



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

MICHELLE NAUARA GOMES DO NASCIMENTO

**PERFIL METABOLÔMICO E AVALIAÇÃO BIOLÓGICA DE ESPÉCIES DE
*Senna E Cassia***

**UBERLÂNDIA
2020**

MICHELLE NAUARA GOMES DO NASCIMENTO

**PERFIL METABOLÔMICO E AVALIAÇÃO BIOLÓGICA DE ESPÉCIES DE
*Senna E Cassia***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação do Instituto de Química, da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito para obtenção do título de Doutora em Química.

Área de concentração Química Orgânica

Orientador: Prof. Dr. Marcos Pivatto

**UBERLÂNDIA
2020**

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

N244 2020	<p data-bbox="416 1312 1101 1444">Nascimento, Michelle Nauara Gomes do, 1985- Perfil metabólico e avaliação biológica de espécies de Senna e Cassia [recurso eletrônico] / Michelle Nauara Gomes do Nascimento. - 2020.</p> <p data-bbox="416 1478 1129 1713">Orientador: Marcos Pivatto. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Pós-graduação em Química. Modo de acesso: Internet. Disponível em: http://doi.org/10.14393/ufu.te.2020.627 Inclui bibliografia. Inclui ilustrações.</p> <p data-bbox="416 1736 1093 1836">1. Química. I. Pivatto, Marcos, 1979-, (Orient.). II. Universidade Federal de Uberlândia. Pós-graduação em Química. III. Título.</p> <p data-bbox="1212 1892 1315 1928">CDU: 54</p>
--------------	--

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:

Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091

MICHELLE NAUARA GOMES DO NASCIMENTO

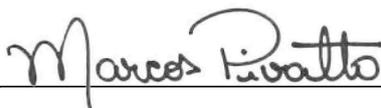
PERFIL METABOLÔMICO E AVALIAÇÃO BIOLÓGICA DE ESPÉCIES DE *Senna* E *Cassia*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação do Instituto de Química, da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito para obtenção do título de Doutora em Química.

Área de concentração Química Orgânica.

Uberlândia, 26 de junho de 2020.

Banca examinadora:



Prof. Dr. Marcos Pivatto

(Orientador – UFU)



Prof. Dra. Raquel Maria Ferreira de Sousa

(Examinador – UFU)



Prof. Dr. Wellington de Oliveira Cruz

(Examinador – UFU)



Prof. Dr. João Henrique Ghilardi Lago

(Examinador – UFABC)



Prof. Dr. Lorena Ramos Freitas de Sousa

(Examinadora – UFCAT)

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Marcos Pivatto pela orientação, apoio e confiança. Obrigada pelo tempo dedicado na realização deste trabalho e pelos ensinamentos transmitidos.

Ao Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart, ao colega Dr. Mário Machado Martins e a Dr. Paula de Souza Santos do Laboratório de Nanobiotecnologia do Instituto de Biotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia (IBTEC-UFU), pela realização dos experimentos de espectrometria de massas e atividade citotóxica.

Aos Professores Dr. Carlos Henrique Gomes Martins e Dr. Luís Carlos Scalon Cunha pela realização dos ensaios antimicrobianos.

Ao professor Dr. Foued Salmen Espindola, do Instituto de Genética e Bioquímica da UFU, pela disponibilidade bem como seu aluno Allisson Benatti Justino, pela realização do ensaio da atividade de inibição da lipase pancreática.

Ao Prof. Dr. Waldomiro Borges Neto e ao aluno Lucas Gustavo da Costa pela realização das análises quimiométricas.

Aos professores do Núcleo de Pesquisa em Produtos Naturais (NuPpEN) pela contribuição no meu processo de aprendizado.

Ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Uberlândia – UFU, por oportunizar a realização deste trabalho.

A todos os amigos que fizeram ou ainda fazem parte do NuPpEN e NPCBio. De um modo especial ao Mário, Marília, Thamires, Karina, Tiara, Gáveni e Raul, pelos bons momentos vividos durante esses anos, pelos ensinamentos compartilhados e por sempre estarem dispostos a ajudar.

Aos meus filhos Sofia e Arthur e ao meu esposo Bruno, pelo carinho, paciência e pela capacidade de me trazerem paz em meio as dificuldades.

A minha mãe Geisa e minha irmã Ayla por acreditarem em mim e por estarem presente em todos os momentos mais importantes da minha vida.

A Deus por iluminar meus caminhos e me permitir chegar até aqui.

RESUMO

Espécies dos gêneros *Senna* e *Cassia* (Fabaceae) apresentam vasta diversidade química e relevante atividade biológica, o que nos motivou para a seleção de duas espécies de *Cassia* (*C. fistula* e *C. bakeriana*) e oito espécies de *Senna* (*S. macranthera*, *S. occidentalis*, *S. siamea*, *S. obtusifolia*, *S. spectabilis*, *S. silvestris*, *S. pendula* e *S. alata*), para serem estudadas do ponto de vista químico e biológico. Extratos etanólicos das flores e folhas destas espécies foram preparados e analisados por espectrometria de massas (EM) de alta resolução com ionização por eletrospray (IES). Através de ferramentas quimiométricas de análise de componentes principais (PCA) e análise hierárquica de agrupamentos (HCA) foi realizado um estudo para agrupar as espécies que apresentaram perfil metabólico semelhante. Em todas as análises *S. spectabilis* se manteve separada das demais, o que pode ser justificado pela presença dos alcaloides piperidínicos identificados por EM somente nesta espécie. O mesmo comportamento foi observado para *S. macranthera*, que também mostrou um perfil metabólico diferente, quando comparado com as demais espécies investigadas. As espécies *S. siamea* e *S. silvestris* ficaram agrupadas, sugerindo que ambas apresentam composição química semelhante. A análise dos EM e EM/EM, em comparação com bases de dados de produtos naturais e padrões de fragmentação conhecidos, permitiu identificar 48 compostos previamente relatados nas espécies de *Senna* e *Cassia*, tais como flavonoides (agliconas e glicosilados), antraquinonas, cromonas, ácidos fenólicos, proantocianidinas e alcaloides, importantes para a compreensão das análises de PCA e HCA. Os extratos etanólicos das folhas e flores de todas as espécies foram submetidos à avaliação da atividade de inibição da lipase pancreática, antimicrobiana e citotóxica. Na avaliação da atividade de inibição da lipase pancreática, o extrato das flores de *C. fistula* apresentou o melhor resultado com $IC_{50} = 25,68 \pm 1,72 \mu\text{g mL}^{-1}$. Os melhores resultados das análises das atividades antimicrobiana e citotóxica foram observados para o extrato etanólico e fração acetato de etila das flores de *S. macranthera*, que apresentaram atividade antifúngica contra três cepas de *Candida* (*C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. glabrata*), com valores de concentração inibitória mínima (CIM) variando de 23,43 a 5,86 $\mu\text{g mL}^{-1}$ que quando comparadas com os dados descritos na literatura, indicam que as amostras são ativas e promissoras ($CIM \leq 50 \mu\text{g mL}^{-1}$) e, valores de índice de seletividade (IS), variando de 1,34 a 1,94 que indicam baixa citotoxicidade. A análise da fração acetato de etila de *S. macranthera* por CLAE-IES-EM/EM permitiu identificar um total de dezoito compostos, incluindo um ácido orgânico, dois flavan-3-ol, uma flavona, dois flavonoides glicosilados, cinco dímeros e sete trímeros de proantocianidinas, que provavelmente estão associados aos resultados antimicrobianos desta espécie. Por não apresentar relatos na literatura, *S. silvestris* foi selecionada para o estudo químico mais detalhado visando o isolamento dos metabólitos secundários. O extrato etanólico das flores foi submetido ao fracionamento cromatográfico, o que levou ao isolamento de duas antraquinonas, crisofanol (I) e fisciona (II), um ácido graxo, o ácido palmítico (III), quatro flavonoides, luteolina (IV), aromadendrina (V), luteolina-7-O-glucosídeo (VIII) e quercetina-3-O-glucosídeo (IX), uma dihidroisocumarina, a 6-dihidroximeleina (VI) e uma cromona, a cassiacromona (VII) que foram caracterizados por técnicas espectroscópicas (espectroscopia de absorção na região do infravermelho, do ultravioleta-visível e ressonância magnética nuclear) e espectrométricas (espectrometrias de massas).

Palavras-chave: *Senna* e *Cassia*, flores, folhas, quimiometria, espectrometria de massas, metabólitos secundários.

ABSTRACT

Species of the genus *Senna* and *Cassia* present a wide chemical diversity and relevant biological activity, which motivated us to select two species of *Cassia* (*C. fistula* and *C. bakeriana*) and eight of *Senna* (*S. macranthera*, *S. occidentalis*, *S. siamea*, *S. obtusifolia*, *S. spectabilis*, *S. silvestris*, *S. pendula* and *S. alata*), to be studied from chemical and biological aspects. The ethanol extracts from the leaves and flowers of these species were prepared and analyzed by mass spectrometry (MS) in high resolution with electrospray ionization (ESI). Through chemometric tools of principal component analysis (PCA) and hierarchical cluster analysis (HCA) a study was made in order to group the species that presented a similar metabolic profile. In all analyzes *S. spectabilis* remains far apart from the others, which can be justified by the presence of the piperidine alkaloids, identified by MS only in this species. The same behavior was observed for *S. macranthera*, which shown a different metabolic profile, when compared with the other investigated species. The species *S. siamea* and *S. silvestris* remain grouped, suggesting that both have a similar composition. MS analysis allowed to identify 48 compounds previously reported in the species, such as flavonoids (aglycones and glycosylated), anthraquinones, chromones, phenolic acids, proanthocyanidins and alkaloids, important for the understanding of PCA and HCA analyzes. The ethanolic extracts of leaves and flowers of all species were submitted to the evaluation of inhibition of pancreatic lipase, antimicrobial and cytotoxic activity. The ethanolic extract of the flowers of *C. fistula* showed the best result in the inhibition of pancreatic lipase activity with $IC_{50} = 25.68 \pm 1.72 \mu\text{g mL}^{-1}$. The best results of the analysis of antimicrobial and cytotoxic activities were observed for the ethanolic extract and ethyl acetate fraction of the *S. macranthera* flower, which presented antifungal activity against three strains of *Candida* (*C. albicans*, *C. tropicalis* and *C. glabrata*), with minimum inhibitory concentration (MIC) values ranging from 23.43 to $5.86 \mu\text{g mL}^{-1}$ which, when compared with the data described in the literature, indicate that the samples are active and promising ($MIC \leq 50 \mu\text{g mL}^{-1}$) and, the selectivity index (SI) values ranged from 1.34 to 1.94, indicate a low cytotoxicity. Analysis of the *S. macranthera* flowers ethyl acetate fraction by HPLC-ESI-MS/MS allowed to identify a total of the eighteen compounds, including one organic acid, two flavan-3-ol, one flavone, two glycosylated flavonols, five proanthocyanidin dimers, and seven proanthocyanidin trimers, that are probably associated with the antimicrobial results of this species. Due to the lack of reports in the literature, *S. silvestris* was selected for a more detailed chemical study aiming at the isolation of secondary metabolites. The ethanolic extract of the flowers was submitted to chromatographic fractionation, which led to the isolation of two anthraquinones, chrysophanol (I) and physcion (II), one fatty acid, palmitic acid (III) four flavonoids, luteolin (IV), aromadendrin (V), luteolin-7-*O*-glucoside (VIII) and quercetin-3-*O*-glucoside (IX), a dihydroisocoumarin, 6-dihydroxymellein (VI) and one chormone cassiachromone (VII) which were characterized by spectroscopic (infrared, ultraviolet-visible and nuclear magnetic resonance spectroscopy) and spectrometric (mass spectrometry) techniques.

Keywords: *Senna* and *Cassia*, flowers, leaves, chemometrics, mass spectrometry, secondary metabolites.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Produtos naturais e derivados bioativos.	26
Figura 2.	Fármacos aprovados pelo FDA de janeiro de 1981 a setembro de 2019 (total = 1881).	27
Figura 3.	Produtos naturais (15–17) e derivados (14) bioativos oriundos da biodiversidade brasileira.	28
Figura 4.	Estruturas de alcaloides piperidínicos (18–25) e piridínicos (26–30) isolados de espécies dos gêneros <i>Senna</i> e <i>Cassia</i> .	32
Figura 5.	Metabólitos secundários isolados de espécies dos gêneros <i>Senna</i> e <i>Cassia</i> .	34
Figura 6.	Lipstatina (54): inibidor da lipase pancreática isolado de <i>Streptomyces toxytricini</i> , e seu derivado orlistat (53).	38
Figura 7.	Compostos isolados de espécies de <i>Cassia</i> com atividade inibidora da lipase pancreática.	40
Figura 8.	Foto de <i>Senna silvestris</i> , detalhes da planta: flor (A) e fruto (B).	40
Figura 9.	Estrutura da quinona (57), antraceno (58) e núcleo fundamental das antraquinonas (59).	42
Figura 10.	Antraquinonas presentes em fármacos comerciais.	43
Figura 11.	Estrutura do núcleo fundamental (65) e principais classes de flavonoides (66–78).	44
Figura 12.	Flavonoides isolados de espécies dos gêneros <i>Senna</i> e <i>Cassia</i> .	46
Figura 13.	Isocumarinas, 3,4-diidroisocumarinas, e análogos.	47
Figura 14.	Gráficos de <i>score plot</i> (A) e <i>loading plot</i> (B), obtidos na análise de PCA, e dendograma (C) obtido na HCA.	50
Figura 15.	Estrutura da placa para o teste de citotoxicidade.	61
Figura 16.	Fluxograma da extração líquido-líquido do extrato etanólico das flores de <i>S. silvestris</i> .	64
Figura 17.	Fluxograma do fracionamento da FHF1 de <i>S. silvestris</i> .	65
Figura 18.	Fluxograma do fracionamento da FAF1 de <i>S. silvestris</i> .	67
Figura 19.	Representação da hidrólise do <i>p</i> -NPP catalisada pela lipase.	71
Figura 20.	Reação de redução da resazurina a resorufina.	74

Figura 21.	Cromatograma obtido por CLAE-EM da fração FAFI de <i>S. macranthera</i> .	80
Figura 22.	EM-IES(-) em alta resolução do composto 1 (A) e seu respectivo EM/EM-IES(-) (B).	81
Figura 23.	Proposta de fragmentação para o ácido orgânico 1 analisado por EM/EM-IES(-).	81
Figura 24.	EM-IES(-) em alta resolução dos compostos 2 (A), 3 (B) e seus respectivos EM/EM-IES(-) 2 (C) e 3 (D).	83
Figura 25.	Proposta de fragmentação para os flavan-3-ol 2 e 3 identificados por EM/EM-IES(-) na fração AcOEt das flores de <i>S. macranthera</i> .	84
Figura 26.	EM-IES(-) em alta resolução do composto 4 (A) e seu respectivo EM/EM-IES(-) (B).	85
Figura 27.	Proposta de fragmentação para a flavona 4 identificada por EM/EM-IES(-) na fração AcOEt das flores de <i>S. macranthera</i> .	85
Figura 28.	EM-IES(-) em alta resolução dos compostos 5 (A), 6 (B) e seus respectivos EM/EM-IES(-) 5 (C) e 6 (D).	87
Figura 29.	Proposta de fragmentação para os flavonóis 5 e 6 identificados por EM/EM-IES(-) na fração AcOEt das flores de <i>S. macranthera</i> .	88
Figura 30.	EM-IES(-) em alta resolução do composto 7 (A) e seu respectivo EM/EM-IES (-) (B).	89
Figura 31.	EM-IES(-) em alta resolução dos compostos 8a (A), 8b (B) e seus respectivos EM/EM-IES (-) 8a (C) e 8b (D).	90
Figura 32.	EM-IES(-) em alta resolução dos compostos 9a (A), 9b (B) e seus respectivos EM/EM-IES (-) 9a (C) e 9b (D).	91
Figura 33.	EM-IES(-) em alta resolução dos compostos 10a (A), 10b (B) e seus respectivos EM/EM-IES (-) 10a (C) e 10b (D).	92
Figura 34.	EM-IES(-) em alta resolução do composto 10c (A) e seu respectivo EM/EM-IES (B).	93
Figura 35.	EM-IES(-) em alta resolução dos compostos 11a (A), 11b (B) e seus respectivos EM/EM-IES 11a (C) e 11b (D).	94
Figura 36.	Proposta de fragmentação para os dímeros 7–11b identificados por EM/EM-IES(-) na fração AcOEt das flores de <i>S. macranthera</i> .	95

Figura 37.	EM-IES(-) em alta resolução do composto 12 (A) e seu respectivo EM/EM-IES(-) (B).	97
Figura 38.	EM-IES(-) em alta resolução dos compostos 13 (A), 14 (B) e seus respectivos EM/EM-IES(-) 13 (C) e 14 (D).	99
Figura 39.	EM-IES(-) em alta resolução dos compostos 15a (A), 15b (B) e seus respectivos EM/EM-IES(-) 15a (C) e 15b (D).	101
Figura 40.	EM-IES(-) em alta resolução do composto 16 (A) e seu respectivo EM/EM-IES(-) (B).	102
Figura 41.	EM-IES(-) em alta resolução dos compostos 17 (A), 18 (B) e seus respectivos EM/EM-IES(-) 17 (C) e 18 (C).	103
Figura 42.	Proposta de fragmentação para os trimeros 12–18 identificados por EM/EM-IES(-) na fração AcOEt das flores de <i>S. macranthera</i> .	104
Figura 43.	EM-IES em alta resolução dos extratos etanólicos das flores e folhas de <i>C. fistula</i> .	109
Figura 44.	EM-IES em alta resolução dos extratos etanólicos das flores e folhas de <i>S. macranthera</i> .	110
Figura 45.	EM-IES em alta resolução dos extratos etanólicos das flores e folhas de <i>C. bakeriana</i> .	111
Figura 46.	EM-IES em alta resolução dos extratos etanólicos das folhas de <i>S. occidentalis</i> .	112
Figura 47.	EM-IES em alta resolução dos extratos etanólicos das flores e folhas de <i>S. siamea</i> .	113
Figura 48.	EM-IES em alta resolução dos extratos etanólicos das flores e folhas de <i>S. obtusifolia</i> .	114
Figura 49.	EM-IES em alta resolução dos extratos etanólicos das flores e folhas de <i>S. spectabilis</i> .	115
Figura 50.	EM-IES em alta resolução dos extratos etanólicos das flores e folhas de <i>S. silvestris</i> .	116
Figura 51.	EM-IES em alta resolução dos extratos etanólicos das flores e folhas de <i>S. pendula</i> .	117
Figura 52.	EM-IES em alta resolução dos extratos etanólicos das flores e folhas de <i>S. alata</i> .	118

Figura 53.	Gráficos de <i>Score Plot</i> (PC1 vs PC3 vs PC4) (A) e (PC1 vs PC3) (B) dos extratos etanólicos das flores no modo positivo.	125
Figura 54.	Dendograma gerado pela HCA dos extratos etanólicos das flores no modo positivo.	128
Figura 55.	Gráficos de <i>Score Plot</i> (PC1 vs PC3 vs PC4) (A) e (PC1 vs PC3) (B) dos extratos etanólicos das folhas no modo positivo.	129
Figura 56.	Dendograma gerado pela HCA dos extratos etanólicos das folhas no modo positivo.	131
Figura 57.	Gráficos de <i>Score Plot</i> (PC1 vs PC2 vs PC4) (A) e (PC1 vs PC2) (B) dos extratos etanólicos das flores no modo negativo.	132
Figura 58.	Dendograma gerado pela HCA dos extratos etanólicos das flores no modo negativo.	135
Figura 59.	Gráficos de <i>Score Plot</i> (PC1 vs PC3 vs PC5) (A) e (PC1 vs PC3) (B) dos extratos etanólicos das folhas no modo negativo.	136
Figura 60.	Dendograma gerado pela HCA dos extratos etanólicos das folhas no modo negativo.	139
Figura 61.	CCD do composto I . Inspeção em câmara de UV 365 nm (A); revelação química com solução etanólica de KOH 5% como revelador (B).	140
Figura 62.	EM-IES(-) em alta resolução do composto I .	141
Figura 63.	Cromatograma obtido por CG-EM do composto I .	142
Figura 64.	Espectro de massas com ionização por elétrons (70 eV) do pico com t_R 13,82 min.	142
Figura 65.	Proposta de fragmentação do composto I por EM-IE.	143
Figura 66.	Espectro de absorção na região do IV do composto I .	144
Figura 67.	Espectro de absorção na região do UV-Visível de I ($C_{EtOH} = 6,0$ nM).	145
Figura 68.	Principais correlações (H-C) observadas no mapa de contorno HMBC de I .	148
Figura 69.	EM/EM-IES(-) do composto I (m/z 253 $[M - H]^-$, energia de colisão 20 eV).	149
Figura 70.	Proposta de fragmentação do composto I por EM-IES.	149
Figura 71.	Espectro de RMN de 1H (400 MHz, $CDCl_3$) do composto I .	150
Figura 72.	Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$) do composto I .	151

Figura 73.	Espectro de DEPT 135 (100 MHz, CDCl ₃) do composto I .	152
Figura 74.	Mapa de contorno HSQC do composto I .	153
Figura 75.	Mapa de contorno HMBC do composto I .	154
Figura 76.	Ampliação mapa de contorno HMBC (δ 8,0–6,5).	155
Figura 77.	Ampliação mapa de contorno HMBC (δ 11,5–12,5).	156
Figura 78.	CCD do composto II . Inspeção em câmara de UV 365 nm (A); revelação química com solução etanólica de KOH 5% como revelador (B).	157
Figura 79.	EM-IES(-) em alta resolução do composto II .	158
Figura 80.	Cromatograma obtido por CG-EM do composto II .	159
Figura 81.	Espectro de massas com ionização por elétrons (70 eV) do pico com t_R 15,82 min.	159
Figura 82.	Proposta de fragmentação do composto II por EM-IE.	160
Figura 83.	Espectro de absorção na região do IV do composto II .	161
Figura 84.	Espectro de absorção na região do UV-Visível de II ($C_{EtOH} = 6,0$ nM).	162
Figura 85.	Contribuição de grupos doadores de elétrons no deslocamento da banda no visível de antraquinonas.	162
Figura 86.	Principais correlações (H–C) observadas no mapa de contorno HMBC de II .	165
Figura 87.	EM/EM-IES(-) do composto II (m/z 283 [M – H] ⁻ , energia de colisão 15 eV).	166
Figura 88.	Espectro de RMN de ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) do composto II .	167
Figura 89.	Espectro de RMN de ¹³ C (100 MHz, CDCl ₃) do composto II .	168
Figura 90.	Espectro de DEPT 135 do composto II .	169
Figura 91.	Mapa de contorno HSQC do composto II .	170
Figura 92.	Ampliação do mapa de contorno HSQC (δ 6,5–8,0).	171
Figura 93.	Mapa de contorno HMBC do composto II .	172
Figura 94.	Ampliação do mapa de contorno HMBC (δ 6–8).	173
Figura 95.	CCD do composto III . Revelação química com vanilina sulfúrica como revelador.	174
Figura 96.	Principais correlações (H–C) observadas no mapa de contorno HMBC de III .	177

Figura 97.	Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do composto III .	178
Figura 98.	Mapa de contorno HSQC do composto III .	179
Figura 99.	Mapa de contorno HMBC do composto III .	180
Figura 100.	CCD do composto IV . Inspeção em câmara de UV 254 nm (A), 365 nm (B) e 365 nm após tratamento com reagente NP/PEG (C).	181
Figura 101.	Cromatograma (CLAE-DAD, 254 nm) em coluna analítica da fração MDFAC02 F14.	182
Figura 102.	EM-IES(-) em alta resolução do composto IV .	183
Figura 103.	Espectro de absorção na região do IV do composto IV .	184
Figura 104.	Espectro de absorção na região do UV-Visível de IV ($C_{\text{MeOH}} = 12,0 \mu\text{M}$).	185
Figura 105.	Principais correlações (H-C) observadas no mapa de contorno HMBC de IV .	188
Figura 106.	EM/EM-IES(-) do composto IV (m/z 285 $[\text{M} - \text{H}]^-$, energia de colisão 20 eV).	189
Figura 107.	Proposta de fragmentação do composto IV por EM-IES.	190
Figura 108.	Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) do composto IV .	191
Figura 109.	Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) do composto IV .	192
Figura 110.	Espectro de DEPT 135 (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) do composto IV .	193
Figura 111.	Mapa de contorno HSQC do composto IV .	194
Figura 112.	Ampliação do mapa de contorno HSQC (δ 6,0–7,6).	195
Figura 113.	Mapa de contorno HMBC do composto IV .	196
Figura 114.	Ampliação do mapa de contorno HMBC (δ 6,0–7,5).	197
Figura 115.	EM-IES(-) em alta resolução do composto V .	198
Figura 116.	Espectro de absorção na região do UV-Visível de V ($C_{\text{MeOH}} = 12,0 \mu\text{M}$).	199
Figura 117.	Principais correlações (H-C) observadas no mapa de contorno HMBC de V .	202
Figura 118.	EM/EM-IES(-) do composto V (m/z 287 $[\text{M} - \text{H}]^-$, energia de colisão 25 eV).	203
Figura 119.	Proposta de fragmentação para a substância V analisado por EM/EM-IES(-).	204
Figura 120.	Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) do composto V .	205
Figura 121.	Espectro de RMN de ^{13}C (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) do composto V .	206

Figura 122	Espectro de DEPT 135 do composto V .	207
Figura 123.	Mapa de contorno HSQC do composto V .	208
Figura 124.	Ampliação do mapa de contorno HSQC (δ 4,5–7,5).	209
Figura 125.	Mapa de contorno HMBC do composto V .	210
Figura 126.	Ampliação mapa de contorno HMBC (δ 5,0–7,5).	211
Figura 127.	CCD do composto VI . Inspeção em câmara de UV 254 nm (A), 365 nm (B) e 365 nm após tratamento com solução etanólica de KOH 5% (C).	212
Figura 128.	EM-IES(-) em alta resolução do composto VI .	213
Figura 129.	Espectro na região do infravermelho da substância VI .	214
Figura 130.	Espectro de absorção na região do UV-Visível de VI ($C_{\text{EtOH}} = 12,0 \mu\text{M}$).	215
Figura 131.	Principais correlações (H-C) observadas no mapa de contorno HMBC de VI .	218
Figura 132.	EM/EM-IES(-) do composto VI (m/z 193 $[\text{M} - \text{H}]^-$, energia de colisão 20 eV).	219
Figura 133.	Proposta de fragmentação para o composto VI analisado por EM/EM- IES(-).	220
Figura 134.	Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) do composto VI .	221
Figura 135.	Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) do composto VI .	222
Figura 136.	Espectro de DEPT 135 (100 MHz, DMSO- d_6) do composto VI .	223
Figura 137.	Mapa de contorno HSQC do composto VI .	224
Figura 138.	Ampliação do mapa de contorno HSQC (δ 1,0–6,4).	225
Figura 139.	Mapa de contorno HMBC do composto VI .	226
Figura 140.	Ampliação do mapa de contorno HMBC (δ 1,0–6,5).	227
Figura 141.	Mapa de contorno COSY para a substância VI .	228
Figura 142.	CCD do composto VII . Após tratamento com solução de vanilina sulfúrica (A); Inspeção em câmara de UV 254 nm (B), e 365 nm (C).	229
Figura 143.	EM-IES(-) em alta resolução do composto VII .	230
Figura 144.	Cromatograma obtido por CG-EM do composto VII .	231
Figura 145.	Espectro de massas com ionização por elétrons (70 eV) do pico com t_{R} 13,62 min.	231
Figura 146.	Proposta de fragmentação do composto VII por EM-IE.	232
Figura 147.	Espectro de absorção na região do UV-Visível de VII	232

(C_{MeOH} = 12,0 μM).

- Figura 148.** Principais correlações (H–C) observadas no mapa de contorno HMBC de **VII**. 235
- Figura 149.** EM/EM-IES(–) do composto **VII** (m/z 231 [M – H][–], energia de colisão 20 eV). 236
- Figura 150.** Proposta de fragmentação do composto **VII** analisado por EM/EM- IES(–). 236
- Figura 151.** Espectro de RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) do composto **VII**. 237
- Figura 152.** Espectro de RMN de ¹³C (100 MHz, DMSO-*d*₆) do composto **VII**. 238
- Figura 153.** Espectro de DEPT 135 (100 MHz, DMSO-*d*₆) do composto **VII**. 239
- Figura 154.** Mapa de contorno HSQC do composto **VII**. 240
- Figura 155.** Mapa de contorno HMBC do composto **VII**. 241
- Figura 156.** Ampliação do mapa de contorno HMBC (δ 1,9–4,4). 242
- Figura 157.** Ampliação do mapa de contorno HMBC (δ 5,7–7,0). 243
- Figura 158.** Cromatograma (CLAE-DAD, 254 nm) em coluna analítica da fração MDFAC04 F6. 244
- Figura 159.** EM-IES(–) em alta resolução do composto **VIII**. 245
- Figura 160.** EM/EM-IES(–) do composto **VIII** (m/z 447 [M – H][–], energia de colisão 20 eV). 246
- Figura 161.** Proposta de fragmentação do composto **VIII** analisado por EM/EM- IES(–). 246
- Figura 162.** Cromatograma (CLAE-DAD, 254 nm) em coluna analítica da fração MDFAC04F5. 247
- Figura 163.** EM-IES(–) em alta resolução do composto **IX**. 248
- Figura 164.** EM/EM-IES(–) do composto **IX** (m/z 463 [M – H][–], energia de colisão 20 eV). 249
- Figura 165.** Proposta de fragmentação do composto **IX** analisado por EM/EM- IES(–). 249

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Espécies coletadas e as respectivas coordenadas geográficas.	56
Tabela 2.	Massa do material vegetal seco, dos extratos e frações obtidos após extração líquido-líquido.	68
Tabela 3.	Triagem fitoquímica dos extratos e frações das diferentes espécies de <i>Senna</i> e <i>Cassia</i> .	70
Tabela 4.	Percentual de inibição (%) e IC ₅₀ da lipase pancreática apresentado pelos extratos etanólicos.	72
Tabela 5.	Resultados da atividade antimicrobiana, expresso em CIM ($\mu\text{g mL}^{-1}$), dos extratos etanólicos de <i>Senna</i> e <i>Cassia</i> .	75
Tabela 6.	Resultados da atividade antifúngica, expresso em CIM ($\mu\text{g mL}^{-1}$), das frações, obtidas a partir do extrato etanólico das flores de <i>S. macranthera</i> .	76
Tabela 7.	Atividade citotóxica, expresso em CC ₅₀ ($\mu\text{g mL}^{-1}$) e índice de seletividade dos extratos etanólicos de <i>Senna</i> e <i>Cassia</i> .	78
Tabela 8.	Atividade citotóxica e índice de seletividade do extrato e frações obtidas das flores de <i>S. macranthera</i> .	79
Tabela 9.	Proposta da composição química da fração AcOEt das flores de <i>S. macranthera</i> identificados por CLAE-EM/EM-IES(-).	105
Tabela 10.	Proposta da composição dos extratos etanólicos, no modo negativo, das diferentes espécies de <i>Senna</i> e <i>Cassia</i> .	119
Tabela 11.	Proposta da composição dos extratos etanólicos, no modo positivo, das diferentes espécies de <i>Senna</i> e <i>Cassia</i> .	122
Tabela 12.	Variáveis (m/z) com maior contribuição para a separação dos grupos, no <i>score plot</i> e na construção de cada componente principal, das flores no modo positivo.	127
Tabela 13.	Variáveis (m/z) com maior contribuição para a separação dos grupos, no <i>score plot</i> e na construção de cada componente principal, das folhas no modo positivo.	130
Tabela 14.	Variáveis (m/z) com maior contribuição para a separação dos grupos, no <i>score plot</i> e na construção de cada componente principal, das flores no modo negativo.	134

Tabela 15.	Variáveis (m/z) com maior contribuição para a separação dos grupos, no <i>score plot</i> e na construção de cada componente principal, das folhas no modo negativo.	138
Tabela 16.	Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (400/100 MHz, CDCl_3) do composto I em comparação com dados da literatura.	147
Tabela 17.	Correlações observadas nos mapas de contorno HSQC e HMBC para o composto I .	148
Tabela 18.	Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (400/100 MHz, CDCl_3) do composto II em comparação com dados da literatura.	164
Tabela 19.	Correlações observadas nos mapas de contorno HSQC e HMBC do composto II .	165
Tabela 20.	Dados de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do composto III em comparação com dados da literatura.	176
Tabela 21.	Correlações observadas nos mapas de contorno HSQC e HMBC do composto III .	177
Tabela 22.	Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (400/100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) do composto IV em comparação com dados da literatura.	187
Tabela 23.	Correlações observadas nos mapas de contorno HSQC e HMBC para o composto IV .	188
Tabela 24.	Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (400/100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) do composto V em comparação com dados da literatura.	201
Tabela 25.	Correlações observadas nos mapas de contorno HSQC e HMBC para o composto V .	202
Tabela 26.	Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (400/100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) do composto VI em comparação com dados da literatura.	217
Tabela 27.	Correlações observadas nos mapas de contorno HSQC e HMBC para o composto VI .	218
Tabela 28.	Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (400/100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) do composto VII em comparação com dados da literatura.	234
Tabela 29.	Correlações observadas nos mapas de contorno HSQC e HMBC para o composto VII .	235

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AcOEt – Acetato de etila

ATCC – *American type culture collection*

ax – Axial

C – Concentração

CC – Cromatografia em coluna

CC₅₀ – Concentração em que se tenha 50% de viabilidade celular

CCD – Cromatografia em camada delgada

C_{EtOH} – Concentração de etanol

CG-EM – Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas

C_{MeOH} – Concentração de metanol

CIM – Concentração inibitória mínima

CLAE-EMⁿ – Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas sequencial

CLSI – *Clinical and laboratory standards institute*

COSY – *Correlation spectroscopy*

d – Duplete

DAD – Detector de arranjo de diodos

dd – Duplo duplete

DE₅₀ – Dose efetiva

DEPT – *Distortionless enhancement by polarization transfer*

ddq – Duplo duplo quadruplete

DMEM – *Dubelcco's modified eagle medium*

DMSO – Dimetilsulfóxido

dq – Duplo quadruplete

EEF1 – Extrato etanólico das flores

EEFo – Extrato etanólico das folhas

ELSD – *Evaporative light scattering detector*

EM – Espectrometria de massas

EM-IE – Espectrometria de massas com ionização por impacto de elétrons

EM-IES – Espectrometria de massas com ionização por eletrospray

eq – Equatorial

FAFI – Fração acetato de etila das flores
FDA – Food and drug administration
FE – Fase estacionária
FHA – Fissão heterocíclica do anel
FHF1 – Fração hexano das flores
FM – Fase móvel
GPS – *Global positioning system*
HCA – *Hierarchical component analysis*
Hex – Hexano
HMBC – *Heteronuclear multiple bond correlation*
HSQC – *Heteronuclear single quantum correlation*
HUFU – Herbário Uberlandense da Universidade Federal de Uberlândia
IC₅₀ – Concentração necessária para inibição de 50% do parasita
IES – Ionização por eletrospray
IQ – Instituto de química
IV – Infravermelho
J – Constante de acoplamento (em Hertz)
MeOH – Metanol
MOPS – Tampão 3-(*N*-morfolino)-propano-ácido sulfônico
NADH – Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NPCBio – Núcleo de Pesquisa em Compostos Bioativos
NP/PEG – *Natural product reagent A* – difenilborato/polietilenoglicol-4000
NuPPeN – Núcleo de Pesquisa em Produtos Naturais
P.A. – Para análises
PBS – *Phosphate buffered saline*
PCA – *Principal component analysis*
PCs – Componentes principais
PN – Produto natural
PNs – Produtos naturais
p-NP – *p*-nitrofenol
p-NPP – Palmitato de *p*-nitrofenila
RDA – Retro-Diels-Alder

R_f – Fator de retenção

RMN – Ressonância magnética nuclear

RMN de ^1H – Ressonância magnética nuclear de hidrogênio 1

RMN de ^{13}C – Ressonância magnética nuclear de carbono 13

RPMI – *Roswell park memorial institute*

s – Simpleto

t – Tripleto

ToF – *Time of flight*

t_R – Tempo de retenção

TSB – *Trypticase soy broth*

UFC – Unidade de formação de colônias

UFU – Universidade Federal de Uberlândia

UV – Ultravioleta

UV-Vis – Ultravioleta-visível

V_{inj} – Volume injetado

Δ – Erro em ppm

δ – Deslocamento químico em relação ao TMS (expresso em ppm)

ϕ – Diâmetro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	24
1.1	Produtos naturais	24
1.2	A família Fabaceae	29
1.3	Os gêneros <i>Senna</i> e <i>Cassia</i>	30
1.4	Atividades biológicas	35
1.4.1	Atividade antimicrobiana	35
1.4.2	Atividade inibidora da lipase pancreática	37
1.5	<i>Senna silvestris</i>	40
1.6	Classes de compostos isolados de <i>S. silvestris</i>	41
1.6.1	Antraquinonas	41
1.6.2	Flavonoides	43
1.6.3	Isocumarinas	46
1.7	Metabolômica, desreplcação e análise quimiométrica em produtos naturais	48
2	OBJETIVOS	51
3	PARTE EXPERIMENTAL	51
3.1	Materiais	51
3.1.1	Solventes e reagentes	51
3.1.2	Reveladores	52
3.1.3	Fases estacionárias	52
3.2	Equipamentos	53
3.3	Materiais e reagentes utilizados nos ensaios antimicrobianos	54
3.4	Materiais e reagentes utilizados no ensaio de citotoxicidade	54
3.5	Materiais e reagentes utilizados no ensaio de inibição da lipase pancreática	55
3.6	Metodologias	55
3.6.1	Coleta e preparo do material vegetal	55
3.6.2	Preparo dos extratos vegetais	56
3.6.3	Triagem fitoquímica dos extratos e frações	57
3.6.4	Inibição da atividade da lipase pancreática	57
3.6.5	Avaliação das atividades antimicrobianas	58
3.6.5.1	<i>Microrganismos utilizados</i>	58

3.6.5.2	<i>Preparo das amostras, do inóculo e controles</i>	59
3.6.5.3	<i>Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)</i>	60
3.6.6	Avaliação da atividade citotóxica	60
3.6.6.1	<i>Preparo das amostras</i>	60
3.6.6.2	<i>Teste de viabilidade celular</i>	61
3.6.7	Análise por espectrometria de massas em alta resolução	62
3.6.8	Quimiometria	63
3.6.9	Coleta, preparo dos extratos e extração líquido-líquido dos órgãos de <i>S. silvestris</i>	64
3.6.10	Fracionamento cromatográfico da fração FHF1 de <i>S. silvestris</i>	65
3.6.11	Fracionamento cromatográfico da fração FAF1 de <i>S. silvestris</i>	65
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	68
4.1	Obtenção dos extratos etanólicos e frações	68
4.2	Triagem fitoquímica dos extratos e frações	69
4.3	Atividade de inibição da lipase pancreática	71
4.4	Atividade antimicrobiana	73
4.5	Avaliação da atividade citotóxica	77
4.6	Identificação dos metabólitos secundários da fração FAF1 de <i>S. macranthera</i>	79
4.7	Triagem química dos extratos das diferentes espécies de <i>Senna</i> e <i>Cassia</i> .	107
4.8	Análises quimiométricas	124
4.8.1	Análises dos extratos etanólicos das flores no modo positivo	124
4.8.2	Análises dos extratos etanólicos das folhas no modo positivo	128
4.8.3	Análises dos extratos etanólicos das flores no modo negativo	131
4.8.4	Análises dos extratos etanólicos das folhas no modo negativo	135
4.9	Elucidação estrutural das substâncias isoladas das flores de <i>Senna silvestris</i>	140
4.9.1	Elucidação estrutural do composto I.	140
4.9.2	Elucidação estrutural do composto II.	157
4.9.3	Elucidação estrutural do composto III	174
4.9.4	Elucidação estrutural do composto IV	181
4.9.5	Elucidação estrutural do composto V	198

4.9.6	Elucidação estrutural do composto VI	212
4.9.7	Elucidação estrutural do composto VII	229
4.9.8	Elucidação o estrutural do composto VIII	244
4.9.9	Elucidação estrutural do composto IX	247
5	CONCLUSÕES	250
	REFERÊNCIAS	253

1 – INTRODUÇÃO

1.1 – Produtos naturais

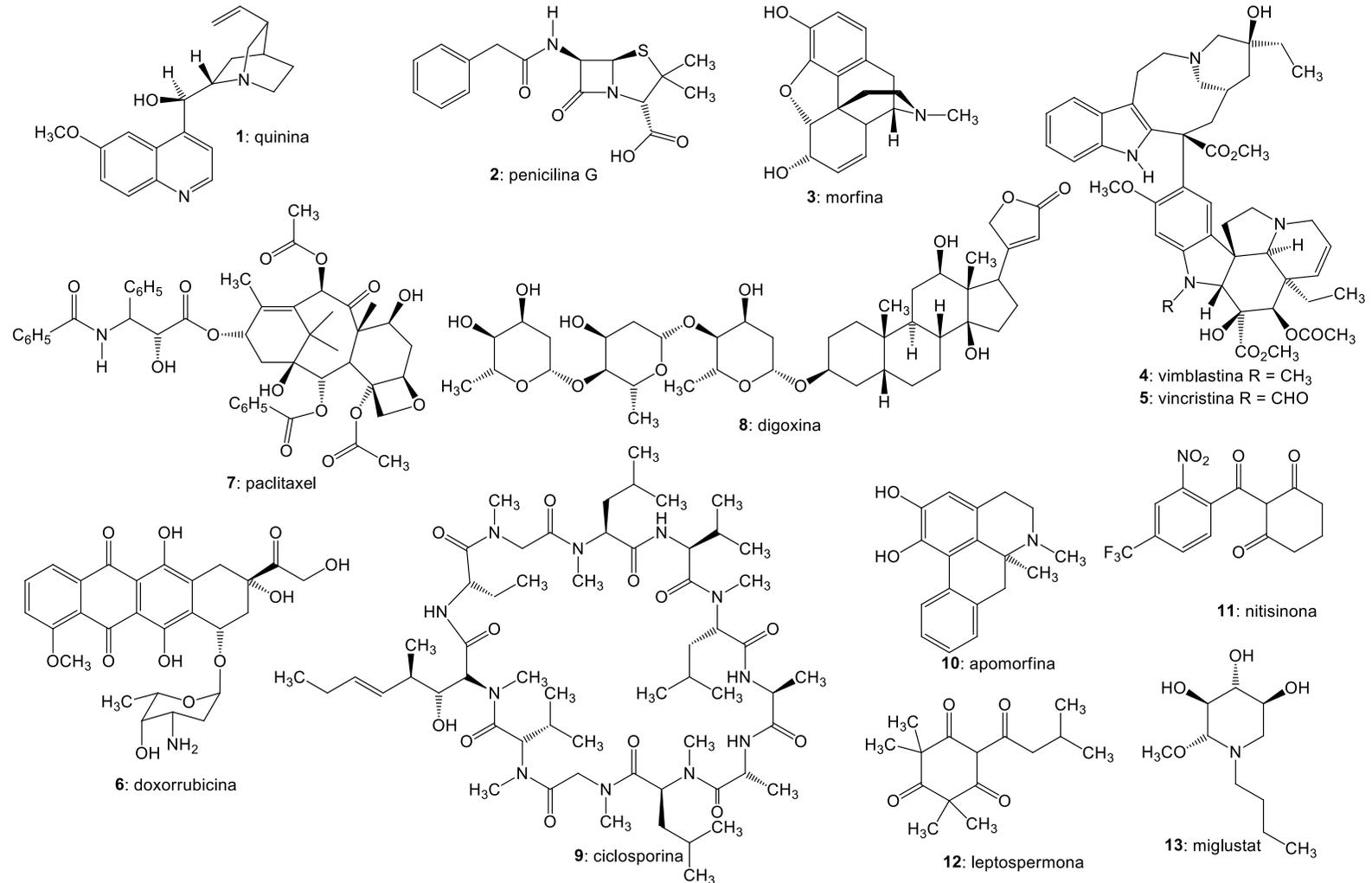
Os produtos naturais (PNs), em especial aqueles oriundos das plantas, têm sido durante séculos utilizados na medicina tradicional para o controle e cura de diversas doenças, principalmente nos países em desenvolvimento nas comunidades mais carentes, chegando a representar 80% dos recursos básicos de saúde (AGRA, FREITAS, BARBOSA-FILHO, 2007). O conhecimento tradicional associado ao uso das plantas impulsionou o desenvolvimento de metodologias e equipamentos para o isolamento de mais de 12.000 compostos bioativos, dos quais 122 são comercializados atualmente (FABRICANT, FARNSWORTH, 2001).

Entre os vários exemplos de fármacos isolados de PN vale destacar a quinina (**1**), o primeiro fármaco antimalárico isolado das cascas de espécies de *Chinchona*; a penicilina G (**2**), isolada em 1928 dos fungos do gênero *Penicillium*, que é a gênese para o desenvolvimento dos antibióticos; a morfina (**3**), analgésico isolado de *Papaver somniferum*; a vimblastina (**4**) e vincristina (**5**), isolados de *Catharanthus roseus*, que são quimioterápicos importantes no tratamento da leucemia; o paclitaxel (**6**), isolado das cascas do *Taxus brevifolia*, importante medicamento utilizado no tratamento do câncer de mama e ovário; a digoxina (**7**), utilizada como cardiotônico e isolada de *Digitalis lanata*; a doxorrubicina (**8**), um antibiótico, isolado da bactéria *Streptomyces peucetius*, usado em associação com fármacos para o tratamento de diversos tipos de câncer; a ciclosporina (**9**), isolada do fungo *Tolypocladium inflatum*, utilizada como imunossupressora no pós cirúrgico de pacientes que tiveram órgãos transplantados para evitar a rejeição (Figura 1) (BARREIRO, 1990; BRAZ-FILHO, 2010; CHAVES, ALBERTI, PETROIANU, 2008; CHEUKA et al., 2017; MISHRA, TIWARI, 2011).

Produtos naturais também têm sido fonte de inspiração para o desenvolvimento de novos medicamentos até os dias atuais. São exemplos a apomorfina (**10**), um composto sintético baseado na estrutura da morfina, comercializada como Apokyn[®], e usada para o tratamento da doença de Parkinson (DELEU, HANSSENS, NORTHWAY, 2004); a nitisinona (**11**), um derivado sintético baseado na estrutura do PN leptospermona (**12**), isolado da espécie *Callistemon citrinus*, é comercializada como (Orphadin[®]), e utilizada para o tratamento de algumas doenças hereditárias como a tirosinemia hereditária tipo 1 (DAS, 2017; SANTRA, BAUMANN, 2008); e o miglustat (**13**) (Zavesca[®]), o primeiro

iminoaçúcar extraído de plantas e microrganismos, aprovado pelo FDA para o tratamento da doença de Gaucher (Figura 1) (ABIAN et al., 2011; MISHRA et al., 2016).

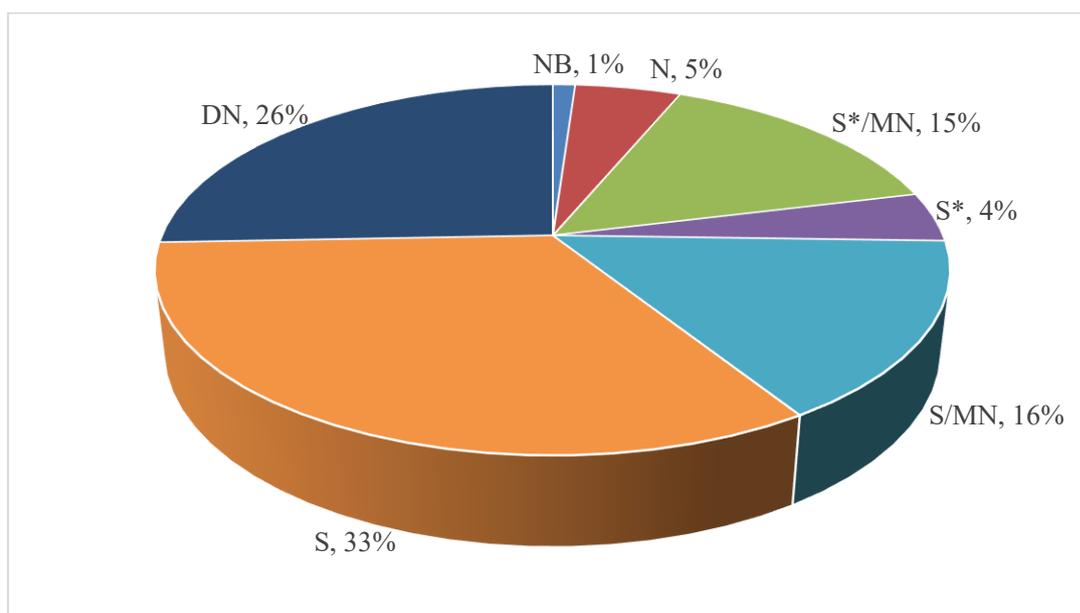
Figura 1 – Produtos naturais e derivados bioativos.



Fonte: autora.

A busca por substâncias biologicamente ativas a partir de plantas merece destaque, pela capacidade que os vegetais apresentam de produzir e acumular estruturas moleculares extremamente funcionalizadas, complexas e incomuns, capazes de interagir com diferentes alvos específicos dentro e fora das células (BAKER et al., 2007; MISHRA, TIWARI, 2011). Assim, as plantas representam uma fonte promissora para estudos visando a descoberta de novas arquiteturas moleculares que possam ser usadas para o desenvolvimento de novos medicamentos. Tal importância fica evidente quando se analisa os percentuais dos novos medicamentos aprovados pelo *Food and Drug Administration* (FDA) em um levantamento realizado por Newman e Cragg (2020), ao longo do período de janeiro de 1981 a setembro de 2019, onde os PNs representam 67% dos novos fármacos aprovados contendo pequenas moléculas, sendo: 5% PN na sua forma original, 26% derivados de PNs (semi-síntese), 1% PN botânico (mistura definida), 4% sintético mas com grupo farmacofórico de origem no PN e 31% obtidos por síntese total, mas considerando os PNs como fonte de inspiração (Figura 2) (NEWMAN, CRAGG, 2020).

Figura 2 – Fármacos aprovados pelo FDA de janeiro de 1981 a setembro de 2019 (total = 1881).



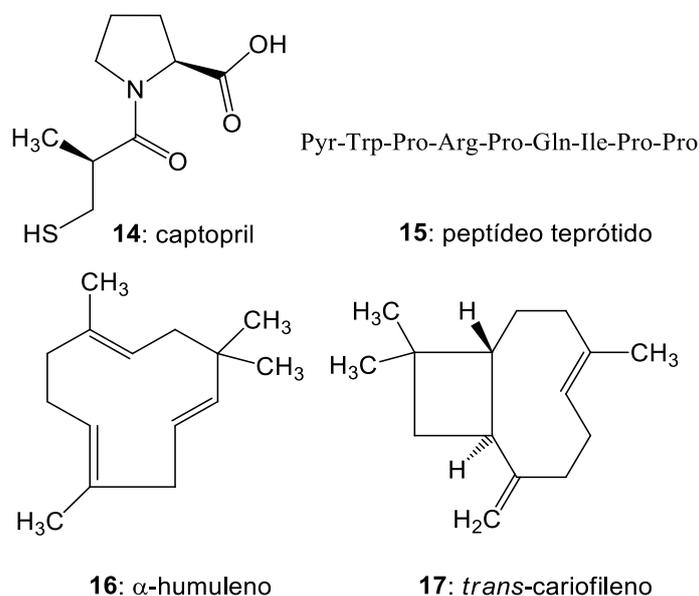
Legenda: S*/MN = Sintético com grupo farmacofórico inspirado em produto natural; S* = Sintético com grupo farmacofórico de produto natural; S/MN = Sintético inspirado em produto natural (“imitação de produto natural”); S = Totalmente sintético; DN = Derivado de produto natural (modificação semi-sintética); NB = Produto natural botânico (mistura definida); N = Produto natural inalterado.

Fonte: adaptado de Newman e Cragg (2020).

Neste contexto, o Brasil encontra-se em situação privilegiada. Considerado o país com a maior biodiversidade do mundo, com aproximadamente 25% do total das espécies vegetais do planeta, das quais muitas são endêmicas (JOLY et al., 2011), representa um vasto reservatório ainda a ser explorado.

No entanto, se considerarmos a grandeza da biodiversidade brasileira, o número de fármacos e fitoterápicos desenvolvidos ainda é pequeno. Um dos exemplos marcantes está relacionado ao desenvolvimento do captopril (**14**) (Figura 3), medicamento utilizado há mais de 20 anos para o tratamento da hipertensão, que foi desenvolvido a partir da descoberta do peptídeo teprótido (**15**), responsável pela inibição da enzima conversora de angiotensina (I em II), que foi isolado do veneno da jararaca (JOLY et al., 2011). Outro exemplo é o Acheflan[®], um anti-inflamatório de uso tópico desenvolvido a partir do óleo extraído de *Cordia verbenaceae*, cuja composição predominam os metabólitos α -humuleno (**16**) e *trans*-cariofileno (**17**) (Figura 3). Essa planta é conhecida popularmente como erva-baleeira e utilizada pelos caiçaras por suas propriedades anti-inflamatórias, analgésicas e antirreumáticas. No mercado desde 2005, o Acheflan teve todas as etapas de desenvolvimento realizadas no Brasil pelo laboratório Aché em parceria com universidades brasileiras, sendo considerado por isso um marco para a indústria farmacêutica nacional (DUTRA et al., 2016; JOLY et al., 2011; QUEIROZ et al., 2014).

Figura 3 – Produtos naturais (**15–17**) e derivados (**14**) bioativos oriundos da biodiversidade brasileira.



Fonte: autora.

O segundo exemplo de medicamento desenvolvido nacionalmente, é o Fitoscar[®] que tem propriedades cicatrizantes. Comercializado pelo laboratório Apsen na forma de extrato padronizado de *Stryphnodendron adstringens*, popularmente conhecido como barbatimão, esse fitomedicamento é rico em compostos fenólicos e taninos (QUEIROZ et al., 2014).

É inegável a importância que os PNs desempenham no processo de descoberta e desenvolvimento de fármacos. E apesar dos inúmeros trabalhos realizados, estima-se que somente 6% das cerca de 350.000 espécies vegetais conhecidas mundialmente foram estudadas do ponto de vista farmacológico, e apenas 15% do ponto de vista químico (CRAGG, NEWMAN, 2013). Desta forma, sabendo que uma planta pode conter milhares de substâncias químicas, ainda há muito a ser explorado. Neste contexto, Fabaceae apresenta grande importância, visto que é considerada a segunda maior família de plantas medicinais (GAO et al., 2010).

1.2 – A família Fabaceae

Fabaceae, é uma família grande e economicamente importante de espécies que apresentam flores. Comumente conhecida como a família das leguminosas, é um grupo com ampla distribuição que ocupa a terceira posição em número de plantas terrestres; com 730 gêneros e mais de 19.400 espécies, está atrás apenas das Orchidaceae e Asteraceae (RAHMAN, PARVIN, 2014). No Brasil, é representada por 212 gêneros e 2.717 espécies (DUTRA et al., 2014). Está presente nos seis biomas brasileiros e, por apresentar grande amplitude em termos de formas de vida, incluindo árvores, arbustos e plantas herbáceas perenes ou anuais, contribui de forma significativa com a diversidade paisagística observada nos diferentes biomas. É considerada a maior família em espécies na Floresta Amazônica e Caatinga, e ocupa a segunda posição na Mata Atlântica, Cerrado e Pantanal (BFG, 2015).

Muitas espécies de Fabaceae possuem grande importância econômica pela produção de alimentos como: *Glycine max* (soja), *Phaseolus* (feijão), *Pisum sativum* (ervilha), *Cicer arietinum* (grão de bico) e *Glycyrrhiza glabra* (alcaçuz) (SPRENT, 2009; WOJCIECHOWSKI, LAVIN, SANDERSON, 2004). Pelo fato de estabelecerem associações com bactérias dos gêneros *Rhizobium* e *Bradyrhizobium*, que são importantes fixadores de nitrogênio promovendo a fertilidade do solo (JUDD et al., 2008). Além disso, Fabaceae possui mais de 490 espécies que são utilizadas

na medicina popular para o tratamento de diversas doenças como: as folhas de *Caesalpinia ferrea* (Jucá, pau-ferro-verdadeiro) utilizadas no tratamento de feridas; as folhas e flores de *Cajanus cajan* (ervilha-de-angola), indicadas para tratar úlceras; o óleo das cascas de *Copaifera langsdorffii* (bálsamo) usado no tratamento de feridas e úlceras gástricas; as cascas de *Stryphnodendron adstringens* (barbatimão) recomendadas contra leucorréia; as raízes de *Glycyrrhiza glabra* (alcaçuz) indicada para tratar bronquite, rouquidão, como estimulante da menstruação e para aumentar a produção de leite em lactantes (FENNER et al., 2006; GAO et al., 2010). Dentre os diversos gêneros pertencentes a família Fabacea, *Cassia* e *Senna* juntos apresentam o maior número de espécies que são utilizadas na medicina tradicional.

1.3 – Os gêneros *Senna* e *Cassia*

Cassia L. e *Senna* Mill., juntamente com *Chamaecrista* Moench, são os três gêneros pertencentes a tribo Cassieae, subtribo Cassiinae, que até 1981 faziam parte do gênero *Cassia* quando, Irwin e Barneby revisaram a classificação taxonômica e o subdividiram em *Cassia* e *Senna* (VIEGAS JÚNIOR et al., 2006), com 350 e 300 espécies, respectivamente (BENTHAM, 1871; MARAZZI et al., 2006). Estão amplamente distribuídas em todo o planeta, como árvores, arbustos e ervas (BOONKERD, PECHSRI, BAUM, 2005).

O gênero *Senna* tem cerca de 80% de suas espécies ocorrendo no continente americano, e as demais na África, Madagascar, Austrália, Índia e nas ilhas do Pacífico. No Brasil estão presentes cerca de 80 espécies, distribuídas nas regiões norte, nordeste, sudeste e sul (IRWIN & BARNEBY, 1982; MARAZZI et al., 2006; RAHMAN, RAHMAN, BEGUM, 2013; SILVA et al., 2016; SOUZA, BORTOLUZZI, 2010). Já o gênero *Cassia*, possui distribuição pantropical com poucas espécies na Ásia (BOONKERD, PECHSRI, BAUM, 2005). No Brasil ocorrem cerca de 11 espécies distribuídas nas 5 regiões brasileiras (SOUZA, BORTOLUZZI, 2010).

Na medicina popular, espécies de ambos os gêneros são comumente usadas para tratar diversas enfermidades. As folhas de *S. corymbosa*, são utilizadas como laxante; as folhas *S. spectabilis* são utilizadas como laxante e as casca do caule são indicadas para tratar gripes e resfriados; as sementes de *S. obtusifolia* são usadas contra insônia, dor de cabeça, constipação intestinal, tosse, visão turva, visão dupla, congestão ocular e hipertensão (LORENZI, 2008); as folhas e raízes de *S. sophera* são usadas no tratamento

de dispepsia; folhas e sementes de *S. tora* são recomendadas como vermífugo e para tratar doenças de pele e asma (RAHMAN, PARVIN, 2014); as folhas de *S. alata* são empregadas no tratamento de eczema, infecções de pele, herpes e sarna e as inflorescências no tratamento de hemorroidas (LORENZI, 2008; MACEDO, FERREIRA, 2004; RAHMAN, PARVIN, 2014); *S. reticulata*, utilizada no tratamento do reumatismo e para obstruções do fígado (SANTOS, SILVA, BRAZ-FILHO, 2008); e as folhas, caule, raízes, flores e sementes de *S. siamea* são utilizadas para tratar a malária (KAMAGATÉ et al., 2014).

