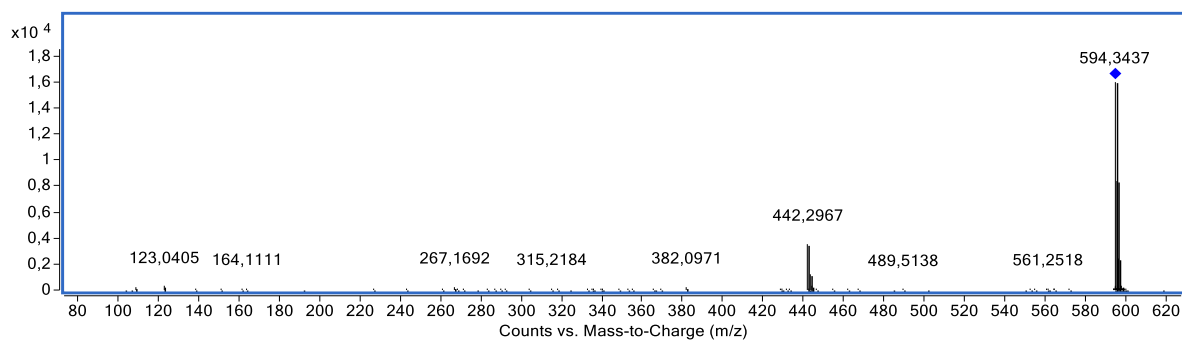
Espectro EM/EM do composto $[M - H]^-$ 564,2969 obtido da P-D.



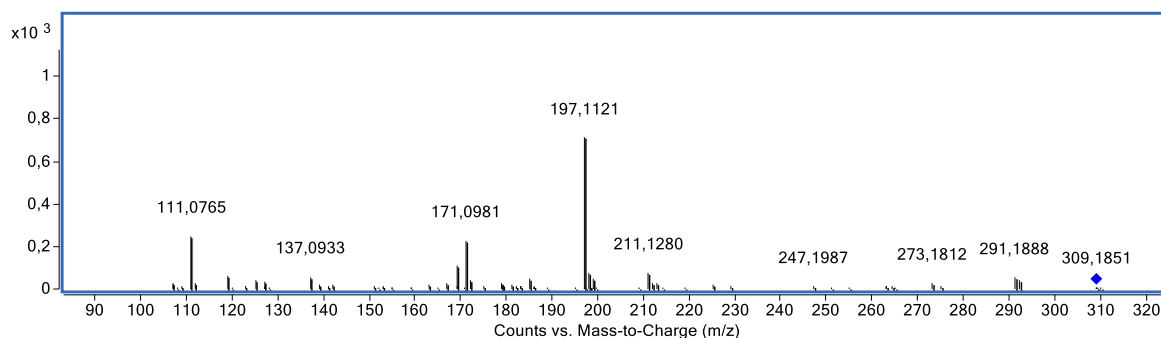
Espectro EM/EM do composto $[M + H]^+$ 550,3178 obtido da P-D.



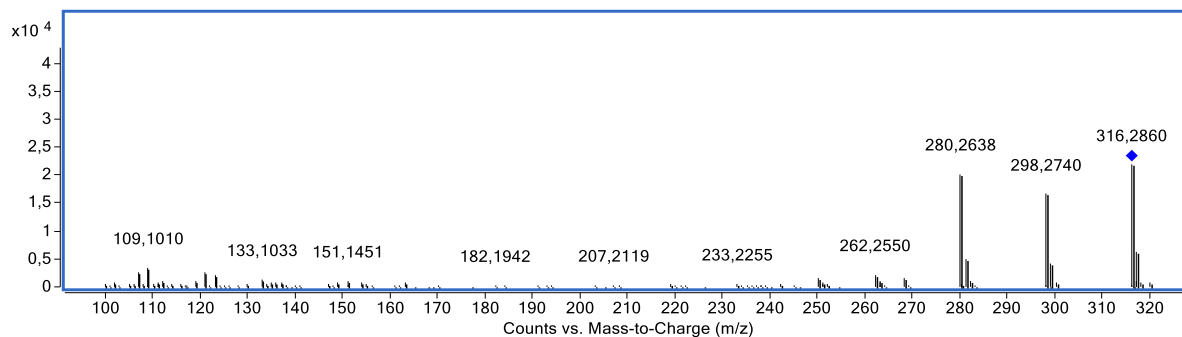
Espectro EM/EM do composto XXIV $[M - H]^-$ 283,0252 obtido da P-D.