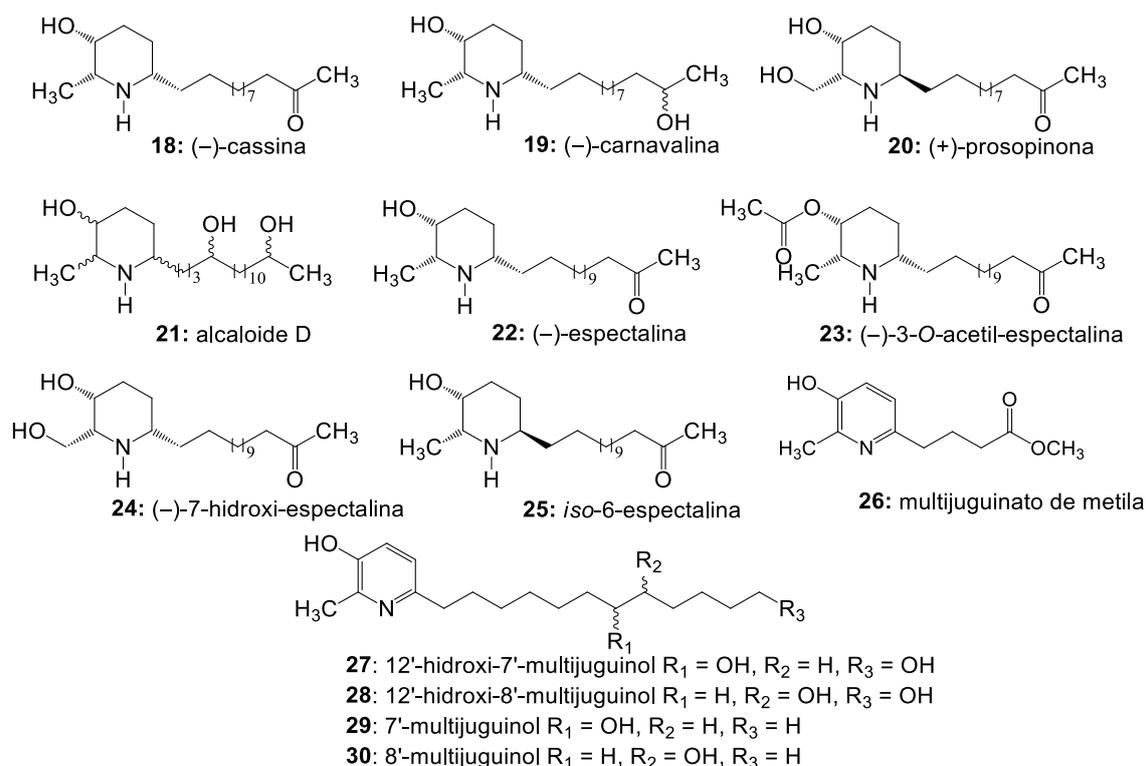
Dentre as espécies do gênero *Cassia*, merecem destaque, *C. fistula*, cujos frutos são utilizados como laxante, para o tratamento de infecções de pele, para alívio das dores do reumatismo, infecção nasal e até contra os efeitos de picada de cobras. Além disso, suas raízes são ditas purgativas, adstringentes e tônicas. Na Índia esta espécie é amplamente utilizada por apresentar ação hepatoprotetora, anti-inflamatória, antitussígeno, antifúngica e antibacteriana (DANISH et al., 2011; LORENZI, 2008; SAMY, IGNACIMUTHU, SEN, 1998). É relatado que o suco das raízes de *C. occidentalis* é usado no tratamento de micoses (DEVI, GUPTA, SINGH, 2012), e que as cascas das raízes são usadas no tratamento das afecções do fígado e da hidropsia, da anemia, dispepsia flatulenta e suspensão da menstruação. As folhas são utilizadas para facilitar ou aumentar o fluxo menstrual, como purgativas e, na forma de cataplasma são usadas para acelerar a cicatrização de feridas e combater impingens e pano-branco (nomes populares para doenças de pele causadas por fungos) (LORENZI, 2008). Na África, as raízes de *C. abbreviata* são utilizadas no tratamento da malária e como antitérmico (MAKUNDI et al., 2006; MUTHAURA et al., 2007), as folhas são utilizadas para o tratamento do diabetes (KETER, MUTISO, 2012), e as raízes, folhas e casca são utilizadas no tratamento da infertilidade, tosse, vômitos, epilepsia, sífilis, gonorreia, icterícia e hérnia (AUGUSTINO et al., 2011; MONGALO, MAFOKO, 2013).

Senna e *Cassia* apresentam uma composição química bastante diversificada, sendo conhecidos pela ocorrência dos alcaloides piperidínicos, que apresentam propriedades farmacológicas importantes (MELO et al., 2014; PIVATTO et al., 2005; VIEGAS JÚNIOR et al., 2006). Das folhas de *C. carnavalia* foram isolados os alcaloides (–)-cassina (**18**), carnavalina (**19**), (+)-prosopinona (**20**) e o alcaloide D (**21**) (Figura 4) (LYTHGOE, VERNENGE, 1967; LYTHGOE et al., 1972).

Das flores de *C. jahnii*, foram isolados os alcaloides **18** e **19** (MENDEZ, 1971). Das flores de *S. spectabilis* também foi isolado o alcaloide (–)-cassina (**18**), juntamente

com o homólogo (-)-espectralina (**22**), que apresentaram atividade antimalárica (PIVATTO et al., 2014) e leishmanicida para as formas promastigotas de *Leishmania major* (MELO et al., 2014). Os alcaloides (-)-espectralina (**22**), (-)-3-O-acetilespectralina (**23**), (-)-7-hidroxi-espectralina (**24**), *iso*-6-espectralina (**25**), isolados das flores e dos frutos verdes de *S. spectabilis*, apresentaram citotoxicidade seletiva frente linhagens mutantes de *Saccharomyces cerevisiae*, o que indica uma potencial atividade antitumoral (VIEGAS JÚNIOR et al., 2004). Atividade antinociceptiva (ALEXANDRE-MOREIRA et al., 2003) e inibidora da acetilcolinesterase (SILVA et al., 2010; VIEGAS JÚNIOR et al., 2005), também têm sido atribuídas a estes metabólitos. Alcaloides piridínicos foram relatados nas folhas de *S. multijuga*; são eles: multijuginato de metila (**26**), 12'-hidroxi-7'-multijuginol (**27**), 12'-hidroxi-8'-multijuginol (**28**), 7'-multijuginol (**29**) e 8'-multijuginol (**30**) (Figura 4). Destes, **27** e **29** apresentaram moderada inibição da acetilcolinesterase (FRANCISCO et al., 2012).

Figura 4 – Estruturas de alcaloides piperidínicos (**18–25**) e piridínicos (**26–30**) isolados de espécies dos gêneros *Senna* e *Cassia*.

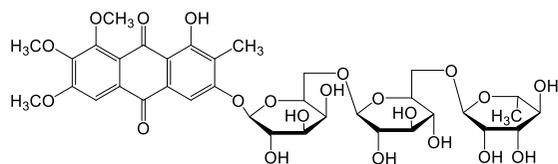


Fonte: autora.

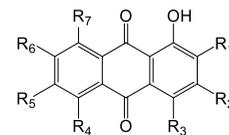
Adicionalmente, outras classes de compostos foram isoladas de ambos os gêneros, como antraquinonas (31–36) e biantraquinonas (39–41) (Figura 5) (CHAUHAN et al., 2001; FARAG, et al., 2015; KITANAKA, TAKIDO, 1995), senosídeos (37–38) (VIEGAS JÚNIOR et al., 2013), flavonoides (43 e 52) (INGKANINAN, IJZERMAN, VERPOORTE, 2000), um alcaloide indólico (44), proantocianidinas (45) (COETZEE et al., 1999), terpenoides (46–48), cromonas (49–50), xantonas (51) (SELEGATO et al., 2017), além de, lactonas (KITANAKA, TAKIDO, 1981), polissacarídeos (KAPOOR et al., 1998), esteroides e taninos (SILVA et al., 2010; SILVA et al., 2014; SOB et al., 2008; SOB et al., 2010) (Figura 5). Muitos destes com atividade biológica considerável. Como exemplos podem ser citadas as atividades analgésica e anti-inflamatória descritas para o alcaloide indólico cassiaindoline (44), isolado das folhas de *C. alata* (VILLASEÑOR, SANCHEZ, 2009); atividade anti-alérgica da antraquinona glicosilada torosídeo B (42), isolada das sementes de *C. torosa* (KANO et al., 1999); atividade citotóxica da flavona torosaflavona C (43) contra linhagens de células tumorais KB (KITANAKA, TAKIDO, 1991); e atividade inibitória de lipases da protobutinidina butiniflavan-(4 α →8)-epicatequina (45), isolada das cascas de *C. petersiana* (COETZEE et al., 1999; HATANO et al., 1997).

Os dados apresentados até aqui mostram que as espécies dos gêneros *Senna* e *Cassia*, são uma importante fonte de metabólitos secundários bioativos e promissores como modelos para o desenvolvimento de novos fármacos, agroquímicos e pesticidas. Nesse sentido, é importante o estudo das espécies ainda não avaliadas, e neste contexto *S. silvestris*, foi selecionada para o estudo químico.

Figura 5 – Metabólitos secundários isolados de espécies dos gêneros *Senna* e *Cassia*.



31: 1,3-dihidroxi-6,7,8-trimetoxi-2-metiltraquinona 3- α -raminopiranosil-(1,6)- β -glucopiranosil-(1,6)- β -galactopiranosídeo



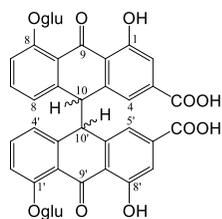
32: questiona $R_2 = \text{CH}_3$, $R_5 = \text{OH}$, $R_7 = \text{OCH}_3$, $R_1 = R_3 = R_4 = R_6 = \text{H}$

33: 8-*O*-metilcrisofanol $R_2 = \text{CH}_3$, $R_7 = \text{OCH}_3$, $R_1 = R_3 = R_4 = R_5 = R_6 = \text{H}$

34: 1,5-diidroxi-3-metoxi-7-metiltraquinona $R_2 = \text{OCH}_3$, $R_4 = \text{OH}$, $R_6 = \text{CH}_3$, $R_1 = R_3 = R_5 = R_7 = \text{H}$

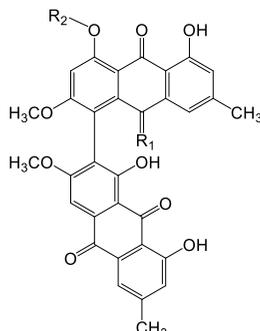
35: 1-hidroxi-7-metoxi-3-metiltraquinona $R_1 = \text{OH}$, $R_2 = \text{OCH}_3$, $R_3 = \text{CH}_3$, $R_4 = R_5 = R_6 = R_7 = \text{H}$

36: crisofaneína $R_2 = \text{CH}_3$, $R_7 = \text{Oglu}$, $R_1 = R_3 = R_4 = R_5 = R_6 = \text{H}$



37: senosídeo A: 10*S*, 10'*S* ou 10*R*, 10'*R*

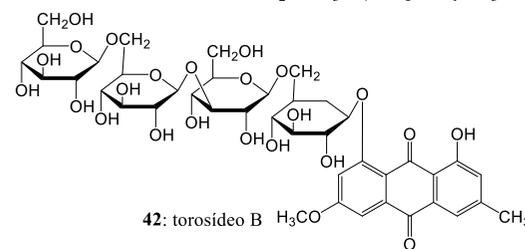
38: senosídeo B: 10*S*, 10'*R* ou 10*R*, 10'*S*



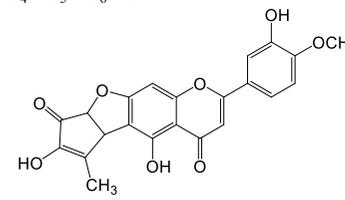
39: torosasídeo A $R_1 = \text{O}$, $R_2 = \text{glucose}$

40: (-)-floribundona-2 $R_1 = \text{H}_2$, $R_2 = \text{H}$

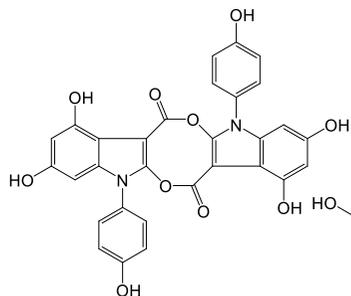
41: (-)-floribundona-1 $R_1 = \text{O}$, $R_2 = \text{H}$



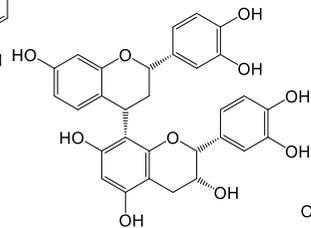
42: torosídeo B



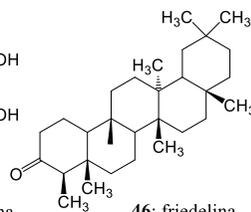
43: torosaflavona C



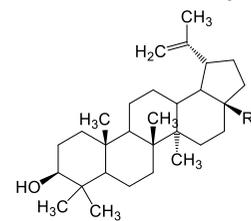
44: cassiaindoline



45: butiniflavan-(4 α , 8)-epicatequina

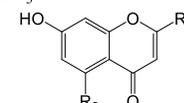


46: friedelina



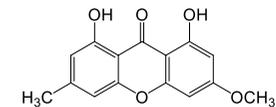
47: ácido betulínico $R = \text{CO}_2\text{H}$

48: lupeol $R = \text{CH}_3$

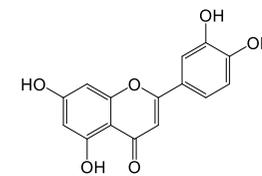


49: 5,7-diidroxicromona $R_1 = R_2 = R_3 = \text{H}$

50: cassiacromona $R_1 = \text{CH}_3$, $R_2 = \text{CH}_2\text{COCH}_3$



51: 1,8-diidroxi-3-metoxi-6-metilxantona



52: luteolina

Fonte: autora.

1.4 – Atividades biológicas

1.4.1 – Atividade antimicrobiana

Extratos e frações obtidos de diferentes espécies dos gêneros *Senna* e *Cassia* foram avaliados em experimentos *in vitro* contra diferentes cepas de bactérias e fungos, e um número significativo apresentou atividade antimicrobiana. Os extratos metanólicos das raízes de *C. occidentalis*, *C. singueana* e das folhas de *C. tora* apresentaram atividade antifúngica, quando avaliados pelo método de difusão em ágar contra os dermatófitos *Trichophyton rubrum*, *T. mentagaphytes*, *Microsporum canis* e *Aspergillus fumigatus* (ADAMU et al., 2006). Os extratos orgânicos e aquosos das folhas de *C. occidentalis* também apresentaram atividade antimicrobiana contra *Pseudomonas aeruginosa*, *P. mirabilis* e *Candida albicans*. A análise fitoquímica revelou a presença de antraquinonas, carboidratos, glicosídeos, esteroides, flavonoides, saponinas e mucilagens (ARYA et al., 2010). Daniyan e colaboradores (2011), ao investigar as flores de *C. occidentalis*, encontrou valores de CIM de 25 e 35 mg mL⁻¹ para o extrato clorofórmio e aquoso, respectivamente, frente ao microrganismo *Klebsiela pneumoniae* (DANIYAN et al., 2011). Diferentes extratos obtidos das folhas e sementes desta mesma espécie, também foram avaliados contra diferentes microrganismos, sendo os melhores resultados obtidos para o extrato em metanol (ODEJA et al., 2015; RAJNI et al., 2014).

Chanda e colaboradores (2012), ao investigar a atividade antimicrobiana das folhas e caule de quatro espécies de *Cassia* (*C. auriculata*, *C. fistula*, *C. siamea* e *C. tora*), encontrou os melhores resultados para o extrato das folhas de *C. auriculata*. Foram observados valores de CIM < 97 e 6250 µg mL⁻¹ frente a *Bacillus megaterium* e CIM de 97 e 390 µg mL⁻¹ frente a *K. pneumoniae*, para os extratos em acetona e metanol, respectivamente (CHANDA et al., 2012).

Extratos etanólicos e frações das cascas e folhas de *C. bakeriana* foram avaliados contra bactérias orais, e os melhores resultados foram observados para a fração diclorometano das cascas, com valores de CIM de 12,5 µg mL⁻¹ contra *Actinomyces naeslundii* e *Fusobacterium nucleatum* e 20 µg mL⁻¹ contra *Bacteroides fragilis*. O estudo químico desta fração levou ao isolamento da antraquinona reina que exibiu elevada atividade contra *Prevotella nigrescens*, *A. naeslundii* e

Porphyromonas gingivalis com valores de CIM de 3,12, 20,0 e 25,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente (CUNHA et al., 2017).

Entre as diversas espécies de *Cassia* avaliadas, *C. fistula* também foi amplamente investigada. Os extratos obtidos das folhas e vagens apresentaram atividade boa ou moderada contra as bactérias *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* e *Pseudomonas aeruginosa* (MANE et al., 2012). O extrato hidroalcoólico das folhas de *C. fistula* também apresentou bons resultados, quando avaliados frente as bactérias *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *P. aeruginosa* e frente aos fungos *Aspergillus niger*, *A. clavatus* e *C. albicans* (BHALODIA, SHUKLA, 2011). No estudo realizado por Duraipandiyan e Ignacimuthu (2007), os extratos em hexano, clorofórmio, acetato de etila, metanol e água, obtidos das flores de *C. fistula* foram avaliados frente a bactérias e fungos e os melhores resultados foram observados para a fração acetato de etila. Seu fracionamento levou ao isolamento do ácido 4-hidroxibenzoico que apresentou atividade antifúngica contra *Trichophyton mentagrophytes* e *Epidermophyton floccosum* (CIM 0,5 mg mL^{-1}) (DURAIPANDIYAN, IGNACIMUTHU, 2007).

Dentre os microrganismos infecciosos, aqueles que levam a doenças bucais, como a cárie e a periodontite, merecem destaque. A boca abriga a segunda comunidade microbiana mais diversificada do corpo, com mais de 700 espécies de bactérias que colonizam as superfícies dos dentes, língua, gengiva, bochechas internas, palato e amígdalas (KILIAN et al., 2016). As bactérias do gênero *Streptococcus* representam cerca de 20% destas bactérias e o acúmulo de espécies como *S. mutans* na cavidade oral, pode provocar a cárie dentária, que se não for controlada pode evoluir para uma inflamação e causar a morte do tecido (HUANG et al., 2011; MAHASNEH, MAHASNEH, 2017). As bactérias *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* são consideradas os principais agentes patógenos responsáveis pelo avanço da periodontite (ALLAKER, DOUGLAS, 2009). Além disso, estudos indicam que as bactérias orais podem desencadear outras doenças, como pneumonia, doenças cardiovasculares, infecções de garganta, endocardite e até câncer (AAS et al., 2005; WHITMORE, LAMONT, 2014).

No que diz respeito as infecções fúngicas, tem se observado o aumento significativo, o que contribui para as elevadas taxas de mortalidade, principalmente em populações de baixa renda e entre pacientes imunocomprometidos (BASSETTI et al., 2013; NG et al., 2015; SARDI et al., 2013). As principais formas de

manifestações são dermatites, como pé de atleta, micose do couro cabeludo, infecção nas unhas, na mucosa oral e em órgãos genitais, como a candidíase vulvovaginal. Estas infecções superficiais são causadas por fungos do gênero *Candida*, que constituem a segunda causa mais frequente de infecções por fungos em todo o mundo (BROWN et al., 2012; WHIBLEY, GAFFEN, 2015). Apesar das infecções mucocutâneas por *Candida* serem geralmente leves ou autolimitadas, como candidíase oral e vaginal, as espécies de *Candida* podem causar infecção sistêmica potencialmente fatal, com taxas de mortalidade relatadas em até 80%. Além de estarem associadas à doença inflamatória intestinal e à asma (WHIBLEY, GAFFEN, 2015).

Dentre as espécies de *Candida* que fazem parte da flora microbiana do organismo humano, as espécies *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* e *C. dubliniensis* são as mais frequentemente encontradas e quando em desequilíbrio estão associadas ao aparecimento de doenças (WHIBLEY, GAFFEN, 2015). Destas, *C. albicans* e *C. glabrata* são consideradas as leveduras patogênicas mais importantes e juntas são responsáveis por aproximadamente 65 a 75% de toda a candidíase sistêmica, seguidas por *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* (BRUNKE, HUBE, 2013). Neste trabalho foram avaliadas as espécies *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. tropicalis*. Devido a sua capacidade de formar biofilmes, as espécies de *Candida* estão associadas ao aumento da resistência a agentes antimicrobianos e têm sido amplamente estudadas, principalmente no que diz respeito ao mecanismo de ação dos antifúngicos (BACHMANN et al., 2002). Um problema específico ocorre com *C. glabrata*, que é resistente às classes mais comuns de medicamentos, azóis e equinocandinas (PFALLER, 2012). Assim, a busca de novos agentes antimicrobianos de fontes naturais como alternativa terapêutica se torna importante.

1.4.2 – Atividade inibidora da lipase pancreática

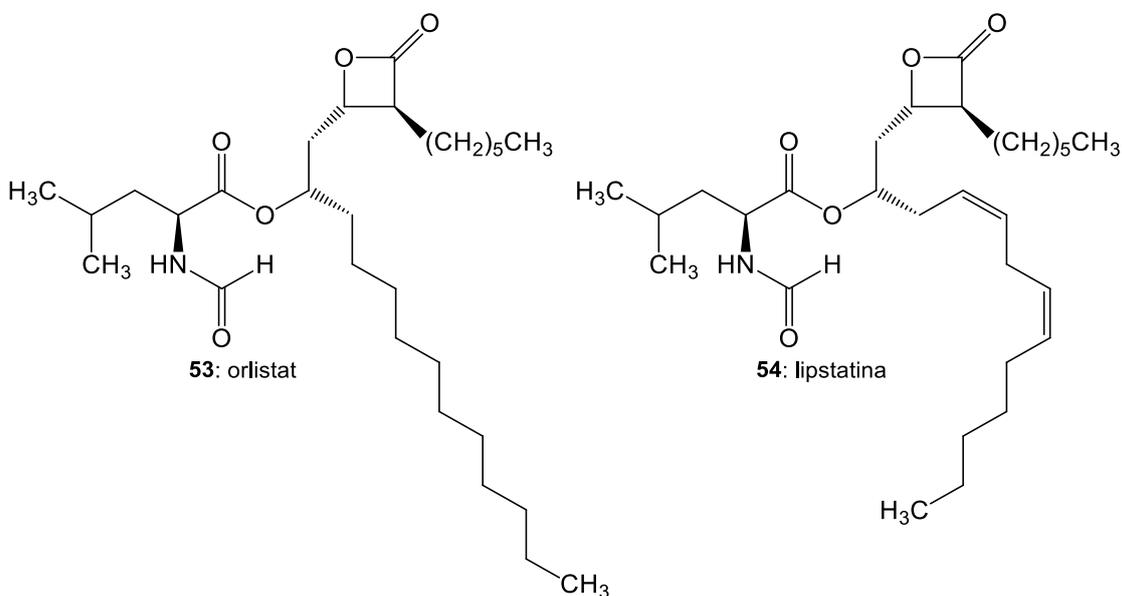
A obesidade resulta de um aumento descontrolado no acúmulo de lipídios no tecido adiposo, devido à ingestão excessiva de calorias (JAWED et al., 2019). Sua prevalência está aumentando em um ritmo alarmante em diversos países, entre todas as faixas etárias e está se tornando um grande problema de saúde pública, com custos sociais elevados (MOHAMED et al., 2014). Diversos estudos mostram que a obesidade está diretamente relacionada a inúmeras complicações, causando ou intensificando distúrbios como diabetes, hipertensão, doenças cardiovasculares, além de doenças crônicas, como acidente

vascular cerebral, osteoartrite, apneia do sono, patologias baseadas em inflamação e até câncer (MOHAMED et al., 2014).

Os lipídios da dieta, compostos principalmente por triglicerídios, são considerados a principal fonte de calorias indesejadas. No intestino, estes compostos são hidrolisados pela lipase pancreática em monoglicerídios e ácidos graxos, para posterior absorção. Assim, uma das estratégias mais usadas na busca de novos compostos com ação antiobesidade, consiste em inibir a digestão de triglicerídeos, através da inibição da lipase pancreática (JAWED et al., 2019).

Entre os fármacos clinicamente aprovados para o tratamento da obesidade, o orlistat (**53**), é um inibidor da lipase pancreática, derivado semissintético da lipstatina (**54**), inibidor de lipase de ocorrência natural produzido pela bactéria *Streptomyces toxytricini* (Figura 6). Após se ligar covalentemente ao sítio ativo da lipase pancreática, o orlistat forma um complexo estável, que induz uma alteração conformacional na enzima expondo o sítio catalítico ativo. Isto leva à acilação do grupo hidroxila presente no resíduo de serina, inativando-a. Assim, a lipase é incapaz de hidrolisar as gorduras que são então excretadas pelas fezes (AL-SUWAILEM et al., 2006). Apesar de ser um dos medicamentos mais vendidos no mundo, efeitos colaterais desagradáveis, como diarreia, flatulências, inchaço, dor abdominal e dispepsia têm sido associados ao seu uso (MOHAMED et al., 2014).

Figura 6 – Lipstatina (**54**): inibidor da lipase pancreática isolado de *Streptomyces toxytricini*, e seu derivado orlistat (**53**).

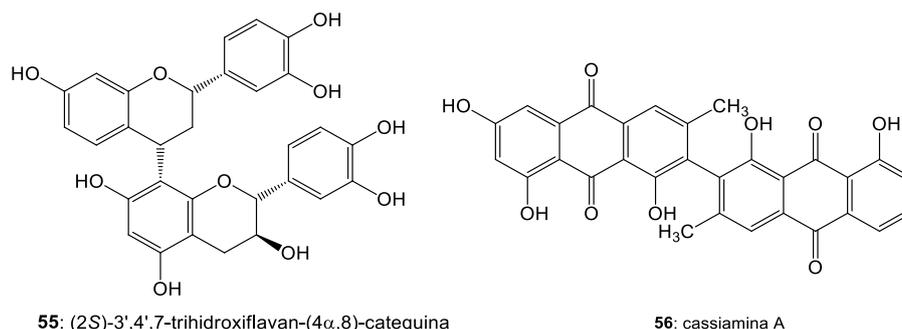


Fonte: autora.

Na busca por potenciais agentes antiobesidade, que sejam eficazes e que não apresentem efeitos colaterais, os PNs, podem ser uma alternativa segura e eficaz. Várias plantas, incluindo extratos e compostos purificados têm sido amplamente estudados e, diversas classes de metabólitos secundários, como alcaloides, carotenoides, saponinas, terpenos, flavonoides e polifenóis foram relatados como inibidores da lipase pancreática (LUNAGARIYA et al., 2014; MOHAMED et al., 2014). Dentre estes, um papel significativo no controle da obesidade, tem sido atribuído principalmente aos flavonoides, seguido pelos compostos polifenólicos (KARRI et al., 2019).

Algumas espécies de *Senna* e *Cassia* demonstraram em estudos químicos e biológicos serem fontes de compostos com atividade inibidora da lipase pancreática. O extrato padronizado dos frutos de *C. nomame*, comercializado com nome de Cassiolamina, é um fitoterápico utilizado como auxiliar nas dietas de perda de peso, com ação inibidora da lipase pancreática (BOORHEM, LAGE, 2009). Hatano e colaboradores (1997), ao investigar a composição química dos frutos de *C. nomame*, isolaram e identificaram vários compostos fenólicos, dentre eles a (2*S*)-3',4',7-trihidroxiflavan-(4 β →8)-catequina (**55**) (Figura 7). Que apresentou o efeito inibitório mais potente com IC₅₀ = 5,5 μ M. A fração acetato de etila obtida das raízes de *C. siamea* apresentou porcentagem de inibição de 74,3 \pm 1,4%. Seu fracionamento levou ao isolamento da biantraquinona cassiamina A (**56**) (Figura 7) que apresentou inibição moderada (IC₅₀ = 41,8 \pm 1,2 μ g mL⁻¹) quando comparada com o padrão positivo orlistat (IC₅₀ = 0,012 \pm 0,002 μ g mL⁻¹) (KUMAR et al., 2013). As partes aéreas de *C. auriculata* e *C. mimosoides* também apresentaram efeito inibitório da lipase pancreática, com valores de IC₅₀ de 6,0 \pm 1,0 e 100,0 μ g mL⁻¹, respectivamente (HABTEMARIAM, 2012; YAMAMOTO et al., 2000). Estes dados mostram que espécies de *Senna* e *Cassia* são promissoras na busca por novos agentes antiobesidade, o que nos motivou avaliar os extratos etanólicos como inibidores da lipase pancreática.

Figura 7 – Compostos isolados de espécies de *Cassia* com atividade inibidora da lipase pancreática.



Fonte: autora.

1.5 - *Senna silvestris*

Senna silvestris (Vell.) H. S. Irwin & Barneby (Fabaceae) é um arbusto que atinge até 3 m de altura (Figura 8), podendo ser encontrada como árvore de até 20 m. Está presente em países como Brasil, Bolívia, Colômbia, Paraguai, Peru e Venezuela (IRWIN, BARNEBY, 1982). No Brasil, é relatada nos estados da Bahia, Espírito Santo, Goiás, Maranhão, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Pará, Tocantins, Rio de Janeiro, Roraima e Santa Catarina, ocorrendo em regiões de Mata Atlântica, Caatinga e Cerrado (IRWIN & BARNEBY, 1982).

Figura 8 – Foto de *Senna silvestris*, detalhes da planta: flor (A) e fruto (B).



Fonte: autora.

Conhecida popularmente como fedegoso do mato, apresenta floração exuberante, com potencial ornamental para uso em paisagismo (LORENZI, 2009). Por produzir grande quantidade de sementes e apresentar elevada resistência ao manejo em plantações e pastagens, é considerada, juntamente com as espécies *S. alata*, *S. hirsuta*, *S. obtusifolia* e *S. occidentalis*, uma das principais espécies daninhas no Brasil (LORENZI, 2000).

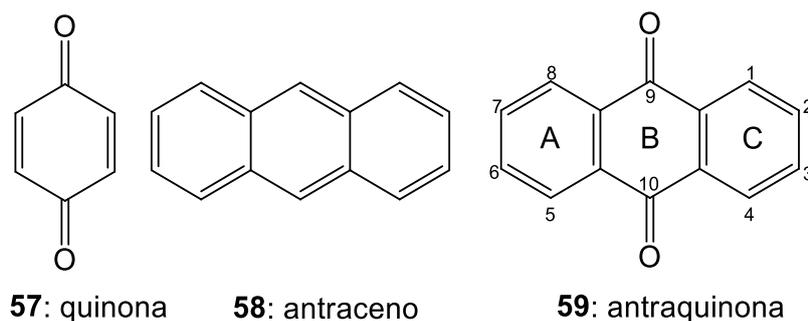
No que diz respeito à atividade biológica, o extrato diclorometano das cascas de *S. silvestris* apresentou atividade antibacteriana frente à *Mycobacterium tuberculosis* (GRAHAM et al., 2003), e os extratos hidroalcoólicos das flores, cascas, frutos e folhas apresentaram atividade antiviral contra o vírus da hepatite B (QUINTERO et al., 2011), sendo os únicos relatos na literatura até o momento, o que nos motivou para a seleção desta espécie para o estudo químico.

1.6 - Classes de compostos isolados de *S. silvestris*

1.6.1 – Antraquinonas

Reconhecida como a maior classe de quinonas (57) naturais, as antraquinonas fazem parte do grupo de metabólitos secundários que possuem um esqueleto semelhante ao antraceno (58) com um núcleo 9,10-antracenodiona (59) também conhecido como 9,10- dioxoantraceno (Figura 9). São abundantes na natureza, sendo que setenta e nove compostos já foram isolados de fungos, líquens ou plantas. Nas Angiospermas ocorrem principalmente nas famílias Polygonaceae, Rhamnaceae, Rubiaceae, Xanthorrhoeaceae e Fabaceae (CHIEN et al., 2015; DEWICK, 2002). Diversas antraquinonas foram isoladas de espécies de *Cassia* e *Senna* (31–36) (Figura 5) e são consideradas os componentes ativos de *Cassia angustifolia* (sinonímia *C. acutifolia*) que é utilizada como laxante (MALIK, MÜLLER, 2016).

Figura 9 – Estrutura da quinona (**57**), antraceno (**58**) e núcleo fundamental das antraquinonas (**59**).



Fonte: autora.

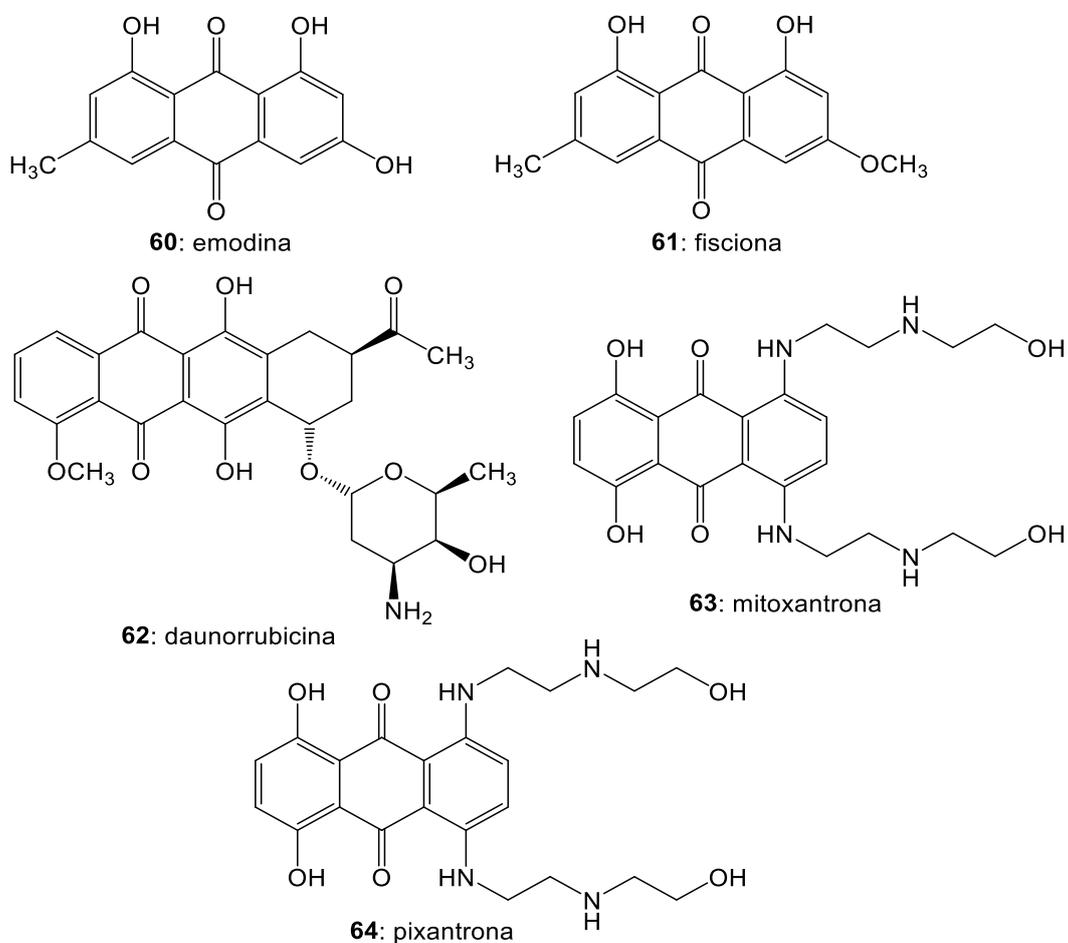
As antraquinonas podem ocorrer livres ou na forma de glicosídeos, com uma ou mais moléculas de açúcar ligada nas formas de *O*- e/ou *C*-glicosídeo. São responsáveis por conferir cor às plantas e por isso são amplamente utilizadas como corantes naturais (SIMPSON, AMOS, 2017). Adicionalmente, apresentam importantes propriedades terapêuticas e farmacológicas, conhecidas há mais de 4000 anos na medicina popular (ex.: ruibarbo e babosa), sendo cada vez mais utilizadas nas áreas cosmética, alimentícia e farmacêutica (ALVES et al., 2004).

Merecem destaque pelas atividades laxativa, já mencionada anteriormente (VAN GORKOM et al., 1999), anti-inflamatória (KHAN et al., 2012), anticâncer (CHA et al, 2005; LIN et al., 2009), antiviral (BARNARD et al., 1995), antifúngica (WUTHI-UDOMLERT, KUPITTAYANANT, GRITSANAPAN, 2010), antiagregante plaquetário (GAN et al., 2008), diurética, vasorelaxante (CHIEN et al., 2015) e efeitos neuroprotetores (JACKSON, VARRIER, KOCHANNEK, 2013), além de apresentarem potencial para o tratamento da malária, como relatado por Winter e colaboradores (1995). Antraquinonas como a emodina (**60**) e a fisciona (**61**) (Figura 10) foram relatadas como inibidores de quinase e tirosinase (JAYASURIYA et al., 1992) e também apresentaram citotoxicidade contra células cancerígenas (LIN et al., 2009).

A importância desses compostos também pode ser evidenciada pelo uso de derivados na prática clínica. A daunorrubicina (**62**), isolada de cepas de *Streptomyces* sp., é uma antraciclina contendo o núcleo antraquinônico, utilizada como antineoplásico no tratamento de leucemias. Os análogos sintéticos, mitoxantrona (**63**) e pixantrona (**64**), são aminoalquilaminoantraquinonas *bis*-substituídas também utilizadas como antineoplásicos. O composto **63** é usado principalmente no tratamento de leucemia, linfoma, câncer de mama e próstata; e devido aos seus efeitos imunossupressores, foi aprovado pelo FDA no

ano de 2000, para o tratamento de esclerose múltipla. O composto **64** é um medicamento anticâncer licenciado na Europa para casos agressivos e refratários de linfomas não Hodgkin (Figura 10) (MALIK, MÜLLER, 2016).

Figura 10 – Antraquinonas presentes em fármacos comerciais.



Fonte: autora.

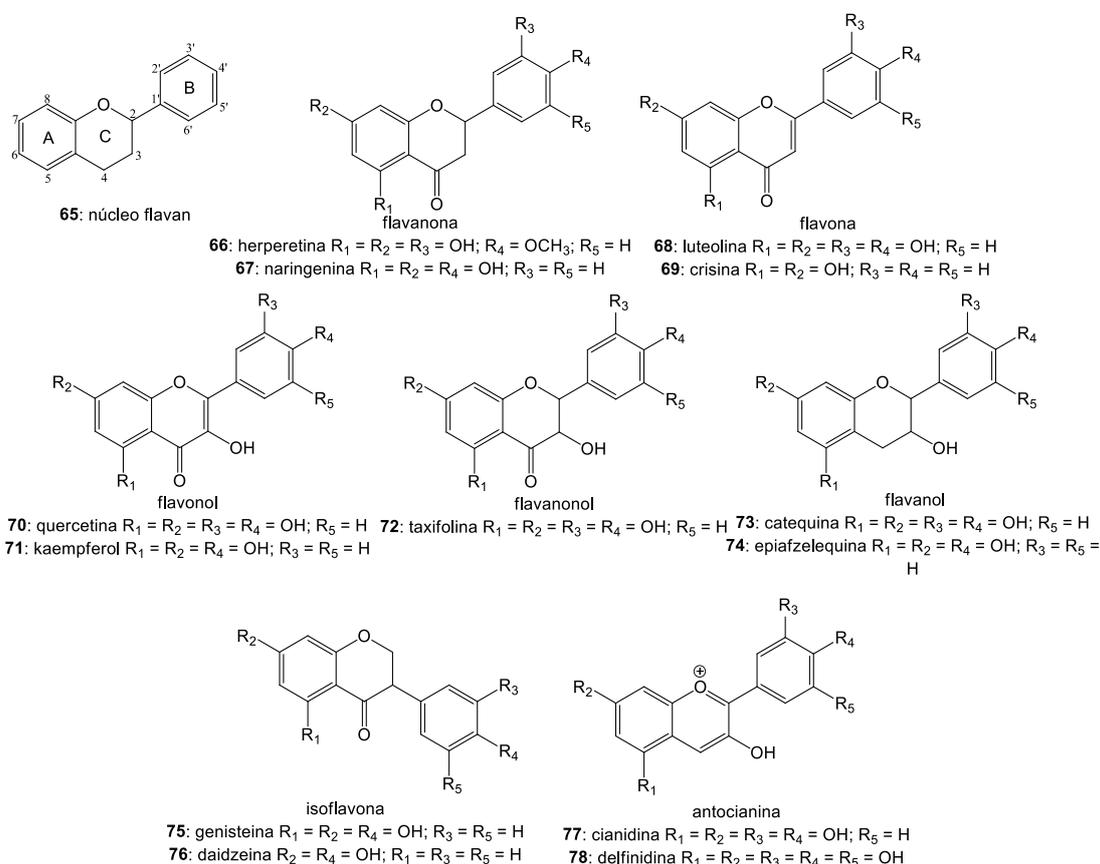
1.6.2 – Flavonoides

Os flavonoides são uma classe de PN's amplamente distribuídos no reino vegetal que apresentam funções fundamentais no crescimento e desenvolvimento das plantas, como proteção contra a incidência de raios ultravioleta, proteção contra herbívoros e microrganismos patogênicos, atração de polinizadores e ação alelopática (GOULD, LISTER, 2006; HARBORNE, WILLIAMS, 2000).

Os flavonoides são compostos polifenólicos com um núcleo central formado por 15 átomos de carbonos, distribuídos em dois anéis aromáticos (anel A e B), interligados a

um anel heterocíclico central (benzopirano, anel C) (65). De acordo com o padrão de substituição existente no heterocíclico, os flavonoides são subdivididos em diferentes subclasses: flavanona (66 e 67), flavona (68 e 69), flavonol (70 e 71), flavanonol (72), flavanol (73 e 74), isoflavona (75 e 76) e antocianinas (77 e 78) (Figura 11). Vale ressaltar que nas antocianinas, flavanois, flavonois e flavanonis, há uma hidroxila no C-3, que está ausente nas flavonas e flavanonas. Nas flavanonas, flavonas, flavonois, flavanonis e isoflavonas, há uma carbonila no C-4, que não aparece nas antocianinas e flavanois. As isoflavonas apresentam o anel B ligado ao C-3, enquanto que nos demais compostos este grupo está ligado no C-2, (Figura 11) (SIMPSON, AMOS, 2017).

Figura 11 – Estrutura do núcleo fundamental (65) e principais classes de flavonoides (66–78).



Fonte: autora.

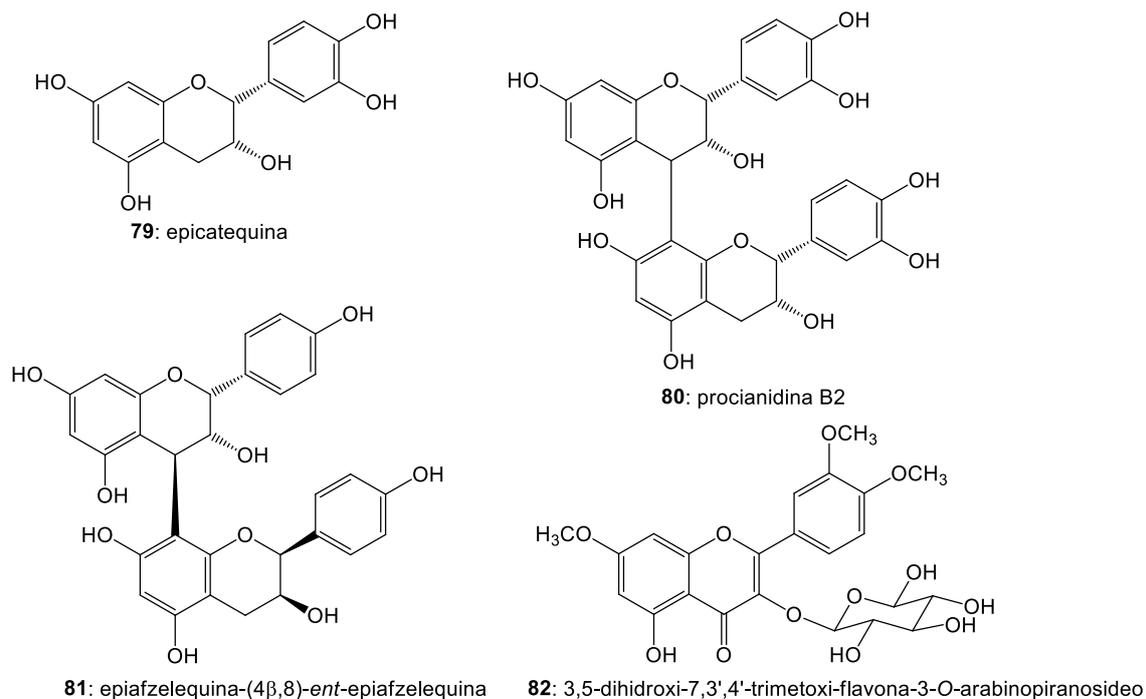
Os flavonoides são constituintes importantes da dieta humana, apesar de não serem considerados nutrientes. Ocorrem naturalmente em frutas, legumes e em bebidas, como nos chás e no vinho (COOK, SAMMAN, 1996), de forma livre ou glicosilada. A maioria é encontrada na forma monomérica, no entanto um número crescente de estruturas

diméricas e oligoméricas vem sendo relatadas na literatura (ANDERSEN, MARKHAM 2006).

Diversos flavonoides já foram identificados em diferentes espécies de *Senna* e *Cassia* (Figura 12). Nas vagens de *C. fistula* e cascas de *C. javanica* foram identificados quatorze compostos desta classe, entre eles a catequina (**73**), a epiafzelequina (**74**) (Figura 11), a epicatequina (**79**), a procianidina B-2 (**80**) e a epiafzelequina-(4 β →8)-ent-epiafzelequina (**81**) (Figura 12) (KASHIWADA, et al., 1990). Flavonoides glicosilados como a flavona 3,5-dihidroxi-7,3',4'-trimetoxi-flavona-3-O-arabinopiranosideo (**82**) (Figura 12), foram isolados das sementes de *S. spectabilis* (SINGH, SINGH, 1985).

Dentre as diversas propriedades farmacológicas atribuídas aos flavonoides, merecem destaque as atividades antioxidante, cardioprotetora, vasoprotetora (COOK, SAMMAN, 1996), hipoglicemiante (YEON et al., 2015; ZHANG et al., 2015), antitrombótica (NAVARRO-NÚÑES et al., 2010), anticancerígena, quimiopreventiva (CAI, RAHN, ZHANG, 1997), e antiviral (SAVI et al., 2010). Adicionalmente, extratos ricos em flavonoides têm sido utilizados para prevenção neurodegenerativa (GOPINATH, SUDHANDIRAN, 2012; WANG, LI, BI, 2018). Devido a natureza fenólica das hidroxilas, estes grupos podem atuar como agentes protetores contra radicais livres, uma vez que podem dispersar o elétron desemparelhado ao longo das duplas ligações conjugadas dos anéis aromáticos (MUSCHIETTI, MARTINO, 2012).

Figura 12 – Flavonoides isolados de espécies dos gêneros *Senna* e *Cassia*.



Fonte: autora.

1.6.3 – Isocumarinas

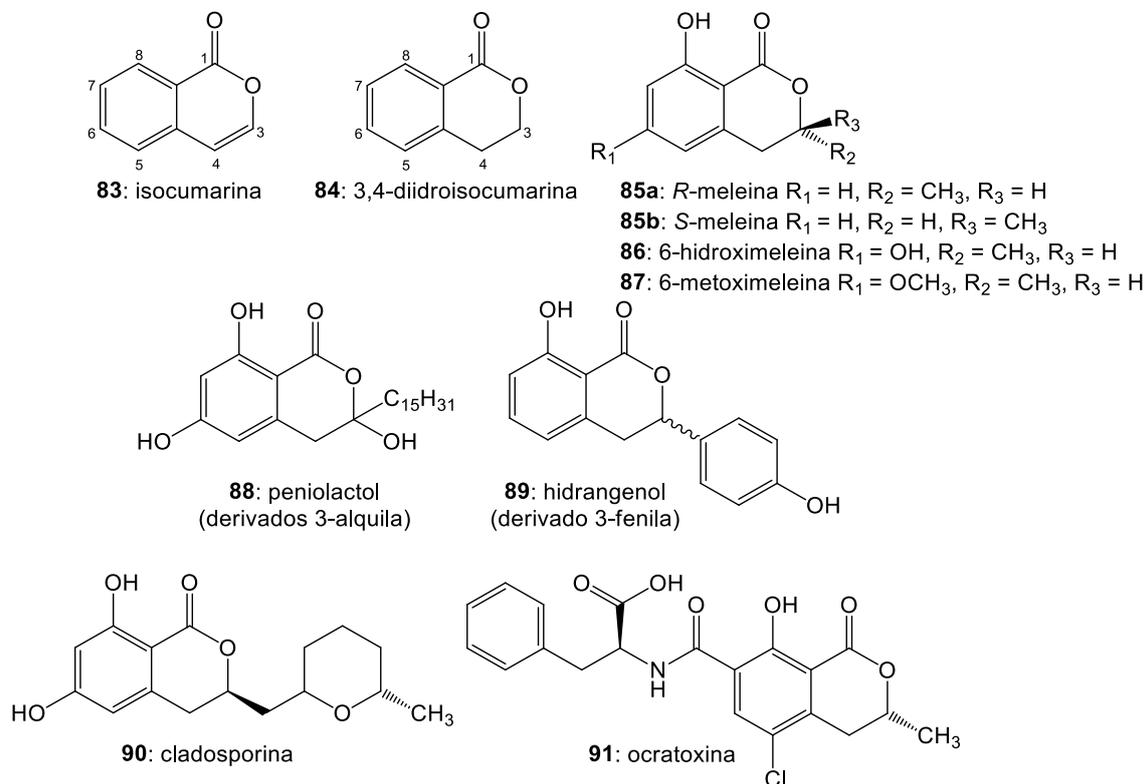
As isocumarinas são a maior classe de derivados 2-benzopirano e apresentam um núcleo central constituído por um anel lactônico α -piranona ligado ao anel benzênico nas posições 5 e 6 (**83**) (Figura 13) (SAEED, 2016). Fazem parte desta classe as 3,4- diidroisocumarinas (**84**), isoladas de plantas, fungos, insetos e organismos marinhos e descritas como micotoxinas, antimicrobianas, fitoalexinas, promotores de crescimento e até como feromônios (BRACA, BADER, TOMMASI, 2012; INERNEY, TAYLOR, 1995).

De acordo com o padrão de substituição apresentado, as 3,4-diidroisocumarinas podem ser representadas pela meleina (**85a–87**) e seus análogos, derivados substituídos no C-3 por alquila (**88**) ou fenila (**89**), cladosporinas (asperentinas) (**90**) e ocratoxinas (**91**) (Figura 13). O composto 6-hidroximeleina (**86**) foi isolado pela primeira vez de uma linhagem de *Aspergillus terreus* e em 1986 foi isolado pela primeira vez de *C. siamea* (BISWAS, MALLIK, 1986). Juntamente com 6-metoximeleina (**87**), também tem sido encontrado em raízes de cenouras submetidas ao estresse (INERNEY, TAYLOR, 1995).

A meleina e seus derivados são consideradas as isocumarinas mais amplamente conhecidas e apresentam atividades biológicas, tais como, antibacteriana, antifúngica,

antimalárica, antialérgica, antitumoral, anti-inflamatória, anti-ulcerogênica, antileucêmica, larvicida e inibidoras da síntese de prostaglandinas (MDACHI, 2016; INERNEY, TAYLOR, 1995; SAEED, 2016).

Figura 13 – Isocumarinas, 3,4-diidroisocumarinas, e análogos.



Fonte: autora.

Já é conhecido que os PN apresentam enorme diversidade química e são fonte promissora de novas moléculas bioativas, e inseridas nesse cenário estão as espécies pertencentes aos gêneros *Cassia* e *Senna*, que por produzirem substâncias estruturalmente diversificadas, muitas com atividades biológicas comprovadas, são interessantes para o desenvolvimento de novos cadidátos à fármacos. Neste contexto, a metabolômica tem demonstrado ser uma ferramenta importante, capaz de auxiliar na identificação dos diferentes compostos presentes nas plantas.

1.7 – Metabolômica, desreplicação e análise quimiométrica em produtos naturais

Metabolômica é definida como a medida de todos os metabólitos em um determinado sistema (ROCHFORD, 2005), e pode ser dividida em duas abordagens principais a metabolômica alvo, definida como a análise quantitativa de um grupo específico de metabólitos pré-selecionados, e a metabolômica global, que tem como objetivo realizar uma análise qualitativa do maior número possível de metabólitos, de diferentes classes químicas, presentes em uma matriz (BELINATO et al., 2019).

Em estudos metabolômicos aplicados a PNs, o uso de técnicas de desreplicação tem sido uma abordagem bastante racional, promovendo economia de tempo e insumos químicos. Desreplicação (do inglês, *dereplication*, significa “não replicar”), trata-se da análise qualitativa de misturas complexas, fundamental no processo de triagem de extratos, permitindo a identificação de compostos em matrizes complexas, sem a necessidade do isolamento (FUNARI et al., 2013).

As técnicas hífenadas modernas de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) acoplada a um detector com capacidade de varredura espectroscópica e/ou espectrométrica são fundamentais para o sucesso dessa abordagem (FUNARI et al., 2013; VALLI et al., 2012). Dentre os diversos tipos de acoplamentos possíveis, a CLAE acoplada a detectores DAD-UV/Vis, são os mais comumente utilizados, pois apresenta menor custo de equipamento e de análises, além de alta sensibilidade e boa linearidade. No entanto, apesar dos espectros de UV servirem como uma “impressão digital” que é característica de determinadas classes estruturais, o uso desta técnica é limitado a compostos que apresentam grupos cromóforos. Assim, a CLAE acoplada a espectrometria de massas sequencial (CLAE-EMⁿ), utilizando a ionização por eletrospray (IES) juntamente com analisadores do tipo tempo de voo (*time of flight* - ToF), têm sido a técnica de desreplicação de matrizes naturais complexas, mais versátil, rápida e sensível, que utiliza as menores quantidades de amostra. A partir da análise dos dados é possível realizar a determinação estrutural dos compostos presentes na amostra através da confrontação dos resultados com àqueles das bases de dados de PNs, como padrões de fragmentação de uma série de compostos análogos, que já foram publicados na literatura (KONISHI et al., 2007).

No entanto, quando se trabalha com misturas complexas, como extratos vegetais, os resultados não são fáceis de serem analisados. Assim, para extrair informações relevantes a partir da grande quantidade de dados, é necessário o uso de técnicas e de abordagens estatísticas (HENDRIKS et al., 2005). Neste contexto, a quimiometria de

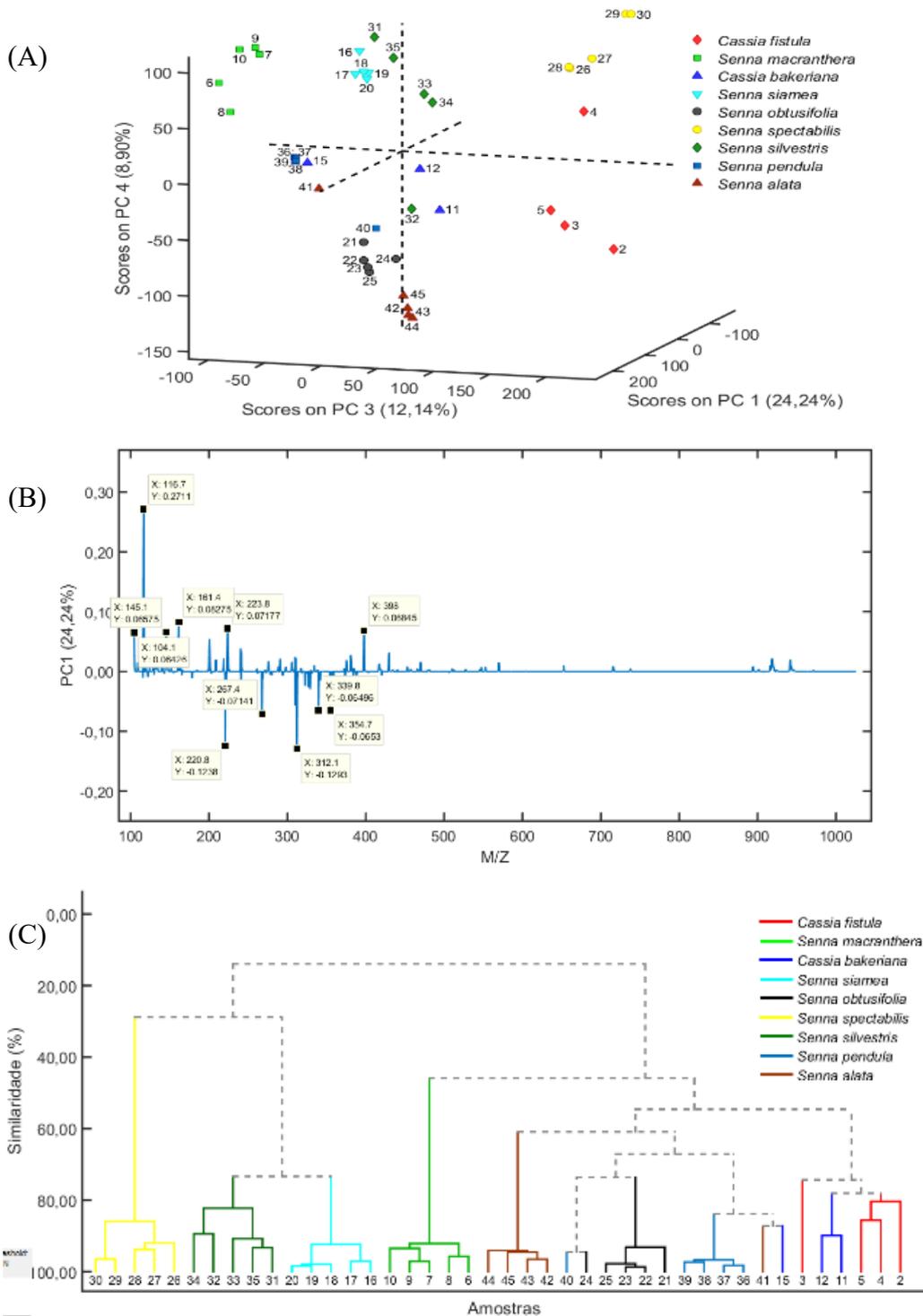
análise exploratória é uma ferramenta de análise importante para reduzir os extensos conjuntos de dados e identificar semelhanças entre amostras complexas (PRATA, EMÍDIO, DÓREA, 2011). Dentre as principais técnicas de análise multivariada, merece destaque a análise por componentes principais (PCA, do inglês: *principal component analysis*) e a análise de agrupamentos hierárquicos (HCA, do inglês *hierarchical component analysis*).

A PCA é considerada uma das técnicas mais importantes na análise de dados multivariados, e tem como objetivo, reduzir a dimensionalidade de um conjunto de resultados, preservando a maior quantidade possível de informação (variância). Essa redução é feita através da representação dos dados em um novo sistema de eixos, ortogonais entre si, denominados componentes principais, ou PCs. Com a redução da dimensionalidade, os resultados (amostras) passam a ser pontos localizados em espaços de dimensões reduzidas definidos pelas PCs. Assim, uma matriz de dados X é decomposta em duas matrizes menores: a de valores T, e a de pesos P, mais uma matriz residual E, que se refere à parte não modelada dos dados originais. As PCs são embasadas no critério de variância máxima, assim, a primeira PC determina a maior variância dos dados originais possíveis e, as PCs subsequentes, a maior variância não capturada pela PC anterior (SOUZA, POPPI, 2012; WU, MASSART, JONG, 1997).

Nestes tipos de análises, os resultados fornecidos são visualizados em gráficos que permitem avaliar quais amostras são semelhantes entre si, de um modo mais simples e rápido. Na análise de PCA são gerados dois tipos de gráficos, os *scores* e os *loadings*, que quando analisados em conjunto, permitem visualizar as amostras no novo sistema de eixos/variáveis formado pelas componentes principais (*score plot*) (Figura 14 A) e verificar quais são as principais variáveis responsáveis pela formação dos grupos em cada componente principal (*loading plot*) (Figura 14 B).

A HCA por sua vez, consiste em um processo de diminuição da matriz original de dados em uma dimensão, pela reunião de pares semelhantes, até a reunião de todos os pontos em um único grupo. O método calcula a distância entre todas as amostras, mantendo aquelas de maior similaridade mais próximas. Os resultados são apresentados na forma de um dendograma (Figura 14 C) (CORREIA, FERREIRA, 2007).

Figura 14 – Gráficos de *score plot* (A) e *loading plot* (B), obtidos na análise de PCA, e dendograma (C) obtido na HCA.



Fonte: autora.

Dentro deste contexto, esse trabalho propõe a seleção de 10 espécies de *Cassia* e *Senna*, cujas flores e folhas foram coletadas, secas e submetidas a extração com etanol para preparação dos respectivos extratos etanólicos. Estes extratos foram analisados por

CCD, utilizando reveladores específicos e análises por CLAE-EM cujos resultados, foram submetidos as metodologias de desreplicação, para identificar os compostos já conhecidos presentes nos diferentes extratos. As técnicas quimiométricas foram utilizadas para observar as semelhanças ou diferenças entre as espécies. A partir deste estudo inicial, e por ser a única espécie que ainda não foi estudada, *S. silvestris* foi selecionada para estudo químico.

2 – OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivo obter os perfis químicos dos extratos etanólicos obtidos das folhas e flores de dez espécies de *Senna* e *Cassia* através de análises por CCD, utilizando reveladores específicos e CLAE-IES-EM/EM. Avaliar através de técnicas quimiométricas de análises multivariadas (PCA e HCA), a semelhança ou diferença entre as espécies. Aplicar a técnica de desreplicação para realizar a identificação estrutural dos compostos já conhecidos, presentes nos extratos das diferentes espécies, e realizar a triagem de novos compostos. Avaliar as atividades antibacteriana, antifúngica, inibidora da lipase pancreática e citotóxica dos extratos etanólicos. Além de investigar a(s) espécie(s) que não apresentava(m) estudo químico (*S. silvestris*), visando o isolamento de metabólitos secundários inéditos.

3 – PARTE EXPERIMENTAL

3.1 – Materiais

3.1.1 – Solventes e reagentes

Foram utilizados solventes grau P.A. (hexano, diclorometano, acetato de etila, metanol, etanol e *n*-butanol) de diversas marcas; solventes grau CLAE (metanol, diclorometano e acetonitrila), marcas Tedia, J. T. Baker e Sigma-Aldrich. Para a obtenção dos espectros de RMN, foram utilizados solventes deuterados (clorofórmio e dimetilsulfóxido), das marcas CIL e Deutero. Para preparo dos reveladores, foram utilizados os seguintes reagentes: vanilina, hidróxido de potássio (Synth), nitrato de bismuto (Isofar), iodeto de potássio (Chemicals), difenilboriloxietilamina NP (Sigma-Aldrich), polietilenoglicol 400 (Vetec).

3.1.2 – Reveladores

- Solução ácida de vanilina, preparada a partir de 3,0 g de vanilina dissolvida em solução contendo 135 mL de água destilada, 135 mL de metanol e 30 mL de ácido sulfúrico concentrado.
- Solução de KOH 5% em etanol.
- Solução de Dragendorff, foi preparada a partir da dissolução de 0,85 g de nitrato de bismuto em 10,0 mL de ácido acético glacial e adição de 40,0 mL de água destilada sob aquecimento (Solução A). Esta solução foi misturada com a solução B contendo 8,00 g de iodeto de potássio em 30,0 mL da água, na mesma proporção para gerar uma solução estoque. A solução reveladora foi preparada a partir de 1,0 mL da solução estoque, 2,0 mL de ácido acético glacial e 10,0 mL de água destilada.
- Solução de iodocloroplatinado, foi preparada a partir de uma solução aquosa a 5% (m m^{-1}), de ácido hexacloroplatinico (IV)($\text{H}_2(\text{PtCl}_6).6\text{H}_2\text{O}$) (solução A). Esta solução foi misturada com uma solução aquosa a 10% (m m^{-1}), de iodeto de potássio (KI) (solução B) e H_2O na proporção de (1:9:10, v v^{-1}).
- NP/PEG, foi preparado a partir da mistura de 10,0 mL de uma solução do ácido β -etilaminodifeilbórico ester (NP) 1% em metanol, com 8,0 mL da uma solução de polietilenoglicol-4000 (PEG) 5% em etanol.

3.1.3 – Fases estacionárias

- Cromatografia em coluna aberta (CC):
 - Sílica gel (SiO_2) para cromatografia (63–200 μm , diâmetro de poro 60 Å) Sigma Aldrich;
 - Sílica gel (SiO_2) para cromatografia *flash* (40–63 μm , diâmetro de poro 60 Å) Sigma Aldrich;
 - C_{18} sílica gel, premium grade (40–63 μm , 230–400 mesh, diâmetro de poro 60 Å) Sorbent Technologies;
 - Resina cromatográfica Sephadex LH-20, da marca GE Healthcare.
- Cromatografia em camada delgada (CCD):
 - Os experimentos de CCD foram realizados em placas comerciais de alumina 60 com indicador de fluorescência (UV_{254}) 0,20 mm de espessura Macherey-Nagel e de sílica gel 60 com indicador de fluorescência (UV_{254}) 0,20 mm de espessura Fluka.

- Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE):
 - Coluna analítica Phenomenex Lunna C₁₈ (250 mm × 4,6 mm, 5 μm) protegida pela respectiva pré-coluna.
 - Coluna Zorbax Extend C₁₈ *Rapid Resolution* HT C₁₈ (2,1 mm × 50 mm, 1,8 μm).
 - Coluna Poroshell HPH-C₁₈ (2,1 mm × 100 mm, 2,7 μm).
- Cromatografia gasosa
 - Coluna SPB-5 (30,0 m × 0,25 mm) capilar de sílica fundida com 5% fenil/95% dimetilpolisiloxano.

3.2 – Equipamentos

- Balança analítica da marca Shimadzu, modelo ATX224;
- Evaporador rotativo da marca IKA, modelo RV 10, com banho de aquecimento Fisatom, modelo 550 e bomba de vácuo da marca Biomec, modelo B740;
- Liofilizador da marca Terroni, modelo LS3000;
- Espectrofotômetro FT-IR Frontier Single Range – MIR da Perkin Elmer, equipado com acessório de reflectância total atenuada (ATR, do inglês: *attenuated total reflectance*), com cristal de diamante (Laboratório de Fotoquímica e Ciência de Materiais - LAFOT-CM do Instituto de Química da UFU).
- Espectrofotômetro da marca Genesysis, modelo 10S UV-Vis;
- Câmara de luz ultravioleta com irradiação de luz no comprimento de onda de 254 e 365 nm;
- Cromatógrafo a líquido de alta eficiência (CLAE):
 - Sistema Analítico: Equipamento da marca Shimadzu, modelo LC-10ADVP, bomba quaternária, com detector de UV e estação de tratamentos de dados;
 - Sistema semipreparativo: equipamento da marca Shimadzu, modelo LC-6A com os detectores de arranjo de diodo (DAD, do inglês: *diode array detector*) e evaporativo por espalhamento de luz (ELSD, do inglês: *evaporative light scattering detector*);
- Cromatógrafo a gás acoplado a espectrômetro de massas (CG-EM):
 - Shimadzu, modelo CG2010, equipado com Coluna SPB-5 (30,0 m × 0,25 mm) capilar de sílica fundida com 5% fenil/95% dimetilpolisiloxano e ionização por elétrons (70 eV) (Faculdade de engenharia química da UFU).
- Espectrômetro de ressonância magnética nuclear (RMN):

- Equipamento da marca Bruker modelo Ascend™ 400 Avance III HD (9,2 Tesla), operando em frequência de 400 MHz para os núcleos de hidrogênio e 100 MHz para o carbono (Laboratório multiusuário do Instituto de Química da UFU).
- Cromatógrafo a líquido acoplado a espectrômetro de massas de alta resolução (CLAE-IES-EM/EM):
 - Equipamento da marca Agilent® Infinity 12060, equipado com coluna Zorbax Extend C18 *Rapid Resolution* HT C18 (2,1 mm × 50 mm, 1,8 μm) acoplado ao espectrômetro de massa do tipo QTOF Agilent® 6520B, com ionização por eletrospray (Laboratório de Nanotecnologia do Instituto de Genética e Bioquímica da UFU).

3.3 – Materiais e reagentes utilizados nos ensaios antimicrobianos

- Microplacas estéreis de 96 poços.
- Incubadora para microarofilia
- Câmara de anaerobiose.
- Caldo triptona de soja (TSB) e caldo Schaedler suplementado;
- Dicloridrato de clorexidina (controle positivo para bactérias aeróbias), nas concentrações de 0,115 μg mL⁻¹ a 59,0 μg mL⁻¹.
- Metronidazol (controle positivo para bactérias anaeróbias), nas concentrações de 0,0115 μg mL⁻¹ a 59,0 μg mL⁻¹.
- Solução aquosa de resazurina a 0,01% (m v⁻¹).
- Ágar Sabouraud.
- Solução salina 0,85%.
- Caldo RPMI.
- Anfotericina B (controle positivo para as leveduras), diluída em caldo para obter a concentração de 8 μg mL⁻¹ a 0,031 μg mL⁻¹.

3.4 - Materiais e reagentes utilizados no ensaio de citotoxicidade

- Microplacas estéreis de 96 poços.
- Células Vero (ATCC CCL 81).
- Meio Dulbecco's modified Eagle's médium (DMEM), suplementado com 10% de soro fetal bovino.

- Incubadora de CO₂ para cultura celular (Thermo Scientific™).
- Solução de resazurina (3,0 mmol L⁻¹) em tampão fosfato-salino (PBS).
- Cisplatina (controle positivo).
- Leitora de microplaca (TP-Reader TP READER Thermo Plate)

3.5 - Materiais e reagentes utilizados no ensaio de inibição da lipase pancreática

- Microplaca de 96 poços.
- Lipase pancreática suína (tipo II, Sigma Aldrich) diluída 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.
- Palmitato de *p*-nitrofenila (*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.
- Orlistat (controle positivo) e DMSO 5% (controle negativo).
- Leitora de microplacas (Molecular Devices, Menlo Park, CA, USA).

3.6 – Metodologias

3.6.1 – Coleta e preparo do material vegetal

As diferentes espécies de *Senna* e *Cassia* foram coletadas no Cerrado do centro-oeste brasileiro, em diferentes localidades nos municípios de Araguari (MG), Uberlândia (MG) e Catalão (GO). Os dados geográficos foram registrados utilizando um sistema de posicionamento global (GPS, do inglês: *global positioning system*). A identificação botânica foi realizada pelos professores Prof. Dr. Ivan Schiavini da Silva (Instituto de Biologia da Universidade Federal de Uberlândia) e Prof^a. Dr. Juliana Gastaldello Rando (Universidade Federal do Oeste da Bahia - UFOB), e as exsiccatas foram depositadas no Herbário Uberlandense da UFU (HUFU) (Tabela 1).

Tabela 1 – Espécies coletadas e as respectivas coordenadas geográficas.

Espécies	Partes da planta	Local	Latitude (S)	Longitude (O)
<i>C. fistula</i>	Flores Folhas	Uberlândia - MG	18°91'96.4"	48°25'68.4"
<i>S. macranthera</i>	Flores Folhas	Uberlândia - MG	18°91'98.0"	48°25'79.3"
<i>C. bakeriana</i>	Flores Folhas	Catalão – GO	18°15'27.0"	47°94'20.7"
<i>S. occidentalis</i> ^a	Folhas	Catalão – GO	17°92'73.1"	47°70'52.0"
<i>S. siamea</i>	Flores Folhas	Catalão – GO	18°89'16.9"	48°28'03.6"
<i>S. obtusifolia</i>	Flores Folhas	Catalão – GO	17°92'43.7"	47°70'79.1"
<i>S. spectabilis</i>	Flores Folhas	Uberlândia – MG	18°91'44.22"	48°23'13.14"
<i>S. silvestris</i>	Flores Folhas	Uberlândia – MG	19°18'23.8"	48°39'32.1"
<i>S. pendula</i>	Flores Folhas	Catalão – GO	17°91'62.8"	47°72'63.5"
<i>S. alata</i>	Flores Folhas	Araguari –MG	18°64'31.7"	48°15'83.6"

^aNão foram coletadas flores.

Fonte: autora.

3.6.2 – Preparo dos extratos vegetais

As folhas e flores das espécies vegetais coletadas foram secas em estufa de circulação de ar a 35 °C por 4 dias, em seguida trituradas e submetidas à maceração com etanol, a temperatura ambiente, durante 3 dias. O solvente foi filtrado e destilado em evaporador rotativo à pressão reduzida de onde foram obtidos os extratos etanólicos (19 extratos), que foram submetidos à avaliação da atividade antimicrobiana, inibição da lipase pancreática e citotóxica. Além de análises por CCD e por CLAE-IES-EM/EM.

Os extratos etanólicos (cerca de 2,0 g) foram dissolvidos em 30 mL de MeOH- H₂O (4:1), filtrados e submetidos a extração líquido-líquido sequencial com *n*- hexano (4 × 20 mL), CH₂Cl₂ (4 × 20 mL) e AcOEt (4 × 20 mL), restando a fração aquosa. Em todas as frações os solventes foram removidos em evaporador rotativo à pressão reduzida de onde foram obtidas as frações hexano (FH), diclorometano (FD), acetato de etila (FA) e hidroalcoólica (MA).

3.6.3 – Triagem fitoquímica dos extratos e frações

Para investigar as classes de metabólitos secundários presentes nos extratos e frações, estes foram solubilizados e aplicados em placas de CCD com fase estacionária de sílica gel 60 e indicador de fluorescência. Foram utilizadas duas fases móveis: I) diclorometano 100% e II) diclorometano:metanol (9:1). As placas foram analisadas utilizando câmara com luz UV (254 e 365 nm), e reveladores específicos, que foram preparados conforme descrito no item 3.1.2.

A) Detecção de flavonoides: As placas de CCD foram aspergidas com NP/PEG e em seguida observadas em câmara de luz UV (365 nm).

B) Detecção de antraquinonas: As placas foram aspergidas com solução de KOH 5% em etanol e analisadas.

C) Detecção de alcaloides: As placas foram aspergidas com solução de iodocloroplatinato ou Dragendorff e analisadas.

3.6.4 – Inibição da atividade da lipase pancreática

As análises de inibição da atividade da lipase pancreática foram realizadas no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular do Instituto de Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia, em colaboração com o Prof. Dr. Foued Salmen Espindola.

Os ensaios foram realizados 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; PEREIRA et al., 2017). Os extratos e partições foram solubilizados em DMSO:água (1:1) (2000 µg mL⁻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 ensaio foi realizado em duplicata. 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 1.

$$\text{Inibição da lipase (\%)} = \left[\frac{(\text{Acontrole} - \text{Aamostra})}{\text{Acontrole}} \right] \cdot 100 \quad \text{Equação 1}$$

Onde: “Acontrole” é a área sob a curva na ausência dos extratos e partições, e “Aamostra” é a área sob a curva na presença dos extratos.

As amostras que apresentaram porcentagem (%) de inibição maior que 60%, foram analisadas novamente, em duplicata para determinação do IC₅₀ nas concentrações de 240, 200, 100, 50, 25, 12,5 e 6,25 µg mL⁻¹.

3.6.5 – Avaliação das atividades antimicrobianas

As atividades antibacteriana e antifúngica foram avaliadas utilizando o método da microdiluição em caldo, seguindo a metodologia descrita por CLSI (do inglês: *Clinical and Laboratory Standards Institute*) para as bactérias anaeróbias (CLSI, 2012a), aeróbias (CLSI, 2012b) e o protocolo CLSI M27-A3 (CLSI, 2008) para os fungos. As análises foram realizadas em colaboração com o Prof. Dr. Carlos Henrique Gomes Martins do Laboratório de Pesquisa em Microbiologia Aplicada da Universidade de Franca (LaPeMA).

3.6.5.1 – *Microrganismos utilizados*

A atividade antimicrobiana dos extratos etanólicos das flores e folhas das diferentes espécies de *Senna* e *Cassia*, foi avaliada utilizando cepas dos microorganismos provenientes da *American Type Culture Collection* (ATCC). Foram utilizadas quatro cepas de bactérias aeróbias: *Streptococcus mutans* (ATCC 25175), *Streptococcus mitis* (ATCC 49456), *Streptococcus sanguinis* (ATCC 10556), *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (ATCC 43717); três cepas de bactérias anaeróbias: *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 33277), *Fusobacterium nucleatum* (ATCC 25586), *Actinomyces naeslundii* (ATCC 19039); e três cepas de fungos: *Candida albicans* (ATCC 28366), *Candida tropicalis* (ATCC 13803) e *Candida glabrata* (ATCC 15126).

3.6.5.2 – Preparo das amostras, do inóculo e controles

As amostras foram solubilizadas em DMSO na concentração de 8.000 µg mL⁻¹ (solução de partida). Para os microrganismos aeróbicos, em cada micropoço foram acrescentados 125 µL das soluções de partida, 1.875 µL de caldo triptona de soja (TSB), resultando em uma solução de concentração 500 µg mL⁻¹. Já para os microrganismos anaeróbicos, cada micropoço foi composto por 162,5 µL da solução de partida, 2.437,5 µL de caldo Schaedler suplementado, obtendo uma solução de 500 µg mL⁻¹.

Para o preparo dos inóculos, as culturas dos microrganismos aeróbicos crescidos em meio ágar triptona de soja enriquecido com 5% de sangue de carneiro durante 24 h, foram transferidas para uma solução salina. O mesmo procedimento foi realizado para as culturas das bactérias anaeróbicas crescidas em ágar Schaedler por 72 h. Para os fungos, o inóculo foi preparado de acordo com o protocolo de referência CLSI M27-A3 (CLSI, 2008). Os mesmos foram cultivados em placas de petri contendo ágar Sabouraud por 24 h a 37 °C e em seguida, com o auxílio de alça de platina esterilizada, colônias das leveduras foram transferidas para tubos contendo 2,0 mL de solução salina 0,85%. Os inóculos foram ajustados a 530 nm em espectrofotômetro para cada microrganismo e comparado com a escala de McFarland 0,5 para obter uma concentração celular de 1,5 × 10⁸ e 6 × 10⁶ unidades formadoras de colônias (UFC mL⁻¹) para bactérias e fungos, respectivamente. Em seguida, foram realizadas diluições em caldo RPMI até que o inóculo atingisse 1,2 × 10³ UFC mL⁻¹.

Para validar os testes, o controle positivo metronidazol foi avaliado nas concentrações de 0,0115 µg mL⁻¹ a 5,9 µg mL⁻¹, utilizando as cepas de referência *Bacteroides fragilis* (ATCC 25285) ou *B. thetaiotaomicron* (ATCC 29741) para bactérias. Para os fungos, foi utilizado a anfotericina frente as cepas de referência *Candida krusei* (ATCC 6258) e *C. parapsilosis* (ATCC 22019). O dicloridrato de clorexidina também foi utilizado como controle positivo nas concentrações de 0,0115 µg mL⁻¹ a 59,0 µg mL⁻¹. Os controles de esterilidade dos caldos TSB e Schaedler, do inóculo, da esterilidade da clorexidina e do metronidazol, das amostras e do solvente DMSO (5 a 1%), também foram realizados.

3.6.5.3 – Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

Para a determinação da atividade antibacteriana, foram utilizadas microplacas com 96 poços. Em cada poço foram adicionados, o inóculo, o caldo triptona de soja ou caldo Schadler e as soluções das amostras. O volume final de cada poço foi de 100 e 200 μL para os microrganismos aeróbios e anaeróbios, respectivamente. As soluções das amostras foram avaliadas nas concentrações de 400 a 0,195 $\mu\text{g mL}^{-1}$. As placas contendo bactérias aeróbias foram seladas com parafilme e incubadas a 36 °C por 24 h em microaerofilia. Os microrganismos anaeróbios foram incubados a 36 °C por 48 a 72 h em câmara de anaerobiose.

Para a determinação da atividade antifúngica, nas microplacas foram realizadas diluições seriadas em concentrações de 3.000 a 1,46 $\mu\text{g mL}^{-1}$ com volume final em cada poço de 200 μL . Caldo RPMI tamponado com MOPS e pH final de 7,2, foi utilizado como meio de cultura. Para o controle positivo foi realizado o mesmo processo, com concentrações de 8 a 0,031 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e para controle negativo a concentração utilizada foi de 10% a 1% (v v⁻¹). Após a montagem, as microplacas foram incubadas 37 °C por 48 h.

Após os períodos de incubação, 30 μL de solução aquosa de resazurina a 0,01% (m v⁻¹) foi adicionada em cada poço das microplacas permitindo a observação imediata do crescimento microbiano. As cores azul e vermelha representaram a ausência e a presença de crescimento microbiano, respectivamente.

3.6.6 – Avaliação da atividade citotóxica

As análises da atividade citotóxica foram realizadas no Laboratório de Nanobiotecnologia do Instituto de Biotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia, em colaboração com o Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart.

3.6.6.1 – Preparo das amostras

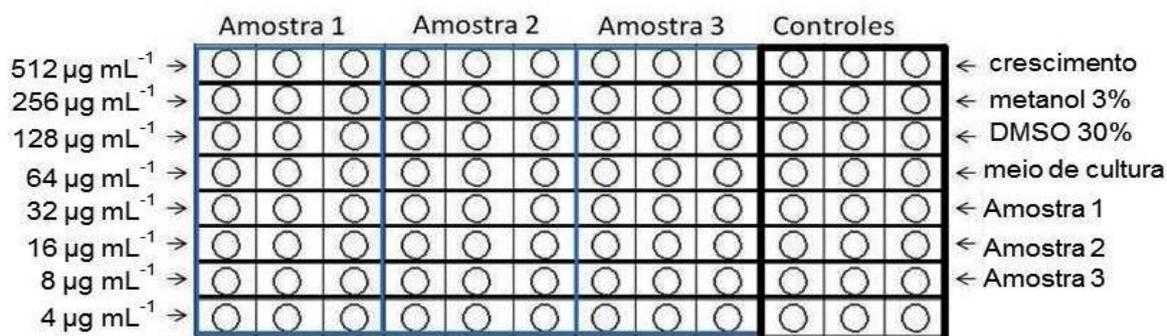
As amostras foram solubilizadas em metanol e diluídas no meio de cultura DMEM (*Dubelcco's Modified Eagle Medium*) suplementado, para formar uma solução estoque de 640 $\mu\text{g mL}^{-1}$. A concentração final de metanol da solução estoque não excedeu 3% (v v⁻¹). O teste de viabilidade celular foi realizado com a célula Vero ATCC CCL 81 (fibroblastos

de rim de macaco verde da África - *Cercopithecus aethiops*), a qual foi mantida em DMEM suplementado, a 37 °C com atmosfera úmida e 5% de CO₂.

3.6.6.2 – Teste de viabilidade celular

Para avaliação da citotoxicidade, foi utilizado o método de microdiluição em placa 96 poços. Foi preparada uma solução contendo 1×10^6 células em 10,0 mL de meio DMEM suplementado, desta solução foram transferidos 100 µL para cada poço da microplaca, que foi incubada por 6 horas à 37 °C com atmosfera úmida e 5% de CO₂, para as células se aderirem ao fundo do poço. Após o período de incubação, o meio de cultura foi retirado e em seguida, foram adicionadas as soluções das amostras nas concentrações testadas ($512 \mu\text{g mL}^{-1}$ à $4 \mu\text{g mL}^{-1}$). O volume final de cada poço foi de 100 µL e a quantidade de células presentes em cada poço foi de 1×10^4 células. Foram preparados os controles de crescimento celular, do solvente (metanol 3%, v v⁻¹), das amostras, controle negativo (0% de viabilidade celular) e controle do meio DMEM suplementado. A estrutura da placa de 96 poços com as concentrações e os controles está apresentada na Figura 15.

Figura 15 – Estrutura da placa para o teste de citotoxicidade.



Fonte: Martins (2018).

Após ser preparada, a placa foi incubada por 48 h à 37 °C com atmosfera úmida e 5% de CO₂. Em seguida foram adicionados, em cada poço, 10 µL de solução reveladora de resazurina a 3 mM em PBS (do inglês: *phosphate buffered saline*) (ROLÓN et al., 2006). As placas foram novamente incubadas por 24 h nas mesmas condições e a leitura da absorbância foi realizada a 595 nm em um espectrofotômetro de microplaca.

Todos os ensaios foram realizados em triplicata e a partir das absorbâncias de cada concentração testada, a viabilidade celular foi calculada em relação ao controle de crescimento. Foi construído um gráfico de dose-resposta com regressão não linear para o cálculo do CC_{50} (concentração em que se tenha 50% de viabilidade celular) (PILLAY et al., 2007).

A partir dos valores de CC_{50} e da CIM foi calculado o índice de seletividade (IS) (CASE et al., 2006) através da Equação 2.

$$IS = \log \frac{CC_{50}(\text{amostra})}{IC_{50} \text{ ou } CE_{50} \text{ ou } CIM(\text{amostra})} \quad \text{Equação 2}$$

3.6.7 – Análise por espectrometria de massas em alta resolução

As análises por espectrometria de massas em alta resolução foram realizadas no Laboratório de Nanobiotecnologia do Instituto de Biotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia (IBTEC-UFU), em colaboração com o Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart.

Para as análises de CLAE, as amostras foram preparadas na concentração de $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$. Foram injetados $10,0 \mu\text{L}$ no cromatógrafo líquido de alta eficiência modelo Agilent® Infinity 12060 em coluna Zorbax Extend C18 Rapid Resolution HT C₁₈ ($2,1 \text{ mm} \times 50 \text{ mm}$, $1,8 \mu\text{m}$), fase móvel: água dopada com ácido fórmico ($0,1\%$, $v v^{-1}$) (fase móvel A) e acetonitrila (fase móvel B). O sistema de gradiente de solventes utilizado começou com 2% de B e 98% de A, atingindo 98% de B em 10 min, permanecendo 2 min. com 98% de B, e retornando a 2% de B, com 1 min., a um fluxo de $0,4 \text{ mL min}^{-1}$.

Para as análises por infusão direta, as amostras foram solubilizadas em metanol ($C = 1,0 \text{ mg mL}^{-1}$) e introduzidas no espectrômetro de massas utilizando seringa ($100,0 \mu\text{L}$), adaptada a uma bomba de infusão direta com fluxo de $200,0 \mu\text{L h}^{-1}$. Em ambas as análises, o detector utilizado foi um espectrômetro de massas de alta resolução da marca Agilent® 6520B, modelo QTO, com ionização por eletrospray. A ionização foi realizada com gás nebulizante a 58 psi, o gás secante aquecido a $200 \text{ }^\circ\text{C}$, fluxo de $8,0 \text{ L min}^{-1}$ e no capilar foi aplicada uma energia de ionização de 4,5 KV. Para cada íon molecular, foram obtidos espectros de massas sequencial (EM/EM) em diferentes energias de colisões ($5\text{--}30 \text{ eV}$) nos modos positivo e negativo.

Os dados foram analisados utilizando o software MassHunter Qualitative (Agilent). As massas obtidas do espectrômetro de massas em alta resolução foram acuradas e comparadas com aquelas obtidas do programa ChemDraw Ultra 12.0 (massas exatas), utilizadas para calcular o erro em ppm, a partir da Equação 3:

$$\text{Erro}_{(\text{ppm})} = \left[\frac{\text{massa experimental} - \text{massa exata}}{\text{massa exata}} \right] \times 10^6 \quad \text{Equação 3}$$

Para a identificação dos compostos os dados obtidos foram comparados com aqueles de banco de dados de produtos naturais (MASS BANK, 2006; METLIN, 2018), além de comparação com padrões de fragmentação de compostos conhecidos, já descritos na literatura.

3.6.8 – Quimiometria

Para as análises quimiométricas foram coletados material vegetal de 5 indivíduos diferentes, de cada uma das espécies, totalizando 95 amostras. Os extratos foram obtidos de acordo com o item 3.6.2. As amostras foram submetidas a análise por EM com infusão direta, nos modos positivo e negativo. As análises foram realizadas em triplicata, totalizando 285 análises. Os dados obtidos (valores das massas exatas e suas respectivas abundâncias relativas) foram exportados em forma de tabela para o *software Microsoft Excel* e salvos como arquivos (*.csv). Os arquivos *.csv foram agrupados em quatro pastas distintas: flores (modo positivo), flores (modo negativo), folhas (modo positivo) e folhas (modo negativo) e então submetidos a análise de estatística multivariada: análise de PCA e HCA.

Os dados foram transportados para ambiente MATLAB, versão R2015a; uma normalização foi realizada e os íons com intensidade menor ou igual a 10% em relação aos íons mais abundantes de cada razão *m/z*, foram retirados. Foi realizada a média dos espectros, dando origem à matriz para análise. Os modelos PCA e HCA, para as flores e folhas nos modos positivo e negativo, foram construídos usando o PLS_Toolbox, versão 8.7.

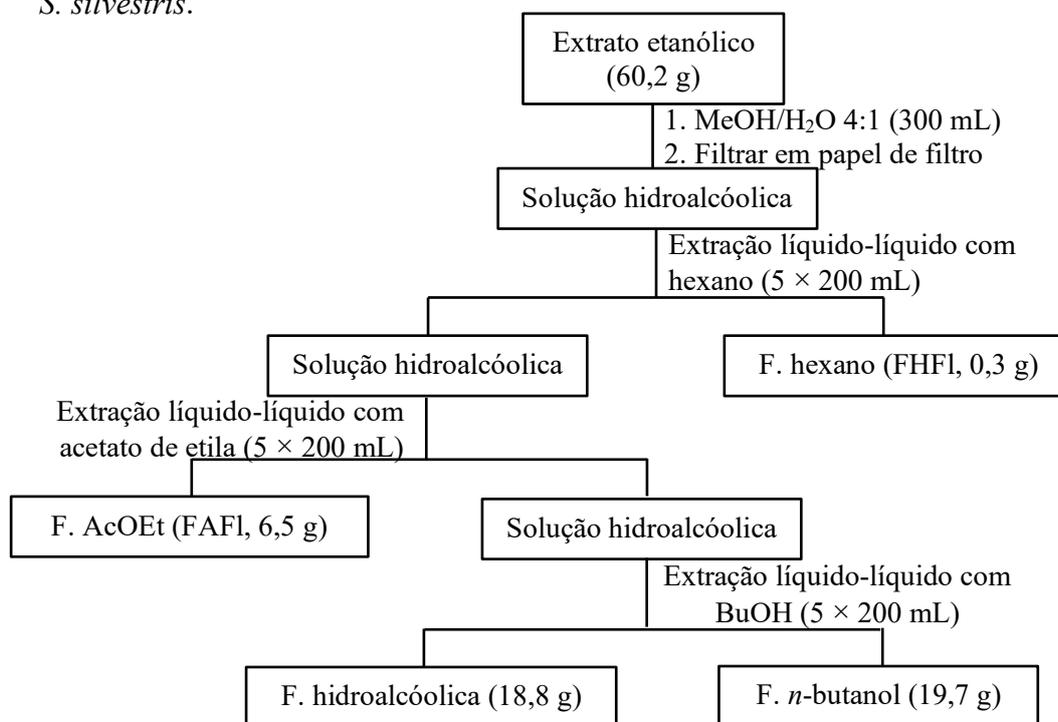
Esta parte do trabalho foi realizada em colaboração com o Professor Dr. Waldomiro Borges Neto – Laboratório de Quimiometria do Triângulo, Instituto de Química, Universidade Federal de Uberlândia.

3.6.9 – Coleta, preparo dos extratos e extração líquido-líquido dos órgãos de *S. silvestris*

As folhas e flores de *S silvestris* coletadas foram secas em estufa de circulação de ar a 35 °C por 4 dias. Em seguida o material vegetal seco e triturado (1,54 Kg de folhas e 257,9 g de flores), foi submetido à maceração com etanol, a temperatura ambiente, durante três dias. O material foi filtrado e o solvente destilado em evaporador rotativo à pressão reduzida, para obtenção dos extratos etanólicos das folhas (EEFo) e flores (EEFl). Esse processo foi repetido cinco vezes.

O EEFl (60,2 g) foi solubilizado em 300 mL de MeOH/H₂O (4:1, v v⁻¹), filtrado e submetido à extração líquido-líquido com hexano (5 × 200 mL), acetato de etila (5 × 200 mL) e *n*-butanol (5 × 200 mL). Os solventes foram destilados em evaporador rotativo à pressão reduzida, de onde foram obtidas as frações hexano (H), acetato de etila (A), *n*-butanol (B) e hidroalcóolica (MA) (Figura 16).

Figura 16 – Fluxograma da extração líquido-líquido do extrato etanólico das flores de *S. silvestris*.

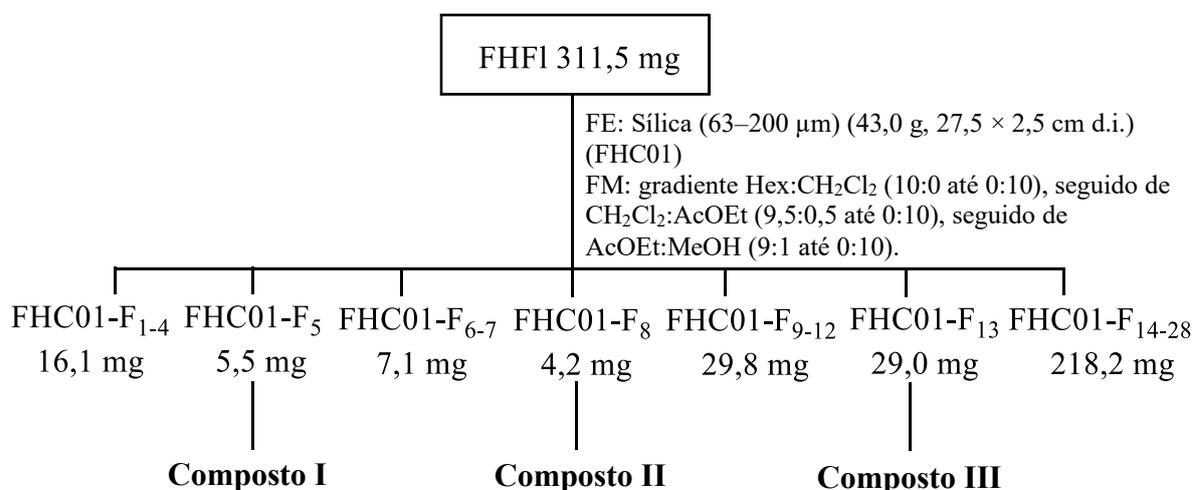


Fonte: autora.

3.6.10 – Fracionamento cromatográfico da fração FHF1 de *S. silvestris*

A FHF1 (311,5 mg), foi submetida a cromatografia em coluna (CC), utilizando como fase estacionária (FE) sílica gel (63–200 μm) (43,0 g, 27,5 \times 2,5 cm d.i.). A eluição foi feita em modo gradiente utilizando como solventes hexano (100%), seguido de hexano:CH₂Cl₂ (9:1) até CH₂Cl₂ (100%), CH₂Cl₂:AcOEt (9,5:0,5) até AcOEt (100%), e AcOEt:MeOH (9:1) até MeOH (100%). As frações coletadas (184) foram analisadas por CCD, e reagrupadas de acordo com a similaridade dos valores de R_f (Figura 17). Para visualização dos compostos separados nas cromatoplasas foi utilizada inspeção em câmara com luz ultravioleta (UV 254 e 365 nm) e revelação química com vanilina sulfúrica, de onde foram isolados os compostos **I**, **II** e **III** (Figura 17).

Figura 17 – Fluxograma do fracionamento da FHF1 de *S. silvestris*.



Fonte: autora.

3.6.11 – Fracionamento cromatográfico da FAF1 de *S. silvestris*

A fração FAF1 foi submetida a diferentes procedimentos cromatográficos (Figura 18). Em todas as etapas, as frações oriundas das separações por CC foram analisadas por CCD e reagrupadas de acordo com a similaridade dos valores de R_f . Para visualização dos compostos separados nas cromatoplasas foi utilizada inspeção em câmara com luz ultravioleta (UV 254 e 365 nm) e revelação química com vanilina sulfúrica.

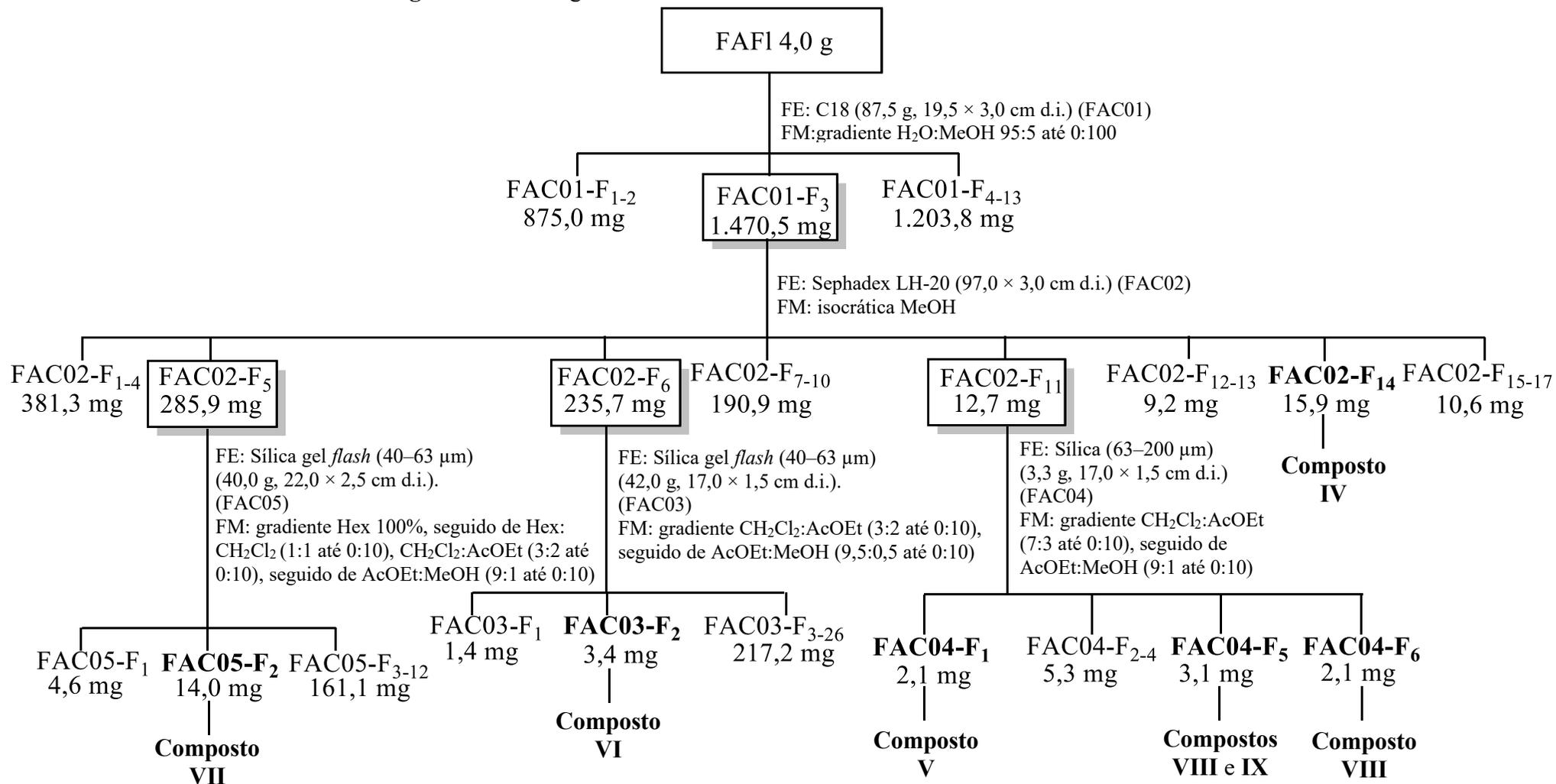
Inicialmente a fração FAF1 (2,0 g) foi submetida à CC, utilizando C18 como FE (87,5 g, 19,5 \times 3,0 cm d.i.). A eluição foi feita utilizando um sistema gradiente de solventes,

iniciando com H₂O/MeOH (95:5) até MeOH (100%). Esse procedimento foi repetido com o restante da fração FAF1 (2,0 g) para obtenção de maior quantidade de massa dos compostos separados.

A fração FAC01-F₃ (1,47 g) foi submetida à CC, utilizando como FE Sephadex LH-20 (97,0 × 3,0 cm d.i.) e FM sistema isocrático de MeOH (1,5 L), de onde foi isolado o composto **IV** (FAC02 F₁₄, 15,9 mg). A fração FAC02 F₆ (235,7 mg) foi submetida a CC, utilizando como FE sílica gel (40–63 μm) (42,0 g, 17,0 × 1,5 cm d.i.). A eluição foi feita em modo gradiente utilizando como solventes CH₂Cl₂:AcOEt (3:2) até AcOEt (100%), seguido de AcOEt:MeOH (9,5:0,5) até MeOH (100%), de onde foi isolado o composto **VI** (FAC03 F₂, 3,4 mg) (Figura 18).

A fração FAC02 F₅ (206,5 mg), foi submetida a CC, utilizando como FE sílica gel (40–63 μm) (40,0 g, 22,0 × 2,5 cm d.i.). A eluição foi feita utilizando um sistema gradiente de solventes, iniciando com hexano (100%), seguido de hexano:CH₂Cl₂ (1:1) até CH₂Cl₂ (100%), CH₂Cl₂:AcOEt (3:2) até AcOEt (100%), e AcOEt:MeOH (9:1) até MeOH (100%), de onde foi isolado o composto **VII**. A fração FAC02 F₁₁ (12,7 mg), foi submetida a CC, utilizando como FE sílica gel (63–200 μm) (3,3 g, 17,0 × 1,5 cm d.i.). A eluição foi feita em modo gradiente utilizando como solventes CH₂Cl₂:AcOEt (7:3) até AcOEt (100%), seguido de AcOEt/MeOH (9:1) até MeOH (100%), de onde foram isolados os compostos **V**, **VIII** e, em mistura com **VIII**, foi identificado o composto **IX** (Figura 18).

Figura 18 – Fluxograma do fracionamento da FAFI de *S. silvestris*.



Fonte: autora

4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 – Obtenção dos extratos etanólicos e frações

A partir das flores e folhas das diferentes espécies de *Cassia* e *Senna* foram preparados os extratos e frações, cujos rendimentos estão descritos na Tabela 2. As frações foram obtidas a partir de cerca de 2,0 g do extrato etanólico e foram utilizadas nas análises de triagem fitoquímica por CCD.

Tabela 2 – Massa do material vegetal seco, dos extratos e frações obtidos após extração líquido-líquido.

Espécies	Parte vegetal	Material Seco (g)	Extrato Etanólico (g)	Rendimento (%)	Frações obtidas (g)			
					H	D	A	MA
<i>C. fistula</i>	Flor	52,00	8,82	16,96	0,04	0,11	0,22	0,88
	Folha	51,98	10,82	20,82	0,07	0,06	0,09	0,80
<i>S. macranthera</i>	Flor	52,00	9,78	22,68	0,03	0,10	0,97	0,50
	Folha	51,98	9,69	18,62	0,04	0,07	0,18	0,61
<i>C. bakeriana</i>	Flor	52,09	9,50	18,24	0,03	0,05	0,32	0,94
	Folha	52,08	9,80	18,82	0,04	0,06	0,16	0,65
<i>S. occidentalis</i> ^a	Folha	47,00	7,43	15,81	0,03	0,19	0,07	0,40
<i>S. siamea</i>	Flor	52,23	7,02	13,44	0,05	0,03	0,12	0,64
	Folha	52,72	8,98	17,03	0,04	0,10	0,04	0,50
<i>S. obtusifolia</i>	Flor	8,50	1,06	12,47	–	–	–	–
	Folha	52,23	7,92	15,16	0,06	0,09	0,01	0,32
<i>S. silvestris</i>	Flor	41,78	8,20	19,63	0,05	0,11	0,22	0,94
	Folha	52,28	10,37	19,84	0,03	0,08	0,16	0,98
<i>S. pendula</i>	Flor	23,30	5,21	22,36	0,03	0,06	0,01	0,85
	Folha	52,00	7,09	13,63	0,04	0,11	0,29	0,70
<i>S. alata</i>	Flor	15,46	3,22	20,83	0,09	0,03	0,02	0,48
	Folha	52,08	8,84	16,97	0,03	0,12	0,24	0,73
<i>S. spectabilis</i>	Flor	3,86	0,58	15,02	0,01	0,09	0,07	–
	Folha	5,32	0,66	12,41	0,02	0,13	0,10	–

^aNão foram coletadas flores; H: Fração hexano; D: Fração diclorometano; A: Fração acetato de etila; MA: Fração hidroalcoólica; – Não realizado.

Fonte: autora.

4.2 – Triagem fitoquímica dos extratos e frações

Para identificar algumas classes de metabólitos presentes nos extratos e frações, as amostras foram submetidas a análise por CCD utilizando inspeção em câmara de luz UV-Vis e reveladores específicos (NP/PEG, iodocloroplatinato e KOH 5% em etanol). Como pode ser observado na Tabela 3, todos os extratos, frações diclorometano e acetato de etila das diferentes espécies de *Senna* apresentaram compostos pertencentes a classe dos flavonoides, que foi evidenciado pelo surgimento de fluorescência verde, amarelo ou laranja, a depender da estrutura, quando exposto a luz ultravioleta ($\lambda = 365$ nm) após aspersão do revelador NP/PEG.

Compostos pertencentes a classe das antraquinonas, evidenciados pelo aparecimento de manchas vermelhas após aspersão com solução alcóolica de KOH 5%, foram observados em algumas espécies, sendo encontrados em maior concentração nas frações diclorometano. Já os alcaloides só foram observados nos extratos e frações (diclorometano e acetato de etila) das flores e folhas de *S. spectabilis* (Tabela 3), o que corrobora com os dados descritos na literatura para esta espécie, que é conhecida por apresentar alcaloides piperidínicos como constituintes majoritários nas flores, folhas e frutos (PIVATTO et al., 2005; VIEGAS JÚNIOR et al., 2004; VIEGAS JÚNIOR et al., 2013).

Tabela 3 – Triagem fitoquímica dos extratos e frações das diferentes espécies de *Senna* e *Cassia*.

Reveladores	Extratos etanólicos																		
	1 ^a	1 ^b	2 ^a	2 ^b	3 ^a	3 ^b	4 ^b	5 ^a	5 ^b	6 ^a	6 ^b	7 ^a	7 ^b	8 ^a	8 ^b	9 ^a	9 ^b	10 ^a	10 ^b
NP/PEG	X	X	X	X	X	X	X	X	X	*	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Iodocloroplatinato	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	X	X	–	–	–	–	–	–
KOH 5% em etanol	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	X	–	X	–	–	–	X	X
	Frações hexano																		
	1 ^a	1 ^b	2 ^a	2 ^b	3 ^a	3 ^b	4 ^b	5 ^a	5 ^b	6 ^a	6 ^b	7 ^a	7 ^b	8 ^a	8 ^b	9 ^a	9 ^b	10 ^a	10 ^b
NP/PEG	–	–	–	–	–	–	–	–	–	*	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Iodocloroplatinato	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
KOH 5% em etanol	–	–	X	–	–	–	–	X	–	–	–	X	–	X	–	–	–	–	–
	Frações diclorometano																		
	1 ^a	1 ^b	2 ^a	2 ^b	3 ^a	3 ^b	4 ^b	5 ^a	5 ^b	6 ^a	6 ^b	7 ^a	7 ^b	8 ^a	8 ^b	9 ^a	9 ^b	10 ^a	10 ^b
NP/PEG	X	X	X	X	X	X	X	X	X	*	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Iodocloroplatinato	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	X	X	–	–	–	–	–	–
KOH 5% em etanol	X	X	–	–	X	X	–	–	–	–	–	X	–	X	–	X	X	X	X
	Frações acetato de etila																		
	1 ^a	1 ^b	2 ^a	2 ^b	3 ^a	3 ^b	4 ^b	5 ^a	5 ^b	6 ^a	6 ^b	7 ^a	7 ^b	8 ^a	8 ^b	9 ^a	9 ^b	10 ^a	10 ^b
NP/PEG	X	X	X	X	X	X	X	X	X	*	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Iodocloroplatinato	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	X	X	–	–	–	–	–	–
KOH 5% em etanol	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–

¹*C. fistula*; ²*S. macranthera*; ³*C. bakeriana*; ⁴*S. occidentalis*; ⁵*S. siamea*; ⁶*S. obtusifolia*; ⁷*S. spectabilis*; ⁸*S. silvestris*; ⁹*S. pendula*; ¹⁰*S. alata*;

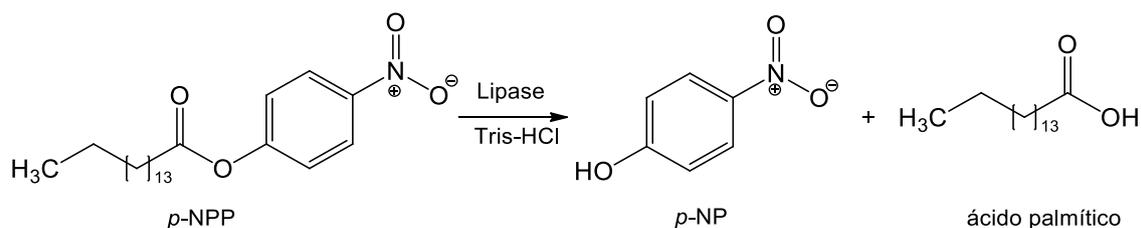
^aExtrato etanólico das flores; ^bExtrato etanólico das folhas; – Não identificado; *Extratos ou frações não foram obtidos.

Fonte: autora.

4.3 – Atividade de inibição da lipase pancreática

Os dezenove extratos etanólicos, obtidos de dez espécies de *Senna* e *Cassia*, preparados conforme o item 3.6.2, foram submetidos a ensaios para determinar a capacidade de inibição da lipase pancreática. O método utilizado consiste em hidrolisar o substrato *p*-NPP na presença da lipase, formando o *p*-nitrofenol (*p*-NP) e o ácido palmítico (Figura 19). A extensão da inibição da lipase tem um impacto negativo na quantidade de *p*-NP liberado, sendo esta, medida espectrofotometricamente (ZAID et al., 2017).

Figura 19 – Representação da hidrólise do *p*-NPP catalisada pela lipase.



Fonte: Zaid et al. (2014).

A atividade de inibição dos extratos etanólicos estão apresentados na tabela 4. O resultado foi expresso em porcentagem de inibição e, as amostras que apresentaram percentuais de inibição acima de 60%, na concentração de 240 $\mu\text{g mL}^{-1}$, tiveram os valores de IC₅₀ determinados.

Entre os dezenove extratos avaliados, aqueles das flores de *C. fistula* e *S. macranthera* apresentaram percentual de inibição de $67,10 \pm 0,58\%$ e $72,81 \pm 9,08\%$, respectivamente, quando avaliados na concentração de 240 $\mu\text{g mL}^{-1}$. A avaliação dos extratos em diferentes concentrações foi realizada para a determinação do IC₅₀, sendo que o extrato etanólico das flores de *C. fistula* foi o que apresentou maior potencial de inibição (IC₅₀ = $25,68 \pm 1,72 \mu\text{g mL}^{-1}$) (Tabela 4).

Tabela 4 – Percentual de inibição (%) e IC₅₀ da lipase pancreática apresentado pelos extratos etanólicos.

Amostras	Lipase pancreática	
	% de inibição ^c	IC ₅₀ (µg mL ⁻¹) ^d
1 ^a	67,10 ± 0,58	25,68 ± 1,72
1 ^b	16,68 ± 4,06	–
2 ^a	72,81 ± 9,08	167,72 ± 21,75
2 ^b	19,17 ± 11,79	–
3 ^a	55,91 ± 5,08	–
3 ^b	26,27 ± 1,20	–
4 ^b	37,99 ± 13,56	–
5 ^a	34,39 ± 4,06	–
5 ^b	0	–
6 ^a	17,16 ± 8,13	–
6 ^b	34,89 ± 2,61	–
7 ^a	8,09 ± 6,82	–
7 ^b	14,14 ± 5,76	–
8 ^a	16,94 ± 8,21	–
8 ^b	11,68 ± 8,31	–
9 ^a	0	–
9 ^b	4,49 ± 2,25	–
10 ^a	4,57 ± 3,17	–
10 ^b	7,80 ± 4,24	–
Orlistat	97,00 ± 4,24	0,17 ± 0,05

¹*C. fistula*; ²*S. macranthera*; ³*C. bakeriana*; ⁴*S. occidentalis*; ⁵*S. siamea*; ⁶*S. obtusifolia*; ⁷*S. spectabilis*; ⁸*S. silvestris*; ⁹*S. pendula*; ¹⁰*S. alata*; ^aExtrato etanólico das flores; ^bExtrato etanólico das folhas; ^cConcentração dos extratos (240 µg mL⁻¹); ^drealizado com as amostras que apresentaram % de inibição maior que 60%; – não testado.

Fonte: autora.

A composição química de *C. fistula* já foi alvo de vários estudos, que relataram a presenças de vários compostos fenólicos (LUXIMON-RAMMA et al., 2002; MARTÍNEZ-ÁVILA, CASTRO-LÓPEZ, ROJAS, 2018; TAN et al., 2018). Dentre eles, diversos flavonoides (kaempferol, catequina, *epi*-catequina, *epi*-afzelequina) (KASHIWADA et al., 1990; MAHESH, SHARMA, SINGH, 1984); proantocianidinas (KASHIWADA et al., 1990); antraquinonas (crisofanol, reina, fisciona, crisofaneina, emodina, citreorseina) (KUO, LEE, WEIN, 2002; LEE, LEE, KUO, 2001; MAHESH, SHARMA, SINGH, 1984); cumarinas (isoescopoletina e escopoletina) (LEE, LEE, KUO, 2001); furanoflavonas (fistulaflavonas A e B) (GAO et al., 2013); senosídeos A e B (ASSELEIH et al., 1990); além de cromonas e outros (KUO, LEE, WEIN, 2002; LEE, LEE, KUO, 2001).

Em relação a atividade de inibição da lipase pancreática, algumas espécies de *Cassia* já foram avaliadas em estudos anteriores. No estudo realizado por Souza e

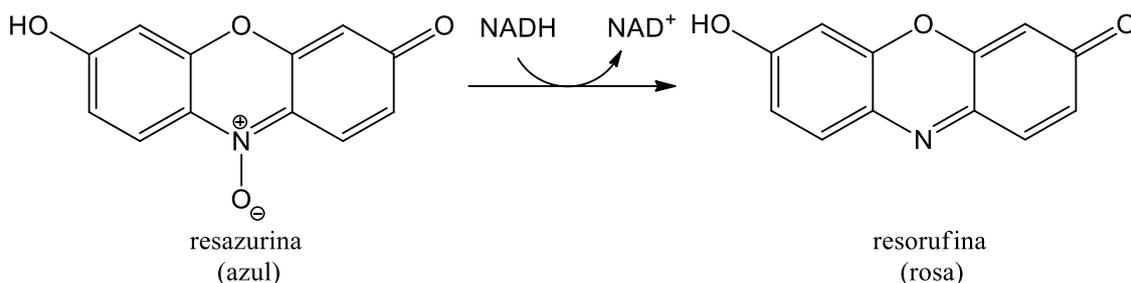
colaboradores (2012), os extratos metanólicos das folhas de *C. fistula* e *C. angustifolia* foram avaliados sobre a lipase pancreática, e estes aumentaram a atividade da enzima. O extrato hexano das folhas de *C. bakeriana* inibiu a lipase pancreática com valor de IC₅₀ de $25,27 \pm 8,78 \mu\text{g mL}^{-1}$ (SILVA et al., 2019). O extrato acetato de etila das raízes de *S. siamea* apresentou forte inibição da lipase pancreática ($74,3 \pm 1,4\%$) e o fracionamento bioguiado levou ao isolamento de antraquinonas, entre elas, cassiamina A, que foi o composto mais ativo com IC₅₀ de $41,8 \pm 1,2 \mu\text{mol L}^{-1}$ (KUMAR et al., 2013). O extrato aquoso rico em proantocianidinas das partes aéreas de *C. mimosoide*, apresentou IC₅₀ de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ (YAMAMOTO et al., 2000); o extrato etanólico das partes aéreas de *C. auriculata* também apresentou atividade inibidora da lipase pancreática com IC₅₀ de $6,0 \pm 1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$, e seu fracionamento levou ao isolamento de alguns flavonoides, entre eles, kaempferol-3-*O*-rutinosídeo, que foi o composto mais ativo com IC₅₀ de $2,9 \pm 0,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ (HABTEMARIAM, 2012).

Neste estudo, diversos compostos fenólicos, em sua maioria pertencente a classe dos flavonoides, entre estes kaempferol-3-*O*-rutinosídeo, foram identificados por ESI-EM/EM nas flores de *C. fistula* (Tabela 10) e podem ser os responsáveis pela atividade inibidora da lipase pancreática observada neste extrato.

4.4 – Atividade antimicrobiana

Os extratos etanólicos obtidos das diferentes espécies de *Senna* e *Cassia*, foram avaliados frente as dez cepas de microrganismos através do método da microdiluição em caldo utilizando como indicador resazurina para determinação da CIM. Utilizado para avaliar o crescimento celular, a resazurina é um indicador de oxidação-redução que apresenta coloração azul e não fluorescente em seu estado oxidado e que se torna rosa e fluorescente quando reduzido a resorufina por oxidoreduases em células viáveis (Figura 20) (MCNICHOLL, MCGRATH, QUINN, 2007).

Figura 20 – Reação de redução da resazurina a resorufina.



Fonte: adaptado de Guerin et al. (2001).

Os resultados de CIM ($\mu\text{g mL}^{-1}$) dos extratos etanólicos das diferentes espécies de *Senna* e *Cassia* frente as bactérias bucais aeróbias, anaeróbias e leveduras, estão apresentados na Tabela 5.

Sobre a atividade antibacteriana de extratos de plantas, Ríos e Recio (2005) consideram valores de CIM menores que $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ como promissores agentes antimicrobianos. Holetz et al. (2002), por outro lado, caracteriza valores de CIM inferiores a $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ como boa atividade antimicrobiana; de 100 a $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ moderada; de 500 a $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ fraca e acima de $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ inativa. Portanto, observando os resultados apresentados na Tabela 5, entre as 10 espécies avaliadas, 4 (*C. fistula*, *S. macranthera*, *C. bakeriana* e *S. spectabilis*) apresentaram atividade moderada contra pelo menos duas das bactérias estudadas, com concentrações variando de 200 a $400 \mu\text{g mL}^{-1}$. No entanto, o extrato mais efetivo na inibição do crescimento bacteriano foi das flores de *S. macranthera*, que apresentou atividade moderada frente a todas as bactérias aeróbias e anaeróbias testadas, com valores de CIM variando de 200 a $400 \mu\text{g mL}^{-1}$. Enquanto o extrato das folhas apresentou efeito inibitório moderado apenas frente às bactérias aeróbias *S. mitis* ATCC 49456 e *A. actinomycetemcomitans* ATCC 43717, com valores de CIM de 400 e $200 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente.

Com relação a atividade antifúngica, os menores CIM encontrados também foram para o extrato etanólico das flores de *S. macranthera* com valores de 23,43, 11,72 e $5,86 \mu\text{g mL}^{-1}$ frente às leveduras *C. tropicalis* ATCC 13803, *C. albicans* ATCC 28366 e *C. glabrata* ATCC 15126, respectivamente. Esses resultados são promissores, uma vez que Tandon e colaboradores (2004), consideram amostras ativas e promissoras para atividade antifúngica, aquelas com valores de CIM menor ou igual a $50 \mu\text{g mL}^{-1}$

Tabela 5 – Resultados da atividade antimicrobiana, expresso em CIM ($\mu\text{g mL}^{-1}$), dos extratos etanólicos de *Senna* e *Cassia*.