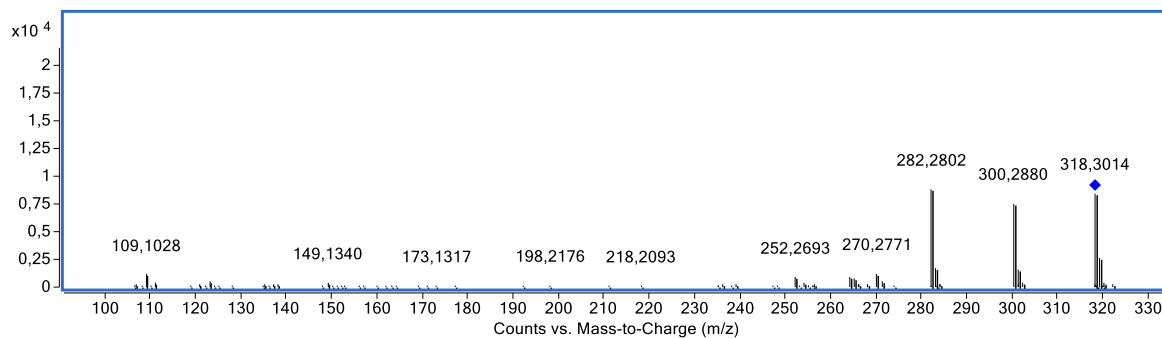
Espectro EM/EM do composto $[M + H]^+$ 594,3426 obtido da P-D.



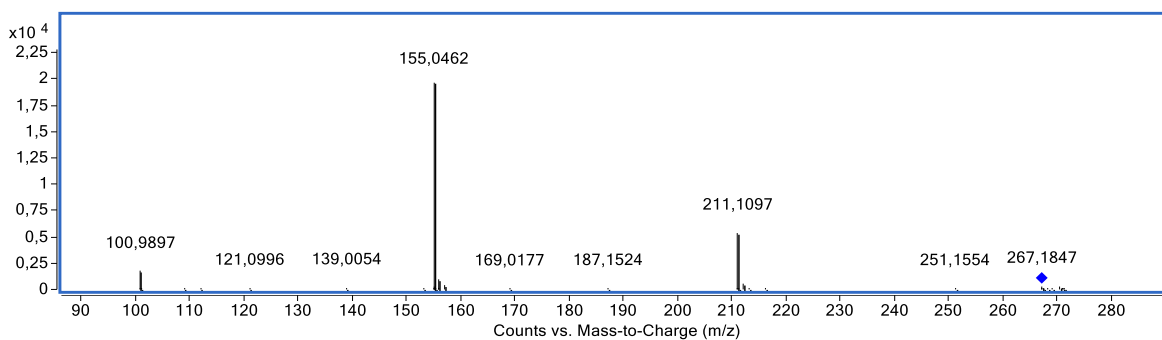
Espectro EM/EM do composto XXV, $[M - H]^-$ 309,074 obtido da P-D.