Microrganismos	CIM ($\mu\text{g mL}^{-1}$)																		Controle positivo	
	1 ^a	1 ^b	2 ^a	2 ^b	3 ^a	3 ^b	4 ^b	5 ^a	5 ^b	6 ^a	6 ^b	7 ^a	7 ^b	8 ^a	8 ^b	9 ^a	9 ^b	10 ^a		10 ^b
Bactérias Aeróbias																				
<i>S. mutans</i> ATCC 25175	>400	>400	400	>400	>400	>400	>400	>400	>400	>400	>400	>400	>400	>400	>400	>400	>400	>400	>400	0,9 ^e
<i>S. mitis</i> ATCC 49456	>400	>400	200	400	>400	>400	>400	>400	>400	>400	>400	400	400	>400	>400	>400	>400	>400	>400	1,8 ^e
<i>S. sanguinis</i> ATCC 10556	>400	>400	400	>400	>400	>400	>400	>400	>400	>400	>400	200	400	>400	>400	>400	>400	>400	>400	1,8 ^e
<i>A. actinomycetemcomitans</i> ATCC 43717	>400	>400	200	200	>400	>400	>400	>400	>400	>400	>400	>400	>400	>400	>400	>400	>400	>400	>400	0,9 ^e
Bactérias Anaeróbias																				
<i>P. gingivalis</i> ATCC 33277	400	200	400	>400	400	400	>400	>400	>400	>400	>400	>400	>400	>400	>400	>400	>400	>400	>400	3,6 ^e
<i>F. nucleatum</i> ATCC 25586	>400	200	200	>400	400	>400	>400	>400	>400	>400	>400	>400	>400	>400	>400	>400	>400	>400	>400	1,8 ^e
<i>A. naeslundii</i> ATCC19039	>400	400	200	>400	400	400	>400	>400	>400	>400	>400	400	>400	>400	>400	>400	>400	>400	>400	1,8 ^e
Leveduras																				
<i>C. albicans</i> ATCC 28366	375	1500	11,72	375	187,5	750	>3000	>3000	>3000	>3000	>3000	187,5	3000	>3000	>3000	>3000	>3000	>3000	>3000	0,2 ^d
<i>C. tropicalis</i> ATCC 13803	1500	1500	23,43	1500	1500	3000	>3000	>3000	>3000	>3000	>3000	375	3000	>3000	>3000	>3000	>3000	>3000	>3000	0,2 ^d
<i>C. glabrata</i> ATCC 15126	93,75	187,5	5,86	93,75	23,43	46,87	>3000	>3000	>3000	>3000	>3000	23,43	750	>3000	>3000	>3000	>3000	>3000	>3000	0,1 ^d

¹*C. fistula*; ²*S. macranthera*; ³*C. bakeriana*; ⁴*S. occidentalis*; ⁵*S. siamea*; ⁶*S. obtusifolia*; ⁷*S. spectabilis*; ⁸*S. silvestris*; ⁹*S. pendula*; ¹⁰*S. alata*;

^aExtrato etanólico das flores; ^bExtrato etanólico das folhas; Controle positivo: ^cClorexidina; ^dAnfotericina.

Os ensaios foram conduzidos utilizando como controle positivo metronidazol, contra as cepas de referência *Bacteroides fragilis* (CIM = 0,7 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e *B. thetaiotaomicron* (CIM = 1,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$), usadas como controle para bactérias (protocolo M11-A7); e anfotericina contra as cepas *C. krusei* (CIM = 1,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e *C. parapsilosis* (CIM = 0,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$) usadas como controle para leveduras (protocolo M27- A3). Esses microrganismos validam os ensaios de bactérias (CLSI, 2007; CLSI, 2012) e leveduras (CLSI, 2008).

Fonte: autora.

Tendo em vista este indicativo de atividade antifúngica, observado no extrato etanólico das flores de *S. macranthera*, as frações (hexano, diclorometano, acetato de etila e hidroalcoólica) obtidas do extrato, também foram avaliadas contra as três cepas de *Candida* e os valores estão apresentados na Tabela 6. Entre as frações avaliadas, a fração acetato de etila apresentou forte atividade antifúngica, frente as três leveduras testadas, com valores de CIM de 5,86, 23,43 e 23,43 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para *C. glabrata*, *C. albicans* e *C. tropicalis*, respectivamente. Vale a pena destacar que *C. glabrata*, é resistente aos agentes antifúngicos azóis e equinocandinas, usados como medicamentos (PFALLER, 2012). Assim, este resultado é considerado promissor na busca de novos agentes antifúngicos.

Tabela 6 – Resultados da atividade antifúngica, expresso em CIM ($\mu\text{g mL}^{-1}$), das frações, obtidas a partir do extrato etanólico das flores de *S. macranthera*.

Leveduras	CIM ($\mu\text{g mL}^{-1}$)				Anfotericina B
	FH ^a	FD ^b	Amostras testadas		
			FA ^c	FMA ^d	
<i>C. albicans</i> ATCC 28366	375	187,5	23,43	375	0,2
<i>C. glabrata</i> ATCC 15126	46,87	23,43	5,86	1500	0,1
<i>C. tropicalis</i> ATCC 13803	375	375	23,43	375	0,2

^aFração hexano; ^bFração diclorometano; ^cFração acetato de etila; ^dFração hidroalcoólica; Os ensaios foram realizados com *C. krusei* (CIM = 1.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e *C. parapsilosis* (CIM = 0.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$) como cepas controle. Esses microrganismos validam os ensaios para leveduras (CLSI, 2008).

Fonte: autora.

S. macranthera H. S. Irwin & Barneby, popularmente conhecida como pau-fava e fedegoso, é uma árvore (6–8 m de altura) comumente usada na arborização de cidades (LORENZI, 2008). Na medicina tradicional os frutos desta espécie são utilizados no tratamento de gripes e resfriados (TRENTI et al., 2011). A atividade antimicrobiana de *S. macranthera* foi investigada em estudos anteriores, onde Scio e colaboradores (2012), ao avaliar a atividade antimicrobiana de extratos de diferentes plantas, encontrou, para o extrato metanólico das folhas de *S. macranthera*, valores de CIM de 156, 300 e 156 $\mu\text{g mL}^{-1}$ frente às bactérias *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Shigella sonnei* ATCC11060 e *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, ATCC 13311, respectivamente; e nenhuma atividade foi observada frente às leveduras *Candida albicans* ATCC 18804 e *Cryptococcus neoformans* ATCC 32608. Já os extratos etanólico e

diclorometano das raízes, quando avaliados contra cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 3828, *S. agalactiae* ATCC 3849 e *S. bovis* ATCC 550, apresentou efeito inibitório com valores de CIM variando de 0,5 a 1,0 mg mL⁻¹, sendo o melhor resultado observado para o extrato diclorometano frente a *S. aureus* (MIC 0,5 mg mL⁻¹), cujo efeito inibitório, foi atribuído às antraquinonas emodina, fisciona e crisofanol isoladas do extrato (ANDRADE et al., 2015).

4.5 – Avaliação da atividade citotóxica

Os extratos etanólicos e as frações obtidas das flores de *S. macranthera*, foram submetidos à análise da atividade citotóxica contra células Vero (ATCC CCL 81), sendo o valor expresso em concentração citotóxica (CC₅₀ – concentração em que se tenha 50% de viabilidade celular). Para estabelecer a relação entre citotoxicidade e atividade antimicrobiana, os valores de índice de seletividade (IS) foram calculados (Tabela 7). Amostras com valores positivos de IS indicam alta seletividade contra os microorganismos, enquanto valores negativos, indicam alta toxicidade para as células Vero (CASE et al., 2006; MESQUITA et al., 2007). Os valores mais elevados de IS foram observados para o extrato etanólico e fração acetato de etila das flores de *S. macranthera* (Tabelas 7 e 8). Estes resultados confirmam que as flores de *S. macranthera* são promissoras na busca por novos agentes antifúngicos, associando elevada atividade antifúngica contra as três leveduras estudadas com baixa citotoxicidade (CIMs 23,43–5,86 µg mL⁻¹, IS 1,34–1,94). Assim, a fração acetato de etila das flores de *S. macranthera* foi submetida a análise por CLAE-EM/EM a fim de realizar a identificação dos compostos bioativos.

Tabela 7 – Atividade citotóxica, expresso em CC₅₀ (µg mL⁻¹) e índice de seletividade dos extratos etanólicos de *Senna* e *Cassia*.

Amostras	Células Vero (ATCC CCL 81)	Microrganismos Índice de seletividade (IS) ^f									
	CC ₅₀ (µg mL ⁻¹)	<i>S.</i> <i>mutans</i> ^c	<i>S.</i> <i>mitis</i> ^c	<i>S.</i> <i>sanguinis</i> ^c	<i>A.</i> <i>actinomycetemcomitans</i> ^c	<i>P.</i> <i>gingivalis</i> ^d	<i>F.</i> <i>nucleatum</i> ^d	<i>A.</i> <i>naeslundii</i> ^d	<i>C.</i> <i>albicans</i> ^e	<i>C.</i> <i>tropicalis</i> ^e	<i>C.</i> <i>glabrata</i> ^e
1 ^a	>512	0,11	0,11	0,11	0,11	0,11	0,11	0,11	0,13	-0,47	0,74
1 ^b	>512	0,11	0,11	0,11	0,11	0,41	0,41	0,11	-0,47	-0,47	0,44
2 ^a	>512	0,11	0,41	0,11	0,41	0,11	0,41	0,41	1,64	1,34	1,94
2 ^b	>512	0,11	0,11	0,11	0,41	0,11	0,11	0,11	0,13	-0,47	0,74
3 ^a	>512	0,11	0,11	0,11	0,11	0,11	0,11	0,11	0,44	-0,47	1,34
3 ^b	>512	0,11	0,11	0,11	0,11	0,11	0,11	0,11	-0,16	-0,77	1,04
4 ^b	>512	0,11	0,11	0,11	0,11	0,11	0,11	0,11	-0,77	-0,77	-0,77
5 ^a	>512	0,11	0,11	0,11	0,11	0,11	0,11	0,11	-0,77	-0,77	-0,77
5 ^b	>512	0,11	0,11	0,11	0,11	0,11	0,11	0,11	-0,77	-0,77	-0,77
6 ^a	>512	0,11	0,11	0,11	0,11	0,11	0,11	0,11	-0,77	-0,77	-0,77
6 ^b	>512	0,11	0,11	0,11	0,11	0,11	0,11	0,11	-0,77	-0,77	-0,77
7 ^a	>512	0,11	0,11	0,41	0,11	0,11	0,11	0,11	0,44	0,13	1,34
7 ^b	315 ± 54	-0,10	-0,10	-0,10	-0,10	-0,10	-0,10	-0,10	-0,98	-0,98	-0,38
8 ^a	>512	0,11	0,11	0,11	0,11	0,11	0,11	0,11	-0,77	-0,77	-0,77
8 ^b	>512	0,11	0,11	0,11	0,11	0,11	0,11	0,11	-0,77	-0,77	-0,77
9 ^a	>512	0,11	0,11	0,11	0,11	0,11	0,11	0,11	-0,77	-0,77	-0,77
9 ^b	>512	0,11	0,11	0,11	0,11	0,11	0,11	0,11	-0,77	-0,77	-0,77
10 ^a	>512	0,11	0,11	0,11	0,11	0,11	0,11	0,11	-0,77	-0,77	-0,77
10 ^b	>512	0,11	0,11	0,11	0,11	0,11	0,11	0,11	-0,77	-0,77	-0,77

¹*C. fistula*; ²*S. macranthera*; ³*C. bakeriana*; ⁴*S. occidentalis*; ⁵*S. siamea*; ⁶*S. obtusifolia*; ⁷*S. spectabilis*; ⁸*S. silvestris*; ⁹*S. pendula*; ¹⁰*S. alata*; ^aExtrato etanólico das flores; ^bExtrato etanólico das folhas; ^cMicrorganismos aeróbicos; ^dMicrorganismos anaeróbicos; ^eLeveduras; ^fIS = log[CC₅₀ (Células Vero)/CIM]

Fonte: autora.

Tabela 8 – Atividade citotóxica e índice de seletividade do extrato e frações obtidas das flores de *S. macranthera*.

Amostras	Célula Vero	Índice de seletividade (IS) ^f		
	(ATCC CCL 81)	Leveduras		
	Atividade citotóxica CC ₅₀ ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. glabrata</i>
EE ^a	>512	1,64	1,34	1,94
FH ^b	435 \pm 83	0,06	0,06	0,98
FD ^c	>512	0,44	0,13	1,34
FA ^d	>512	1,34	1,34	1,94
FMA ^e	418 \pm 72	0,05	0,05	-0,55

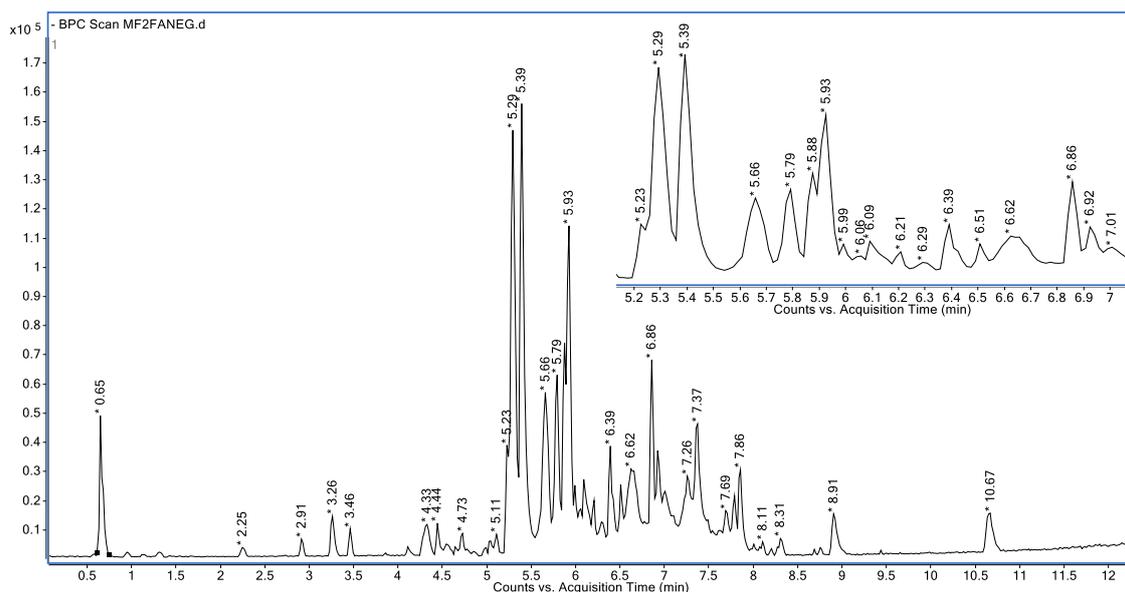
^aExtrato etanólico das flores de *S. macranthera*; ^bfração hexano; ^cfração CH₂Cl₂; ^dfração acetato de etila; ^efração hidroalcoólica; ^fIS = log[CC₅₀ (Vero cells)/CIM].

Fonte: autora.

4.6 – Identificação dos metabólitos secundários da fração FAF1 de *S. macranthera*

A análise da fração FAF1 de *S. macranthera* por CLAE-EM, permitiu identificar os compostos de **1–18** (Figura 21; Tabela 9). As identificações estruturais foram realizadas a partir das massas exatas e vias de fragmentação propostas com base nas análises de massas em alta resolução obtidas no modo negativo EM-IES(-) e EM/EM. Foram considerados somente valores de erros menores ou iguais a 5 ppm e todos os dados foram comparados com outros trabalhos descritos na literatura, biblioteca Metlin e banco de dados de PNs. A Tabela 9 resume os tempos de retenção (t_R), as massas em alta resolução $[M - H]^-$, as fórmulas moleculares, os erros (ppm) entre os valores teóricos e medidos, os principais e mais importantes íons produtos EM² e os compostos identificados.

Figura 21 – Cromatograma obtido por CLAE-EM da fração FAFI de *S. macranthera*.

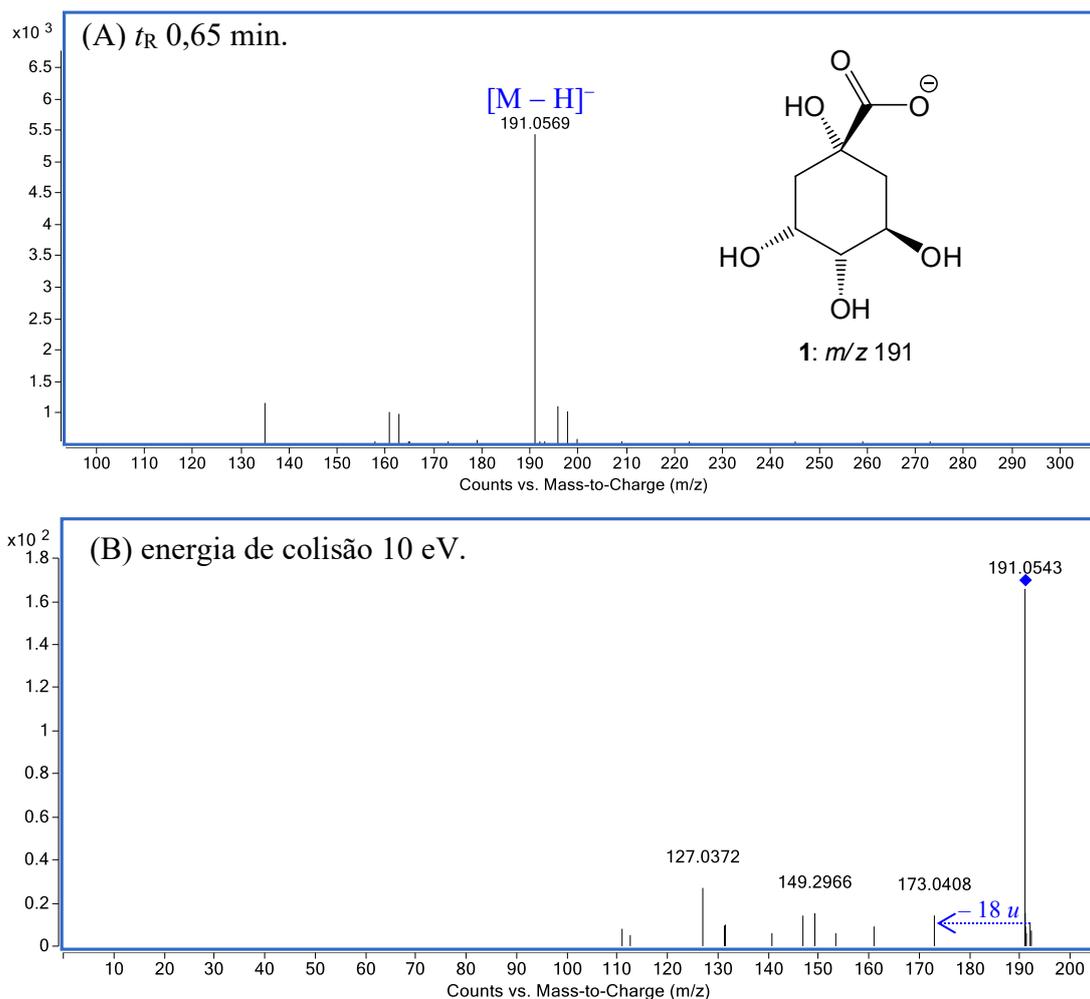


Condições CLAE: Coluna Poroshell HPH-C₁₈ (100 × 2,1 mm, 2,7 μm); gradiente (10 min), 2–98% de MeOH-HCO₂H 0,1%; C = 1,0 mg mL⁻¹, V_{inj.} = 1,0 μL, fluxo 3,0 mL min⁻¹ e detector EM-IES.

Fonte: autora.

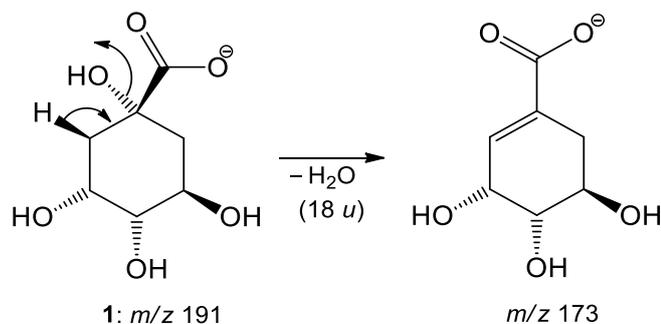
O primeiro composto identificado (*t_R* 0,65 min), apresentou o sinal do íon molecular em *m/z* 191,0569 [M – H]⁻ (Figura 22 A), e íon fragmento em *m/z* 173 (Figura 22 B), que corresponde a eliminação neutra de água [M – H – H₂O]⁻ (Figura 23), sendo consistente com os dados descritos na literatura para o ácido quínico (**1**) (MASIKE et al., 2017).

Figura 22 – EM-IES(-) em alta resolução do composto **1** (A) e seu respectivo EM/EM-IES(-) (B).



Fonte: autora.

Figura 23 – Proposta de fragmentação para o ácido orgânico **1** analisado por EM/EM-IES(-).

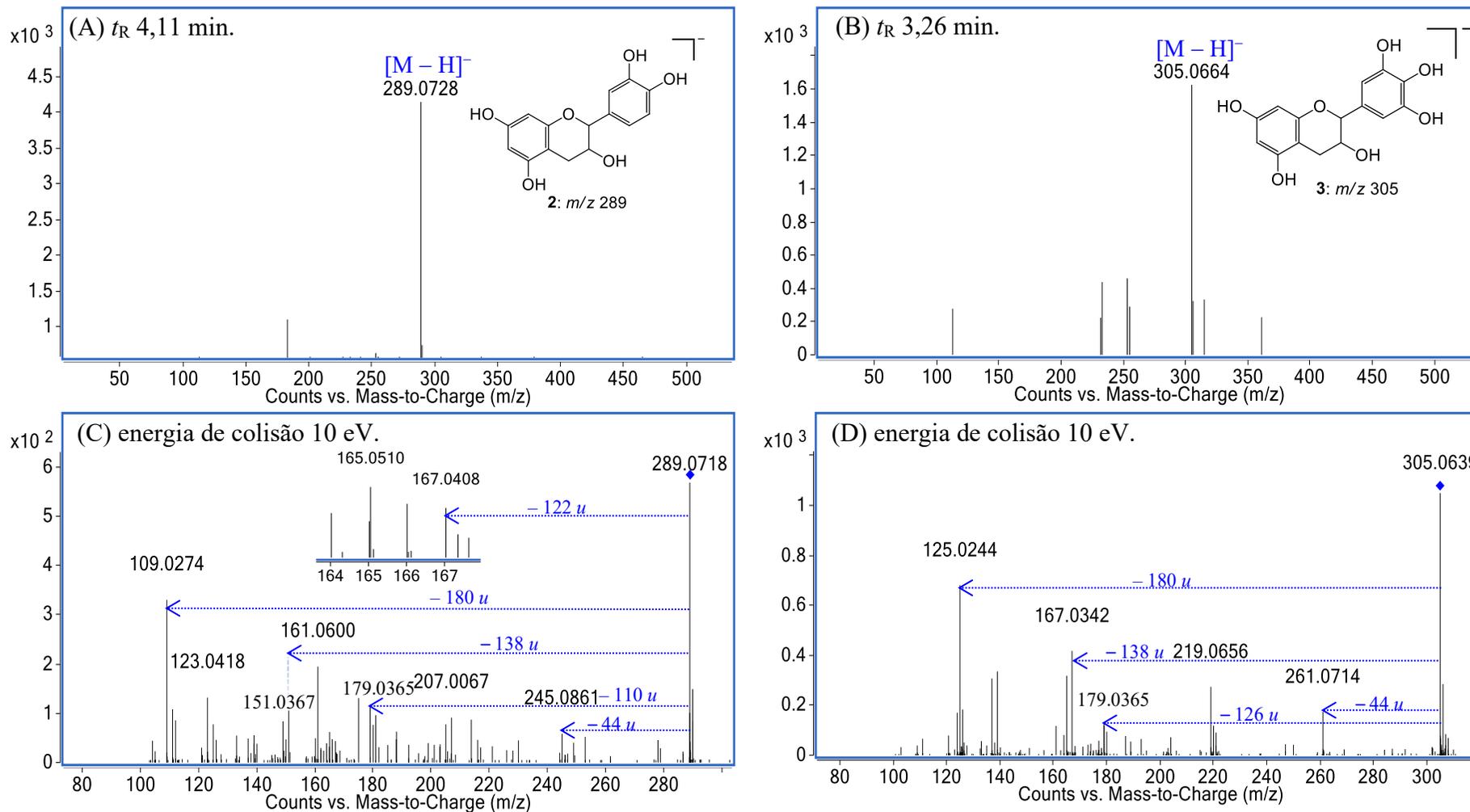


Fonte: autora.

Catequina ou *epicatequina* (**2**) (t_R 4,11 min) e galocatequina ou *epigalocatequina* (**3**) (t_R 3,26 min) apresentaram o pico referente ao íon molecular $[M - H]^-$ em

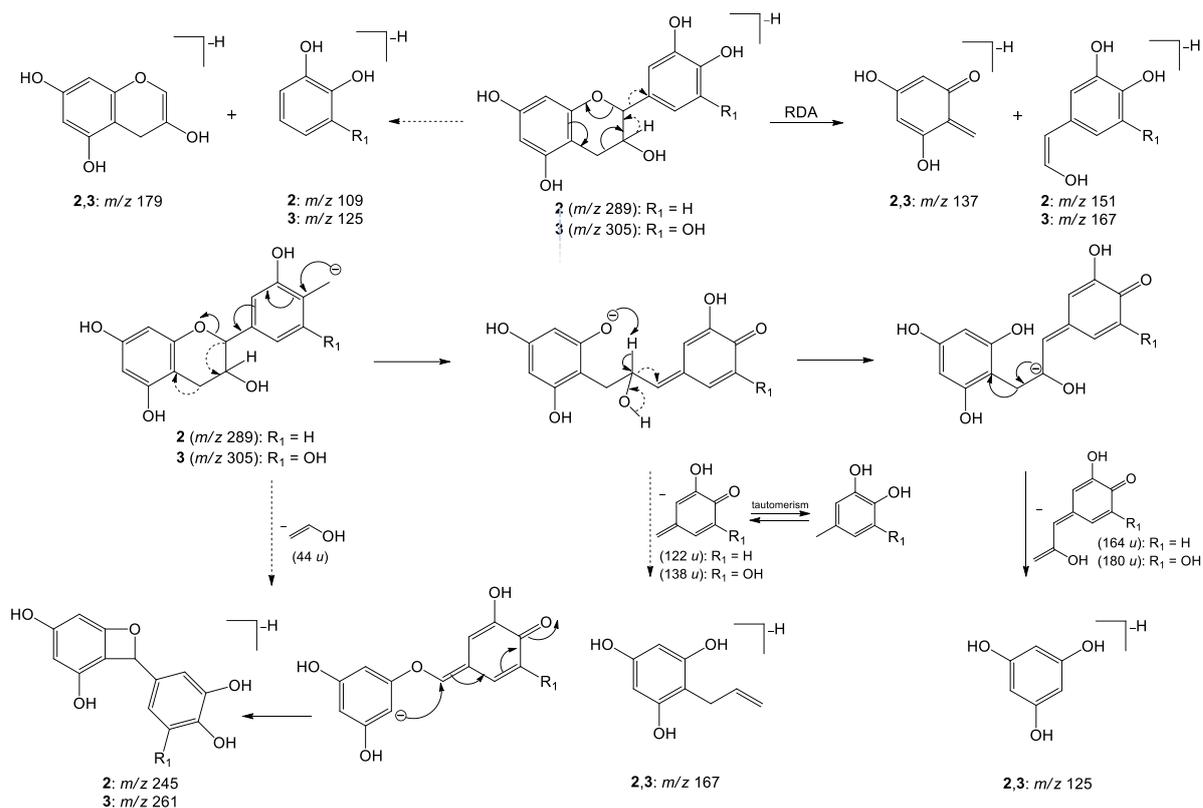
m/z 289,0728 e 305,0664, respectivamente (Figuras 24 A e B). Quando estes sinais foram submetidos a espectrometria de massas sequencial no modo negativo (Figuras 24 C e D) foram observados íons fragmentos em m/z 137 (para **2** e **3**), m/z 151 (para **2**) e m/z 167 (para **3**), que foram atribuídos à clivagem do anel C através de um mecanismo retro-Diels-Alder (RDA) (OLIVEIRA et al., 2018; RODRIGUES et al., 2007). Os fragmentos em m/z 179, 109 e 125 observados para **2** e **3**, para **2**, e para **3**, respectivamente, foram formados através da clivagem heterolítica entre os anéis B e C (OLIVEIRA et al., 2018). A clivagem heterolítica do anel C, promovida pelo íon fenóxido (anel B), leva a eliminação neutra de um grupo enol ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{OH}$, que através do equilíbrio ceto-enólico pode levar à etanal), para gerar os íons fragmentos em m/z 245 e 261 observados para **2** e **3**, respectivamente; cuja carga pode ficar retida no anel A ou dispersa no anel B através da formação de um novo heterociclo tensionado (OLIVEIRA et al., 2018). Adicionalmente, conforme proposto por Oliveira et al. (2018), a partir do íon fenóxido (m/z 289 (**2**) e 305 (**3**)) (anel B) pode ocorrer uma clivagem heterocíclica (anel C), com eliminação neutra de 164 e 180 u para **2** e **3**, respectivamente, levando a formação do íon fragmento em m/z 125 (Figura 25). Além disso, o intermediário originado na clivagem heterocíclica também pode gerar o íon fragmento em m/z 167, observado para **2** e **3** (Figura 25).

Figura 24 – EM-IES(–) em alta resolução dos compostos **2** (A), **3** (B) e seus respectivos EM/EM-IES(–) **2** (C) e **3** (D).



Fonte: autora.

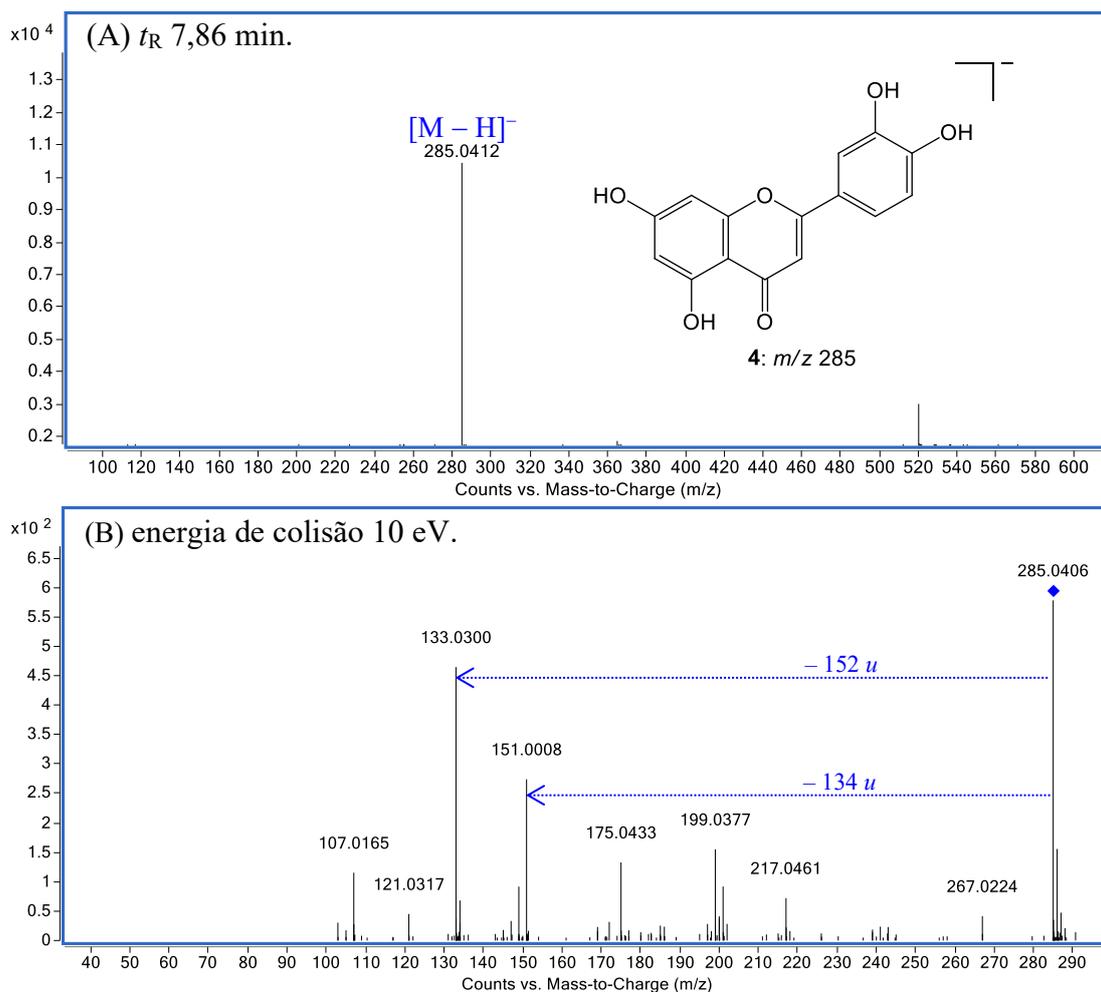
Figura 25 – Proposta de fragmentação para os flavan-3-ol **2** e **3** identificados por EM/EM-IES(-) na fração AcOEt das flores de *S. macranthera*.



Fonte: autora.

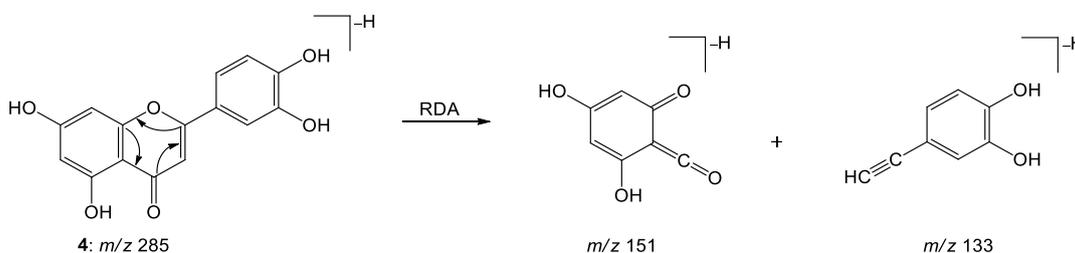
A flavona luteolina (**4**) (t_R 7,86 min) apresentou pico referente ao íon molecular $[M - H]^-$ em m/z 285,0412 (Figura 26 A). O EM/EM-IES(-) obtido da dissociação induzida por colisão deste íon com N_2 , gerou como principais fragmentos os íons em m/z 133 e 151 (Figura 26 B), que foram atribuídos a clivagem do anel C através de um mecanismo retro-Diels-Alder (RDA), como descrito em estudos anteriores com flavonoides (Figura 27) (FABRE et al., 2001; HUGHES et al., 2001; OLIVEIRA et al., 2018; RIJKE et al., 2006).

Figura 26 – EM-IES(-) em alta resolução do composto **4** (A) e seu respectivo EM/EM-IES(-) (B).



Fonte: autora.

Figura 27 – Proposta de fragmentação para a flavona **4** identificada por EM/EM-IES(-) na fração AcOEt das flores de *S. macranthera*.

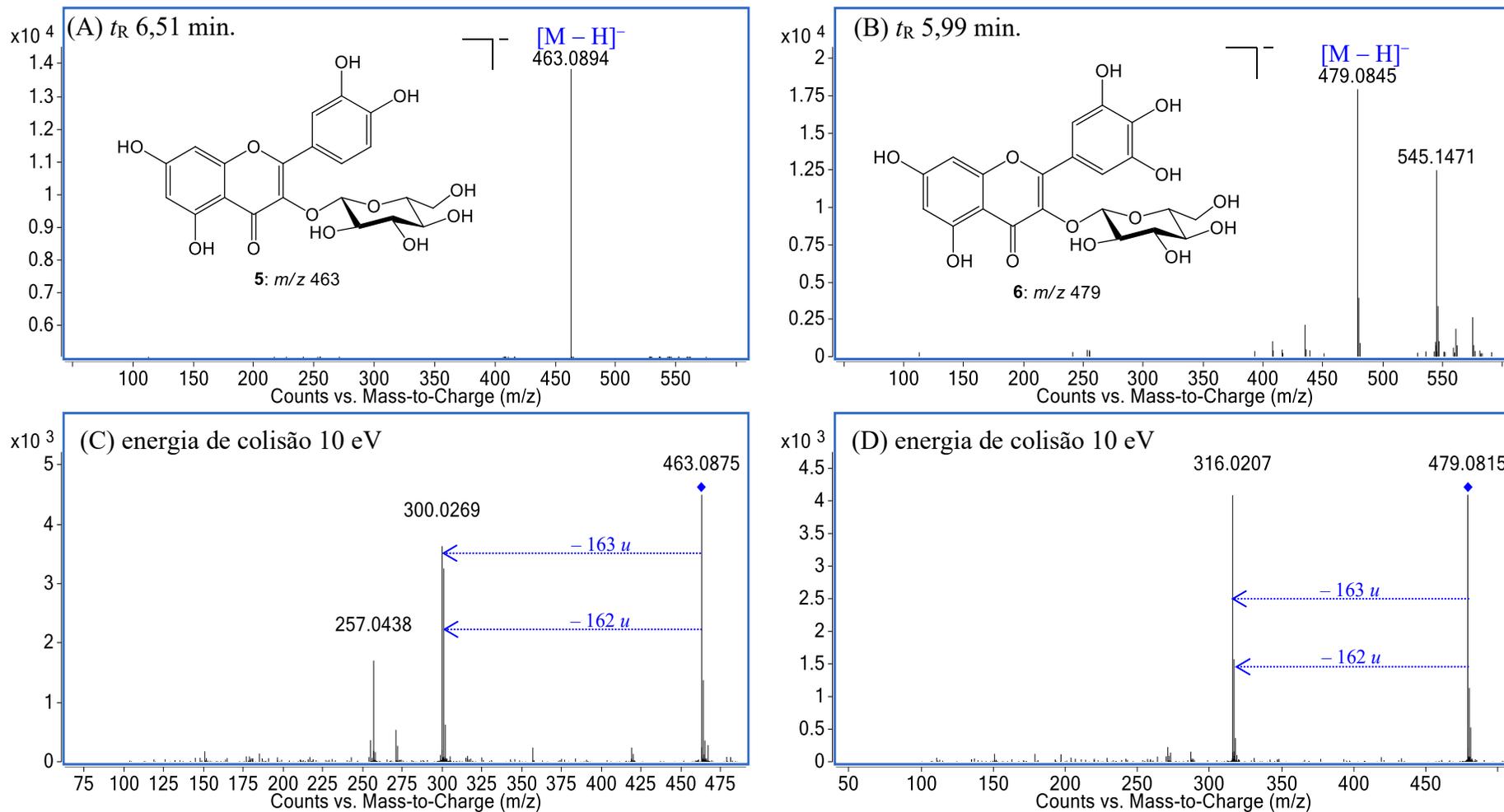


Fonte: autora.

Os sinais em m/z 463,0894 e 479,0845 $[M - H]^-$ foram relacionados aos flavonóis glicosilados **5** (t_R 6,51 min) e **6** (t_R 5,99 min), respectivamente (Figuras 28 A e B). Quando estes sinais foram submetidos a EM/EM (Figuras 28 C e D),

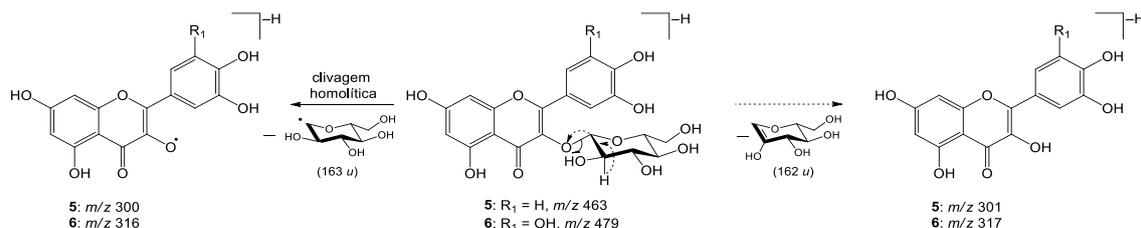
foram observados como principais fragmentos os íons em m/z 300 e 316, respectivamente, que foram atribuídos a clivagem homolítica entre a porção aglicona e o glicosídeo na posição C-3. A eliminação neutra da unidade monossacarídica (162 u) gerou os íons fragmentos em m/z 301 e 317 (Figura 29) (GONZALES et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2018).

Figura 28 – EM-IES(-) em alta resolução dos compostos **5** (A), **6** (B) e seus respectivos EM/EM-IES(-) **5** (C) e **6** (D).



Fonte: autora.

Figura 29 – Proposta de fragmentação para os flavonóis **5** e **6** identificados por EM/EM-IES(-) na fração AcOEt das flores de *S. macranthera*.

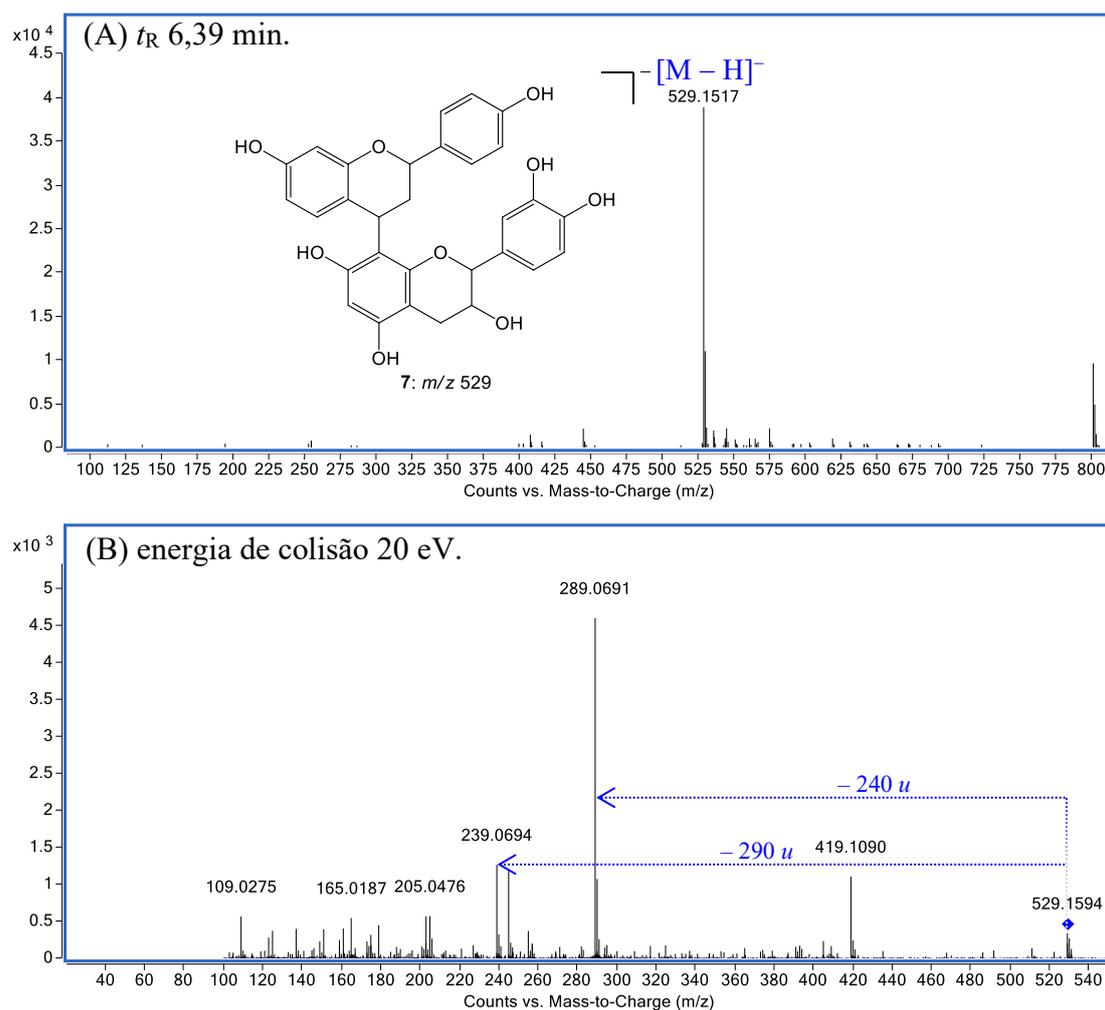


Fonte: autora.

Os sinais de m/z 529 (**7**, t_R 6,39 min, m/z 529,1517) (Figura 30 A), 545 (**8a**, t_R 5,66 min, m/z 545,1464; **8b**, t_R 5,79 min, m/z 545,1471; **9a**, t_R 5,88 min, m/z 545,1466; e **9b**, t_R 5,93 min, m/z 545,1461) (Figuras 31 A e B, e 32 A e B), 561 (**10a**, t_R 5,23 min, m/z 561,1416; **10b**, t_R 5,29 min, m/z 561,1419; e **10c**, t_R 5,39 min, m/z 561,1423) (Figuras 33 A e B, e 34 A), e 577 (**11a**, t_R 4,33 min, m/z 577,1360; e **11b**, t_R 4,44 min, m/z 577,1363) (Figuras 35 A e B) foram atribuídos a moléculas desprotonadas $[M - H]^-$ de proantocianidinas diméricas (Tabela 9). Quando estes sinais foram submetidos à análise de EM/EM (Figuras 30–35), os principais fragmentos foram originados a partir da quebra da ligação interflavana (C4–C8), entre os monômeros, através de um mecanismo quinona metídeo (QM), para formar os íons referentes aos monômeros da unidade de extensão em m/z 239 (**7–8b**), 255 (**9a–10c**), e 271 (**11a** e **11b**) e da unidade terminal em m/z 289 (**7**, **9a** e **9b**) e 305 (**8a**, **8b** e **10a–11b**), que permitiu definir as duas unidades monoméricas (Figura 36). Adicionalmente, foram observados íons fragmentos em m/z 109 (**7**, **9a** e **9b**), 125 (**8a**, **8b** e **10a–11b**), e 179 (**7–11b**), que foram atribuídos à clivagem heterolítica entre os anéis B e C da unidade terminal. Outros fragmentos típicos de proantocianidinas diméricas foram gerados pela clivagem através do mecanismo RDA, com perda de todo o anel B juntamente com a parte C2–C3 do anel C, dando origem aos íons fragmentos em m/z 425 (**8a**, **8b** e **10a–11b**) e 409 (**7**, **9a** e **9b**); que após subsequente eliminação de água gerou os fragmentos em m/z 407 e 391,

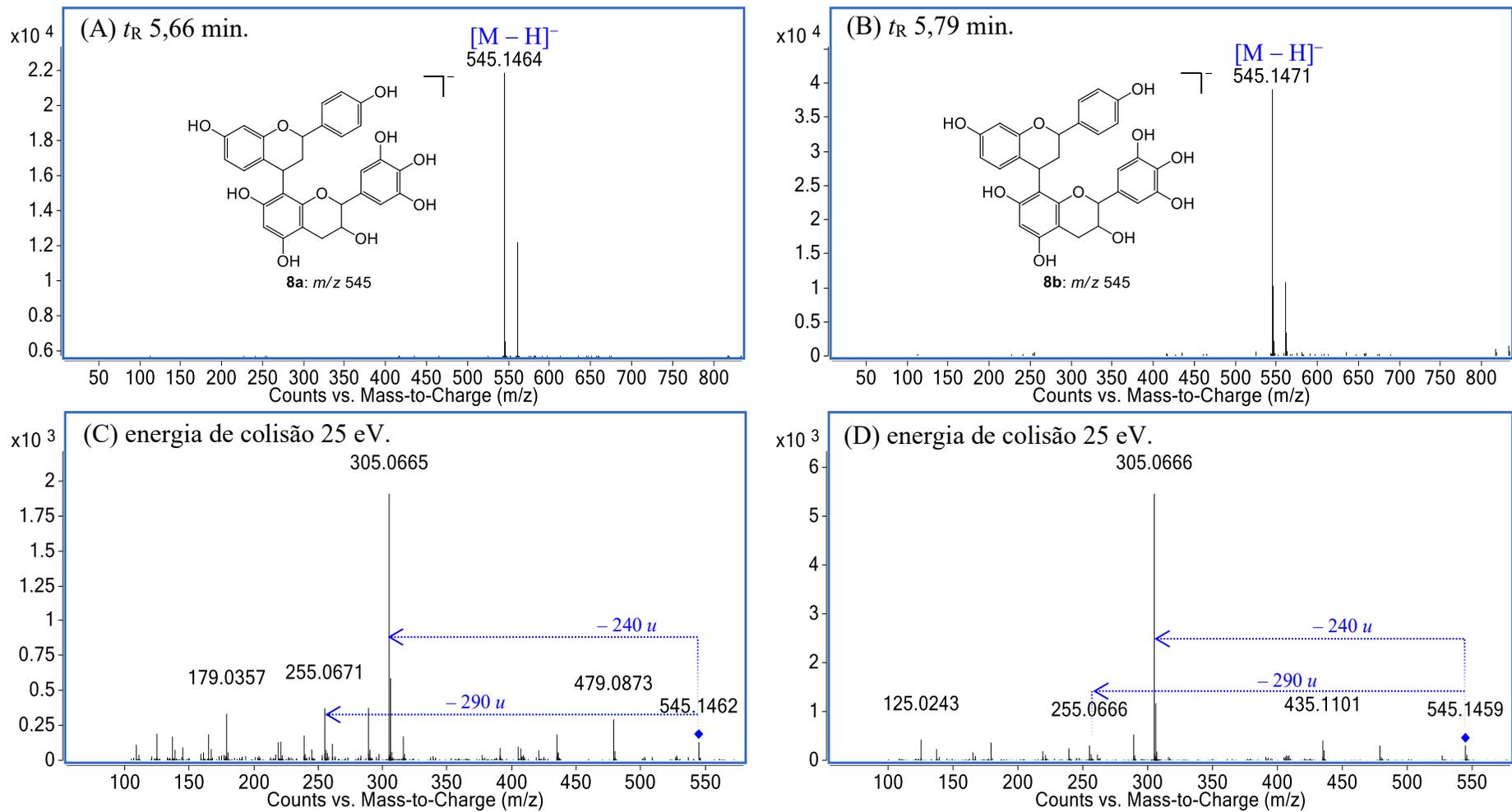
respectivamente. Também foram observados os íons fragmentos em m/z 419 (7), 435 (8a–9b), 451 (10a–10c), e 467 (11a e 11b), gerados a partir da fissão heterocíclica do anel (FHA) C, da unidade de extensão, e subsequente perda do anel A (110 u) (Figura 36) (JAISWAL, JAYASINGHE, KUHNERT, 2012; LIN et al., 2014).

Figura 30 – EM-IES(-) em alta resolução do composto 7 (A) e seu respectivo EM/EM-IES (-) (B).



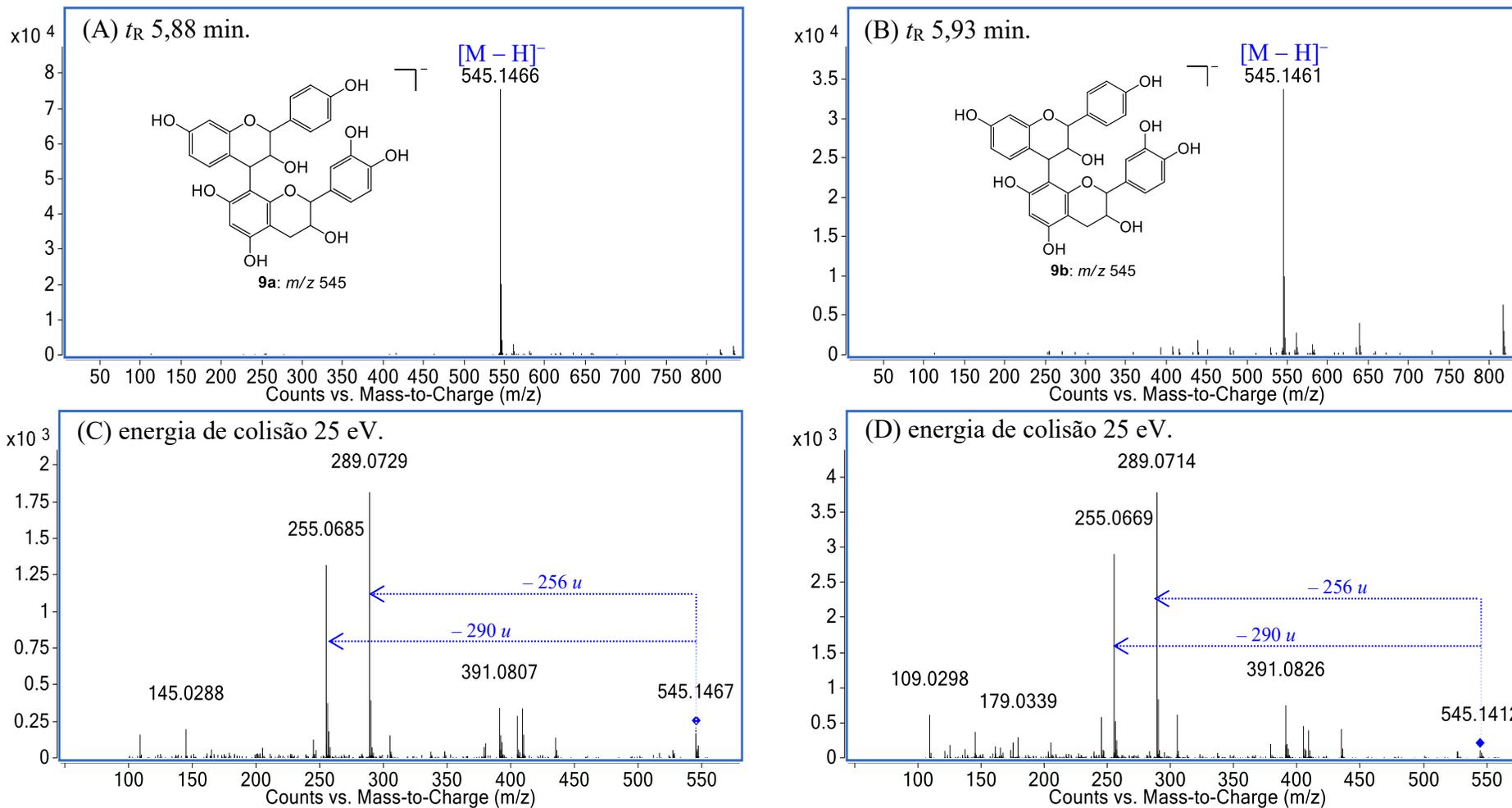
Fonte: autora.

Figura 31 – EM-IES(-) em alta resolução dos compostos **8a** (A), **8b** (B) e seus respectivos EM/EM-IES (-) **8a** (C) e **8b** (D).



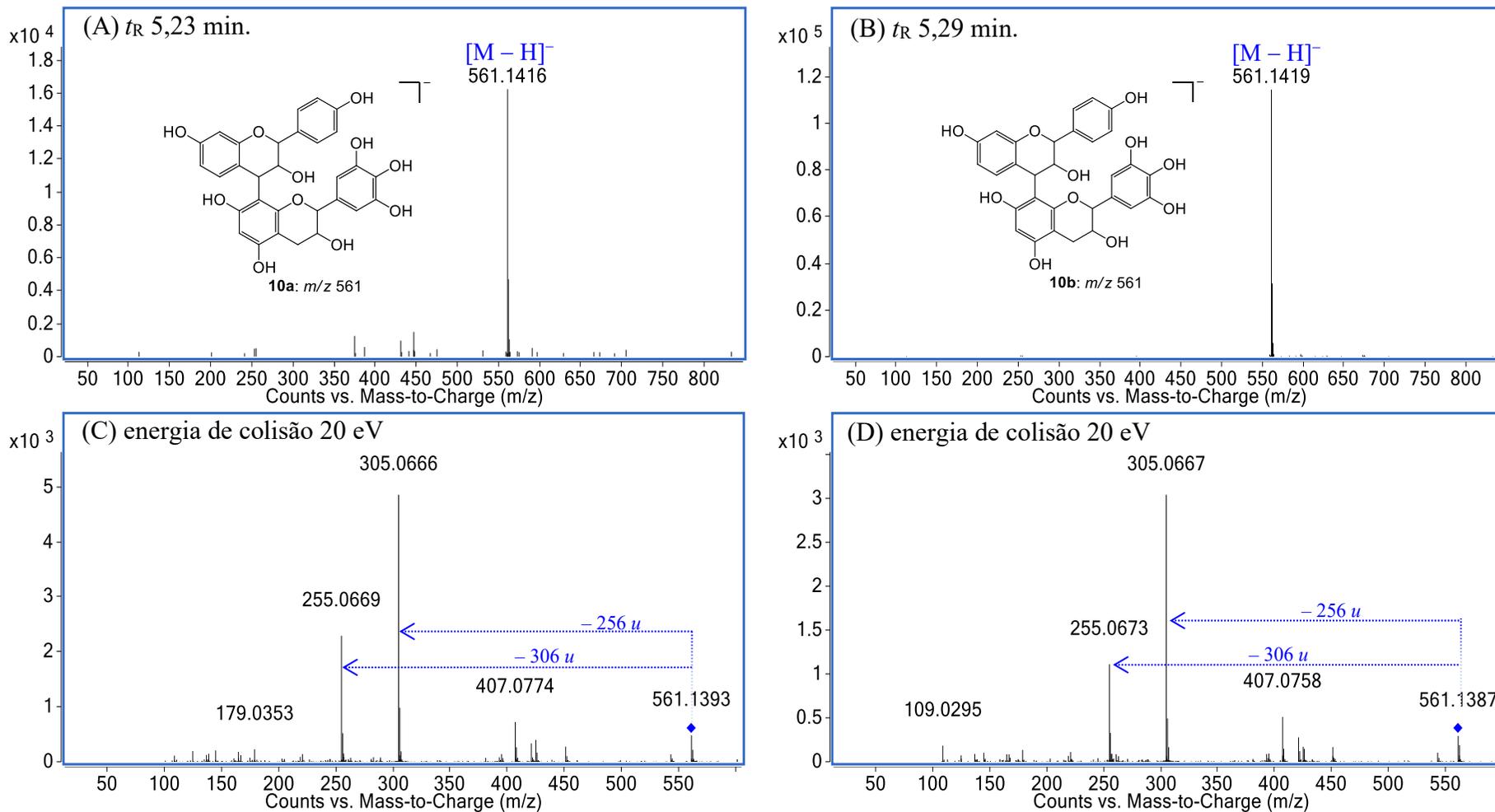
Fonte: autora.

Figura 32 – EM-IES(-) em alta resolução dos compostos **9a** (A), **9b** (B) e seus respectivos EM/EM-IES (-) **9a** (C) e **9b** (D).



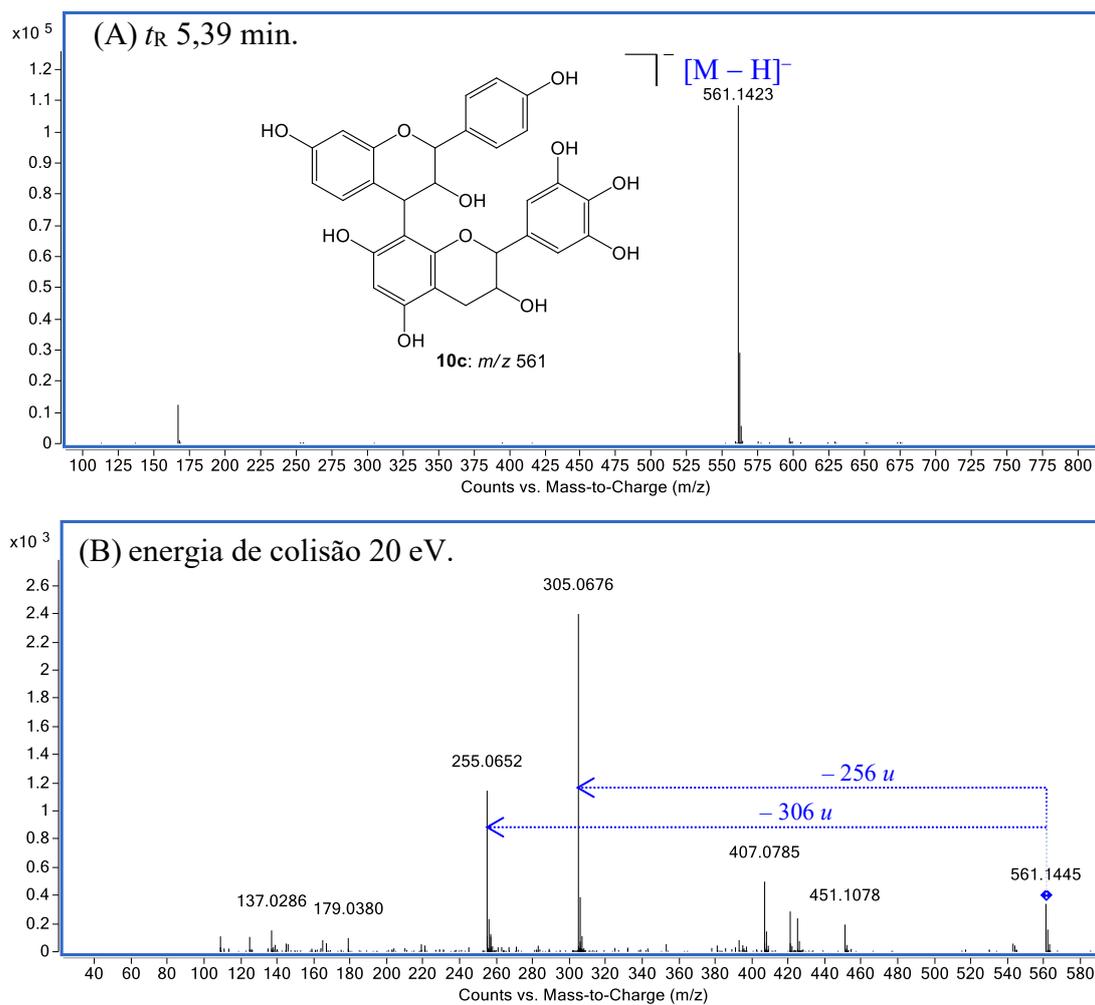
Fonte: autora.

Figura 33 – EM-IES(–) em alta resolução dos compostos **10a** (A), **10b** (B) e seus respectivos EM/EM-IES (–) **10a** (C) e **10b** (D).



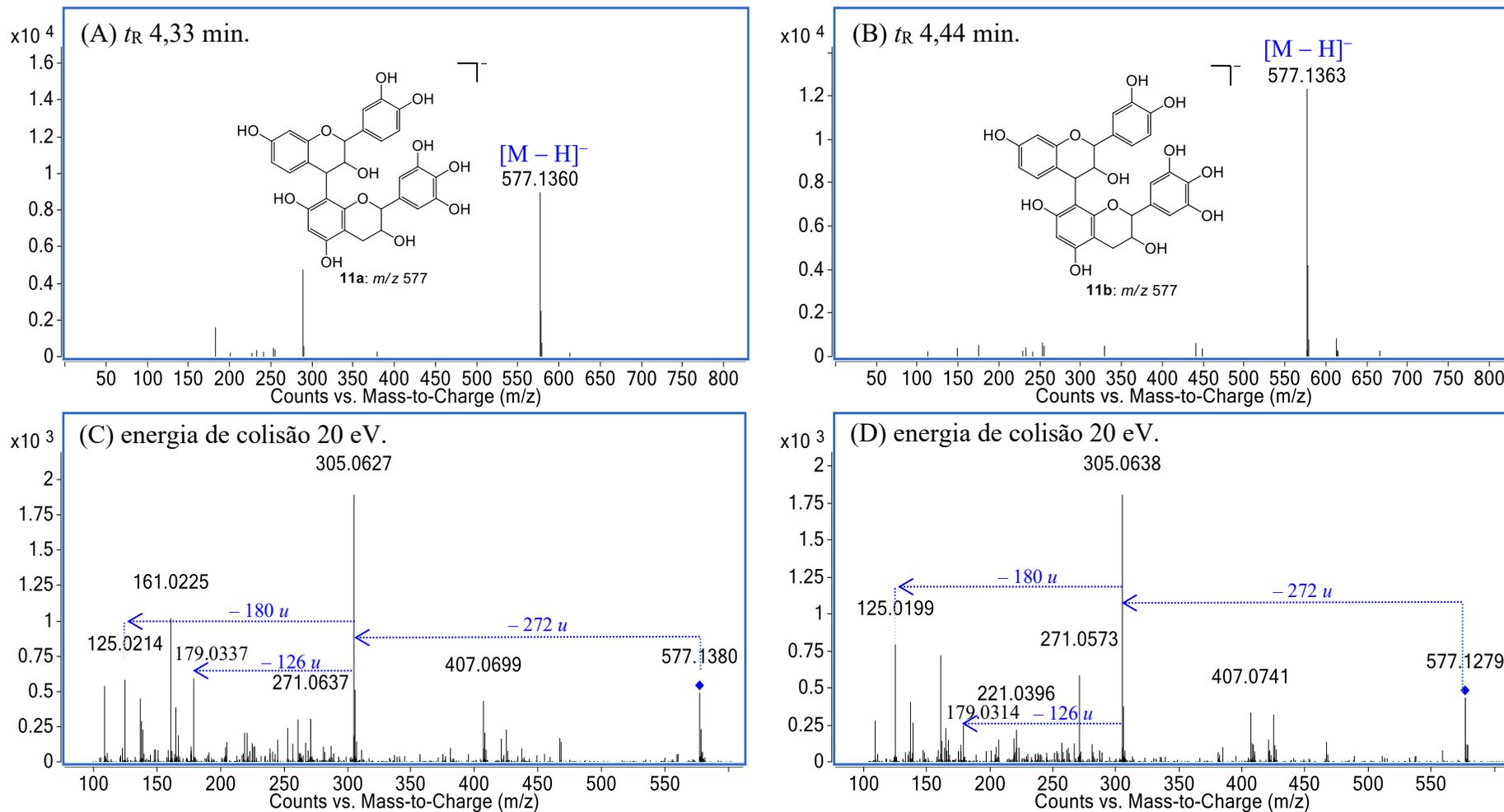
Fonte: autora.

Figura 34 – EM-IES(-) em alta resolução do composto **10c** (A) e seu respectivo EM/EM-IES (B).



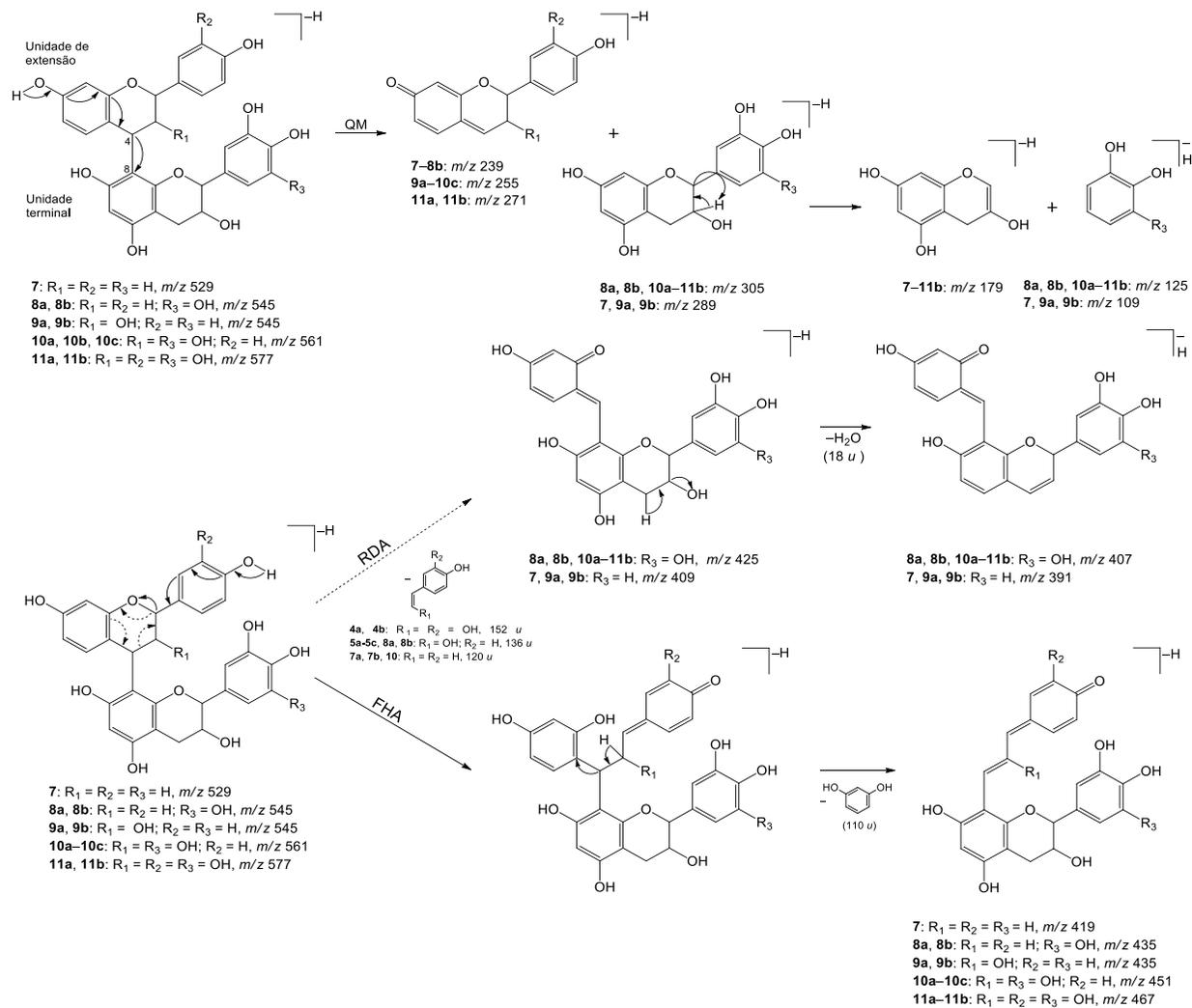
Fonte: autora.

Figura 35 – EM-IES(–) em alta resolução dos compostos **11a** (A), **11b** (B) e seus respectivos EM/EM-IES **11a** (C) e **11b** (D).



Fonte: autora.

Figura 36 – Proposta de fragmentação para os dímeros **7–11b** identificados por EM/EM-IES(-) na fração AcOEt das flores de *S. macranthera*.

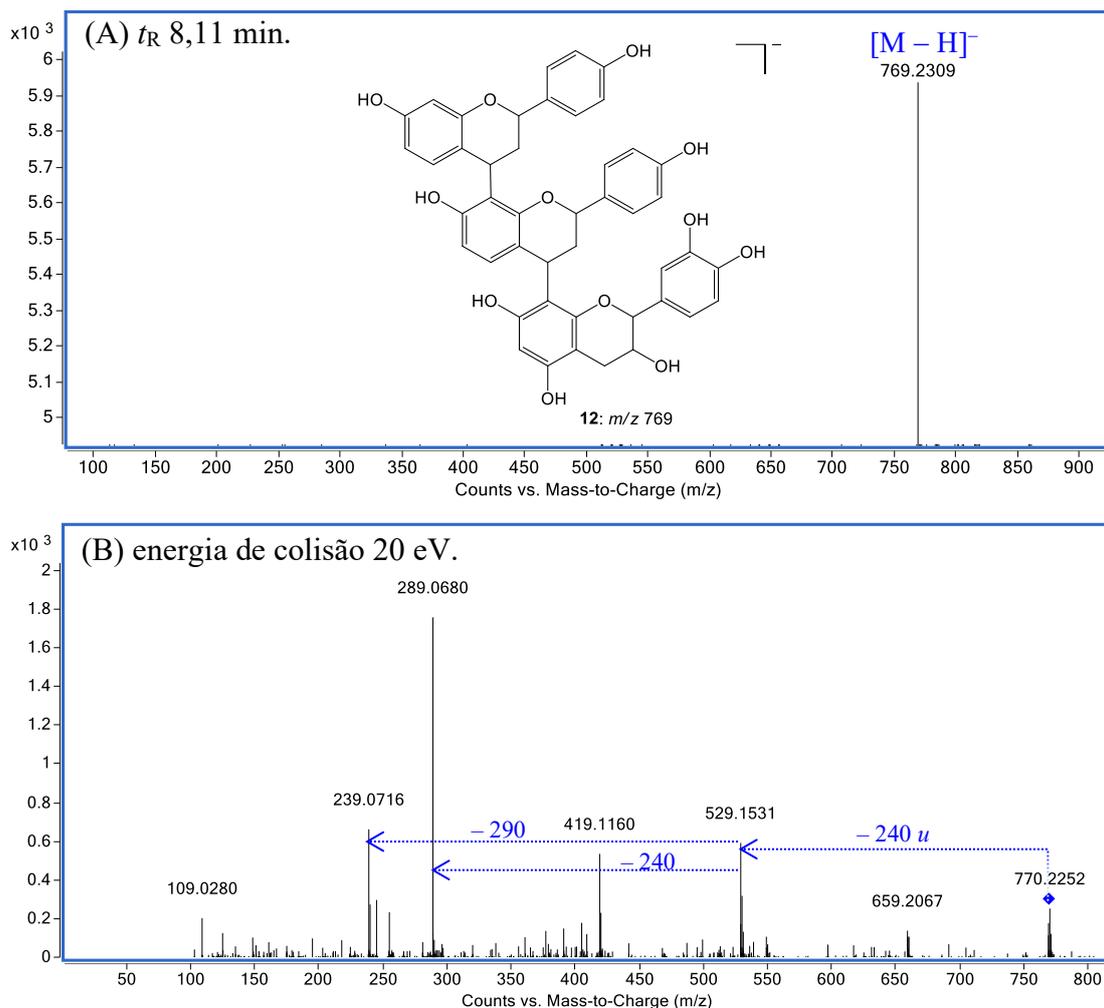


Fonte: autora.

Um total de oito proantocinidinas contendo três unidades flavan-3-ol condensadas (trímeros), também foram identificadas (**12–18**). Os principais fragmentos observados, derivados das clivagens QM e FHA permitiram identificar os monômeros e a ordem de conexão nos trímeros.

O composto identificado no t_R 8,11 min (**12**) apresentou o sinal referente a molécula desprotonada em m/z 769,2309 $[M - H]^-$ (Figura 37 A). Quando este sinal foi submetido a EM/EM, foram observados como principais fragmentos os íons em m/z 529, 419, 289 e 239 (Figura 37 B). A quebra da ligação (C4–C8) entre os monômeros, através de um mecanismo QM, gerou os íons em m/z 529 $[M - H - 240]$ e m/z 239, que permitiu definir a unidade de extensão como sendo cassiaflavana. Um segundo mecanismo QM, através da quebra da ligação (C4'–C8') gerou os íons fragmentos em m/z 289 $[M - H - 240 - 240]$ e m/z 239, que caracteriza a presença de uma segunda unidade de cassiaflavana e uma unidade de catequina ou *epicatequina*, respectivamente. O íon fragmento em m/z 419 foi atribuído a eliminação neutra de 110 *u* (perda do anel A) a partir do íon de m/z 529, através de um mecanismo FHA (JAISWAL, JAYASINGHE, KUHNERT, 2012; LIN et al., 2014; SOBEH et al., 2017) (Figura 42).

Figura 37 – EM-IES(-) em alta resolução do composto **12** (A) e seu respectivo EM/EM-IES(-) (B).

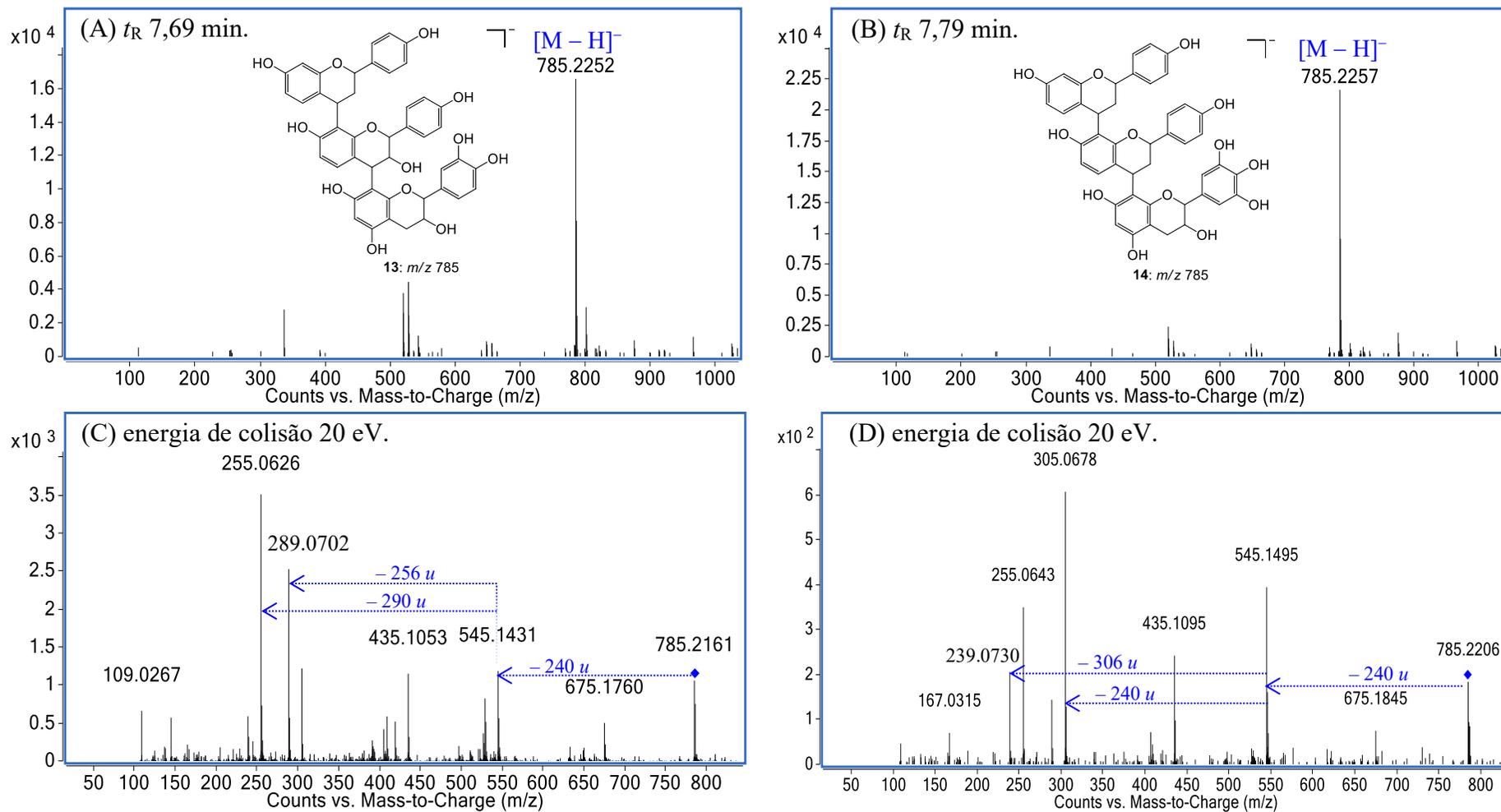


Fonte: autora.

Dois picos apresentaram os sinais referentes as moléculas desprotonadas em m/z 785 $[M - H]^-$ (**13**, t_R 7,69, m/z 785,2252; e **14**, t_R 7,79, m/z 785,2257) (Figuras 38 A e B). Quando estes sinais foram submetidos a EM/EM (Figura 38 C e D), ambos apresentaram o íon fragmento em m/z 545 $[M - H - 240]$, gerado a partir do mecanismo QM, que permitiu identificar a unidade de extensão como sendo o monômero cassiaflavana. Uma segunda quebra da ligação interflavan ($C4'-C8'$), gerou os fragmentos em m/z 289 $[M - H - 240 - 256]$ e 255 $[M - H - 240 - 290]$ para **13** e 305 $[M - H - 240 - 240]$ e 239 $[M - H - 240 - 306]$ para **14**, que permitiu definir as outras duas unidades monoméricas como sendo guibourtinidol e catequina ou *epicatequina* (**13**) e cassiaflavana e galocatequina ou *epigalocatequina* (**14**). Também foi observado para ambos os compostos, o íon fragmento em m/z 435 gerado a partir do mecanismo FHA, o

que indica que a unidade terminal pode ser a mesma para os dois compostos (JAISWAL, JAYASINGHE, KUHNERT, 2012; LIN et al., 2014; SOBEH et al., 2017) (Figura 42).

Figura 38 – EM-IES(–) em alta resolução dos compostos **13** (A), **14** (B) e seus respectivos EM/EM-IES(–) **13** (C) e **14** (D).



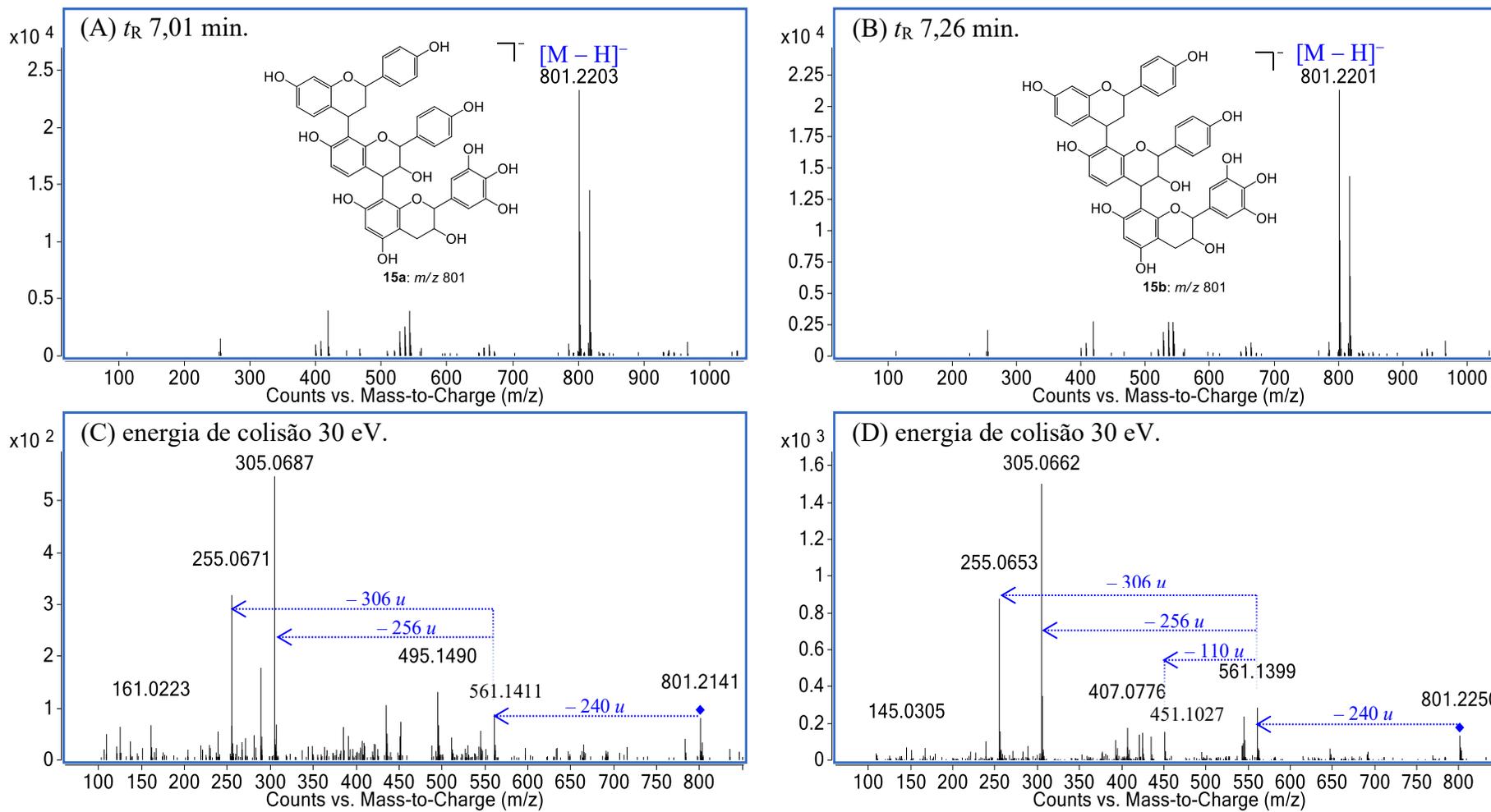
Fonte: autora.

Dois picos apresentaram os sinais referentes as moléculas desprotonadas em m/z 801 $[M - H]^-$ (**15a**, t_R 7,01 min, m/z 801,2203; e **15b**, t_R 7,26 min, m/z 801,2201) (Figuras 39 A e B) e íons fragmentos principais em m/z 561 $[M - H - 240]$, 305 $[M - H - 240 - 256]$ e 255 $[M - H - 240 - 306]$ (Figuras 39 C e D); que permitiu identificar os compostos como sendo cassiaflavana-guibourtinidol-galocatequina (Figura 42). Um terceiro pico também com sinal em m/z 801 $[M - H]^-$ (**16**, t_R 7,37 min, m/z 801,2206) (Figura 40 A), apresentou os principais íons fragmentos em m/z 545 $[M - H - 256]$, 289 $[M - H - 256 - 256]$ e 255 $[M - H - 256 - 290]$ (Figura 40 B) e foi identificado como guibourtinidol-guibourtinidol-catequina (SOBEH et al., 2017).

O composto identificado no t_R 6,62 min (**17**) apresentou o sinal referente a molécula desprotonada em m/z 817,2148 $[M - H]^-$ (Figura 41 A). Quando este sinal foi submetido a EM/EM, foram observados como principais fragmentos os íons em m/z 561, 305 e 255 (Figura 41 C), referentes as duas clivagens das ligações interflavan (C4–C8 e C4'–C8') através do mecanismo QM; além do íon em m/z 451 gerado a partir do mecanismo FHA (Figura 42) (JAISWAL, JAYASINGHE, KUHNERT, 2012; LIN et al., 2014; SOBEH et al., 2017).

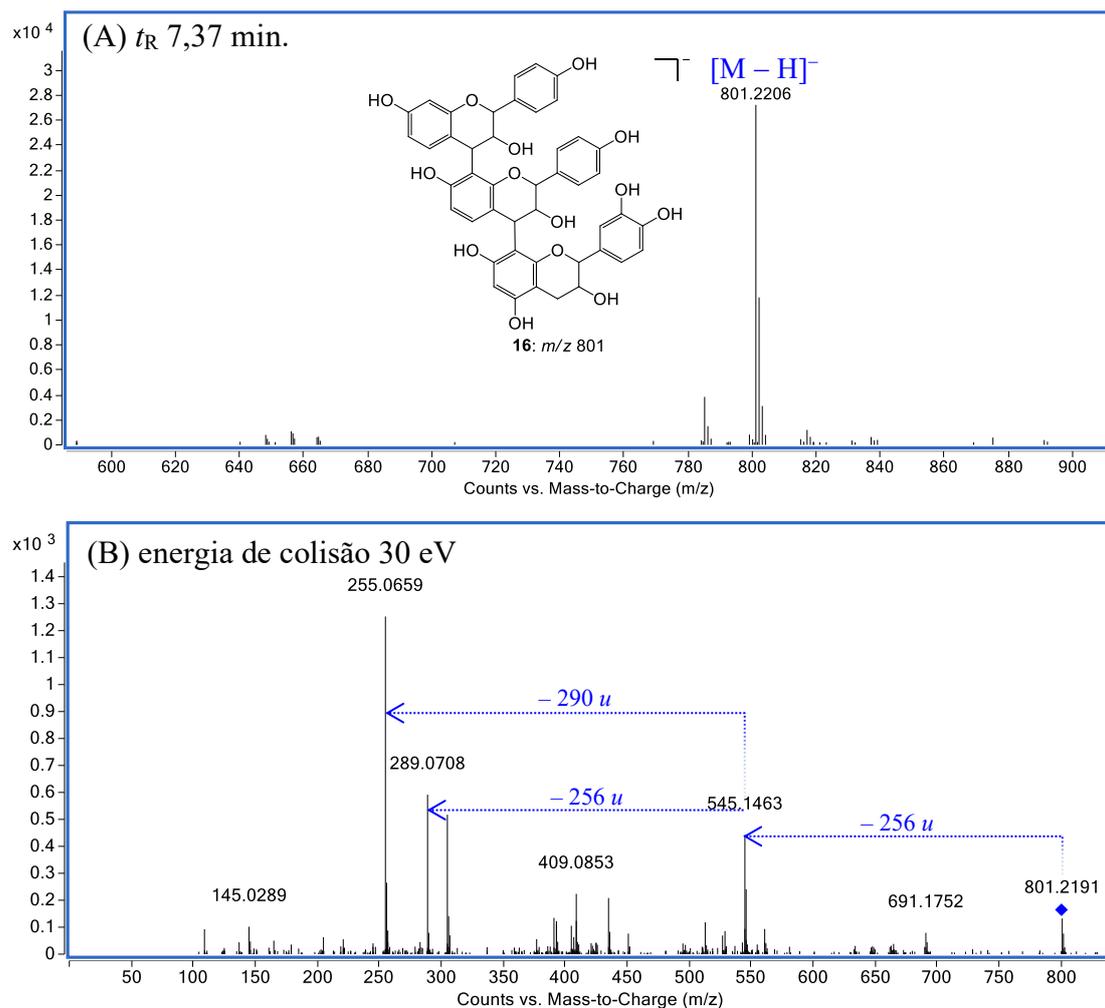
O composto identificado no t_R 5,66 min (**18**) apresentou o sinal referente a molécula desprotonada em m/z 833,2107 $[M - H]^-$ (Figura 41 B) e principais íons fragmentos em m/z 577, 305 e 271 (Figura 41 D), referentes as duas clivagens das ligações interflavan (C4–C8 e C4'–C8') através do mecanismo QM; além do íon em m/z 451, atribuído a perda de 126 u através do mecanismo FHA (Figura 42) que permitiu identificar o compostos como sendo o guibourtinidol-afzalequina-galocatequina (JAISWAL, JAYASINGHE, KUHNERT, 2012; LIN et al., 2014; SOBEH et al., 2017).

Figura 39 – EM-IES(–) em alta resolução dos compostos **15a** (A), **15b** (B) e seus respectivos EM/EM-IES(–) **15a** (C) e **115b** (D).



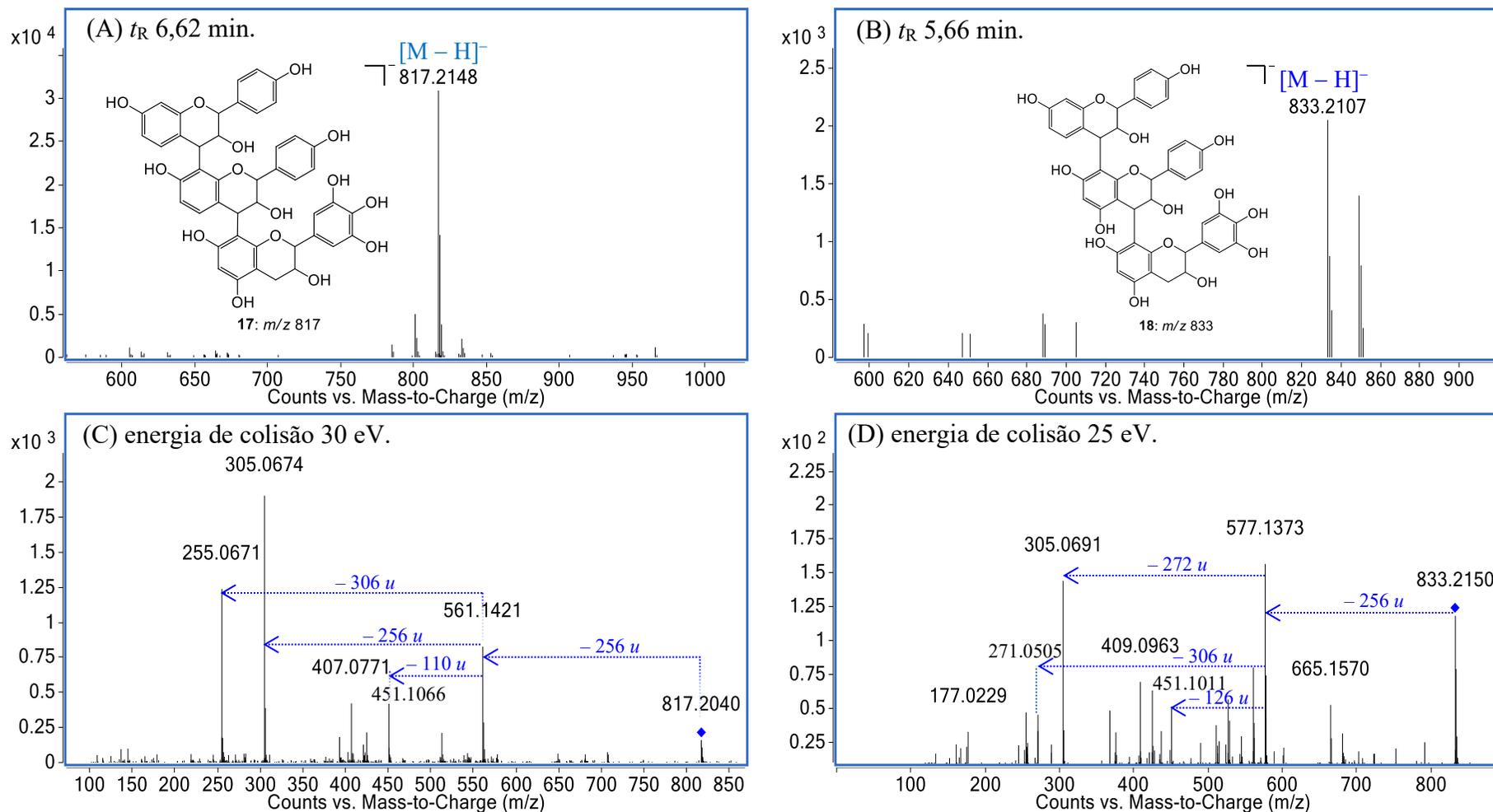
Fonte: autora.

Figura 40 – EM-IES(-) em alta resolução do composto **16** (A) e seu respectivo EM/EM-IES(-) (B).



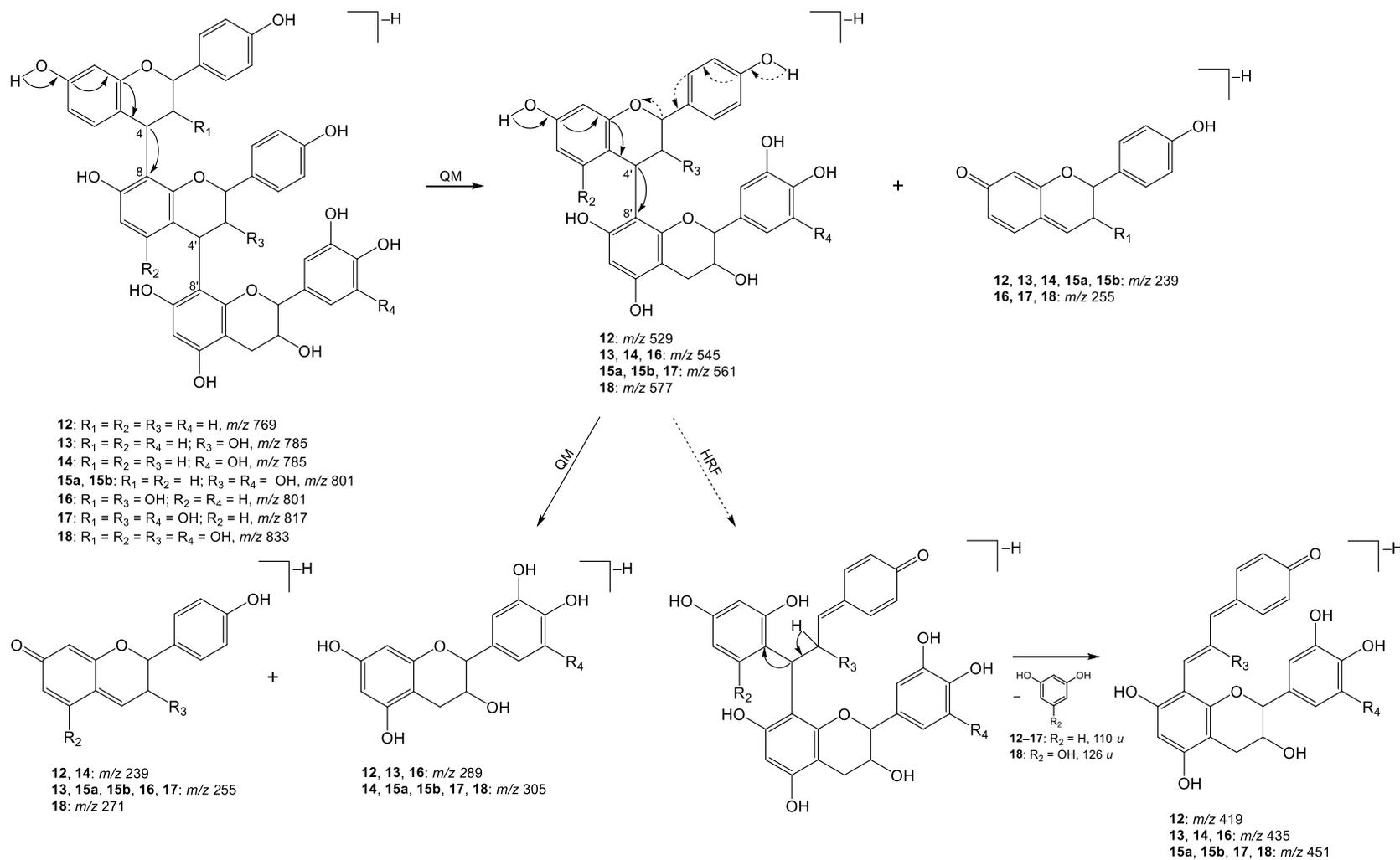
Fonte: autora.

Figura 41 – EM-IES(–) em alta resolução dos compostos **17** (A), **18** (B) e seus respectivos EM/EM-IES(–) **17** (C) e **18** (D).



Fonte: autora.

Figura 42 – Proposta de fragmentação para os trimeros **12–18** identificados por EM/EM-IES(–) na fração AcOEt das flores de *S. macranthera*.



Fonte: autora.

Tabela 9 – Proposta da composição química da fração AcOEt das flores de *S. macranthera* identificados por CLAE-EM/EM-IES(-).

t_R (min)	[M – H] ⁻	[M – H] ⁻ Exata	Fórmula molecular	Δ^a (ppm)	Fragmentos EM/EM	Compostos identificados	Referência
0,65	191,0569	191,0561	C ₇ H ₁₂ O ₆	4,2	173, 149, 127, 109	ácido quínico (1)	MASIKE et al., 2017
3,26	305,0664	305,0667	C ₁₅ H ₁₄ O ₇	-1,0	261, 219, 165, 139, 125, 111	galocatequina ^b (3)	METLIN, 2018; LIN et al., 2014.
4,11	289,0728	289,0718	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	3,4	245, 139, 123, 109	catequina ^b (2)	OLIVEIRA et al., 2018; JIN et al., 2007; SOBEH et al., 2018
4,33	577,1360	577,1351	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₂	1,6	407, 305, 179, 161, 137, 125	fisetinidol-galocatequina ^b (11a)	LIN et al., 2014
4,44	577,1363	577,1351	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₂	2,1	407, 305, 179, 161, 137, 125	fisetinidol-galocatequina ^b (11b)	LIN et al., 2014
5,23	561,1416	561,1402	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₁	2,5	407, 305, 255, 179, 109	guibourtinidol-galocatequina ^b (10a)	SOBEH et al., 2017
5,29	561,1419	561,1402	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₁	3,0	407, 305, 255, 179, 109	guibourtinidol-galocatequina ^b (10b)	SOBEH et al., 2017
5,39	561,1423	561,1402	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₁	3,7	407, 305, 255, 179, 109	guibourtinidol-galocatequina ^b (10c)	SOBEH et al., 2017
5,66	833,2107	833,2087	C ₄₅ H ₃₈ O ₁₆	2,4	577, 561, 407, 305, 255, 161	guibourtinidol-afzelequina-galocatequina ^b (18)	SOBEH et al., 2017
5,66	545,1464	545,1453	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₀	2,0	479, 435, 305, 255, 179, 125	cassiaflavana-galocatequina ^b (8a)	COETZEE et al., 2000; SOBEH et al., 2017
5,79	545,1471	545,1453	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₀	3,3	479, 435, 305, 255, 179, 125	cassiaflavana-galocatequina ^b (8b)	COETZEE et al., 2000; SOBEH et al., 2017
5,88	545,1466	545,1453	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₀	2,4	435, 409, 391, 289, 255, 145, 109	guibourtinidol-catequina ^b (9a)	SOBEH et al., 2017; SOBEH et al., 2018
5,93	545,1461	545,1453	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₀	1,5	435, 409, 391, 289, 255, 145, 109	guibourtinidol-catequina ^b (9b)	SOBEH et al., 2017; SOBEH et al., 2018
5,99	479,0845	479,0831	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₃	2,9	316, 287, 271	miricetina-3- <i>O</i> -glucosideo (6)	YANG et al., 2014
6,39	529,1517	529,1504	C ₃₀ H ₂₆ O ₉	2,4	419, 289, 245, 239, 205, 165, 109	(<i>ent</i>)-cassiaflavana-catequina ^b (7)	SOBEH et al., 2018
6,51	463,0894	463,0882	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	2,6	300, 301, 271, 257	quercetina-3- <i>O</i> -glucosideo (5)	GONZALES et al., 2014

Tabela 9 – continuação

t_R (min)	$[M - H]^-$	$[M - H]^-$ Exata	Fórmula molecular	Δ^a (ppm)	Fragmentos EM/EM	Compostos identificados	Referência
6,62	817,2148	817,2138	C ₄₅ H ₃₈ O ₁₅	1,2	561, 305, 255	guibourtinidol-guibourtinidol-galocatequina ^b (17)	SOBEH et al., 2017
6,86 ^c	255,0659	–	–	–	237, 211, 145, 133, 109	–	
7,01	801,2203	801,2189	C ₄₅ H ₃₈ O ₁₄	1,7	561, 305, 255	(<i>ent</i>)-cassiaflavana-guibourtinidol-galocatequina ^b (15a)	SOBEH et al., 2017
7,26	801,2201	801,2189	C ₄₅ H ₃₈ O ₁₄	1,5	561, 305, 255	(<i>ent</i>)-cassiaflavana-guibourtinidol-galocatequina ^b (15b)	SOBEH et al., 2017
7,37	801,2206	801,2189	C ₄₅ H ₃₈ O ₁₄	2,1	545, 289, 255	guibourtinidol-guibourtiniol-catequina ^b (16)	SOBEH et al., 2017
7,69	785,2252	785,2240	C ₄₅ H ₃₈ O ₁₃	1,5	675, 545, 435, 289, 255	(<i>ent</i>)-cassiaflavana-guibourtinidol-catequina ^b (13)	SOBEH et al., 2017
7,79	785,2257	785,2240	C ₄₅ H ₃₈ O ₁₃	2,2	675, 545, 435, 305, 289, 255	(<i>ent</i>)-cassiaflavana-(<i>ent</i>)-cassiaflavana-galocatequina ^b (14)	SOBEH et al., 2017
7,86	285,0412	285,0405	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	2,4	267, 217, 199, 175, 151, 133, 121, 107	luteolina (4)	FABRE et al., 2001
8,11	769,2309	769,2291	C ₄₅ H ₃₈ O ₁₂	2,3	529, 419, 289, 239, 109	(<i>ent</i>)-cassiaflavana-(<i>ent</i>)-cassiaflavana-catequina ^b (12)	SOBEH et al., 2017
8,31 ^c	609,1837	–	–	–	285	–	
8,91 ^c	351,0197	–	–	–	271, 256	–	
10,67 ^c	365,0353	–	–	–	285, 270	–	

^aErro relativo. ^bRepresenta diferentes formas estereoisoméricas (ex.: catequina, pode ser catequina ou *epicatequina*). ^cCompostos não identificados.

4.7 – Triagem química dos extratos das diferentes espécies de *Senna* e *Cassia*

A fim de obter o perfil metabólico das diferentes espécies de *Senna* e *Cassia*, os extratos etanólicos das flores e folhas de 10 espécies diferentes foram submetidos à análise por espectrometria de massas sequencial (EM/EM), em alta resolução, nos modos positivo e negativo, como descrito no item 3.6.7.

Tendo em vista que em estudos anteriores foi relatado que nas flores de *Senna spectabilis* há elevada concentração de alcaloides (VIEGAS JÚNIOR et al., 2004, PIVATTO et al., 2005), a primeira análise realizada foi com relação a presença desses metabólitos nas flores e folhas das demais espécies de *Senna* e *Cassia*.

A análise dos espectros de massas em alta resolução (Figuras 43–52) permitiu observar que os extratos etanólicos de *S. spectabilis* (flores e folhas) apresentam vários íons com massas pares $[M + H]^+$, o que pode indicar a presença de substâncias com número ímpar de nitrogênio (alcaloides). Foram observados os íons de m/z 298,2748, m/z 300,2899, m/z 314,2688, m/z 316,2853, m/z 326,3058, m/z 328,3213, m/z 340,2848, m/z 342,3006, 368,3158, m/z 472,3422 e m/z 502,3530 $[M + H]^+$, calculados para $C_{18}H_{36}NO_2$ (Δ 0,7), $C_{18}H_{37}NO_2$ (Δ 0,7), $C_{18}H_{35}NO_3$ (Δ -0,6), $C_{18}H_{37}NO_3$ (Δ 2,2), $C_{20}H_{40}NO_2$ (Δ 1,2), $C_{20}H_{41}NO_2$ (Δ 0,9), $C_{20}H_{37}NO_3$ (Δ 0,6), $C_{20}H_{40}NO_3$ (Δ 0,9), $C_{22}H_{42}NO_3$ (Δ 0,3), $C_{29}H_{45}NO_4$ (Δ 0,2) e $C_{30}H_{47}NO_5$ (Δ 0,6) respectivamente, que foram identificados como sendo os alcaloides piperidínicos cassina, carnavalina, 7-hidroxycassina, prosopina, espectralina, 11'-hidroxiespectralina, 3-*O*-acetil-cassina, 7-hidroxi-espectralina, 3-*O*-acetil-espectralina, *p*-coumaroilespectralina e feruloilespectralina (Tabela 11) (PIVATTO et al., 2005; VIEGAS JÚNIOR et al., 2004).

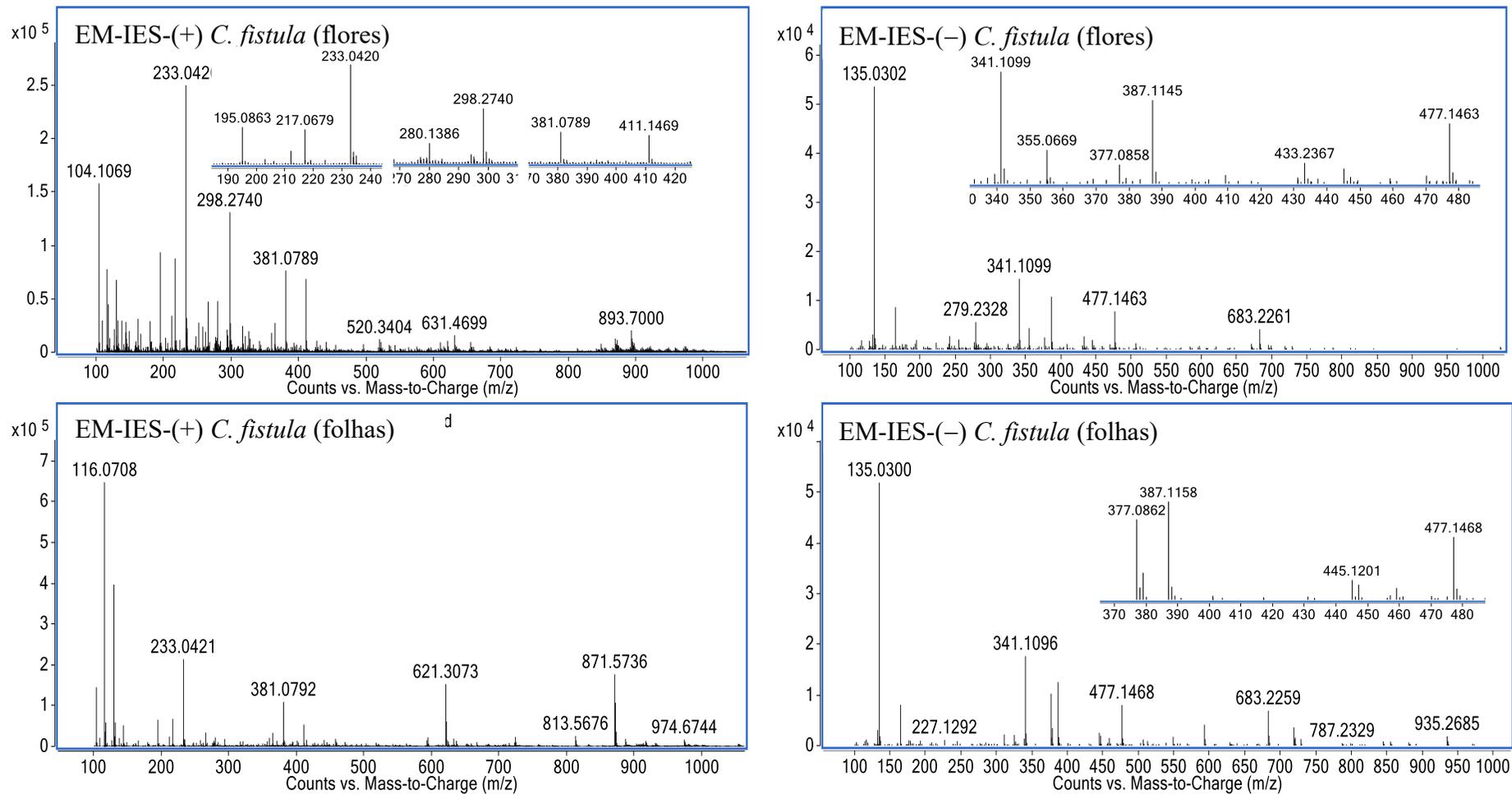
Diferentemente do observado nas análises por CCD, onde apenas os extratos e frações de *S. spectabilis* testaram positivo para a presença de alcaloides, a análise dos EM em alta resolução assim como dos EM/EM sugere que alguns destes compostos, também estão presentes em outras espécies de *Senna* e *Cassia*. Como no caso da cassina, prosopina, espectralina e 3-*O*-acetil-cassina (Tabela 11). Os alcaloides, carnavalina, 7-hidroxycassina, 11'-hidroxiespectralina, 7-hidroxi-espectralina, 3-*O*-acetil-espectralina, *p*-coumaroilespectralina e feruloilespectralina foram identificados somente em *S. spectabilis*. A não observação dos alcaloides em outras espécies nas análises por CCD, pode estar relacionado ao fato de estarem presente em baixas concentrações quando comparado a *S. spectabilis*.

Além dos alcaloides piperidínicos, um alcaloide aromático, contendo um esqueleto tricíclico, cassiarina A, foi identificado (m/z 214,0825 $[M + H]^+$) nas flores e folhas de *S. siamea* e nas flores de *S. silvestris*. Este alcaloide foi isolado anteriormente das folhas de *S. siamea* (MORITA et al., 2007) e, está sendo relatado pela primeira vez neste estudo em *S. silvestris*.

A análise dos extratos etanólicos também permitiu realizar a identificação estrutural de alguns compostos nas diferentes espécies (Tabelas 10 e 11). A identificação foi realizada através da busca da fórmula molecular, obtida nos experimentos em alta resolução, em bases de dados de produtos naturais (MASS BANK, 2006; METLIN, 2018) e, através da comparação dos fragmentos obtidos nas análises por espectrometria de massas sequencial, com aqueles descritos na literatura.

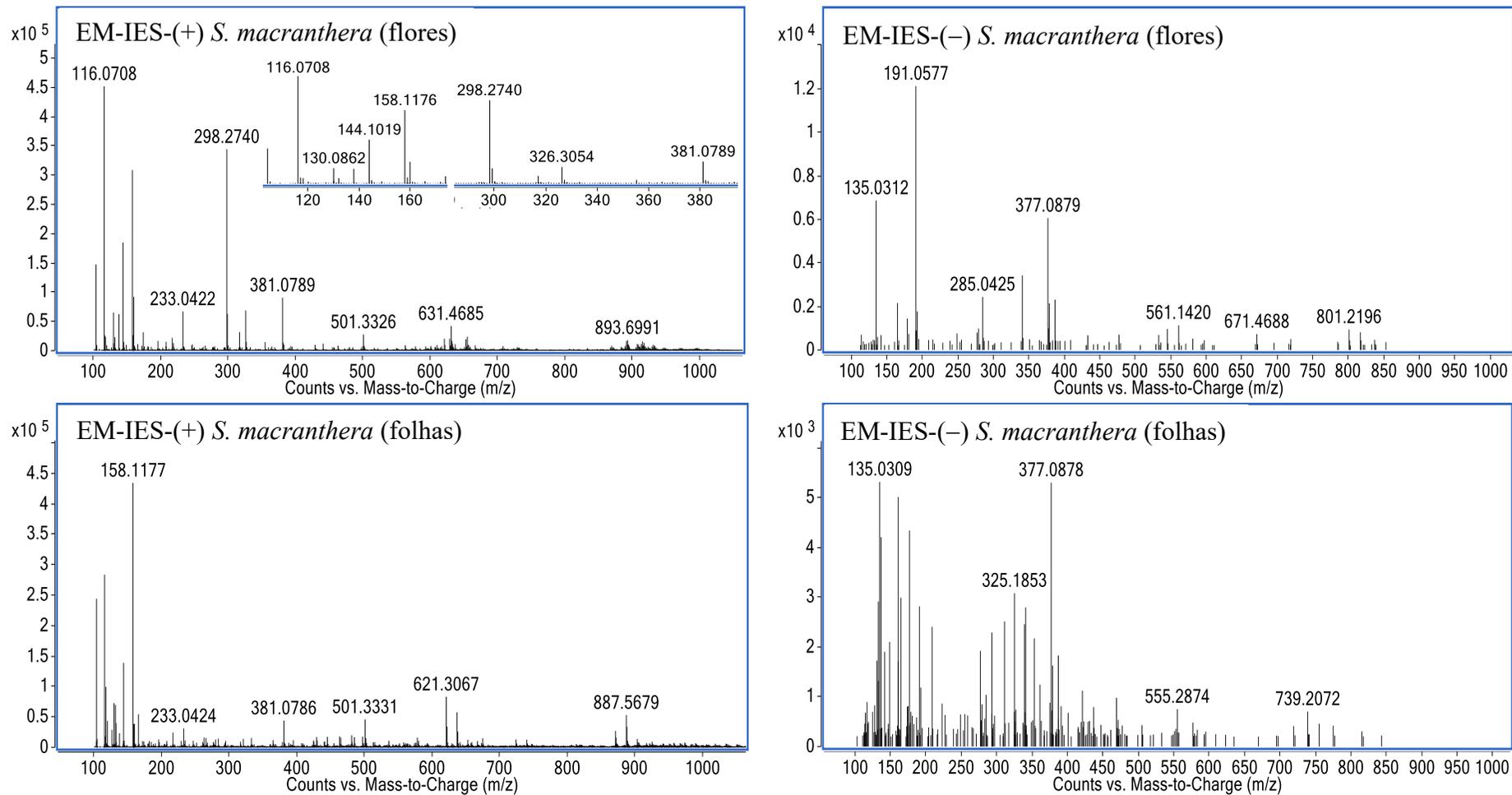
Foram identificados um total de 48 compostos (Tabelas 10 e 11), incluindo onze alcaloides piperidínicos, um alcaloide aromático pertencente a classe das cassiarinas, vinte e dois flavonoides, sendo oito agliconas e quatorze glicosilados, quatro antraquinonas, duas cromonas, um fenólico glicosilado, uma dihidroisocumarina, quatro ácidos fenólicos, uma proantocianidina dimérica e um sennosídeo.

Figura 43 – EM-IES em alta resolução dos extratos etanólicos das flores e folhas de *C. fistula*.



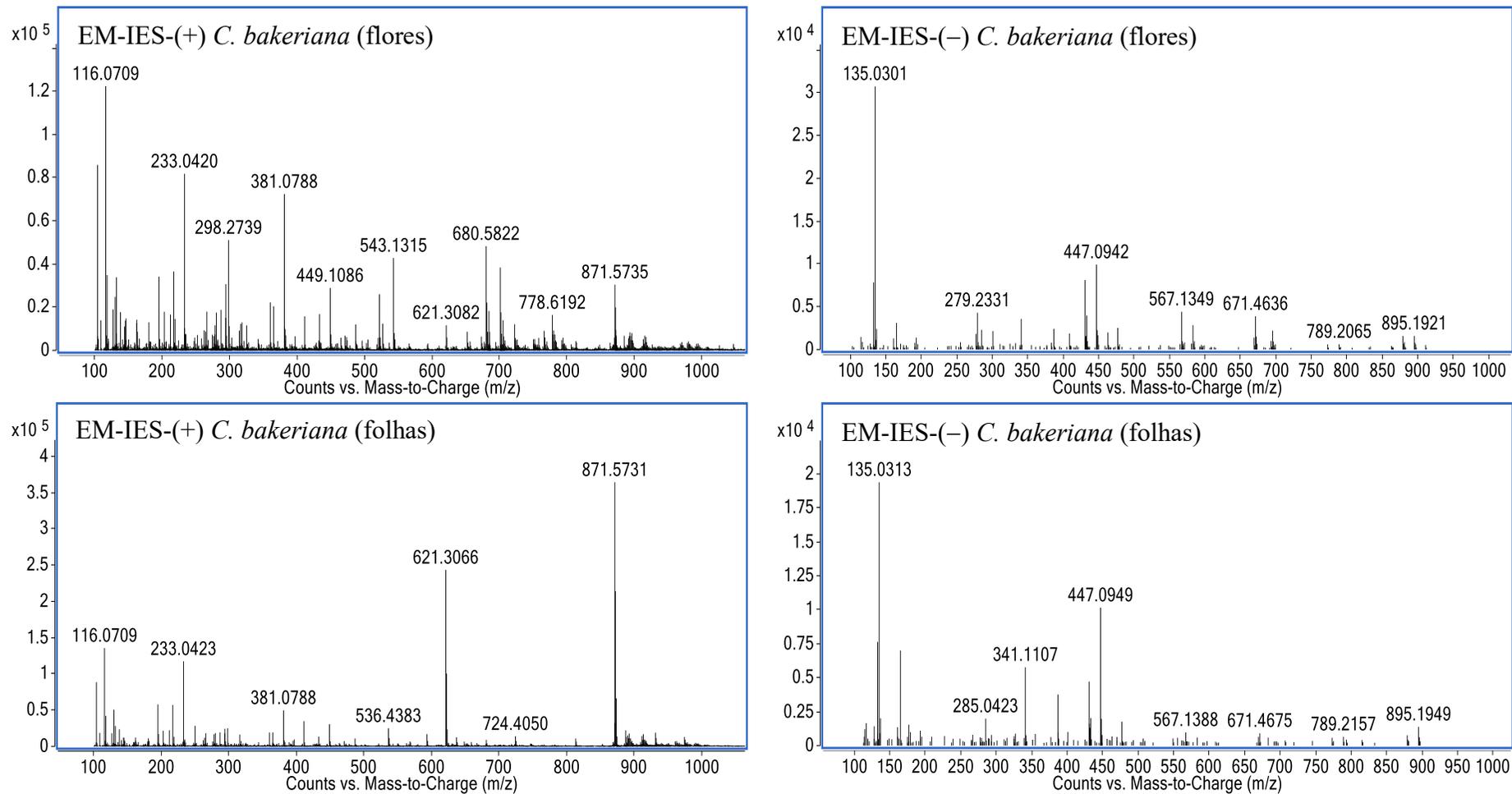
Fonte: autora.