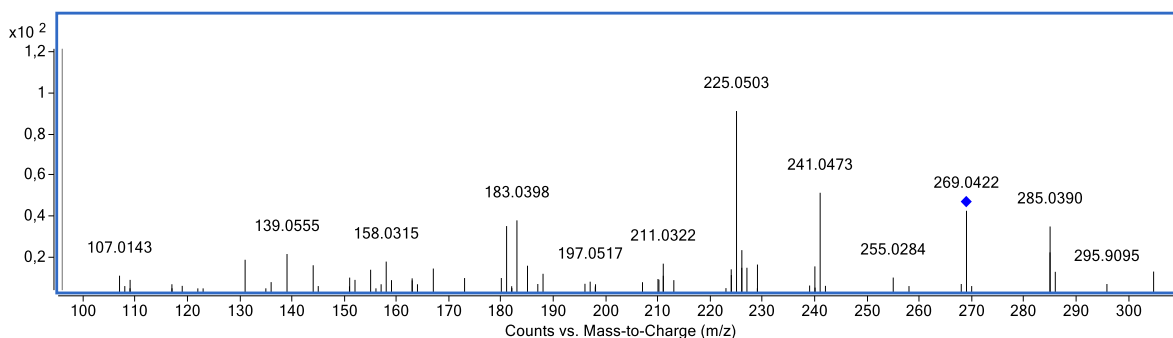
Espectro EM/EM do composto XXVI $[M + H]^+$ 316,2849 obtido da P-D.



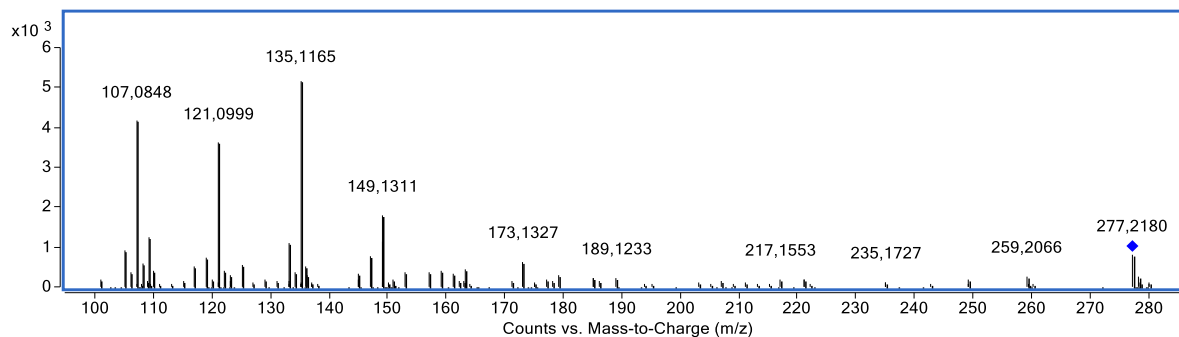
Espectro EM/EM do composto XXVII $[M + H]^+$ 318,3002 obtido da P-D.



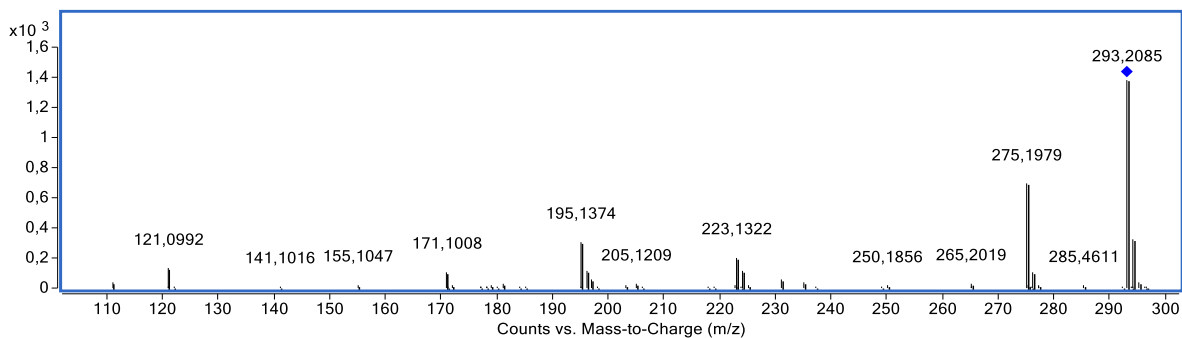
Espectro EM/EM do composto $[M + H]^+$ 267,1727 obtido da P-D.