Figura 44 – EM-IES em alta resolução dos extratos etanólicos das flores e folhas de *S. macranthera*.



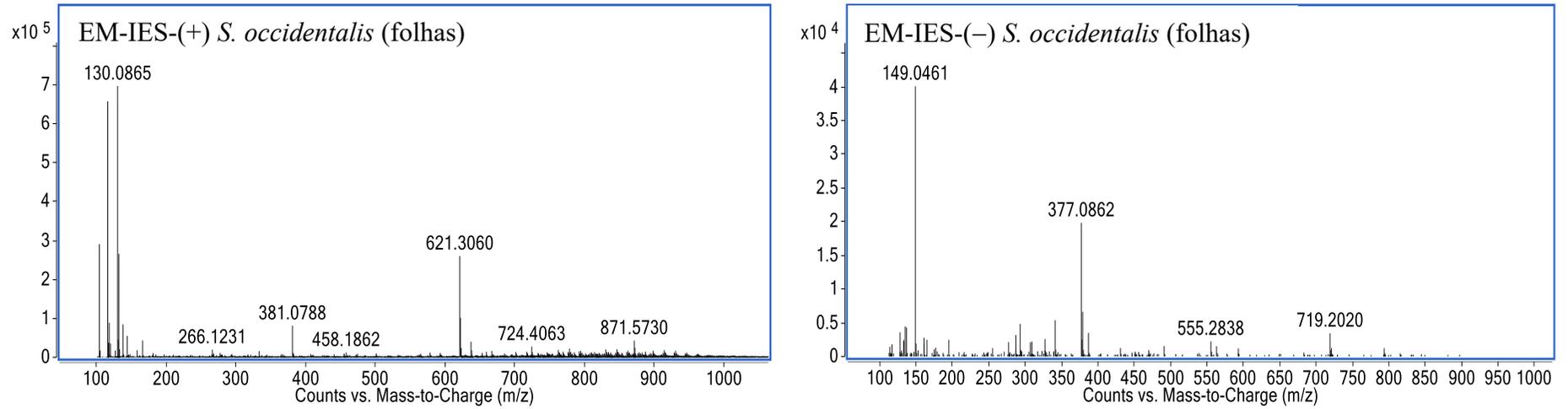
Fonte: autora.

Figura 45 – EM-IES em alta resolução dos extratos etanólicos das flores e folhas de *C. bakeriana*.



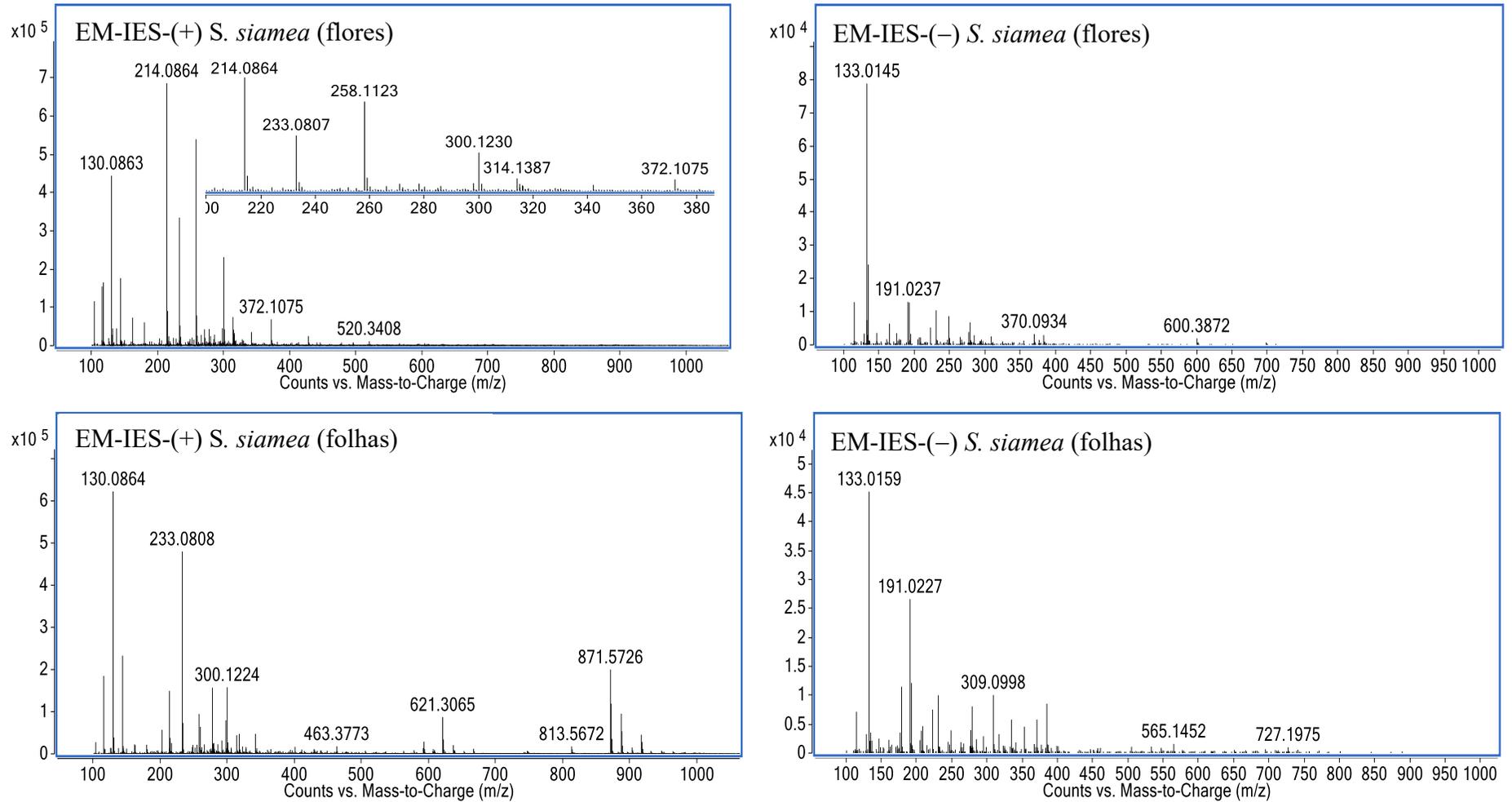
Fonte: autora.

Figura 46 – EM-IES em alta resolução dos extratos etanólicos das folhas de *S. occidentalis*.



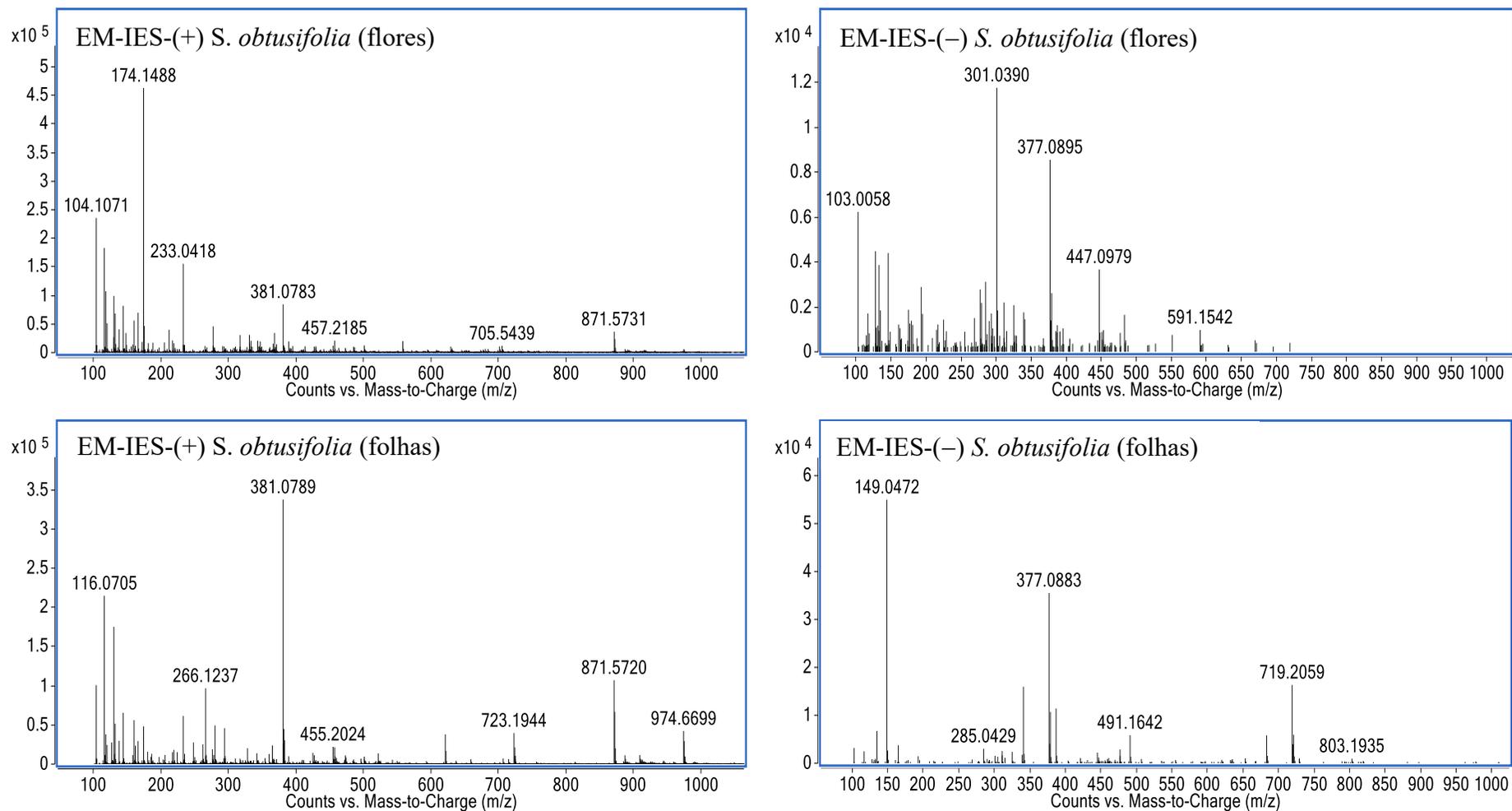
Fonte: autora.

Figura 47 – EM-IES em alta resolução dos extratos etanólicos das folhas de *S. siamea*.



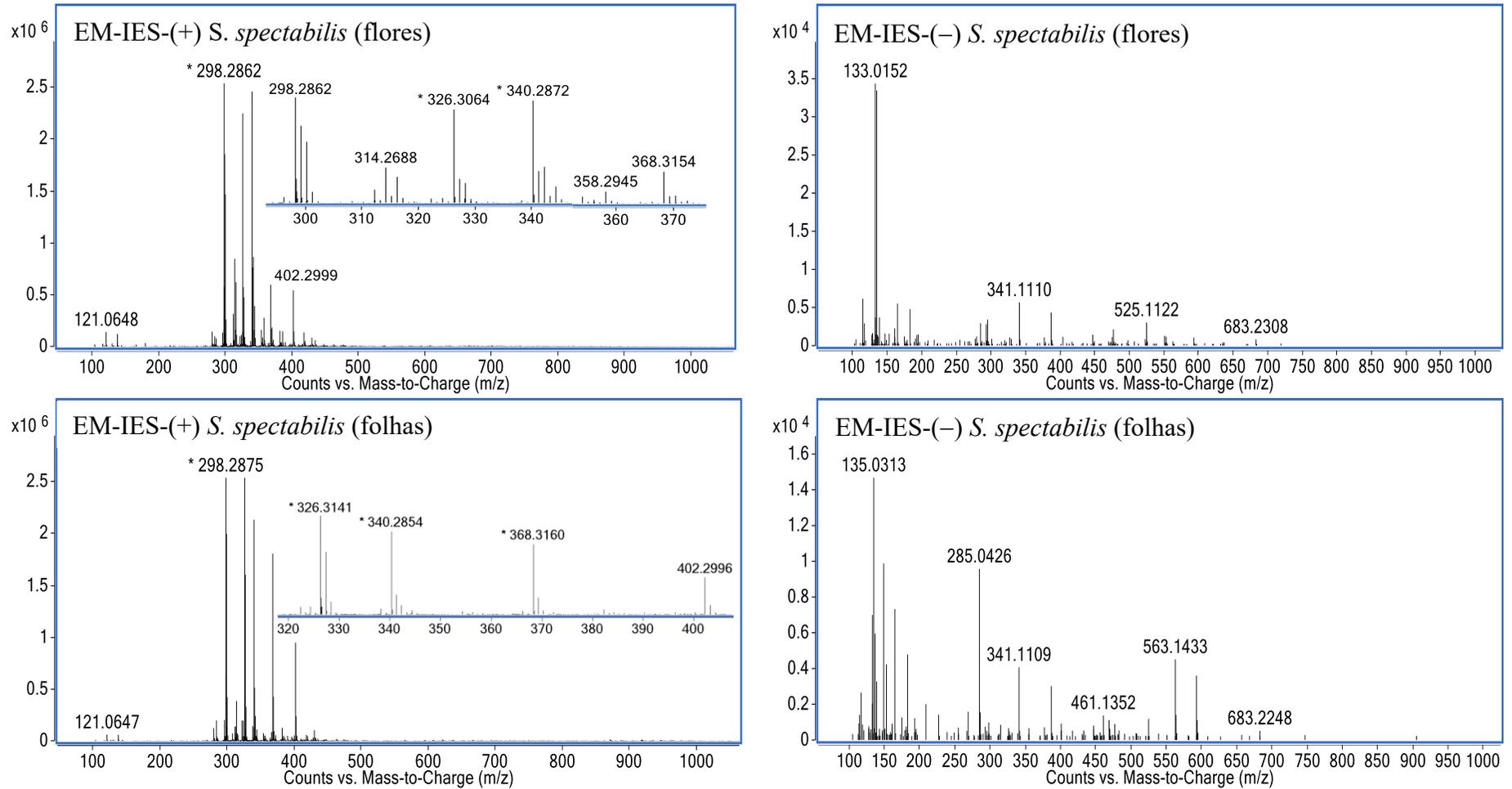
Fonte: autora.

Figura 48 – EM-IES em alta resolução dos extratos etanólicos das folhas de *S. obtusifolia*.



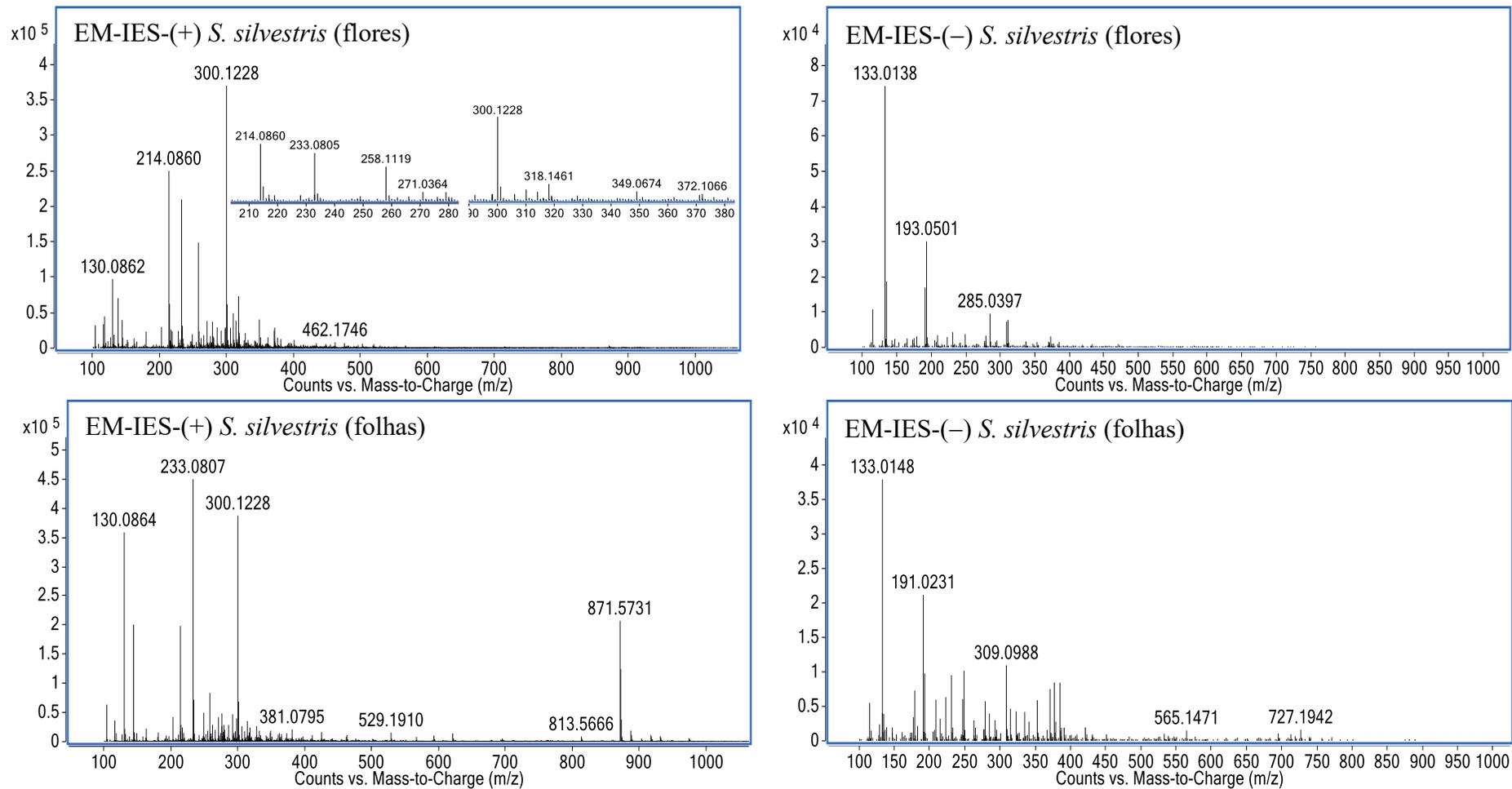
Fonte: autora.

Figura 49 – EM-IES em alta resolução dos extratos etanólicos das flores e folhas de *S. spectabilis*.



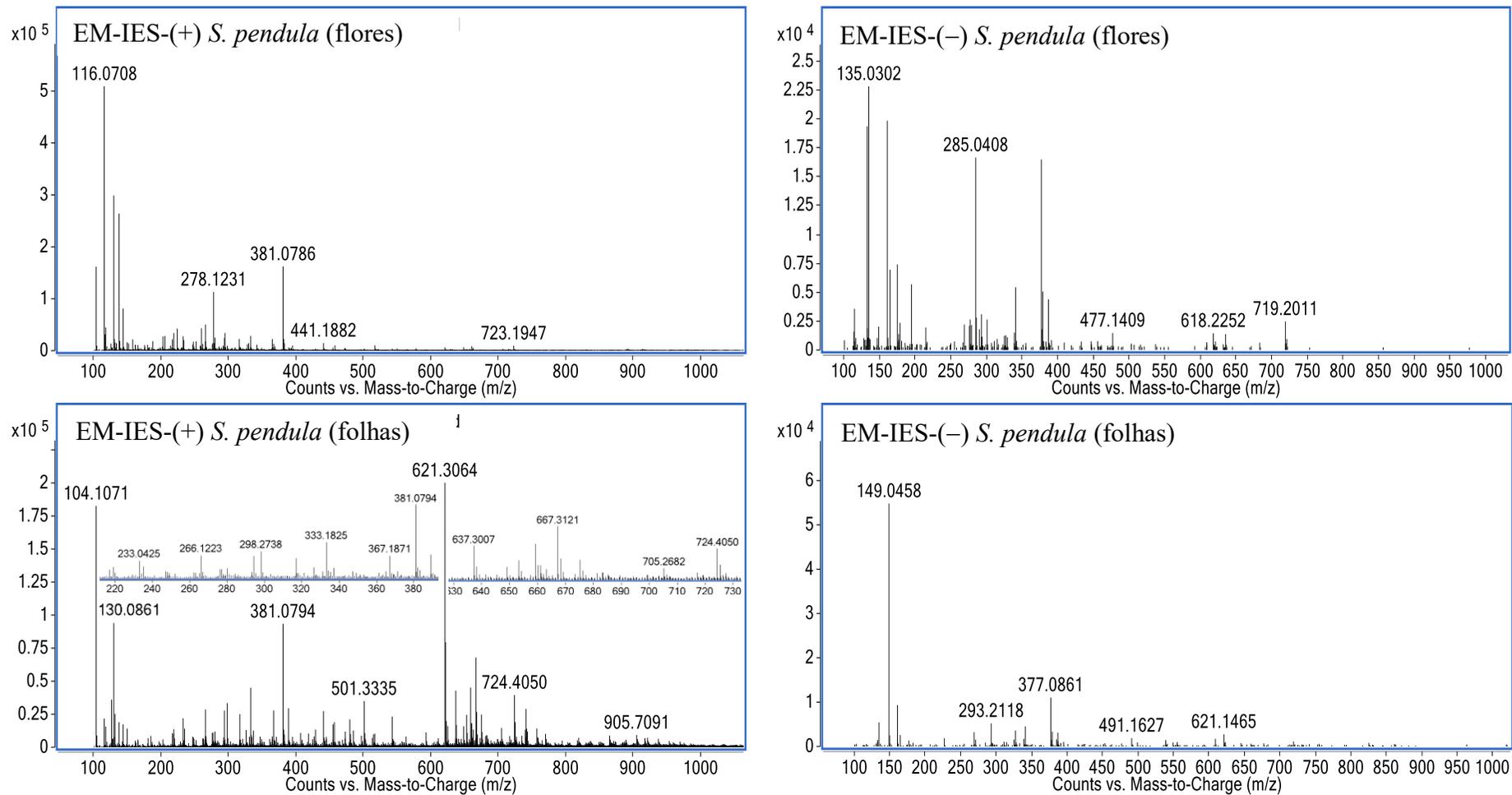
Fonte: autora.

Figura 50 – EM-IES em alta resolução dos extratos etanólicos das flores e folhas de *S. silvestris*.



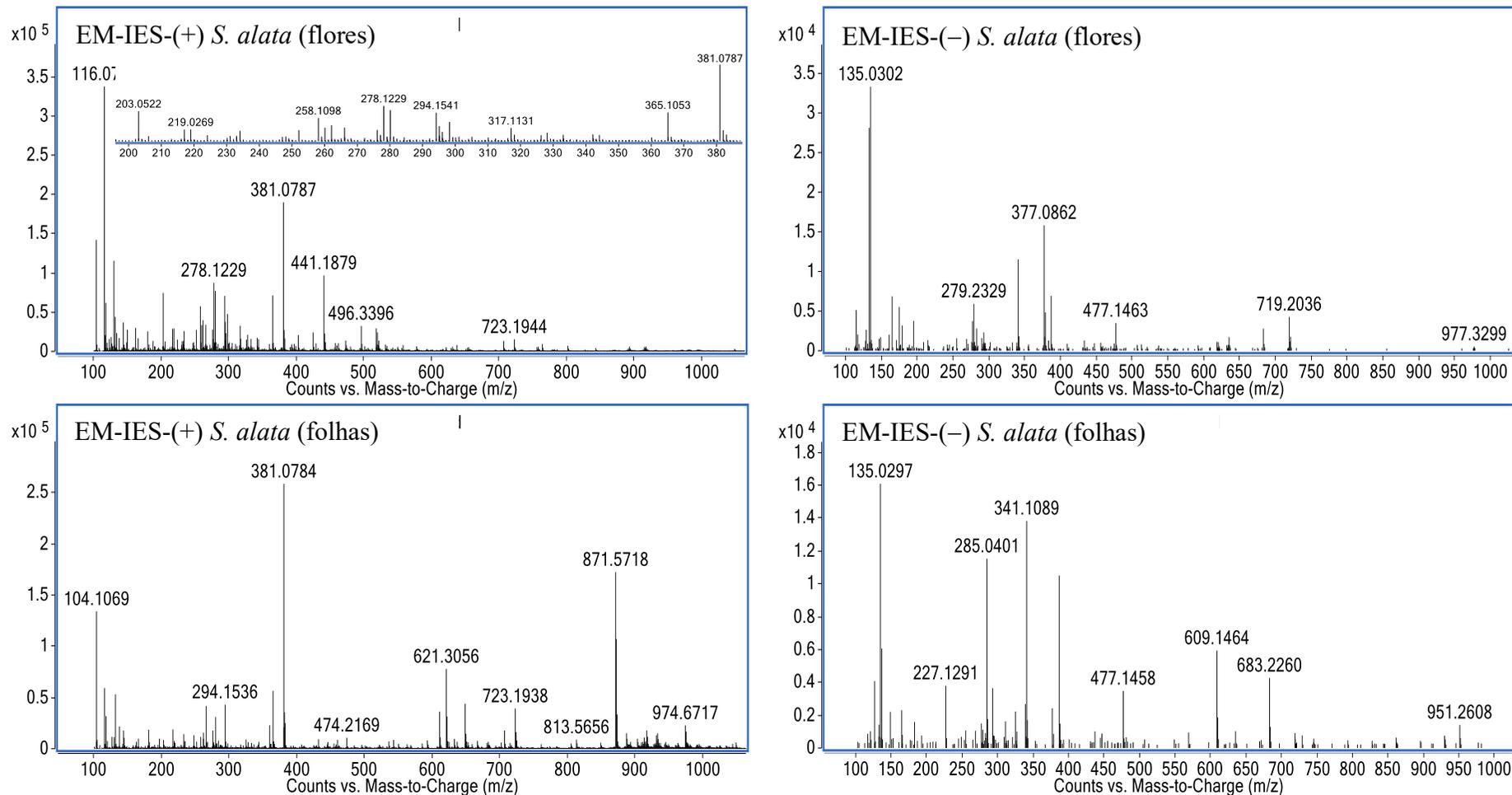
Fonte: autora.

Figura 51 – EM-IES em alta resolução dos extratos etanólicos das flores e folhas de *S. pendula*.



Fonte: autora.

Figura 52 – EM-IES em alta resolução dos extratos etanólicos das flores e folhas de *S. alata*.



Fonte: autora.

Tabela 10 – Proposta da composição dos extratos etanólicos, no modo negativo, das diferentes espécies de *Senna* e *Cassia*.

[M – H] ⁻	Fórmula molecular	Δ ^c (ppm)	Fragmentos EM/EM	Compostos identificados	Espécie	Referência
191,0199	C ₆ H ₈ O ₇	1,0	173, 146, 134, 111	ácido cítrico	1 ^a , 3 ^a , 5 ^a , 5 ^b , 8 ^a , 8 ^b	MASS BANK, 2006; LAY-KEOW, LAFONTAINE, VANIER, 2004, MASIKE et al., 2017
191,0552	C ₇ H ₁₂ O ₆	-4,7	173, 127, 109	ácido quínico	2 ^a , 2 ^b , 3 ^b	MASS BANK, 2006; LAY-KEOW, LAFONTAINE, VANIER, 2004, MASIKE et al., 2017
231,0652	C ₁₃ H ₁₂ O ₄	-4,8	213, 189, 147	cassiacromona	5 ^a , 5 ^b , 8 ^a	METLIN, 2018
269,0450	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	-1,9	241, 225, 197	emodina	2 ^b , 3 ^a , 5 ^a , 5 ^b , 6 ^a , 6 ^b , 8 ^a , 8 ^b , 9 ^a , 9 ^b , 10 ^a , 10 ^b	YE et al., 2007
269,0411	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	0,7	240, 211, 183	aloe-emodina	10 ^a , 10 ^b	YE et al., 2007
283,0251	C ₁₅ H ₈ O ₆	1,1	239, 211, 183, 167, 138, 118	reína	1 ^a , 3 ^a , 3 ^b , 10 ^a , 10 ^b	WANG, FENG, 2009
285,0405	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	0	268, 243, 217, 199, 175, 151, 133, 107	luteolina	1 ^a , 2 ^a , 2 ^b , 4 ^b , 5 ^a , 5 ^b , 6 ^a , 6 ^b , 7 ^a , 7 ^b , 8 ^a , 8 ^b , 9 ^a , 9 ^b , 10 ^a , 10 ^b	METLIN, 2018; RIJKE et al., 2006
285,0405	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	-0,3	239, 187, 143, 107	kaempferol	1 ^b , 3 ^a , 3 ^b , 6 ^b , 10 ^a , 10 ^b	MASS BANK, 2006; CHEN et al., 2015
289,0714	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	-1,4	245, 179, 151, 137, 123, 109	catequina ^d	1 ^b , 2 ^a , 3 ^a , 3 ^b	OLIVEIRA et al., 2018; JIN et al., 2007; SOBEH et al., 2018
299,0771	C ₁₃ H ₁₆ O ₈	-0,3	137	ácido <i>p</i> -hidroxibenzoico- <i>O</i> -glucosídeo	1 ^a , 2 ^a	MASS BANK, 2006, VIACAVA et al., 2017
299,0559	C ₁₆ H ₁₂ O ₆	-0,7	284, 256, 227, 151, 107	crisoeriol	1 ^a , 4 ^b , 5 ^b , 8 ^a , 8 ^b , 9 ^a	MASS BANK, 2006
301,0354	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	0	179, 151, 121, 107	quercetina	2 ^b , 3 ^a , 3 ^b , 9 ^a , 10 ^a , 10 ^b	METLIN, 2018, FARAG et al., 2015
301,0354	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	-3,6	191, 151, 150, 149	trictina	5 ^a , 6 ^a , 9 ^a	MASS BANK, 2006

Tabela 10 – Continuação.

[M – H] ⁻	Fórmula molecular	Δ ^c (ppm)	Fragmentos EM/EM	Compostos identificados	Espécie	Referência
305,0660	C ₁₅ H ₁₄ O ₇	-2,3	261, 219, 209, 167, 125	galocatequina ^d	2 ^a , 10 ^a	LIN et al., 2014
353,0869	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	-2,5	191, 179, 173, 135	ácido cafeoilquínico	2 ^a , 2 ^b	MASS BANK, 2006
431,0983	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	0,2	341, 311, 283, 161, 117	apigenina-6- <i>C</i> -glucosídeo (isovitexina)	4 ^b	METLIN, 2018; MASS BANK, 2006
431,0980	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	-0,9	285, 284, 269, 255, 227, 180, 152	kaempferol-3- <i>O</i> -ramnosídeo (afzelina)	1 ^b , 3 ^a , 3 ^b , 6 ^a	MASS BANK, 2006; WOJTANOWSKI, MROCZEK, 2018
431,0984	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	0,0	269	genistina	7 ^b	MASS BANK, 2006
447,0943	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	2,2	285, 284, 255, 151	kaempferol-3- <i>O</i> -glucosídeo	1 ^a , 1 ^b , 3 ^a , 3 ^b , 10 ^a , 10 ^b	METLIN, 2018; YANG et al., 2014
447,0921	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	-2,7	285, 284	luteolina-7- <i>O</i> -glucosídeo	5 ^b , 6 ^b	GONZALES et al., 2014
461,0729	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₂	0,9	285, 229, 113	kaempferol-3-glucuronídeo	6 ^b	MASS BANK, 2006
461,1081	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₁	-1,7	371, 341, 298	crisoeriol-8- <i>C</i> -glucosídeo (scoparina)	4 ^b	MASS BANK, 2006; BRITO et al., 2014
461,1080	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₁	-1,9	446, 299, 298, 283, 255	crisoeriol-7- <i>O</i> -glucosídeo	5 ^a , 5 ^b	MASS BANK, 2006
477,0685	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₃	2,1	301, 179, 151	quercetina-3- <i>O</i> -glucoronídeo	6 ^a , 6 ^b	MASS BANK, 2006; QU et al., 2001
477,1047	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₂	1,9	314, 299, 271	isoramnetina-3- <i>O</i> -glucosídeo	9 ^a , 9 ^b	CHEN et al., 2015
479,0822	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₃	-1,9	316, 317, 287, 271, 179	miricetina-3- <i>O</i> -glucosídeo	2 ^a	METLIN, 2018; YANG et al., 2014
545,1435	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₀	-3,3	405, 305, 289, 255, 219, 205, 179, 165, 137, 125, 109	guibourtinidol-catequina ^d	2 ^a	KLIKA et al., 2015

Tabela 10 – Continuação.

[M – H] ⁻	Fórmula molecular	Δ ^c (ppm)	Fragmentos EM/EM	Compostos identificados	Espécie	Referência
593,1497	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	-2,5	447, 429, 284, 255	kaempferol-3- <i>O</i> -neohesperidosídeo	2 ^b	CHEN et al., 2015, LI et al., 2016
593,1504	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	-1,3	285, 284, 255	kaempferol-3- <i>O</i> -rutinosídeo	1 ^a , 1 ^b , 2 ^b , 9 ^b	MASS BANK, 2006; CHEN et al., 2015
593,1482	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	-5,1	575, 473, 383, 353	apigenina-6,8-di- <i>C</i> -β- <i>D</i> -glicopiranasídeo	2 ^a , 4 ^b	PICCINELLI, et al., 2008
607,1657	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₅	-1,8	299, 284	crisoeriol-7- <i>O</i> -neohesperidosídeo	4 ^b	BRITO et al., 2014
609,1585	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	3,9	561, 343, 284	kaempferol-3- <i>O</i> -gentiobiosídeo	1 ^a , 10 ^b	YANG et al., 2014; VARGHESE, BOSE, HABTEMARIAM, 2013
861,1870	C ₄₂ H ₃₈ O ₂₀	-1,6	699, 655, 537, 386, 268, 224	sennosídeo A	1 ^a , 1 ^b , 3 ^a , 10 ^a , 10 ^b	YE et al., 2007

1 = *C. fistula*; 2 = *S. macranthera*; 3 = *C. bakeriana*; 4 = *S. occidentalis*; 5 = *S. siamea*; 6 = *S. obtusifolia*; 7 = *S. spectabilis*; 8 = *S. silvestris*; 9 = *S. pendula*; 10 = *S. alata*.

^aExtrato etanólico das flores; ^bExtrato etanólico das folhas; ^cErro relativo; ^dRepresenta diferentes formas estereoisoméricas (ex.: catequina, pode ser catequina ou epicatequina).

Fonte: autora.

Tabela 11 – Proposta da composição dos extratos etanólicos, no modo positivo, das diferentes espécies de *Senna* e *Cassia*.

[M + H] ⁺	Fórmula molecular	Δ ^c (ppm)	Fragmentos EM/EM	Compostos identificados	Espécie	Referência
195,0652	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	0	177, 167, 149	6-hidroximeleina	5 ^a , 8 ^a , 8 ^b ,	METLIN, 2018
214,0865	C ₁₃ H ₁₁ NO ₂	0,9	199, 131, 103	cassiarina A	5 ^a , 5 ^b , 8 ^a	OSHIMI et al., 2008
215,0704	C ₁₃ H ₁₀ O ₃	0,5	187, 149, 131, 103	anhydrobarakol	5 ^b , 8 ^a	
233,0809	C ₁₃ H ₁₂ O ₄	-0,4	215, 191	cassiacromona	5 ^a , 5b, 8 ^a , 8 ^b , 10 ^a	METLIN, 2018
285,0758	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	0,3	270, 242	fisciona	4 ^b , 5 ^a , 5 ^b , 6 ^b , 8 ^a , 8 ^b	YE et al, 2007
285,0397	C ₁₅ H ₈ O ₆	1,0	267, 241	reína	1 ^a , 3 ^a , 3 ^b , 10 ^a , 10 ^b	CUNHA et atl., 2017
287,0552	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	0,7	153	luteolina	2 ^a , 2 ^b , 4 ^b , 5 ^a , 5 ^b , 6 ^a , 6 ^b , 8 ^a , 8 ^b , 9 ^a , 9 ^b , 10 ^a , 10 ^b	METLIN, 2018
287,0553	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	1,0	259, 258, 241, 213, 185, 165, 153, 121	kaempferol	3 ^a , 3 ^b , 10 ^a , 10 ^b	MASS BANK, 2006; WANG et al., 2008
291,0865	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	0,7	207,165, 139, 123	catequina ^d	1 ^b , 3 ^a , 3 ^b	MASS BANK, 2006; OLIVEIRA et al., 2018
298,2748	C ₁₈ H ₃₆ NO ₂	0,7	280	cassina	1 ^a , 2 ^a , 3 ^a , 3 ^b , 5 ^a , 5 ^b , 6 ^a , 7 ^a , 7 ^b , 8 ^a , 9 ^a , 9 ^b	PIVATTO et al., 2005
300,2899	C ₁₈ H ₃₇ NO ₂	0,7	282, 264,70	carnavalina	7 ^a , 7 ^b	PIVATTO et al., 2005
314,2688	C ₁₈ H ₃₅ NO ₃	-0,6	296, 278, 252	7-hidroxicassina	7 ^a , 7 ^b	PIVATTO et al., 2005; VIEGAS Jr. et al., 2013
316,2853	C ₁₈ H ₃₇ NO ₃	2,2	298, 280, 262, 225, 209, 109	prosopina	1 ^a , 1 ^b , 2 ^a , 2 ^b , 3 ^a , 3 ^b , 4 ^b , 5 ^a , 5 ^b , 6 ^a , 6 ^b , 7 ^a , 7 ^b , 8 ^a , 8 ^b , 9 ^a , 10 ^a	PIVATTO et al., 2005

Tabela 11 – Continuação.

[M + H] ⁺	Fórmula molecular	Δ^c (ppm)	Fragmentos EM/EM	Compostos identificados	Espécie	Referência
326,3058	C ₂₀ H ₄₀ NO ₂	1,2	308	espectralina	1 ^a , 2 ^a , 3 ^a , 5 ^a , 6 ^a , 7 ^a , 7 ^b , 8 ^a , 9 ^a	PIVATTO et al., 2005
328,3213	C ₂₀ H ₄₁ NO ₂	0,9	310, 292, 95, 70	11'-hidroxiespectralina	7 ^a , 7 ^b	PIVATTO et al., 2005
340,2848	C ₂₀ H ₃₇ NO ₃	0,6	280	3-O-acetil-cassina	5 ^b , 7 ^a , 7 ^b	PIVATTO et al., 2005
342,3006	C ₂₀ H ₄₀ NO ₃	0,9	324, 306	7-hidroxi-espectralina	7 ^a , 7 ^b	PIVATTO et al., 2005
368,3158	C ₂₂ H ₄₂ NO ₃	-0,3	308	3-O-acetil-espectralina	7 ^a , 7 ^b	VIEGAS Jr. et al., 2004
397,1495	C ₁₉ H ₂₄ O ₉	0,5	235, 217	aloesol-7-O-glucosídeo	5 ^a , 5 ^b , 8 ^a , 8 ^b	WISHART et al., 2018
472,3422	C ₂₉ H ₄₅ NO ₄	0,2	326, 308, 147	<i>p</i> -coumaroilespectralina	7 ^b	PIVATTO et al., 2005
502,3530	C ₃₀ H ₄₇ NO ₅	0,6	326, 308, 177, 145	feruloilespectralina	7 ^a , 7 ^b	PIVATTO et al., 2005

1 = *C. fistula*; 2 = *S. macranthera*; 3 = *C. bakeriana*; 4 = *S. occidentalis*; 5 = *S. siamea*; 6 = *S. obtusifolia*; 7 = *S. spectabilis*; 8 = *S. silvestris*; 9 = *S. pendula*; 10 = *S. alata*.

^aExtrato etanólico das flores; ^bExtrato etanólico das folhas; ^cErro relativo; ^dRepresenta diferentes formas estereoisoméricas (ex.: catequina, pode ser catequina ou epicatequina).

Fonte: autora.

4.8 – Análises quimiométricas

Embora a inspeção visual dos espectros de massas, permitiu reconhecer diferenças e semelhanças entre as espécies de *Senna* e *Cassia*, as ferramentas quimiométricas, análise por componentes principais (PCA) e análise hierárquica de agrupamentos (HCA), foram aplicadas com o intuito de extrair as informações mais relevantes a partir da grande quantidade de dados gerados. As análises foram utilizadas como métodos de visualização, para observar características de agrupamento não supervisionado.

Os extratos etanólicos de *C. fistula* (flores e folhas), *S. macranthera* (flores e folhas), *C. bakeriana* (flores e folhas), *S. occidentalis* (folhas), *S. siamea* (flores e folhas), *S. obtusifolia* (flores e folhas), *S. spectabilis* (flores e folhas), *S. silvestris* (flores e folhas), *S. pendula* (flores e folhas) e *S. alata* (flores e folhas) foram submetidos a análise por espectrometria de massas (EM-IES) com injeção direta, nos modos positivo e negativo, e os dados obtidos foram submetidos a análise de componentes principais.

As PCAs foram construídas usando como pré-processamento o *mean center* e, para as HCAs foram utilizadas a distância euclidiana, o *mean center* como pré-processamento e o *Ward's Method* como método de ligação.

4.8.1 – Análises dos extratos etanólicos das flores no modo positivo

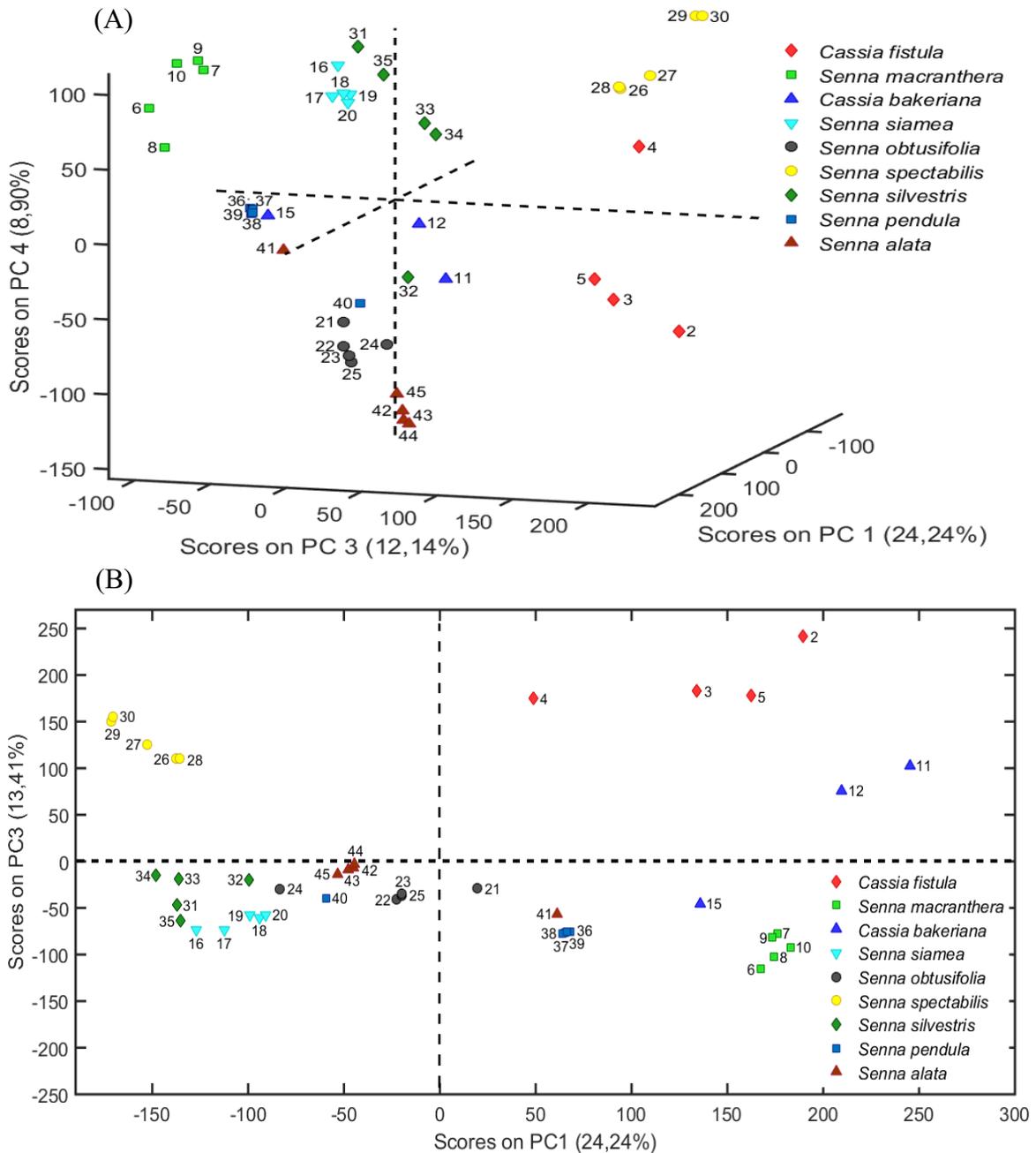
Na construção do modelo PCA a partir do extrato das flores, modo positivo, os dados da amostra 1 da espécie *C. fistula*, e das amostras 13 e 14 de *C. bakeriana*, foram retirados por apresentarem elevado distanciamento do modelo, assim como dos vetores **PC**.

O modelo PCA para as flores, modo positivo, com 64,50% de variância explicada, foi construído utilizando 4 PC's (**PC1** 24,24%, **PC2** 16,96%, **PC3** 13,41% e **PC4** 9,88%) e permitiu diferenciar em maior grau as espécies *C. fistula*, *S. macranthera* e *S. spectabilis*, que aparecem posicionadas nos extremos do gráfico de *score Plot* (**PC1 vs PC3 vs PC4**) (Figura 53 A).

No *score plot* (**PC1 vs PC3**) (Figura 53 B) foi possível observar que a **PC1** separa *C. fistula*, *S. macranthera*, *C. bakeriana* e *S. pendula* (*scores* positivos) de *S. siamea*, *S. obtusifolia*, *S. silvestris*, *S. alata* e *S. spectabilis* (*scores* negativos), estando *S. spectabilis* mais separada das demais espécies, posicionada no extremo esquerdo do gráfico (*score* positivo da **PC3**). Também é possível observar que as espécies *S. siamea*

e *S. silvestris* se assemelham e que, as amostras de *S. alata*, apresentam grande similaridade entre si e se diferenciam, em menor grau, das espécies *C. bakeriana*, *S. obtusifolia* e *S. pendula*, as quais apresentaram uma maior dispersão ao longo da **PC1**.

Figura 53 – Gráficos de *Score Plot* (**PC1 vs PC3 vs PC4**) (A) e (**PC1 vs PC3**) (B) dos extratos etanólicos das flores no modo positivo.



Fonte: autora.

Os *loadings plot* correspondentes foram utilizados para tentar identificar as diferenças na composição metabólica, que são responsáveis pela separação entre os grupos. Neste caso, foram utilizados valores de *loading versus* razão massa/carga (*m/z*) (Tabela 12). Portanto, as variáveis (*m/z*) mais importantes, são aquelas com uma maior contribuição para a separação dos grupos no *score plot* e na construção de cada componente principal em questão.

Analisando os íons responsáveis pela separação observada ao longo das **PCs** (Tabela 12), foi possível observar que o sinal de *m/z* 340,2 que aparece nos *scores* negativo e positivo da **PC1** e **PC3**, respectivamente, está presente somente nos espectros de massas em alta resolução dos extratos etanólicos das flores *S. spectabilis* e foi identificado como sendo o alcaloide 3-*O*-acetil-cassina *m/z* 340,2846 [M + H]⁺ (PIVATTO et al., 2005). Outro sinal que aparece como sendo um dos responsáveis pela separação observada ao longo da **PC1** é íon de *m/z* 314 (*score* negativo) que foi identificado nas flores de *S. spectabilis* *m/z* 314,2688 [M + H]⁺ como sendo o alcaloide 7-hidroxicassina. O íon de *m/z* 314 também aparece nos espectros de massas em alta resolução das espécies *S. siamea* e *S. silvestris* *m/z* 314,1377 [M + H]⁺, e pode ser referente ao alcaloide cassiarina B 314,1387 [M + H]⁺, que já foi isolado em estudos anteriores das folhas de *S. siamea* (MORITA et al., 2007). No entanto por aparecer com baixa abundância nos espectros de massas em alta resolução, este íon não foi fragmentado, não sendo possível desta forma confirmar a identificação estrutural. O sinal de *m/z* 215,07 também presente somente em *S. siamea* e *S. silvestris* foi identificado como sendo a cromona anidrobarakol 215,0703 [M + H]⁺ o que justifica a proximidade destas espécies nos gráficos de PCA. Este composto é formado a partir do barakol, o principal constituinte ativo presente nas flores e folhas de *S. siamea* (KAMAGATÉ et al., 2014), que, por ser instável é convertido a anidrobarakol pela perda de uma molécula de água (TEANGPOOK et al., 2012)

Tabela 12 – Variáveis (*m/z*) com maior contribuição para a separação dos grupos, no *score plot* e na construção de cada componente principal, das flores no modo positivo.

<i>m/z</i>	Identificação	Fórmula estrutural	Utilizada por*
180,08	–	–	PC4
195,06	6-hidroximeleina		PC1 e PC3
215,07	anidrobarakol		PC3
219,02	–	–	PC3 e PC4
224,10	–	–	PC1
242,11	–	–	PC2
	7-hidroxicassina		
314,00	cassiarina B		PC1
340,20	3-O-acetil-cassina		PC3
397,15	–	–	PC3
398,30	–	–	PC1

*Componente Principal onde o composto possui maior contribuição para a separação das amostras; – Não foram identificados.

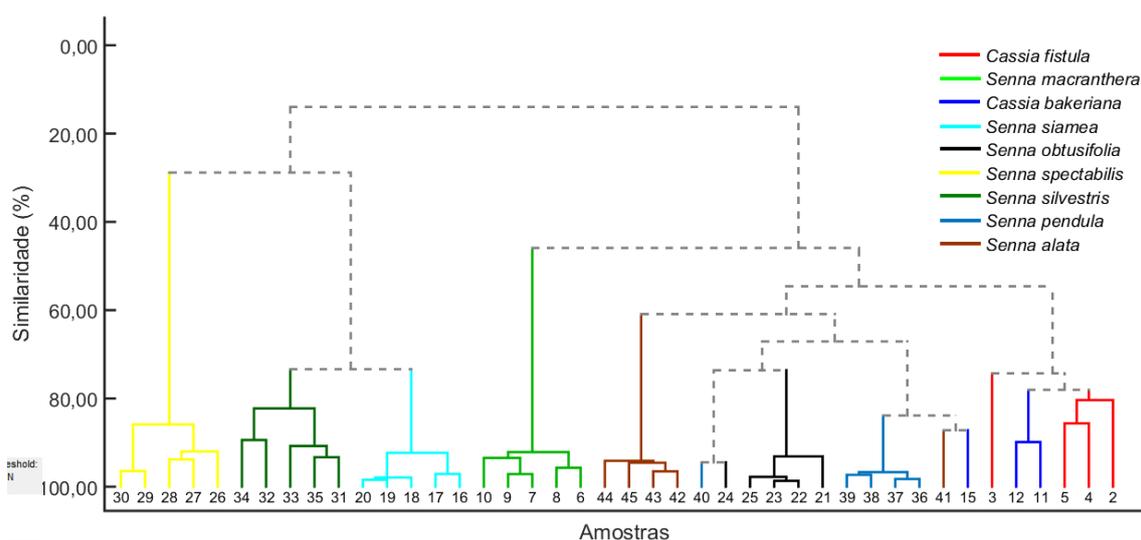
Fonte: autora.

A ferramenta HCA também foi utilizada como método exploratório para a visualização dos dados. Nesta análise, a distância euclidiana entre as amostras foi calculada e aquelas com maior proximidade, são mais similares entre si. Como resultado o HCA plota um gráfico em forma de dendograma, onde o eixo y corresponde ao grau de

similaridade, que é mostrado em uma escala de 0,0 (nada de similaridade) a 100,0 (espectros de massas idênticos).

A HCA (Figura 54) apresenta o mesmo comportamento observado na PCA, com exceção da espécie *C. fistula*, que nesta análise possui elevada similaridade com amostras de *C. bakeriana*. As espécies *S. siamea* e *S. silvestris* estão próximas entre si apresentando, portanto, maior grau de similaridade e, juntamente com *S. spectabilis* possuem pouca similaridade com as demais espécies.

Figura 54 – Dendograma gerado pela HCA dos extratos etanólicos das flores no modo positivo.



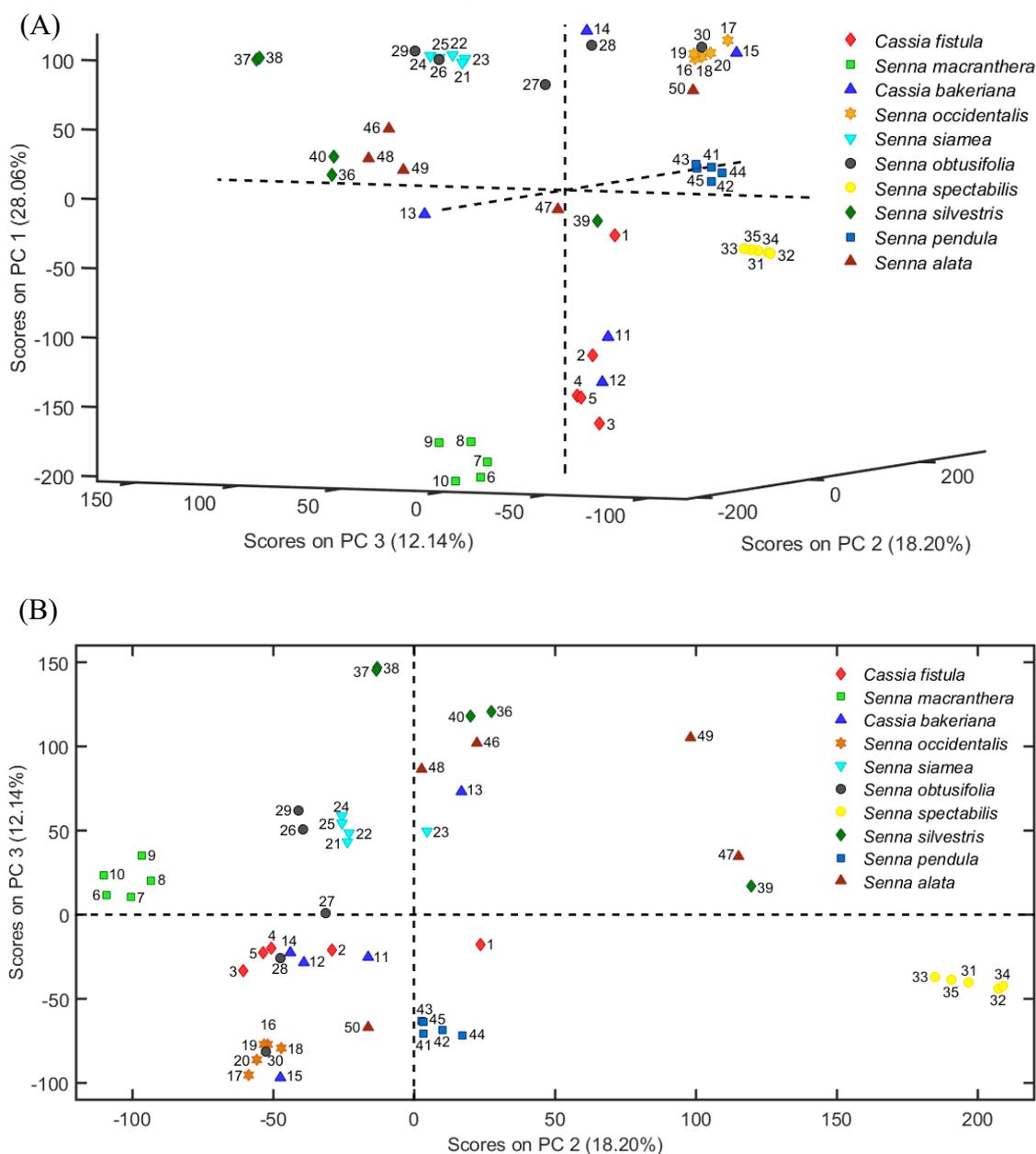
Fonte: autora.

4.8.2 – Análises dos extratos etanólicos das folhas no modo positivo

A PCA para as folhas, modo positivo, com 75,34% de variância explicada, foi construída utilizando 5 PC's (**PC1** 28,06%, **PC2** 18,20%, **PC3** 12,14%, **PC4** 8,90% e **PC5** 8,04%) e permitiu observar uma maior diferenciações entre as espécies, com exceção de *C. bakeriana*, *S. silvestris* e *S. alata* que aparecem misturadas no gráfico (Figura 55 A).

No *score plot* (**PC2 vs PC3**) (Figura 55 B) é observado ao longo da **PC2** uma maior separação das amostras de *S. spectabilis* (*score* positivo) das demais espécies analisadas. Assim como a separação das amostras de *S. macranthera*, que aparecem posicionadas no extremo esquerdo (*score* negativo e positivo da **PC2** e **PC3**, respectivamente) do gráfico de PCA (Figura 55 B).

Figura 55 – Gráficos de *Score Plot* (PC1 vs PC3 vs PC4) (A) e (PC1 vs PC3) (B) dos extratos etanólicos das folhas no modo positivo.

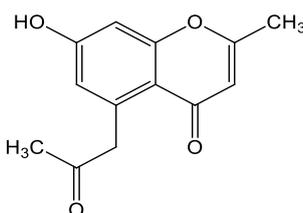
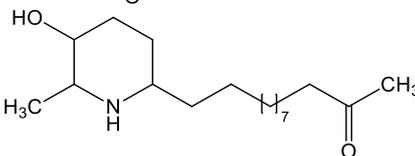
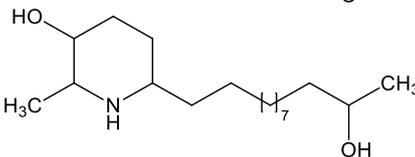
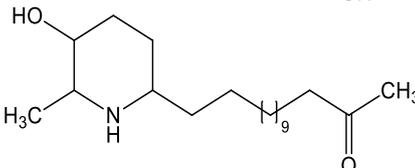
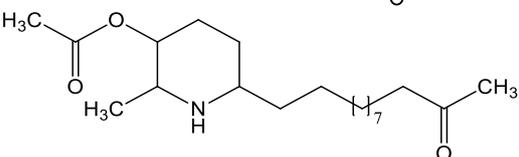
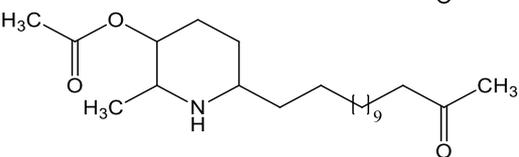


Fonte: autora.

Analisando os principais íons responsáveis pela separação ao longo das PCs (Tabela 13), foi possível observar que os sinais referentes aos alcaloides cassina (m/z 298,27), seu homólogo espectralina (m/z 326,30), 3-*O*-acetilcassina (m/z 340,28) e carnavalina (m/z 300,28), estão presentes com elevada abundância somente nas amostras de *S. spectabilis* e são os principais responsáveis pela separação desta, das demais espécies observada ao longo da PCA (Figura 55 A e 55 B).

O sinal de m/z 233,08, que aparece nos *scores* positivos da **PC1**, **PC3** e **PC4**, foi identificado como sendo o composto cassiacromona $[M + H]^+$ 233,0808, que está presente com elevada abundância nas amostras de *S. siamea* (210.816,76) e em menor abundância em *S. silvestris* (152.764,65).

Tabela 13 – Variáveis (m/z) com maior contribuição para a separação dos grupos, no *score plot* e na construção de cada componente principal, das folhas no modo positivo.