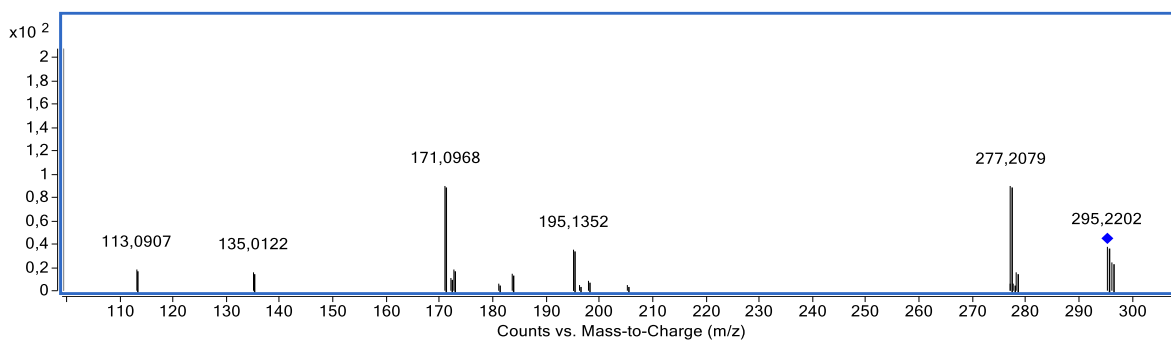
Espectro EM/EM do composto XXVIII, $[M - H]^-$ 269,0450 obtido da P-D.



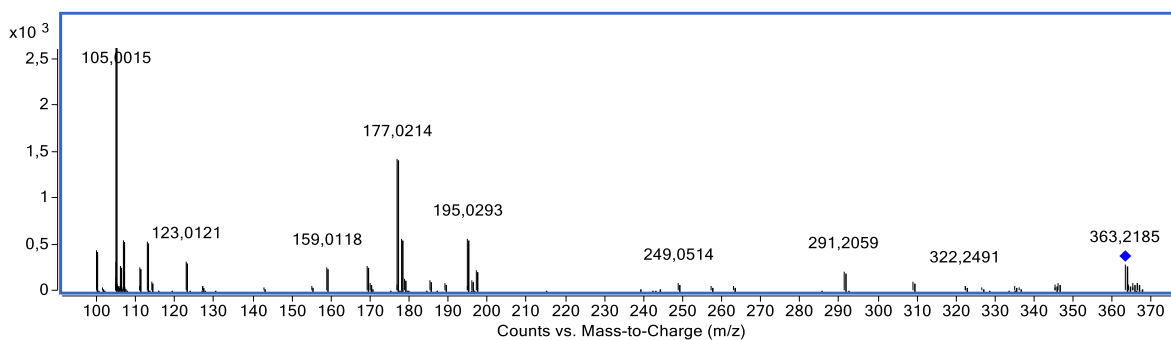
Espectro EM/EM do composto XXIX $[M + H]^+$ 277,2162 obtido da P-D.



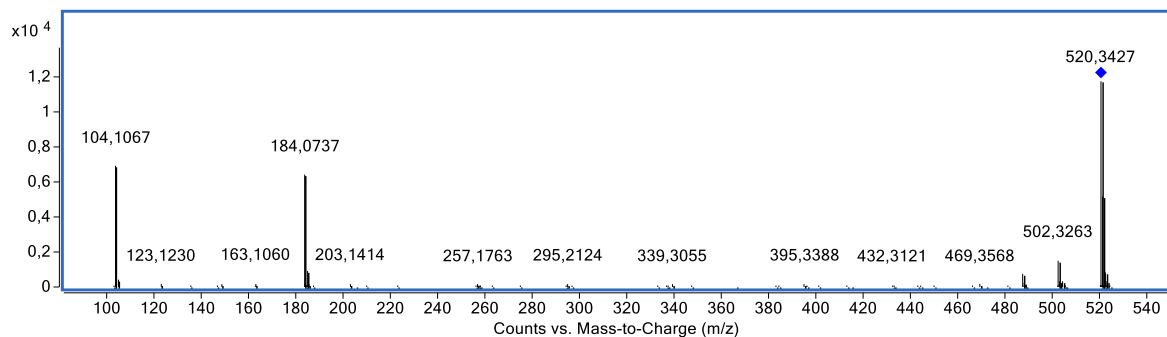
Espectro EM/EM do composto XXX, $[M - H]^-$ 293,2125 obtido da P-D.