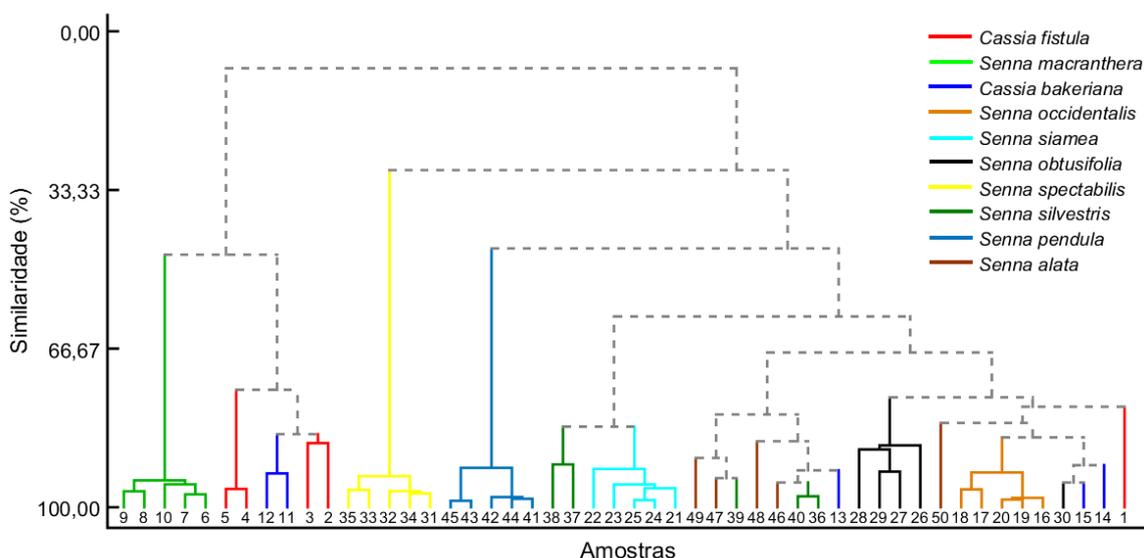
m/z	Identificação	Fórmula estrutural	Utilizada por*
181,12	–	–	PC1
233,08	cassiacromona		PC1
298,27	cassina		PC2
300,28	carnavalina		PC3
326,30	espectalina		PC2
340,28	3-O-acetil-cassina		PC2
368,31	3-O-acetil-espectalina		PC2
381,07	–	–	PC1
402,20	–	–	PC2
621,30	–	–	PC3
871,50	–	–	PC3

*Componente Principal onde o composto possui maior contribuição para a separação das amostras; – Não foram identificados.

Fonte: autora.

Na HCA (Figura 56) é possível notar o mesmo comportamento observado na PCA, onde as espécies *S. macranthera*, *S. spectabilis* e *S. pendula*, se mantêm mais distantes entre si e das demais espécies analisadas. O que sugere uma grande diferença entre os compostos destas espécies. Assim como observado nas flores, modo positivo, também é possível notar que as amostras das folhas de *S. siamea* e *S. silvestris*, estão mais próximas entre si, o que sugere a presença de compostos similares entre as duas espécies. Quanto as demais espécies analisadas, estas aparecem misturadas no gráfico de HCA com porcentagens de similaridade entre si acima de 60%.

Figura 56 – Dendograma gerado pela HCA dos extratos etanólicos das folhas no modo positivo.



Fonte: autora.

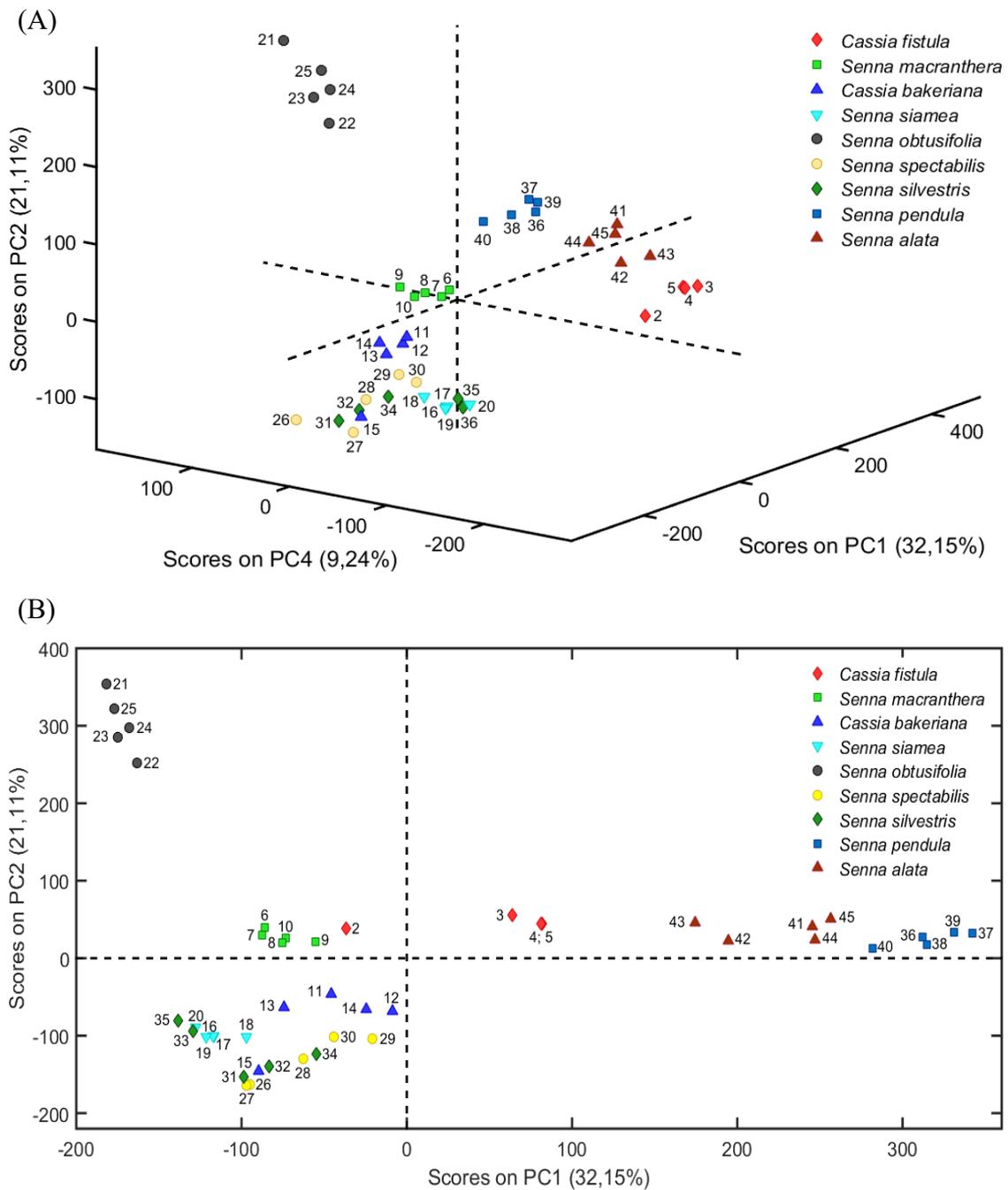
4.8.3 – Análises dos extratos etanólicos das flores no modo negativo

Na construção do modelo PCA a partir dos extratos das flores, modo negativo, os dados da amostra 1 da espécie de *C. fistula* foram retirados por apresentar elevado distanciamento do modelo, assim como dos vetores **PC**.

Para as flores, modo negativo, o modelo PCA com 77,85% de variância explicada, foi construído com 4 PC's (**PC1** 32,15%, **PC2** 21,11%, **PC3** 12,08%, **PC4** 9,24%). No *score Plot* (**PC1 vs PC2 vs PC4**) (Figura 57 A) e (**PC1 vs PC2**) (Figura 57 B), é observado ao longo da **PC1** a separação das espécies *C. fistula*, *S. pendula* e *S. alata* (scores positivos) das demais espécies; assim como a separação ao longo da **PC2** da espécie *S. obtusifolia*, sendo esta a que mais se difere no conjunto de

dados, ocupando posições bem distintas das demais amostras do gráfico PCA (*scores* negativo da **PC1** e positivo da **PC2**). As demais espécies apresentam elevada similaridade, aparecendo misturadas no gráfico (Figura 57 A).

Figura 57 – Gráficos de *Score Plot* (**PC1 vs PC2 vs PC4**) (A) e (**PC1 vs PC2**) (B) dos extratos etanólicos das flores no modo negativo.



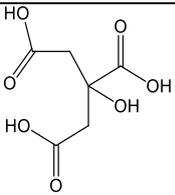
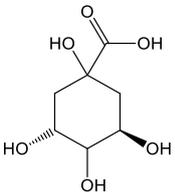
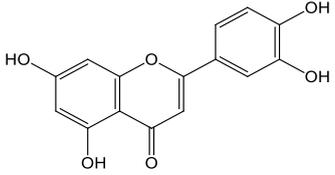
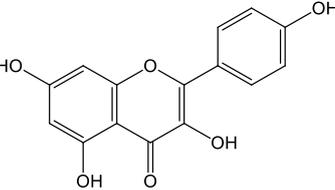
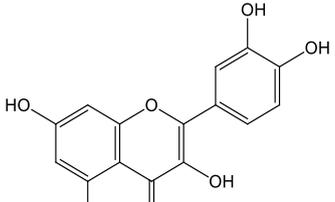
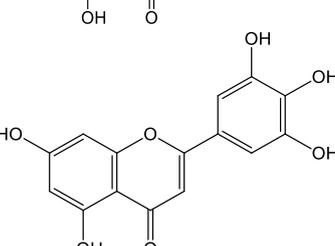
Fonte: autora.

Analisando os principais íons responsáveis pela separação ao longo das **PCs** (Tabela 14) foi possível observar que o sinal em m/z 301,03 é um dos íons responsáveis pela separação das amostras observadas ao longo da **PC1** e **PC2** e foi identificado como sendo os flavonoides quercetina m/z 301,0354 $[M - H]^-$, presente em *C. bakeriana*, *S. spectabilis*, *S. alata* e *S. pendula* e tricetina m/z 301,0354 $[M - H]^-$, presente em *S. siamea*, *S. obtusifolia* e *S. pendula*. A maior separação de *S. obtusifolia* no conjunto de dados, está no fato de nesta espécie o íon de m/z 301 ser encontrado com elevada abundância (6379,22), quando comparado as demais, nas quais a abundância variou de 1398,79 em *S. pendula* a 233,63, em *S. macranthera*.

O sinal referente aos flavonoides luteolina e/ou kaempferol (m/z 285,0405 $[M - H]^-$) também aparece como uma das variáveis importantes para a separação (Tabela 14), sendo um dos responsáveis pela separação de *S. pendula* das demais espécies ao longo da **PC1** (Figura 57 B). Estes flavonoides foram identificados nas flores de todas as espécies estudadas, estando em maior abundância em *S. pendula* (luteolina, 8208,50), seguido de *S. silvestris* (luteolina, 2874,91), *S. macranthera* (luteolina, 2612,70), *S. siamea* (luteolina, 1735,30), *S. obtusifolia* (luteolina, 1460,29), *S. spectabilis* (luteolina, 976,64), *C. bakeriana* (kaempferol, 858,32), *C. fistula* (luteolina, 518,26) e *S. alata* (luteolina e kaempferol, 459,26).

O sinal de m/z 191,0 também aparece como um dos contribuintes e, foi atribuído aos ácidos fenólicos, ácido cítrico (m/z 191,0197 $[M - H]^-$) e/ou ácido quínico (m/z 191,0561 $[M - H]^-$), que foram identificados nas flores de *C. fistula* (ácido cítrico, 388,22), *C. bakeriana* (ácido cítrico, 492,81), *S. siamea* (ácido cítrico, 7298,01), *S. spectabilis* (ácido cítrico, 512,13), *S. silvestris*, (ácido cítrico, 12773,53) e *S. macranthera* (ácido quínico, 9350,54). Nas espécies *S. obtusifolia*, *S. pendula* e *S. alata* estes ácidos estão ausentes, o que corrobora com a separação observada.

Tabela 14 – Variáveis (m/z) com maior contribuição para a separação dos grupos, no *score plot* e na construção de cada componente principal, das flores no modo negativo.

m/z	Identificação	Fórmula estrutural	Utilizada por*
191,0	ácido cítrico		PC1
	ácido quínico		
285,04	luteolina		PC1 e PC4
	kaempferol		
301,03	quercetina		PC2
	tricetina		
341,1	–	–	PC1
377,0	–	–	PC1 e PC2
378,0	–	–	PC1 e PC4
445,10	–	–	PC2 e PC4
447,06	–	–	PC2
483,07	–	–	PC2

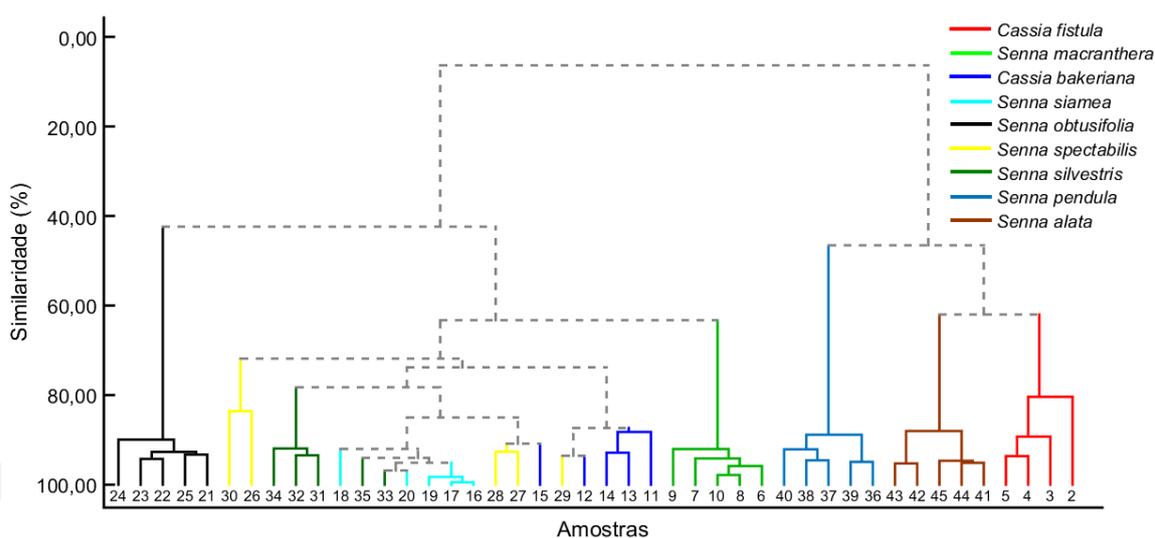
*Componente Principal onde o composto possui maior contribuição para a separação das amostras; –Não foram identificados.

Fonte: autora.

Na HCA construída para as flores no modo negativo (Figura 58) é possível confirmar o resultado observado na PCA, estando as espécies *C. bakeriana*, *S. siamea*,

S. silvestris e *S. spectabilis* mais próximas na HCA, formando o agrupamento com maior grau de similaridade. Em uma escala menor, *S. macranthera* se assemelha a estas, com porcentagem de similaridade superior a 60%, enquanto *S. obtusifolia* se mantém mais separada. Também é possível observar uma porcentagem de similaridade próxima a 60%, entre as espécies *C. fistula* e *S. alata* e em menor grau, a similaridade destas com *S. pendula*.

Figura 58 – Dendrograma gerado pela HCA dos extratos etanólicos das flores no modo negativo.

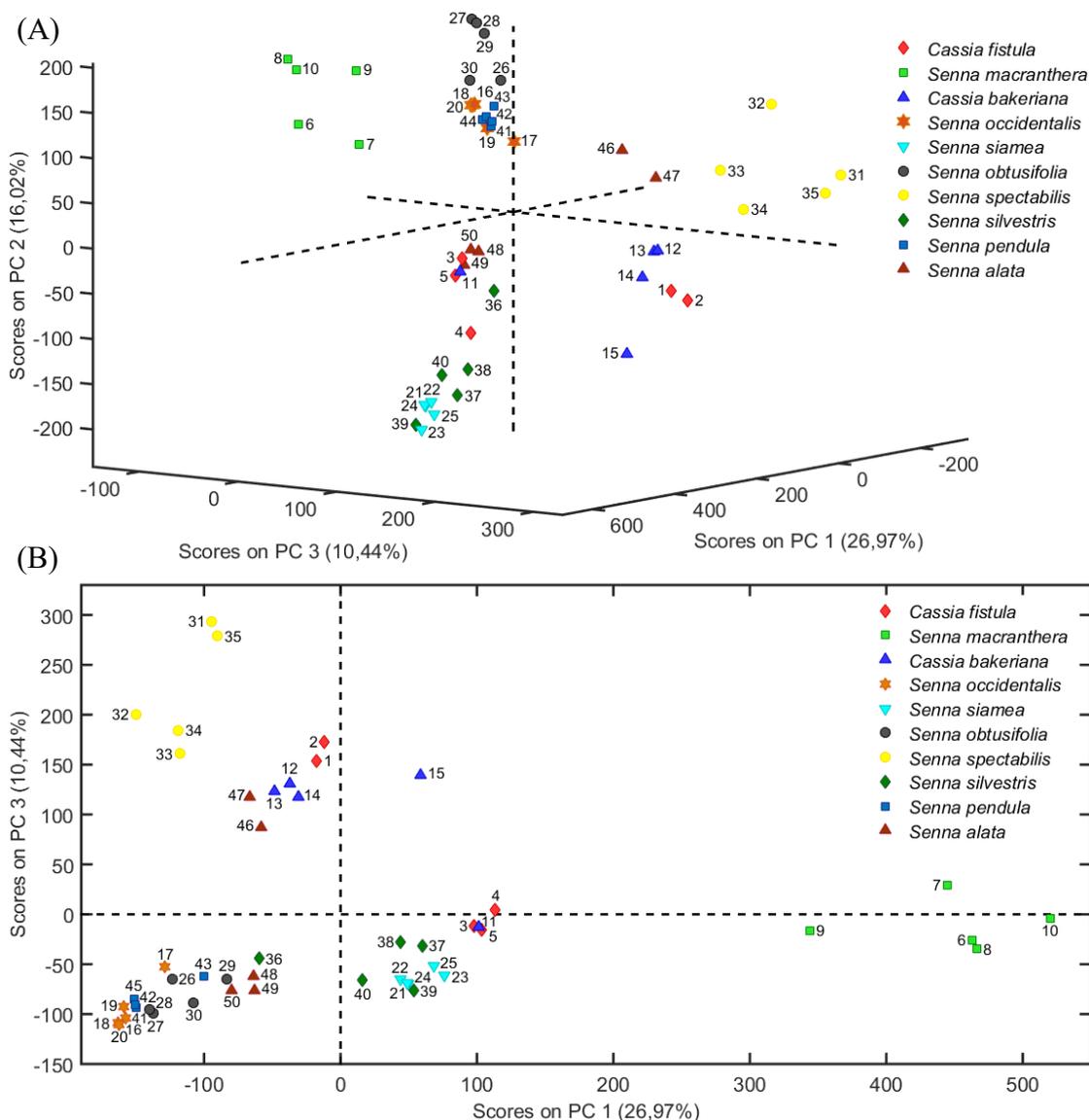


Fonte: autora.

4.8.4 – Análises dos extratos etanólicos das folhas no modo negativo

Para as folhas, modo negativo, o modelo PCA com 60,94% de variância explicada foi construído com 4 PC's (**PC1** 26,97%, **PC2** 16,02%, **PC3** 10,44% e **PC4** 7,51%) e indicou uma maior diferenciação das espécies *S. macranthera* e *S. spectabilis*, que aparecem mais separadas das demais espécies, ocupando os extremos do gráfico de *score Plot* (**PC1 vs PC2 vs PC3**) (Figura 59 A) e (**PC1 vs PC3**) (Figura 59 B). Também foi observado, em menor proporção, a diferenciação da espécie *C. bakeriana*, a semelhança entre as espécies *S. occidentalis*, *S. obtusifolia* e *S. pendula* e, assim como observado para as flores, modo positivo, *S. siamea* e *S. silvestris* também apresentam semelhanças na composição de suas folhas, quando analisadas no modo negativo.

Figura 59 – Gráficos de *Score Plot* (PC1 vs PC3 vs PC5) (A) e (PC1 vs PC3) (B) dos extratos etanólicos das folhas no modo negativo.



Fonte: autora.

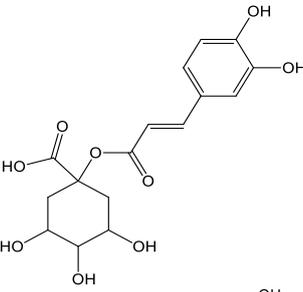
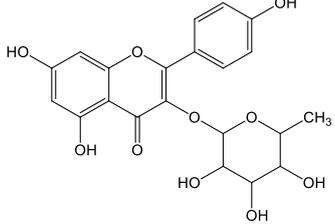
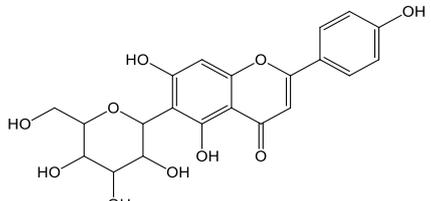
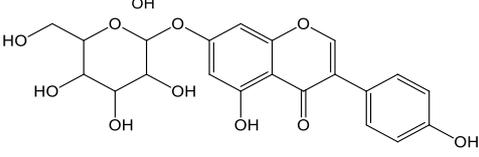
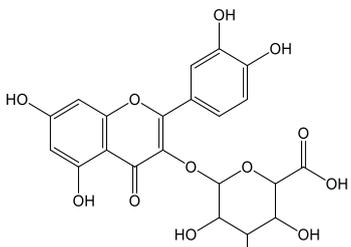
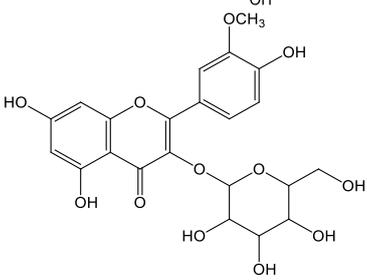
Entre os íons responsáveis pela separação observada ao longo das PCs (Tabela 15), o sinal em m/z 461,15, aparece como sendo um dos principais íons responsáveis dela separação ao longo da PC2 e, foi identificado como sendo os flavonoides kaempferol-3-glucoronídeo m/z 461,0725 $[M - H]^-$, presente em *S. obtusifolia*, e crisoeriol-7-*O*-glucosídeo e/ou crisoeriol-8-*C*-glucosídeo, ambos com m/z 461,1089 $[M - H]^-$, presente nos espectros de massas em alta resolução dos extratos etanólicos das folhas de *C. bakeriana*, *S. occidentalis*, *S. spectabilis* e *S. alata*. Nas espécies *C. fistula*, *S. macranthera*, *S. silvestris* e *S. pendula*, este íon está ausente.

O sinal de m/z 431,1 também aparece como uma das variáveis importantes para a separação (Tabela 15) e, foi atribuído aos flavonoides apigenina-6-*C*-glucosídeo, kaempferol-3-*O*-ramnosídeo e/ou genistina (m/z 431,0984 [M – H]⁻), que foram identificados nas folhas de *C. fistula* (kaempferol-3-*O*-ramnosídeo), *C. bakeriana* (kaempferol-3-*O*-ramnosídeo), *S. occidentalis* (apigenina-6-*C*-glucosídeo) e *S. spectabilis* (genistina). Nas espécies *S. macranthera*, *S. siamea*, *S. obtusifolia*, *S. silvestris* e *S. pendula*, estes compostos estão ausentes.

O sinal referente ao ácido cafeoilquínico (m/z 353,0878 [M – H]⁻) também aparece como uma das variáveis importantes para a separação (Tabela 15), sendo identificado somente nas folhas de *S. macranthera*, o que corrobora para a maior separação desta espécie ao longo da **PC1**.

Outra variável importante para a separação observada ao longo da **PC2**, é o sinal de m/z 477,1 (Tabela 15). Este sinal, aparece nos espectros de massas em alta resolução (m/z 477,1481 [M – H]⁻) das espécies *C. fistula*, *C. bakeriana*, *S. occidentalis*, *S. obtusifolia*, *S. spectabilis*, *S. pendula* e *S. alata*. Em *S. macranthera*, *S. siamea* e *S. silvestris* este íon está ausente. No entanto, não foi possível identificá-lo, pois devido a baixa abundância o íon não foi fragmentado. Além do íon de m/z 477,1481, os sinais em m/z 477,0685 [M – H]⁻ e m/z 477,1047 [M – H]⁻, foram observados em *S. obtusifolia* e *S. pendula*, respectivamente e, foram identificados como sendo os flavonoides quercetina-3-*O*-glucoronídeo (m/z 477,0675 [M – H]⁻) e isoramnetina-3-*O*-glucosídeo (m/z 477,1038 [M – H]⁻).

Tabela 15 – Variáveis (*m/z*) com maior contribuição para a separação dos grupos, no *score plot* e na construção de cada componente principal, das folhas no modo negativo.

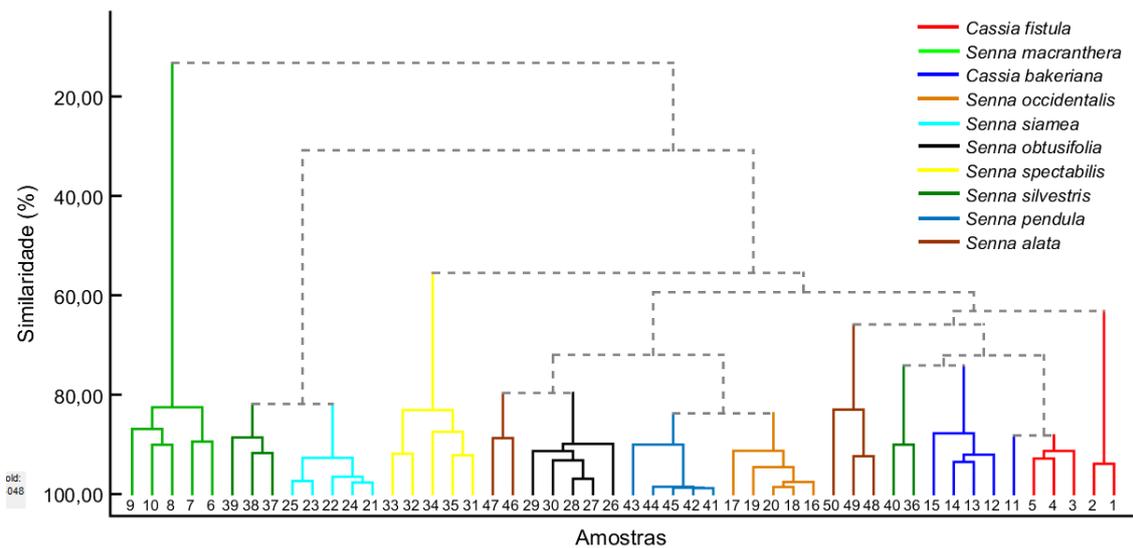
<i>m/z</i>	Identificação	Fórmula estrutural	Utilizada por*
209,06	–	–	PC3
341,1	–	–	PC3
353,08	ácido cafeoilquínico		PC1
	kaempferol-3-O-ramnosídeo		
431,1	apigenina-6-C-glucosídeo		PC1
	genistina		
461,15	–	–	PC2
	quercetina-3-O-glucoronídeo		
477,1	–	–	PC2
	isoramnetina-3-O-glucosídeo		
747,14	–	–	PC3

*Componente Principal onde o composto possui maior contribuição para a separação das amostras; – Não identificados.

Fonte: autora.

Na HCA construída para as folhas no modo negativo (Figura 60) é possível confirmar o resultado observado na PCA, estando as espécies *S. occidentalis* e *S. pendula* mais próximas entre si, com porcentagem de similaridade acima de 80%. Também é possível observar uma porcentagem de similaridade elevada entre *S. siamea* e *S. silvestris*, e a grande diferença entre *S. macranthera* e as demais espécies.

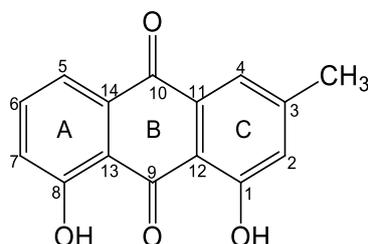
Figura 60 – Dendograma gerado pela HCA dos extratos etanólicos das folhas no modo negativo.



Fonte: autora.

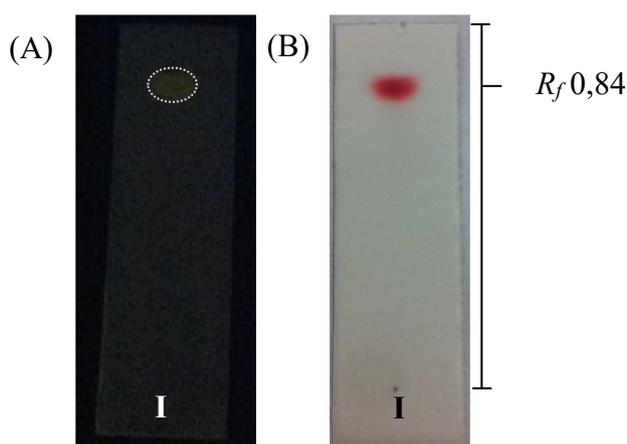
4.9 – Elucidação estrutural das substâncias isoladas das flores de *Senna silvestris*

4.9.1 – Elucidação estrutural do composto I.



O composto I (5,5 mg), isolado da fração hexano das flores de *S. silvestris*, foi obtido como um sólido alaranjado que apresentou fluorescência amarela quando observado em câmara com luz UV (365 nm) (Figura 61 A). Após aspersão com solução alcohólica de KOH 5% a placa apresentou um único sinal de coloração vermelha com R_f 0,84 (Figura 61 B), indicativo de um composto da classe das antraquinonas (WAGNER, BLADT, 2001).

Figura 61 – CCD do composto I. Inspeção em câmara de UV 365 nm (A); revelação química com solução etanólica de KOH 5% como revelador (B).

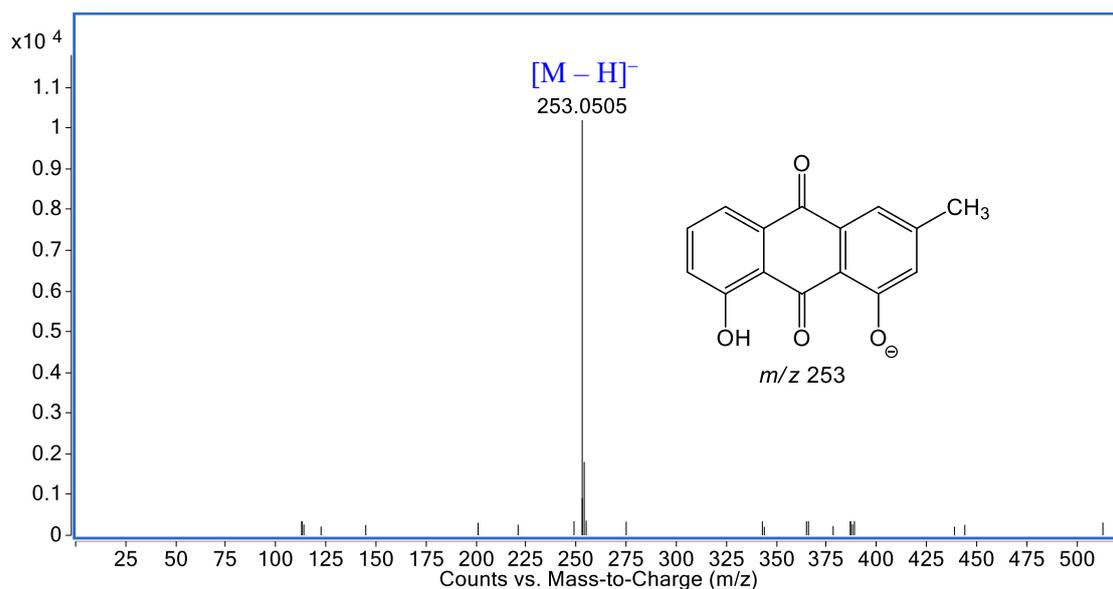


FM: CH₂Cl₂100% e FE: SiO₂.

Fonte: autora.

Quando o composto I foi submetido à análise por espectrometria de massas em alta resolução, modo negativo, foi possível estabelecer a fórmula molecular, C₁₅H₁₀O₄, com índice de deficiência de hidrogênio igual a onze. O sinal referente à molécula desprotonada foi observado em m/z 253,0505 [M – H]⁻, calculado para C₁₅H₉O₄, 253,0506 (Δ -0,4 ppm) (Figura 62).

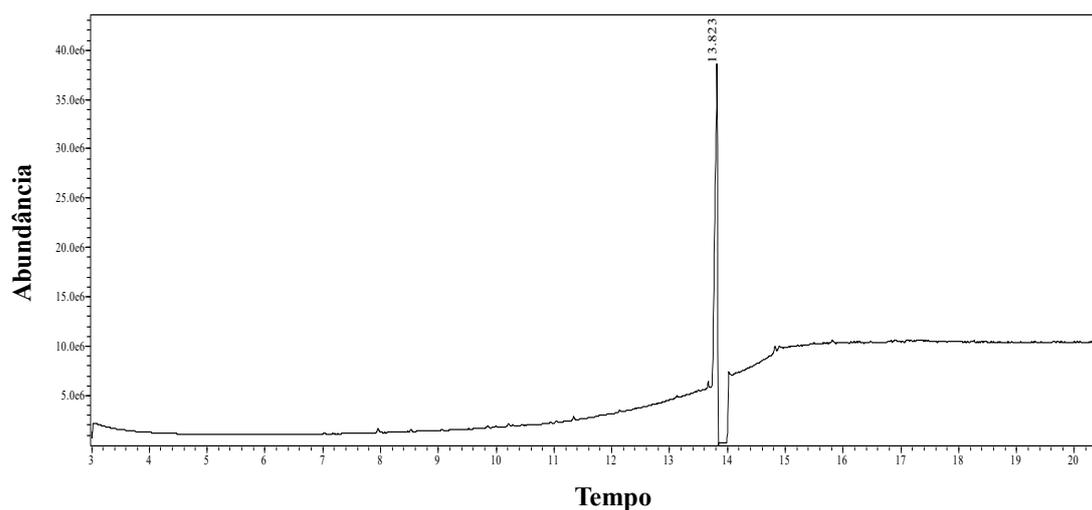
Figura 62 –EM-IES-(–) em alta resolução do composto **I**.



Fonte: autora.

O cromatograma de íons totais da análise por CG-EM (Figura 63), apresentou apenas um sinal com t_R 13,8 min. A comparação do espectro de massas com aqueles da biblioteca do *software* NIST (8, 27 e 147) disponível no equipamento, sugeriu com 90% de similaridade que trata-se da antraquinona crisofanol (**I**). O EM-IE (Figura 64) apresentou o sinal do íon molecular ($[M]^+$, 100%) em m/z 254, compatível com a fórmula molecular, $C_{15}H_{10}O_4$. Também foram observados os íons fragmentos de m/z 239, 226, 198, 197, 180, 169 e 152. A análise dos fragmentos permitiu observar que os sinais de m/z 226 e 198 apresentam diferenças de 28 u , a partir do sinal referente ao íon molecular m/z 254. A partir desta análise foi proposto que o anel B sofre duas contrações consecutivas com eliminação de duas moléculas de CO (Figura 65). Em seguida foram analisados os sinais de m/z 180 e 152, que correspondem a perdas de 18 e 28 u , e que foram atribuídas às eliminações de H_2O e CO, respectivamente. Também foram observados os sinais de m/z 239 e 197, que foram correlacionados às eliminações de CH_3 (15 u) e H_2CCO (42 u), a partir do íon molecular (Figura 65).

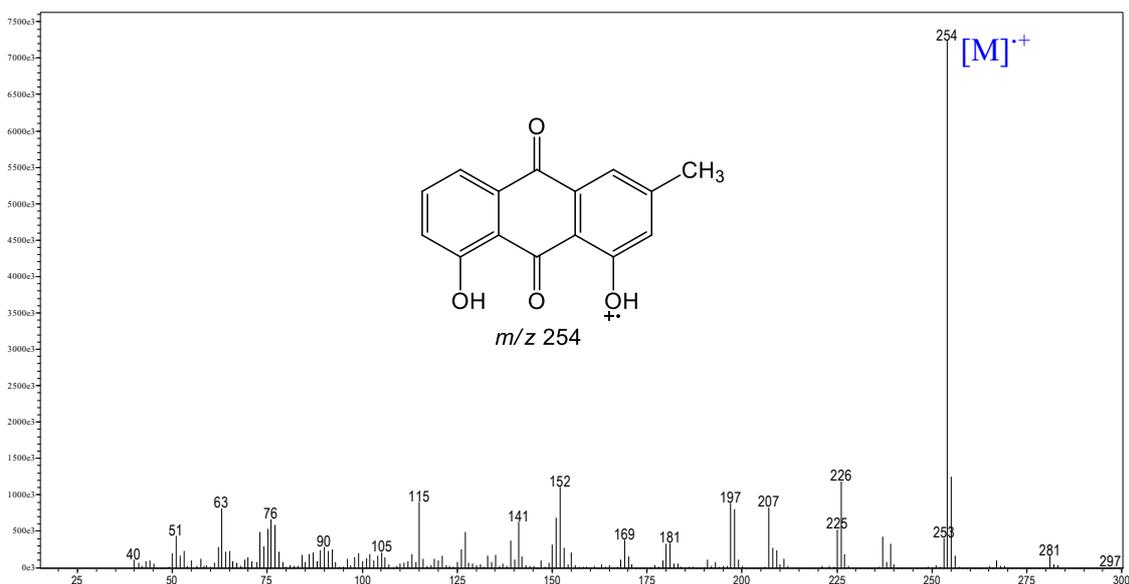
Figura 63 – Cromatograma obtido por CG-EM do composto I.



Condições: Coluna SBP-5 (5% de fenil e 95% de polidimetilsiloxano, 30 m × 0,25 mm × 0,25 μm), gradiente: 100–280 °C (13 °C/min, 21,0 min); C = 1,0 mg/mL, V_{inj.} = 1,0 μL, fluxo: 3,0 mL/min., gás de arraste: N₂, e detector EM-IE.

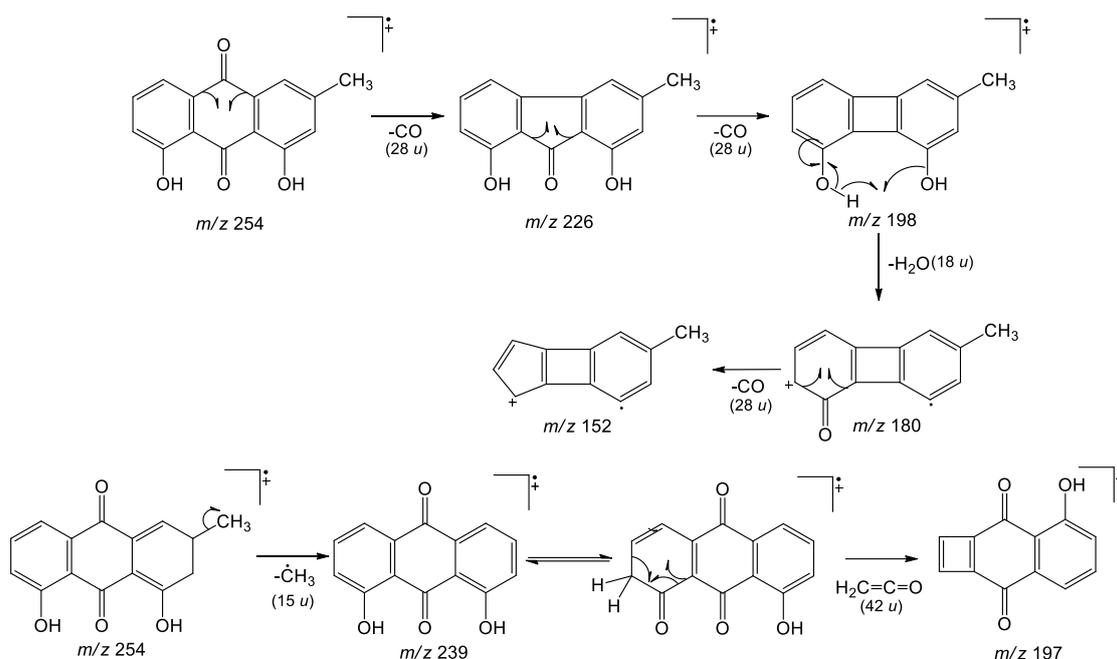
Fonte: autora.

Figura 64 – Espectro de massas com ionização por elétrons (70 eV) do pico com t_R 13,82 min.



Fonte: autora.

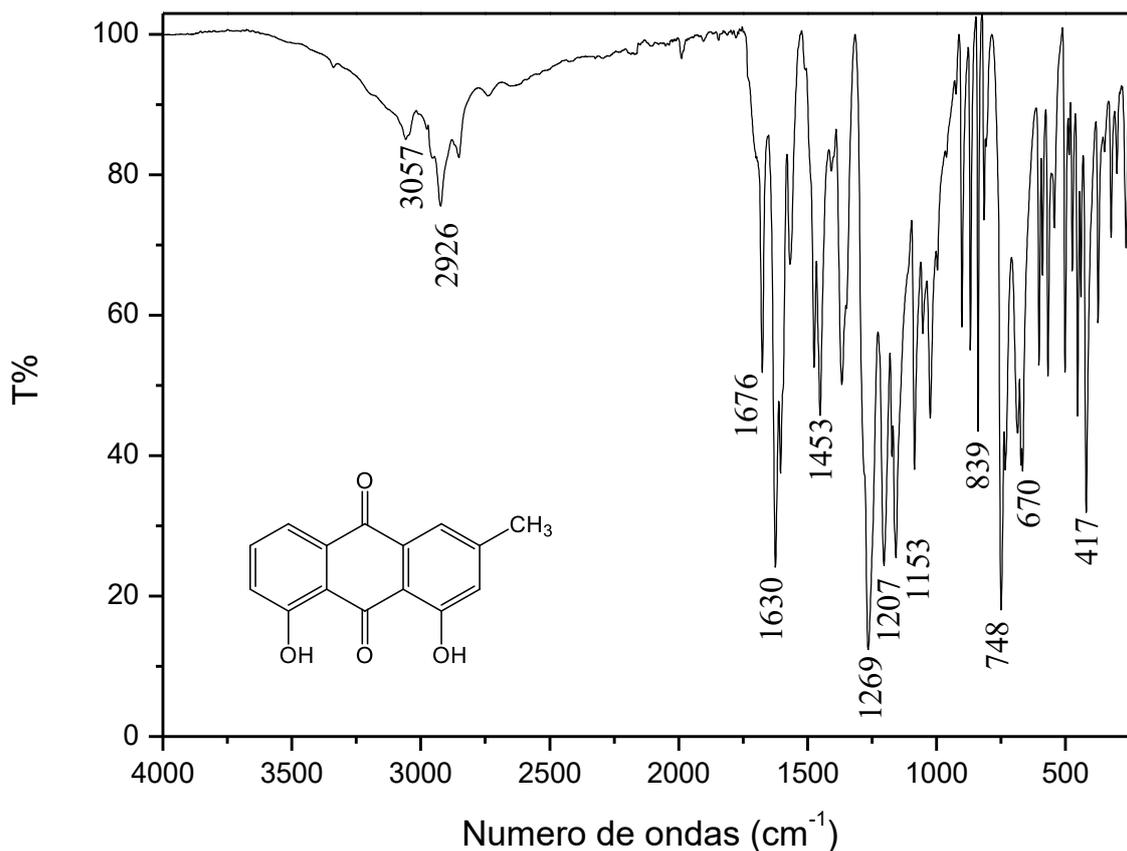
Figura 65 – Proposta de fragmentação para o composto **I** por EM-IE.



Fonte: autora.

O espectro na região do infravermelho de **I** (Figura 66) apresentou bandas de absorção de grupos hidroxila envolvido em ligação de hidrogênio (ν 3057 cm^{-1}), estiramento C-H alifático (ν 2926 cm^{-1}), estiramento C-O (ν 1269 cm^{-1}), deformação angular C=O (ν 1207 cm^{-1}) e deformação angular C-H de aromático (ν 748 cm^{-1}). Também foram observadas duas absorções em (ν 1630 e 1676 cm^{-1}), que de acordo com a literatura estão relacionadas ao grupo carbonila envolvido e não envolvido em ligação de hidrogênio, respectivamente, de uma antraquinona (CHUMBALOV, CHANY SHEVA, MUZYCHKINA, 1967; TIWARI, SINGH, 1977).

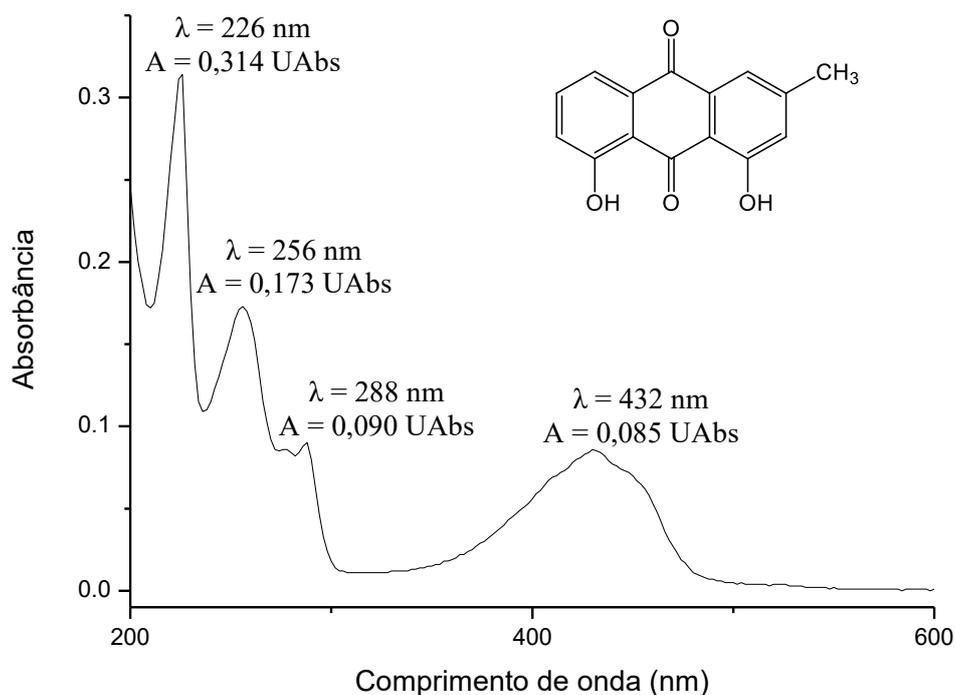
Figura 66 – Espectro de absorção na região do IV do composto **I**.



Fonte: autora.

O espectro UV-visível do composto **I** (Figura 67) apresentou características similares àquelas das antraquinonas. Foram observadas três bandas em $\lambda_{\text{máx}}$ ($\log \epsilon$): 226 (4,78), 256 (4,46) e 288 nm (4,22), que são características de transições eletrônicas $\pi \rightarrow \pi^*$. Também foi observada uma banda de média intensidade em $\lambda_{\text{máx}}$ 432 nm ($\log \epsilon = 4,19$), atribuída a transições eletrônicas $n \rightarrow \pi^*$ (DIAZ, 1990).

Figura 67 – Espectro de absorção na região do UV-Visível de **I** ($C_{EtOH} = 6,0 \text{ nM}$).



Fonte: autora.

O espectro de RMN de ^1H de **I** (Figura 71; Tabela 16) apresentou, na região dos sinais referentes aos hidrogênios aromáticos, dois dupletos em $\delta 7,11$ (1H, $J = 1,0 \text{ Hz}$, H-2) e $7,66$ (1H, $J = 1,0 \text{ Hz}$, H-4), característico de um sistema aromático 1,2,3,5-tetrassubstituído. Também foram observados três duplos dupletos em $\delta 7,83$ (1H, $J = 7,5; 1,1 \text{ Hz}$, H-5), $7,29$ (1H, $J = 8,0; 1,1 \text{ Hz}$, H-7) e $7,67$ (1H, $J = 8,0; 7,5 \text{ Hz}$, H-6), característico de outro sistema aromático 1,2,3-trissubstituído. A região de hidrogênios alifáticos apresentou um simpleto em $\delta 2,47$ (3H, H-15), referente a uma metila ligada a carbono aromático. Também foram observados sinais característicos de hidrogênio de hidroxila que faz ligação intramolecular com a carbonila (quelatado) em $\delta 12,02$ (1H, C1-OH) e $12,13$ (1H, C8-OH) (ANDRADE et al., 2015; PAVIA et al., 2010).

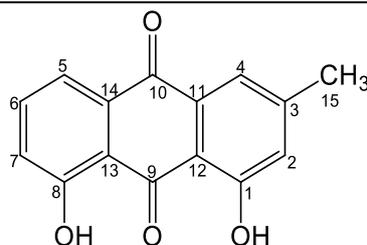
No espectro de RMN de ^{13}C (Figura 72; Tabela 16), foram observados 12 sinais na região de carbonos aromáticos em $\delta 162,6$ (C-1), $124,7$ (C-2), $149,5$ (C-3), $121,5$ (C-4), $120,1$ (C-5), $137,1$ (C-6), $124,5$ (C-7), $162,9$ (C-8), $133,5$ (C-11), $113,9$ (C-12), $116,0$ (C-13) e $133,8$ (C-14); além de dois sinais característicos de carbonila em $\delta 182,2$ (C-10) e $192,7$ (C-9), que caracterizam o núcleo antraquinônico. A metila ligada ao C-3 foi observada em $\delta 22,4$ (C-15). Os sinais observados no espectro de DEPT 135 (Figura 73) corroboram a proposta da antraquinona e juntamente com o mapa de contorno

HSQC (Figura 74), permitiu correlacionar os carbonos aos seus respectivos hidrogênios (Tabela 17).

As principais correlações, observadas no mapa de contorno HMBC (Figuras 75–77), entre δ_H 7,11 (H-2) com δ_C 162,6 (C-1) ($^2J_{H\rightarrow C}$), δ_C 121,5 (C-4) ($^3J_{H\rightarrow C}$), δ_C 113,9 (C-12) ($^3J_{H\rightarrow C}$) e δ_C 22,4 (C-15) ($^3J_{H\rightarrow C}$); entre δ_H 2,47 (H-15) com δ_C 124,7 (C-2) ($^3J_{H\rightarrow C}$), δ_C 149,5 (C-3) ($^2J_{H\rightarrow C}$) e δ_C 121,5 (C-4) ($^3J_{H\rightarrow C}$) e entre δ_H 7,66 (H-4) com δ_C 124,7 (C-2) ($^3J_{H\rightarrow C}$), δ_C 182,2 (C-10) ($^3J_{H\rightarrow C}$), δ_C 113,9 (C-12) ($^3J_{H\rightarrow C}$), δ_C 133,5 (C-11) ($^2J_{H\rightarrow C}$) e δ_C 22,4 (C-15) ($^3J_{H\rightarrow C}$); permitiram confirmar o padrão de substituição do anel C. Assim como as correlações entre δ_H 7,83 (H-5) com δ_C 124,5 (C-7) ($^3J_{H\rightarrow C}$), δ_C 182,2 (C-10) ($^3J_{H\rightarrow C}$) e δ_C 116,0 (C-13) ($^3J_{H\rightarrow C}$); entre δ_H 7,67 (H-6) com δ_C 162,9 (C-8) ($^3J_{H\rightarrow C}$) e δ_C 133,8 (C-14) ($^3J_{H\rightarrow C}$) e entre δ_H 7,29 (H-7) com δ_C 120,1 (C-5) ($^3J_{H\rightarrow C}$) e δ_C 162,9 (C-8) ($^2J_{H\rightarrow C}$), permitiram confirmar o padrão de substituição do anel A. Também foram observadas correlações entre o sinal em δ_H 12,02 (C1-OH) com δ_C 113,9 (C-12) ($^3J_{H\rightarrow C}$) e entre δ_H 12,13 (C8-OH) com δ_C 116,0 (C-13) ($^3J_{H\rightarrow C}$) (Figuras 68 e 75–77; Tabela 17).

Os dados de RMN aliados aos dados de EM, IV e UV-Vis foram similares àqueles encontrados na literatura (ANDRADE et al., 2015; DIAZ, 1990; TIWARI, SINGH, 1977) e são consistentes com a estrutura da 1,8-dihidroxi-3-metilantraquinona (**I**), também conhecida como crisofanol ou ácido crisofânico.

Tabela 16 – Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (400/100 MHz, CDCl_3) do composto **I** em comparação com dados da literatura.



Posição	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$ mult. ^b (<i>J</i> em Hz)	$\delta_{\text{C}}^{\text{a}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{c}}$ mult. ^b (<i>J</i> em Hz)	$\delta_{\text{C}}^{\text{c}}$
1	---	162,6	---	162,4
2	7,11 d (<i>J</i> = 1,0 Hz)	124,7	7,10 d (<i>J</i> = 1,1 Hz)	124,5
3	---	149,5	---	149,3
4	7,66 d (<i>J</i> = 1,0 Hz)	121,5	7,67 d (<i>J</i> = 1,1 Hz, 1H)	121,4
5	7,83 dd (<i>J</i> = 7,5; 1,1 Hz)	120,1	7,85 dd (<i>J</i> = 7,5; 1,4 Hz)	119,9
6	7,67 dd (<i>J</i> = 8,0; 7,5 Hz)	137,1	7,70 t (<i>J</i> = 8,0 Hz)	136,9
7	7,29 dd (<i>J</i> = 8,0; 1,1 Hz)	124,5	7,31 dd (<i>J</i> = 7,62; 1,4 Hz)	121,4
8	---	162,9	---	162,7
9	---	192,7	---	192,5
10	---	182,2	---	182,0
11	---	133,5	---	133,3
12	---	113,9	---	113,7
13	---	116,0	---	115,9
14	---	133,8	---	133,6
15	2,47 s	22,4	2,47 s	22,4
1-OH	12,02 s	---	12,03 s	---
8-OH	12,13 s	---	12,14 s	---

^aDeslocamentos químicos estabelecidos em relação ao padrão interno TMS ($\delta_{\text{TMS}} = 0,0$ ppm).

^bMultiplicidade: d (duplete), s (simpleto). ^cDados da literatura: Experimentos de RMN realizados a 400 e 100 MHz para ^1H e ^{13}C , respectivamente, utilizando CDCl_3 como solvente (MESELHY, 2003).

Fonte: autora.

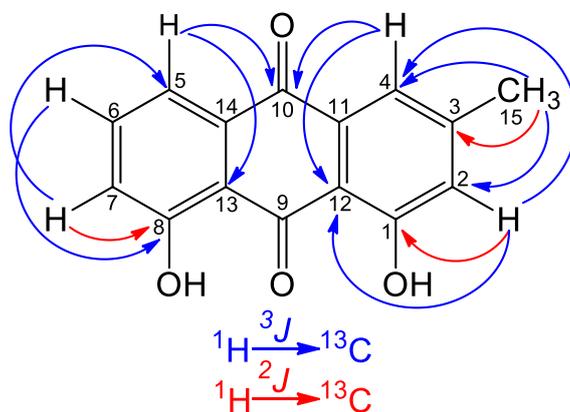
Tabela 17 – Correlações observadas nos mapas de contorno HSQC e HMBC para o composto **I**.

Posição	δ_C^a	DEPT	HSQC	HMBC
1	162,6	---	---	H-2
2	124,7	CH	7,11	H-15, H-4
3	149,5	---	---	H-15
4	121,5	CH	7,66	H-15, H-2,
5	120,1	CH	7,83	H-7
6	137,1	CH	7,67	---
7	124,5	CH	7,29	H-5
8	162,9	---	---	H-6, H-7
9	192,7	---	---	---
10	182,2	---	---	H-4, H-5
11	133,5	---	---	H-4, H-6
12	113,9	---	---	H-2, H-4, H-5, 1-OH
13	116,0	---	---	H-5, 8-OH
14	133,8	---	---	H-6
15	22,4	CH ₃	2,47	H-2, H-4

^aDeslocamentos químicos (δ em ppm) estabelecidos em relação ao padrão interno TMS ($\delta_{TMS} = 0,0$ ppm).

Fonte: autora.

Figura 68 – Principais correlações (H–C) observadas no mapa de contorno HMBC de **I**.

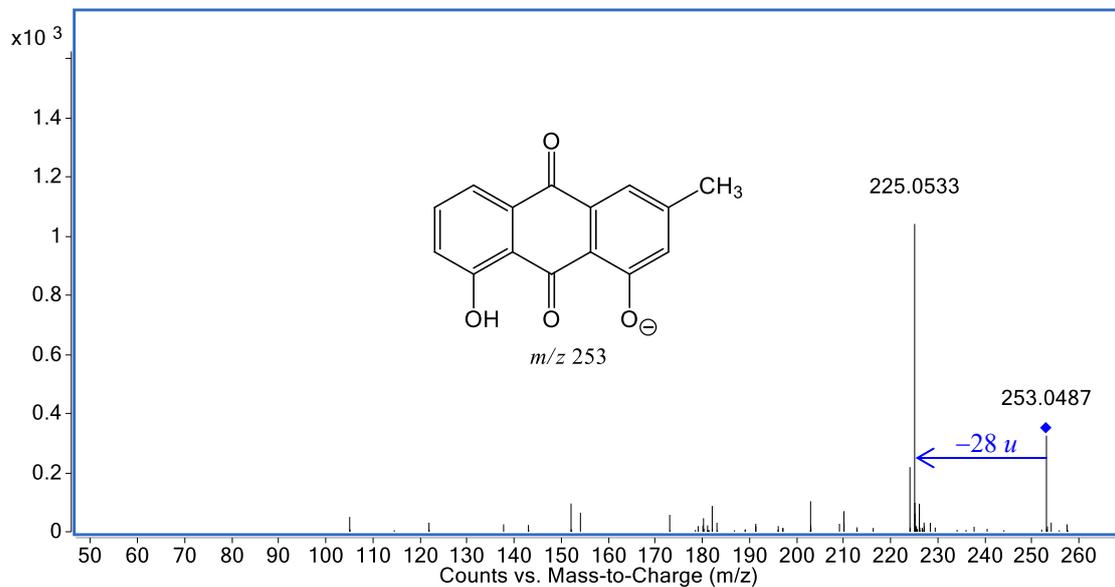


Fonte: autora.

Para confirmar a estrutura proposta, do composto **I**, foi realizada a análise por espectrometria de massas sequencial no modo negativo. O EM-IES obtido da dissociação induzida por colisão do íon m/z 253 $[M - H]^-$ com N_2 , gerou como principal fragmento o íon em m/z 225 (Figura 69), que pode ser atribuído a uma eliminação neutra de CO (28 u)

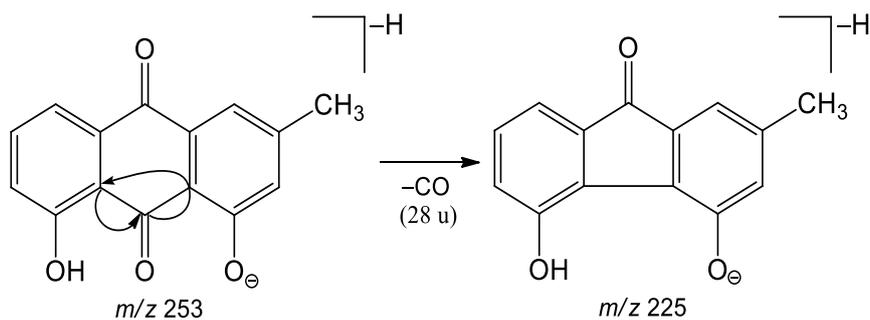
a partir do íon molecular (Figura 70), que é consistente com os dados descritos na literatura para a estrutura do crisofanol (**I**) (WANG, FENG, 2009).

Figura 69 – EM/EM-IES(-) do composto **I** (m/z 253 $[M - H]^-$, energia de colisão 20 eV).