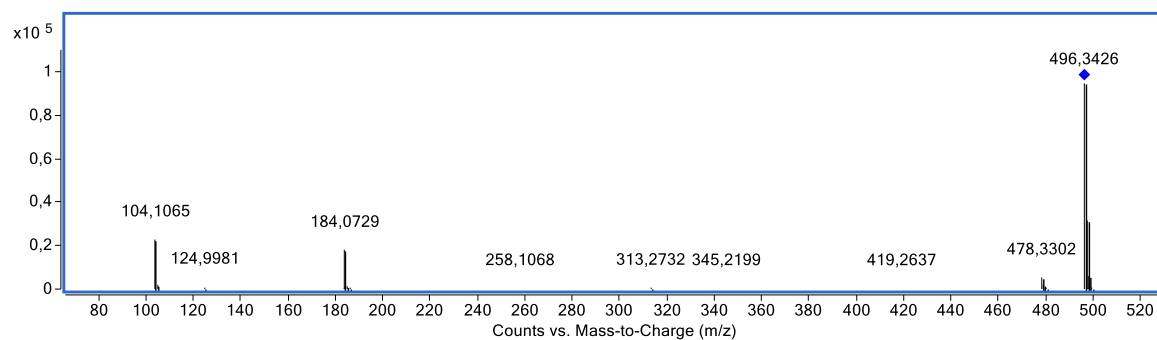
Espectro EM/EM do composto XXX, $[M - H]^-$ 295,2275 obtido da P-D.



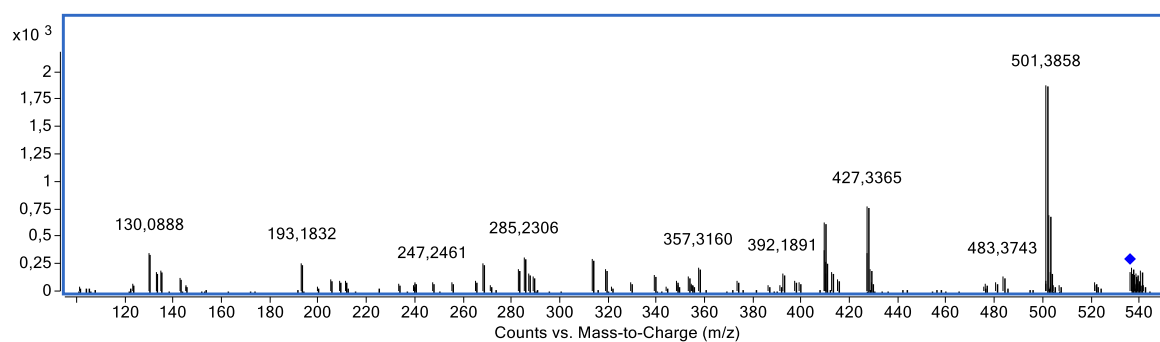
Espectro EM/EM do composto $[M + H]^+$ 363,2203 obtido da P-D.



Espectro EM/EM do composto $[M + H]^+$ 520,3400 obtido da P-D.



Espectro EM/EM do composto $[M + H]^+$ 496,3413 obtido da P-D.



Espectro EM/EM do composto $[M + H]^+$ 536,4159 obtido da P-D.