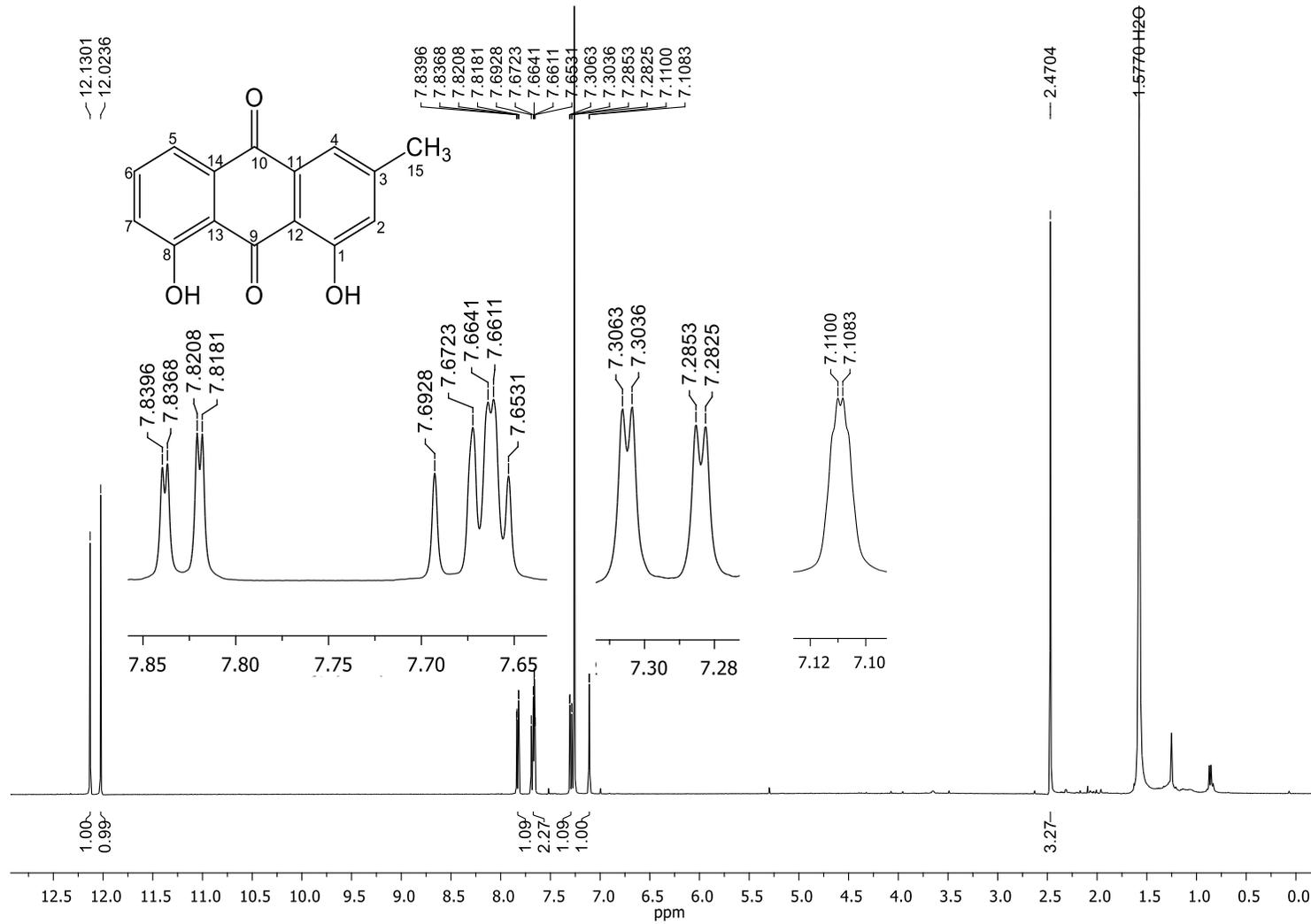
Fonte: autora.

Figura 70 – Proposta de fragmentação do composto **I** por EM-IES.



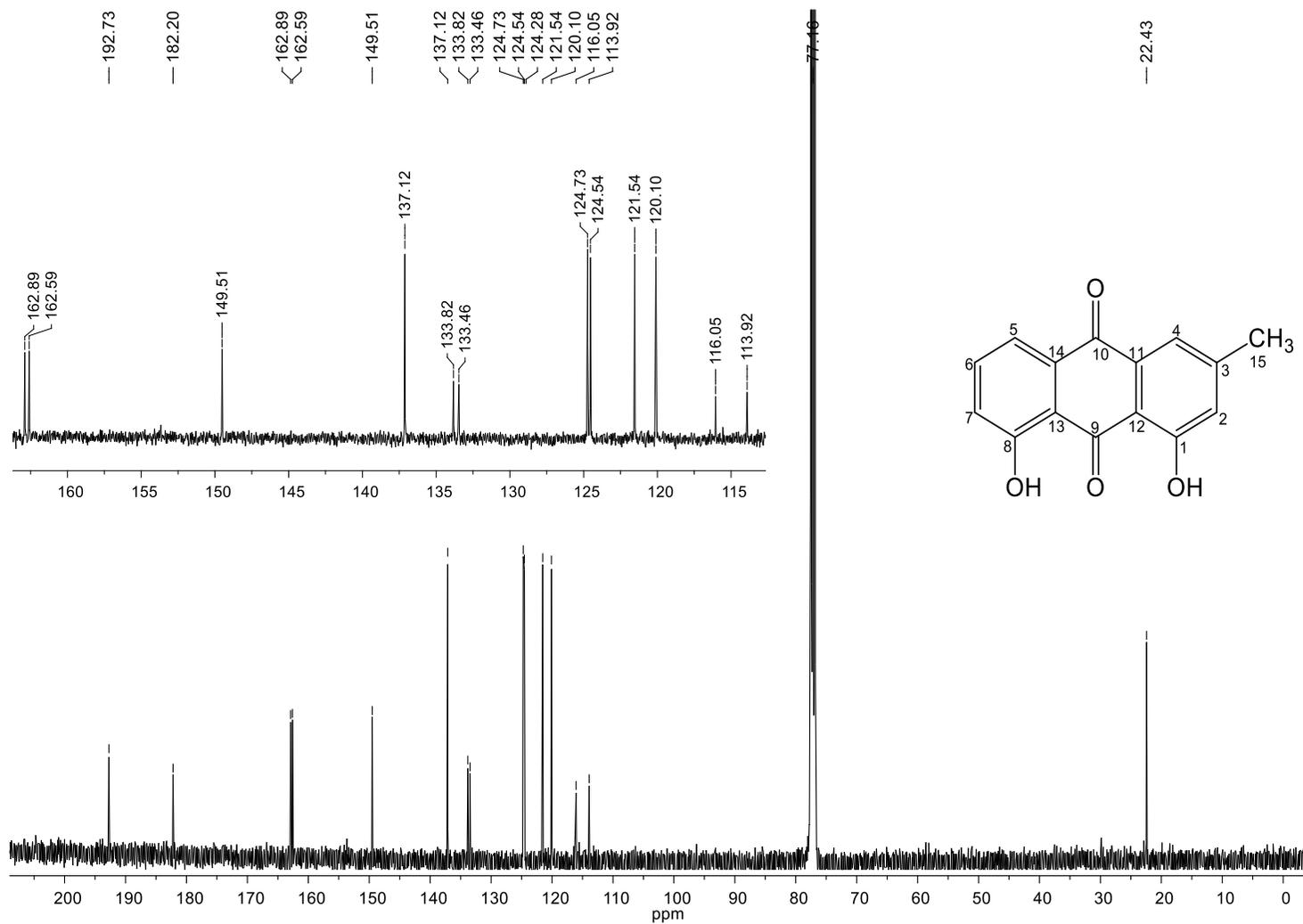
Fonte: autora.

Figura 71– Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do composto I.



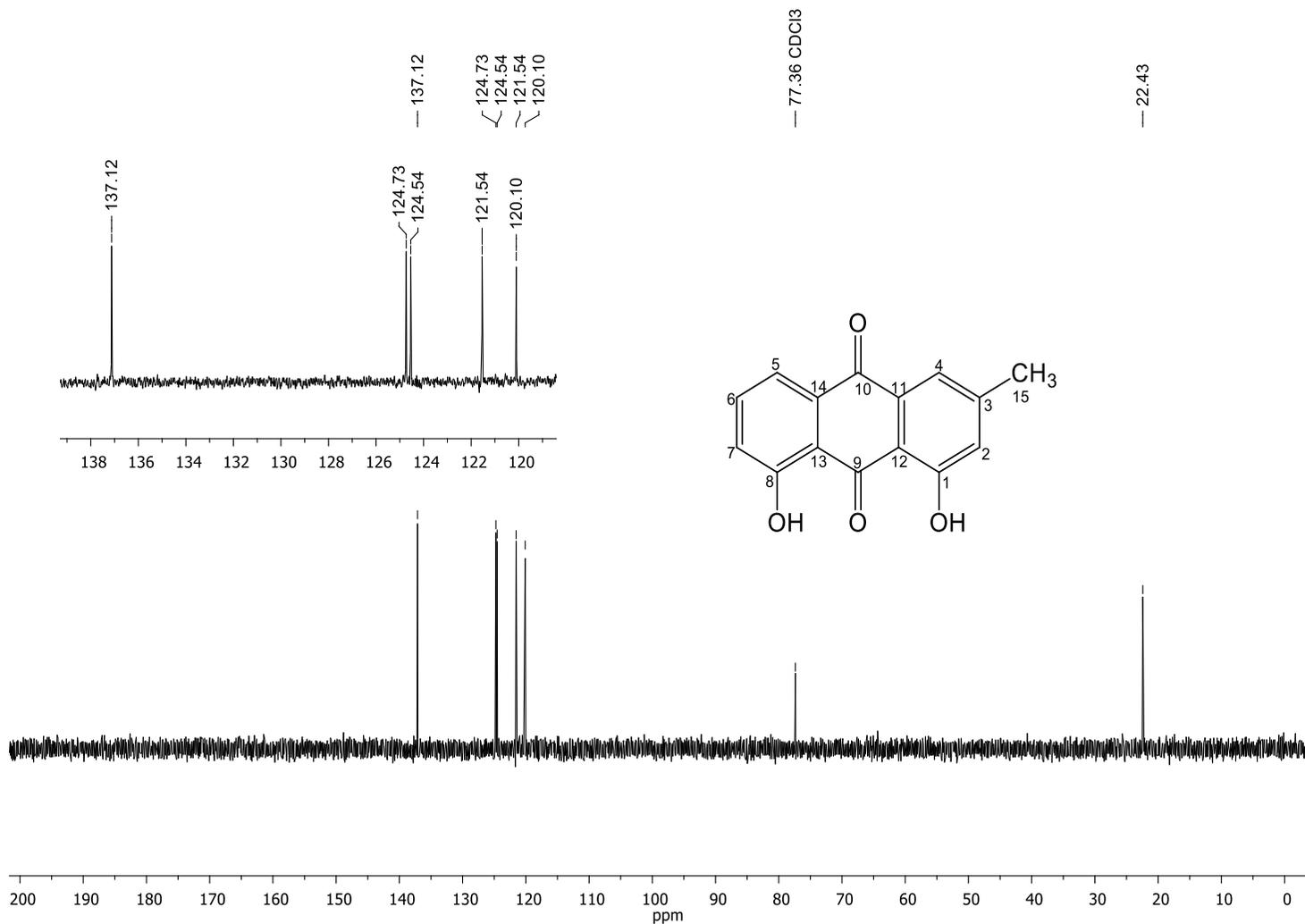
Fonte: autora.

Figura 72 – Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do composto I.



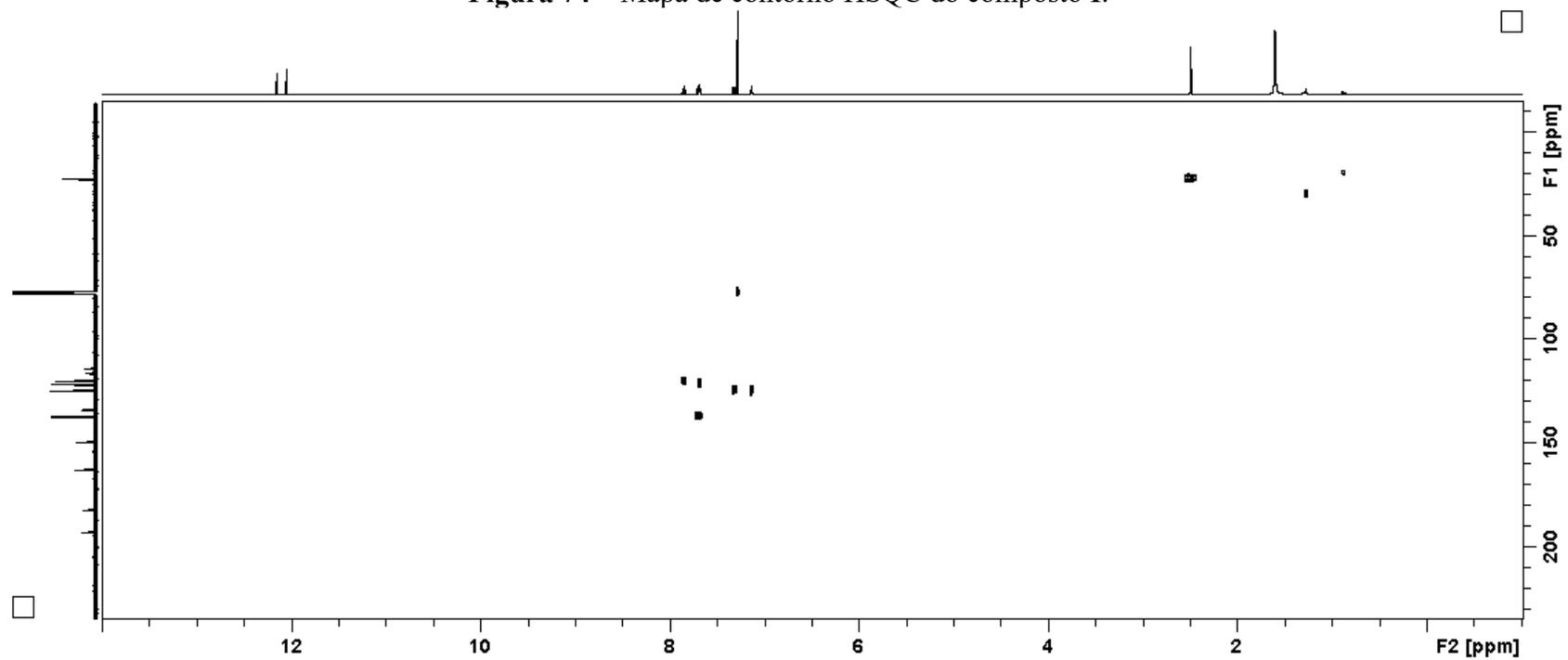
Fonte: autora.

Figura 73 – Espectro de DEPT 135 (100 MHz, CDCl₃) do composto I.



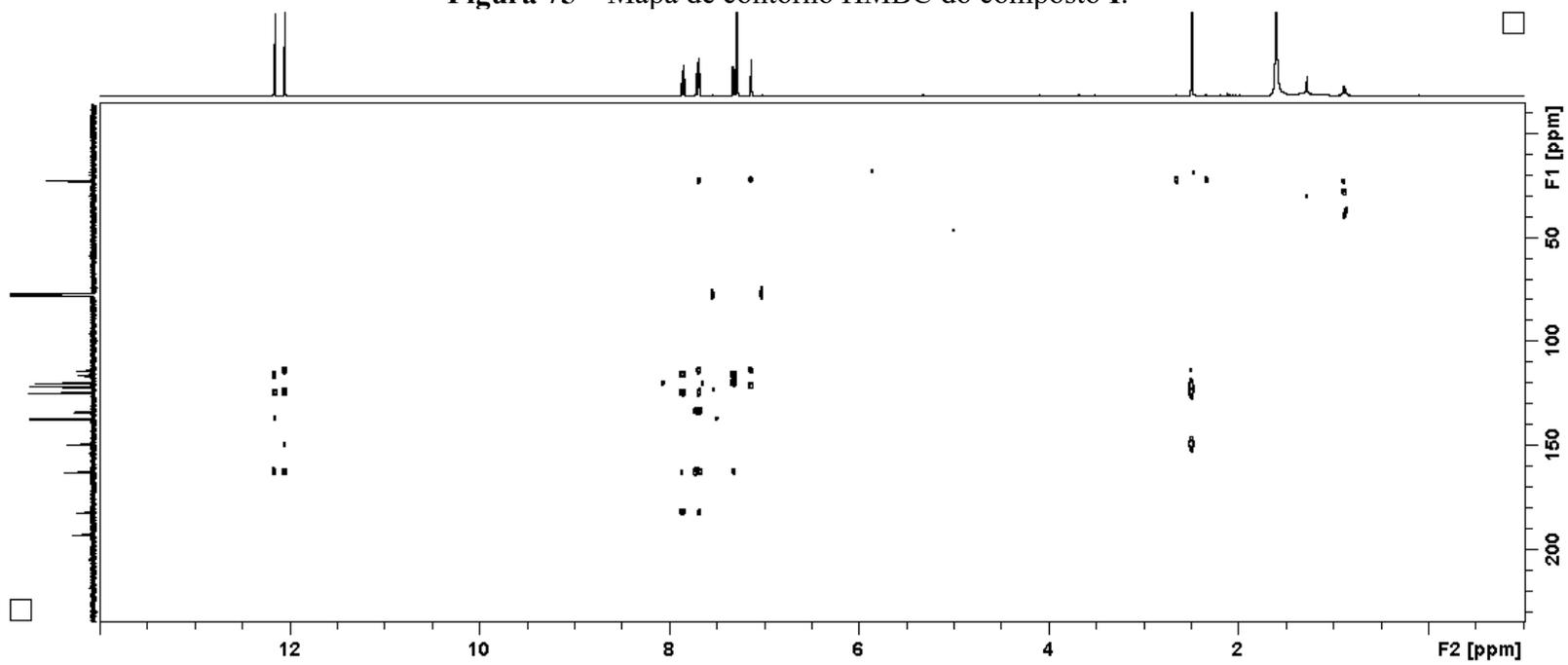
Fonte: autora.

Figura 74 – Mapa de contorno HSQC do composto I.



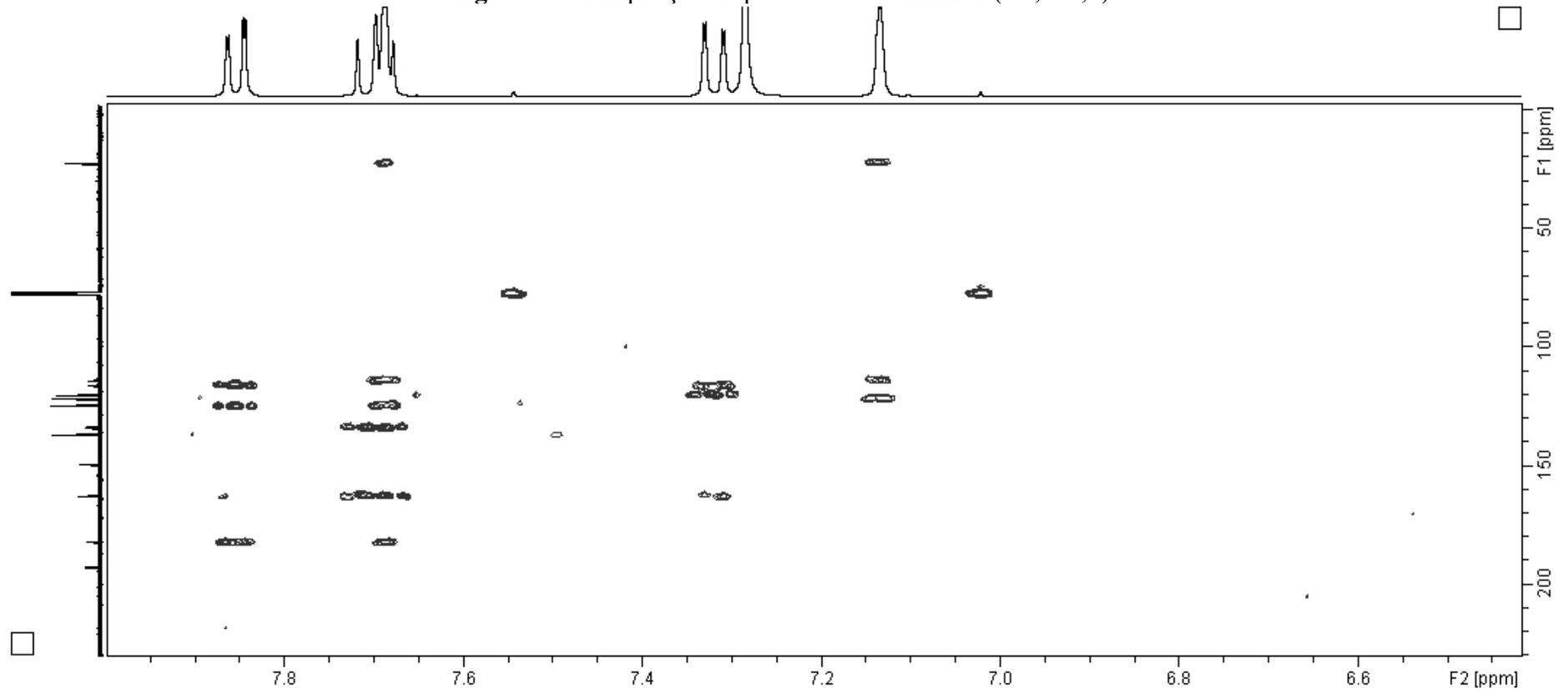
Fonte: autora.

Figura 75 – Mapa de contorno HMBC do composto I.



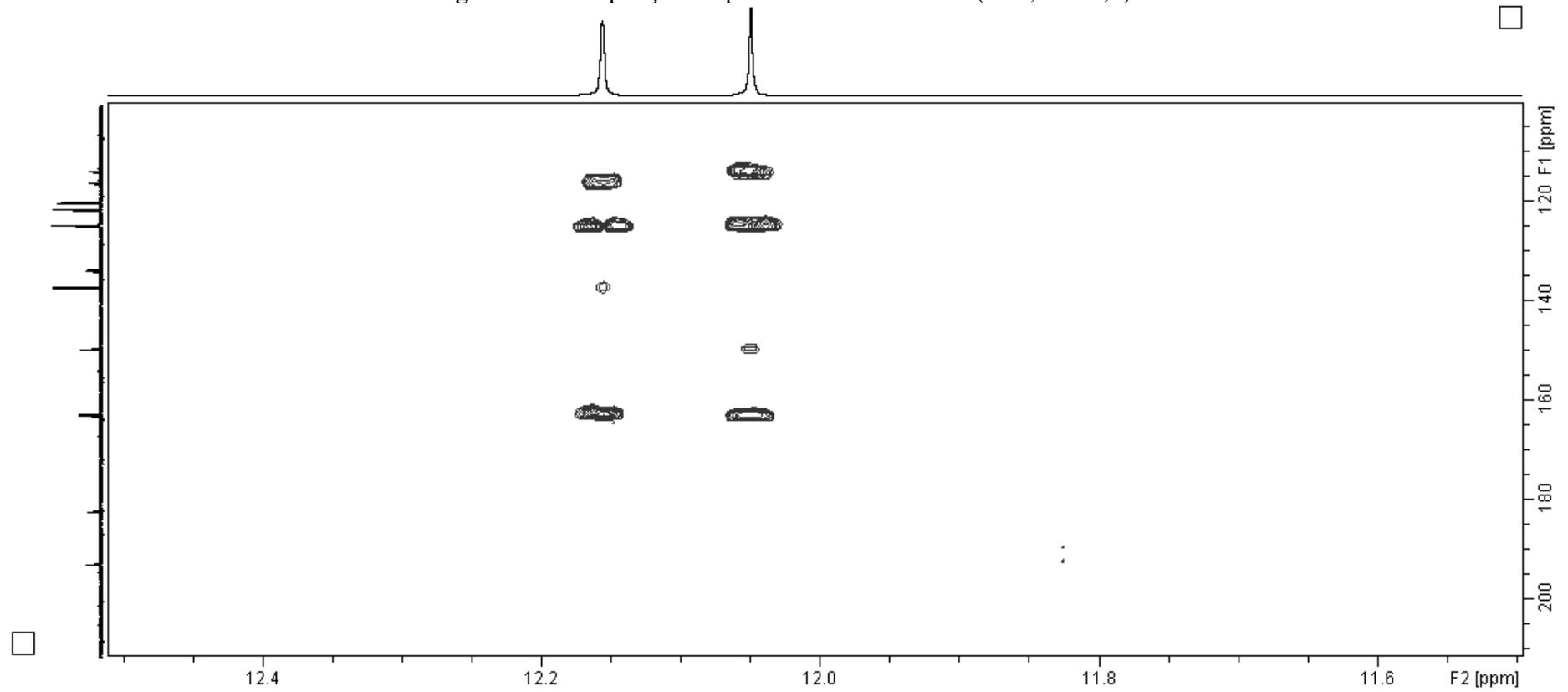
Fonte: autora.

Figura 76 – Ampliação mapa de contorno HMBC (δ 8,0–6,5).



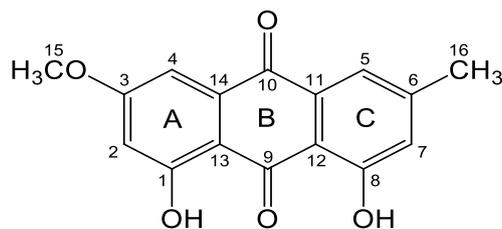
Fonte: autora.

Figura 77 – Ampliação mapa de contorno HMBC (δ 11,5 – 12,5).



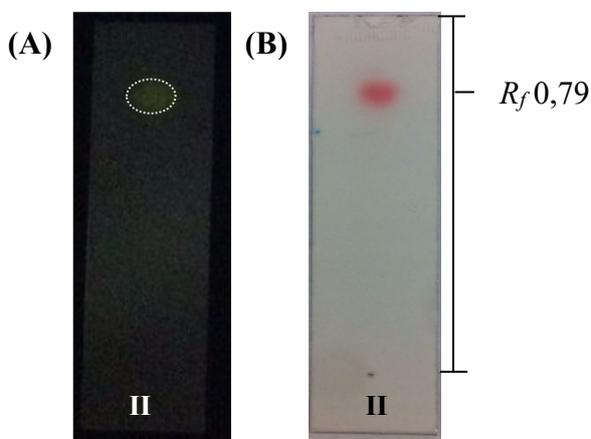
Fonte: autora.

4.9.2 – Elucidação estrutural do composto II.



O composto **II** (4,2 mg), isolado da fração hexano das flores de *S. silvestris*, foi obtido como um sólido alaranjado que apresentou fluorescência amarela quando analisado por CCD e observado em câmara com luz UV (365 nm) (Figura 78 A). Também apresentou teste positivo após aspersão com solução de KOH 5% (R_f 0,79) (Figura 78 B) (WAGNER, BLADT, 2001).

Figura 78 – CCD do composto **II**. Inspeção em câmara de UV 365 nm (A); revelação química com solução etanólica de KOH 5% como revelador (B).

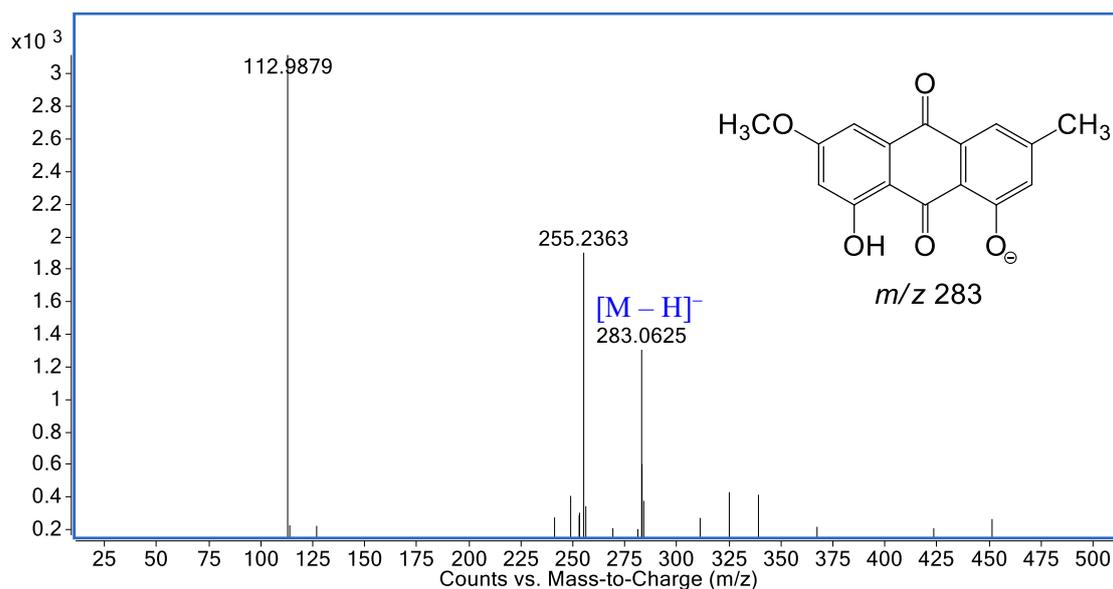


FM: CH₂Cl₂/MeOH (9:1) e FE:SiO₂.

Fonte: autora.

A análise por espectrometria de massas em alta resolução no modo negativo, do composto **II**, permitiu estabelecer a fórmula molecular C₁₆H₁₂O₅, com índice de deficiência de hidrogênio igual a onze. O pico referente molécula desprotonada foi observado em m/z 283,0625 [M – H]⁻, calculado para C₁₆H₁₁O₅, 283,0612 (Δ 4,6 ppm). (Figura 79). Foi possível observar que a massa molecular de **II**, 283,0625, é 30 u maior que **I**, 253,0506), sugerindo a presença de um grupo metoxila (–OCH₃) adicional na estrutura.

Figura 79 – EM-IES(-) em alta resolução do composto **II**.

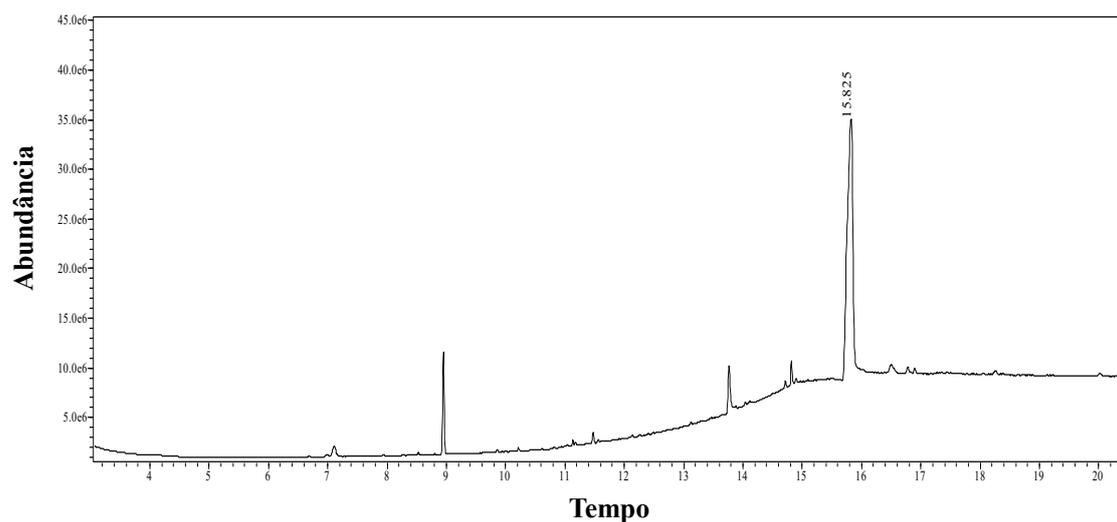


Fonte: autora.

O cromatograma de íons totais da análise por CG-EM (Figura 80) apresentou um sinal majoritário com t_R 15,8 min. A comparação do espectro de massas com aqueles da biblioteca do *software* NIST (8, 27 e 147) disponível no equipamento, sugeriu com 85% de similaridade que trata-se da antraquinona fisiona (**II**). O EM-IE deste pico (Figura 81) apresentou o sinal do íon molecular ($[M]^+$, 100%) em m/z 284, compatível com a fórmula molecular, C₁₆H₁₂O₅. Também foram observados os íons fragmentos de m/z 254, 255, 256, 241, 227, 226, 213, 198, 185 e 167.

Os sinais de m/z 256 e 255 apresentam diferenças de 28 e 29 *u* a partir do sinal referente ao íon molecular m/z 284 (Figura 82). A partir desta análise foi proposto que uma contração do anel B com eliminação de CO, gera o fragmento de m/z 256, e a eliminação de COH a partir do anel A, gera o fragmento de m/z 255. Em seguida foram analisados os sinais de m/z 241 e 227, que correspondem a perdas de 14 e 28 *u*, e que foram atribuídas às eliminações de CH₂ e CO, a partir do íon de m/z 255. A partir da análise dos sinais de m/z 213 e m/z 185, que apresentam diferenças de 28 e 56 *u*, a partir do sinal de m/z 241, foi proposto que o anel B sofre duas contrações consecutivas com eliminação de duas moléculas de CO. O sinal de m/z 167 foi correlacionado à eliminação de H₂O (18 *u*), a partir do íon de m/z 185. Também foram observados os sinais de m/z 254, 226 e 198, que foram correlacionados às eliminações de CH₂O (30 *u*), seguida de duas eliminações consecutivas de CO (28 *u*), a partir do íon molecular (Figura 82).

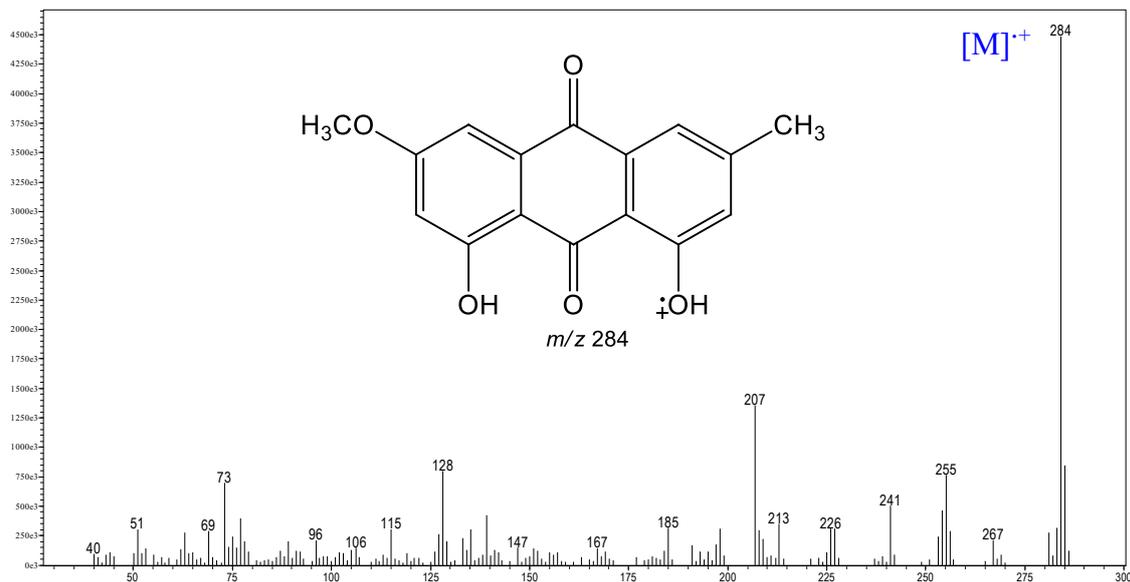
Figura 80 – Cromatograma obtido por CG-EM do composto **II**.



Condições: Coluna SBP-5 (5% de fenil e 95% de polidimetilsiloxano, 30 m × 0,25 mm × 0,25 μm), gradiente: 100–280 °C (13 °C/min., 21,0 min.); C = 1,0 mg/mL, V_{inj.} = 1,0 μL, fluxo: 3,0 mL/min., gás de arraste: N₂, e detector EM-IE.

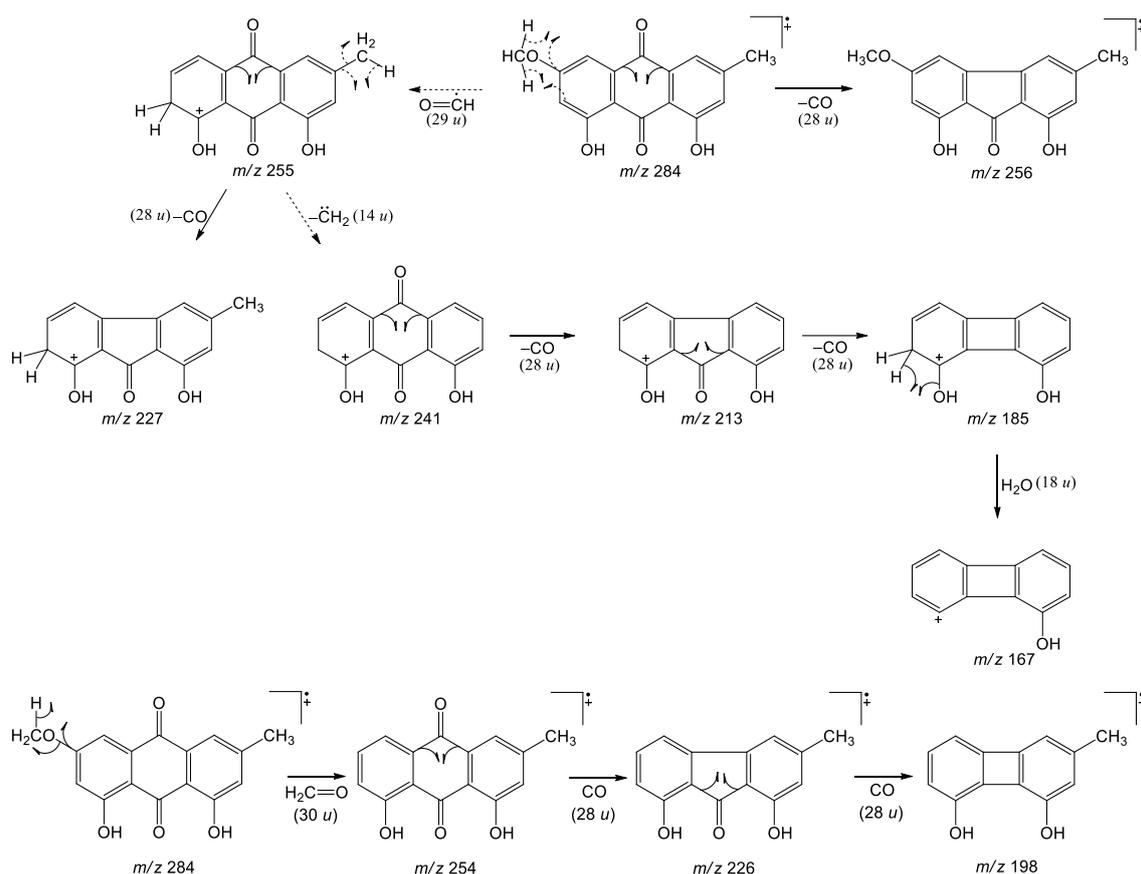
Fonte: autora.

Figura 81 – Espectro de massas com ionização por elétrons (70 eV) do pico com t_R 15,82 min.



Fonte: autora.

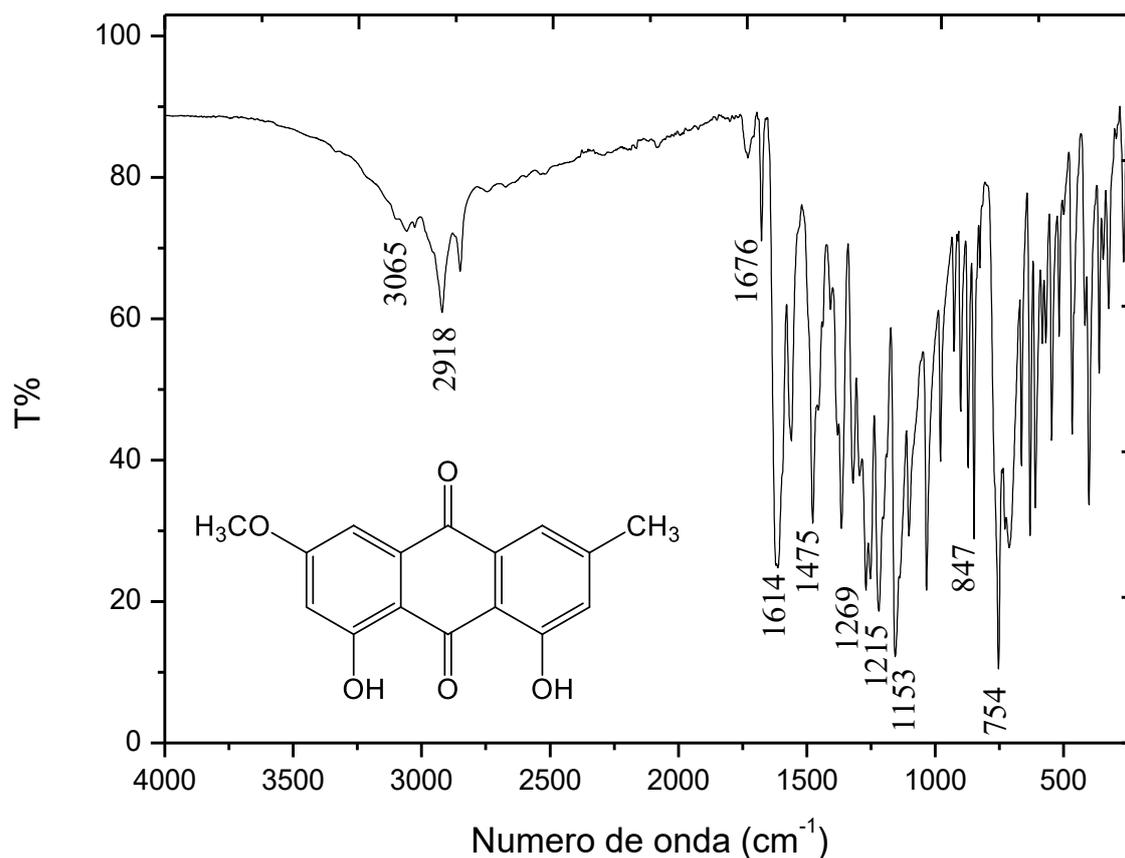
Figura 82 – Proposta de fragmentação do composto **II** por EM-IE.



Fonte: autora.

Nos espectros nas regiões do IV e Uv-Vis do composto **II** foram observados perfis similares àqueles do composto **I**. No IV (Figura 83) Foram observadas bandas em ν 1676 cm^{-1} (estiramento C=O livre), ν 1614 (estiramento C=O envolvido em ligação de hidrogênio), 1475 cm^{-1} (estiramento C=C de anéis aromáticos), ν 1269 cm^{-1} (estiramento C-O) e ν 754 cm^{-1} (deformação angular C-H de aromático) (CHUMBALOV, CHANYNSHEVA, MUZYCHKINA, 1967; TIWARI, SINGH, 1977).

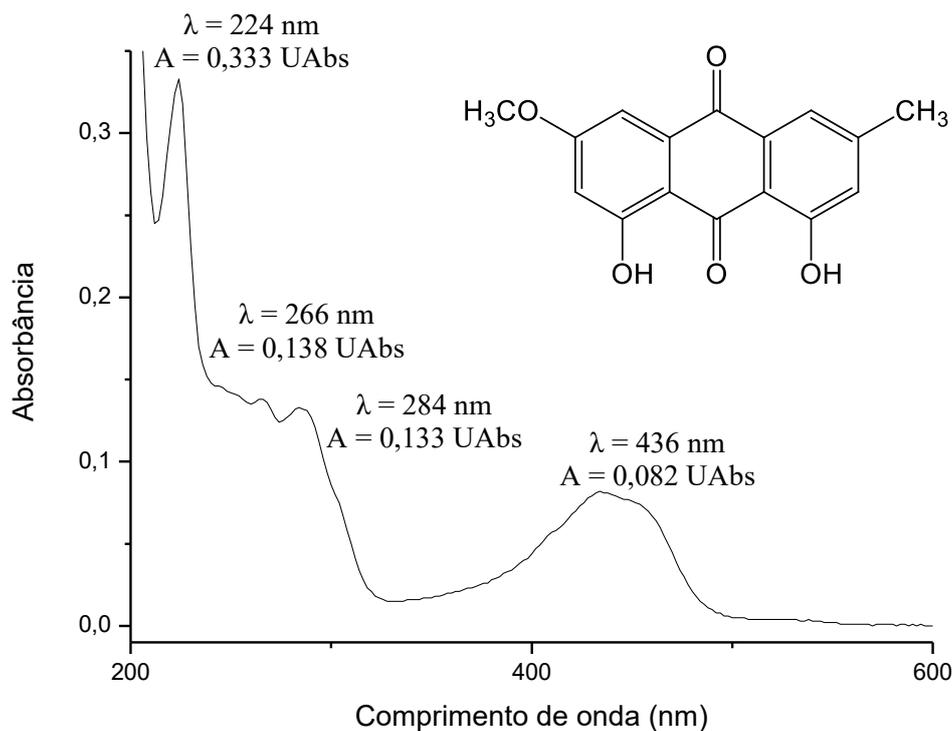
Figura 83 – Espectro de absorção na região do IV do composto **II**.



Fonte: autora.

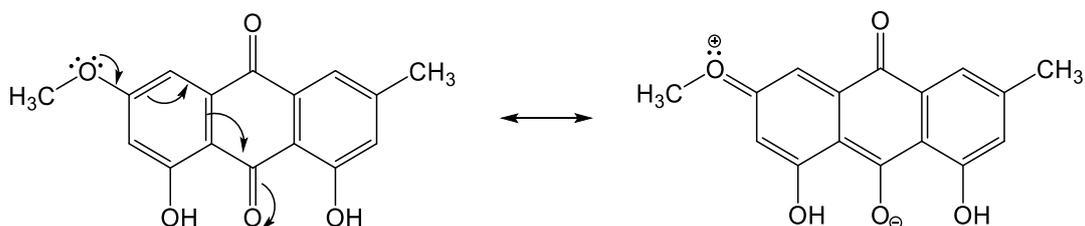
No espectro na região do UV-Vis (Figura 84), foram observadas três bandas em $\lambda_{\text{máx}}$ ($\log \epsilon$): 224 (4,46), 266 (4,05) e 284 nm (4,03), que são características de transições eletrônicas $\pi \rightarrow \pi^*$ (DIAZ, 1990; MARKOVIĆ, MANOJLOVIĆ, ZLATANOVIĆ, 2008; TIWARI, SINGH, 1977). A banda na região do visível com máximo de absorção em 436 nm ($\log \epsilon = 3,81$) apresentou um deslocamento batocrômico quando comparada com a banda equivalente no composto **I** (432 nm). Esse deslocamento está associado à presença do grupo metoxila ($-\text{OCH}_3$), adicional na estrutura do composto **II** (PETERS, SUMNER, 1953). A presença de substituinte doador de elétrons por ressonância ligado ao núcleo antraquinônico auxilia a conjugação com a carbonila, conseqüentemente diminui a energia necessária para esse tipo de absorção (Figura 85).

Figura 84 – Espectro de absorção na região do UV-Visível de **II** ($C_{EtOH} = 6,0 \text{ nM}$).



Fonte: autora.

Figura 85 – Contribuição de grupos doadores de elétrons no deslocamento da banda no visível de antraquinonas.



Fonte: autora.

O espectro de RMN de ^1H de **II** (Figura 88; Tabela 18) apresentou características similares às do composto **I**. Adicionalmente, foi observado um simpleto em δ 3,97 (3H, H-16) característico de grupo metoxila. Na região dos sinais referentes aos hidrogênios aromáticos característicos do anel A, foram observados dois dupletos em δ 6,69 (1H, $J = 2,6 \text{ Hz}$, H-2) e δ 7,37 (1H, $J = 2,6 \text{ Hz}$, H-4) que caracterizam um sistema aromático 1,2,3,5 tetrassubstituído (MESELHY, 2003; PAVIA et al., 2010).

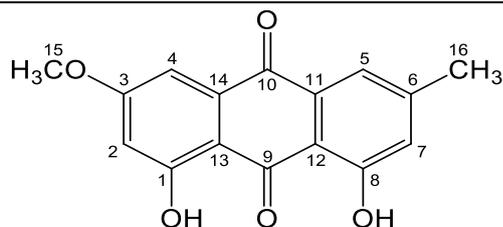
A análise do espectro de RMN de ^{13}C (Figura 89; Tabela 18), permitiu observar a presença de um sinal adicional em δ 56,2 (C-15), que foi correlacionado a metoxila.

Também foi observado que o sinal referente ao C-3 no composto **II** (δ 166,7), está em uma região de maior desproteção quando comparado com o sinal equivalente no composto **I** (δ 137,1), o que indica a presença do grupo $-\text{OCH}_3$. Os sinais observados no espectro de DEPT 135 (Figura 90) corroboram com a proposta da antraquinona e juntamente com o mapa de contorno HSQC (Figuras 91 e 92), permitiu correlacionar os carbonos aos seus respectivos hidrogênios (Tabela 19).

No mapa de contorno HMBC (Figuras 93 e 94) foi possível observar a correlação entre o sinal em δ_{H} 3,97 (3H, H-15) com δ_{C} 166,7 (C-3) ($^3J_{\text{H-C}}$), que confirma a posição da metoxila no carbono C-3. Correlações adicionais estão compiladas na Figura 86 e Tabela 19.

Os dados de RMN (Tabelas 18 e 19; Figuras 88–94), aliados aos dados de EM, IV, UV-Vis e CG-EM, foram similares àqueles encontrados na literatura (CHUMBALOV, CHANY SHEVA, MUZYCHKINA, 1967; DIAZ, 1990; JIN et al., 2007; MARKOVIĆ, MANOJLOVIĆ, ZLATANOVIĆ, 2008; MESELHY, 2003; TIWARI, SINGH, 1977; WANG, FENG, 2009) e são consistentes com a estrutura da 1,8- diidroxí-6-metil-3-metoxiantraquinona (**II**), também conhecida como fisciona.

Tabela 18 – Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (400/100 MHz, CDCl_3) do composto **II** em comparação com dados da literatura.



Posição	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$ mult. ^b (<i>J</i> em Hz)	$\delta_{\text{C}}^{\text{a}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{c}}$ mult. ^b (<i>J</i> em Hz)	$\delta_{\text{C}}^{\text{c}}$
1	---	165,3	---	165,2
2	6,69 d (<i>J</i> = 2,6 Hz)	106,9	6,69 d (<i>J</i> = 2,6 Hz)	106,8
3	---	166,7	---	166,6
4	7,37 d (<i>J</i> = 2,6 Hz)	108,4	7,36 d (<i>J</i> = 2,6 Hz)	108,4
5	7,63 d (<i>J</i> = 1,0 Hz)	121,4	7,62 sl	121,3
6	---	148,7	---	148,5
7	7,08 d (<i>J</i> = 1,0 Hz)	124,7	7,08 sl	124,5
8	---	162,5	---	162,5
9	---	190,9	---	190,8
10	---	182,2	---	182,0
11	---	133,4	---	133,3
12	---	113,8	---	113,7
13	---	110,4	---	113,7
14	---	135,4	---	135,3
15	3,97 s	56,2	3,50	56,1
16	2,45 s	22,3	2,45 s	22,2
1-OH	12,31 s	---	12,31 s	---
8-OH	12,12 s	---	12,10 s	---

^aDeslocamentos químicos estabelecidos em relação ao padrão interno TMS ($\delta_{\text{TMS}} = 0,0$ ppm).
^bMultiplicidade: d (duplete), s (simpleto), sl (simpleto largo). ^cDados da literatura: Experimentos de RMN realizados a 400 e 100 MHz para ^1H e ^{13}C , respectivamente, utilizando CDCl_3 como solvente (MESELHY, 2003).

Fonte: autora

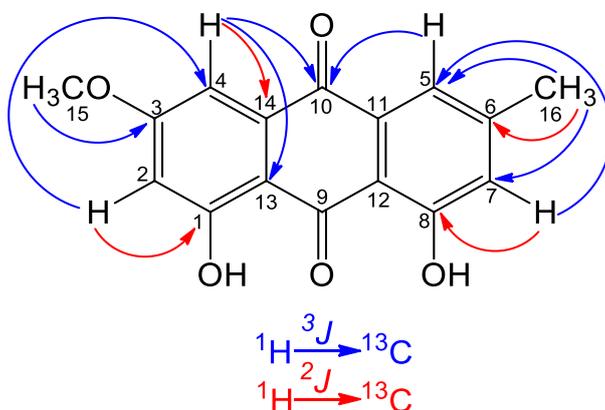
Tabela 19 – Correlações observadas nos mapas de contorno HSQC e HMBC do composto **II**.

Posição	δ_C^a	DEPT	HSQC	HMBC
1	165,3	---	---	H-2
2	106,9	CH	6,69	H-4
3	166,7	---	---	H-4, H-2, H-15
4	108,4	CH	7,37	H-2
5	121,4	CH	7,63	H-16, H-7,
6	148,7	---	---	H-16
7	124,7	CH	7,08	H-16, H-5
8	162,5	---	---	H-7
9	190,9	---	---	---
10	182,2	---	---	H-5, H-4
11	133,4	---	---	---
12	113,8	---	---	H-7, H-5
13	110,4	---	---	H-4
14	135,4	---	---	H-4
15	56,2	CH ₃	3,97	---
16	22,3	CH ₃	2,47	H-7, H-5

^aDeslocamentos químicos (δ em ppm) estabelecidos em relação ao padrão interno TMS ($\delta_{TMS} = 0,0$ ppm).

Fonte: autora.

Figura 86 – Principais correlações (H–C) observadas no mapa de contorno HMBC de **II**.

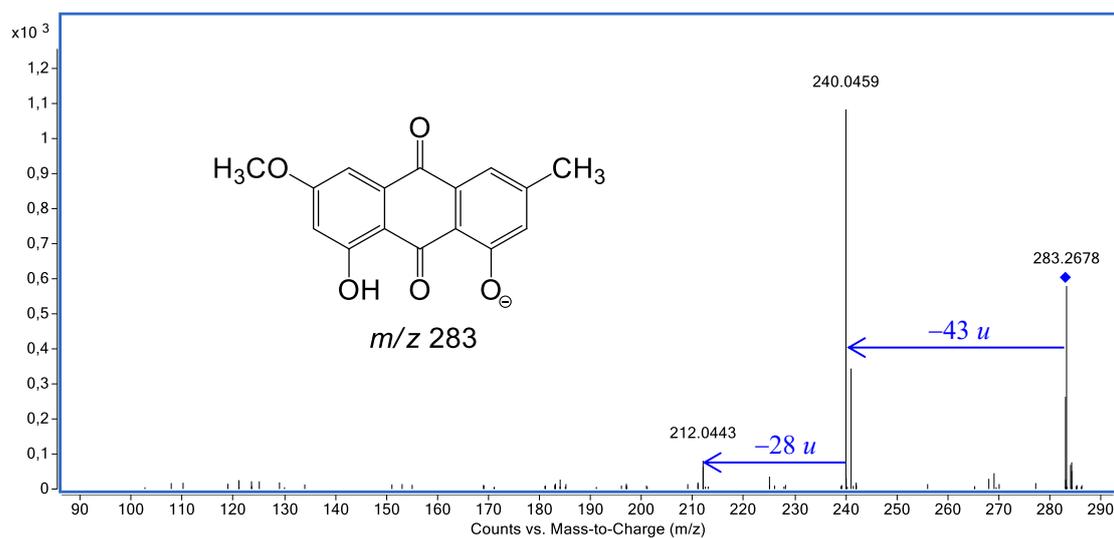


Fonte: autora.

O EM-IES obtido da dissociação induzida por colisão do íon molecular m/z 283 $[M - H]^-$, com N_2 (Figura 87), originou o íon de m/z 240 e 212. De acordo com os dados descritos na literatura para este composto, a eliminação da metila do grupo metoxila

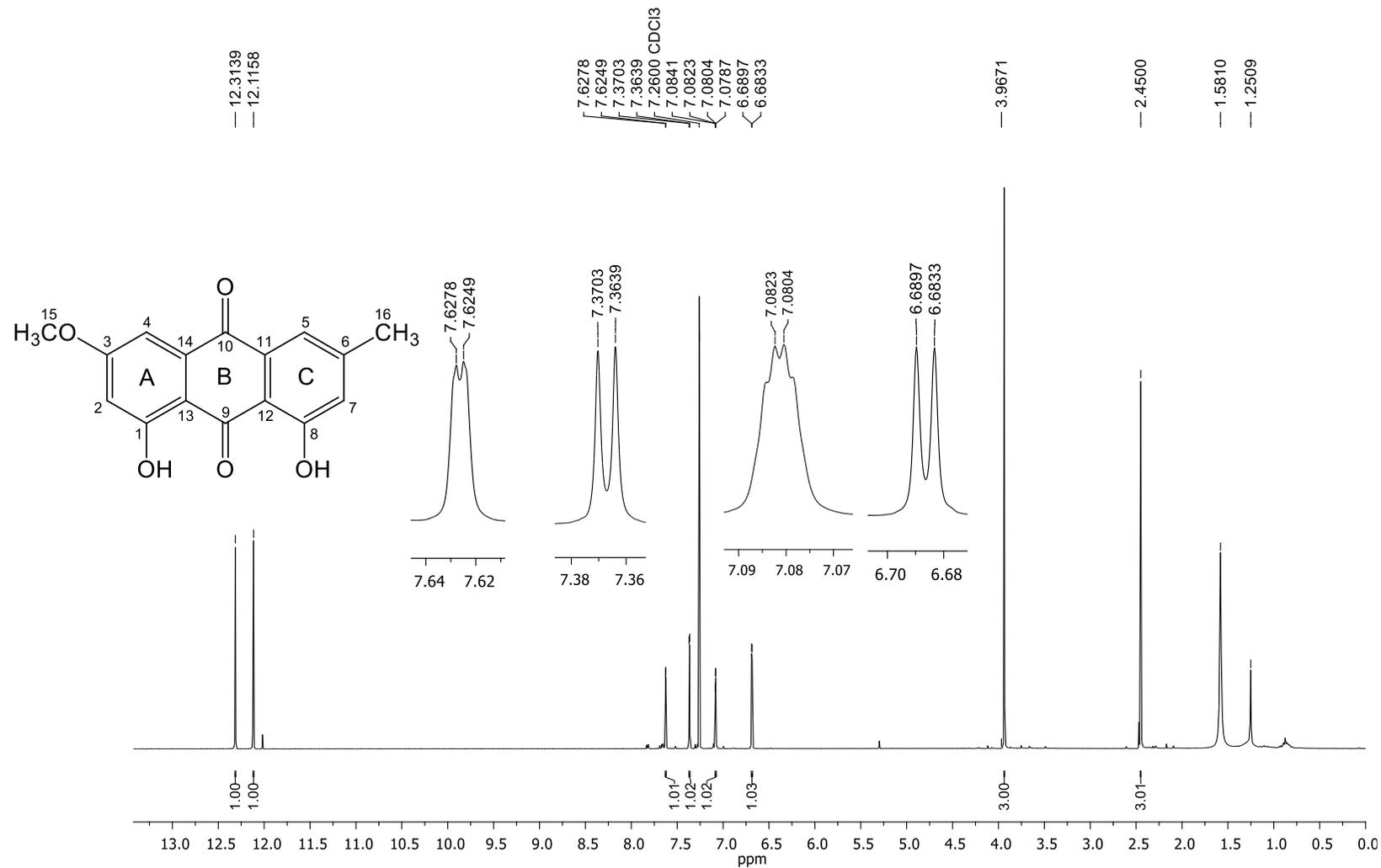
(15 *u*), seguida de eliminação neutra de CO (28 *u*), a partir do íon molecular gera o íon de *m/z* 240 (DEMARQUE et al., 2016; JIN et al., 2007; SONG et al., 2008; WANG, FENG, 2009; YE et al., 2007), no entanto não foi possível estabelecer um mecanismo condizente para justificar este íon. Uma segunda eliminação neutra de CO a partir do íon de *m/z* 240 gera o sinal de *m/z* 212.

Figura 87 – EM/EM-IES(-) do composto **II** (*m/z* 283 [M – H]⁻, energia de colisão 15 eV).



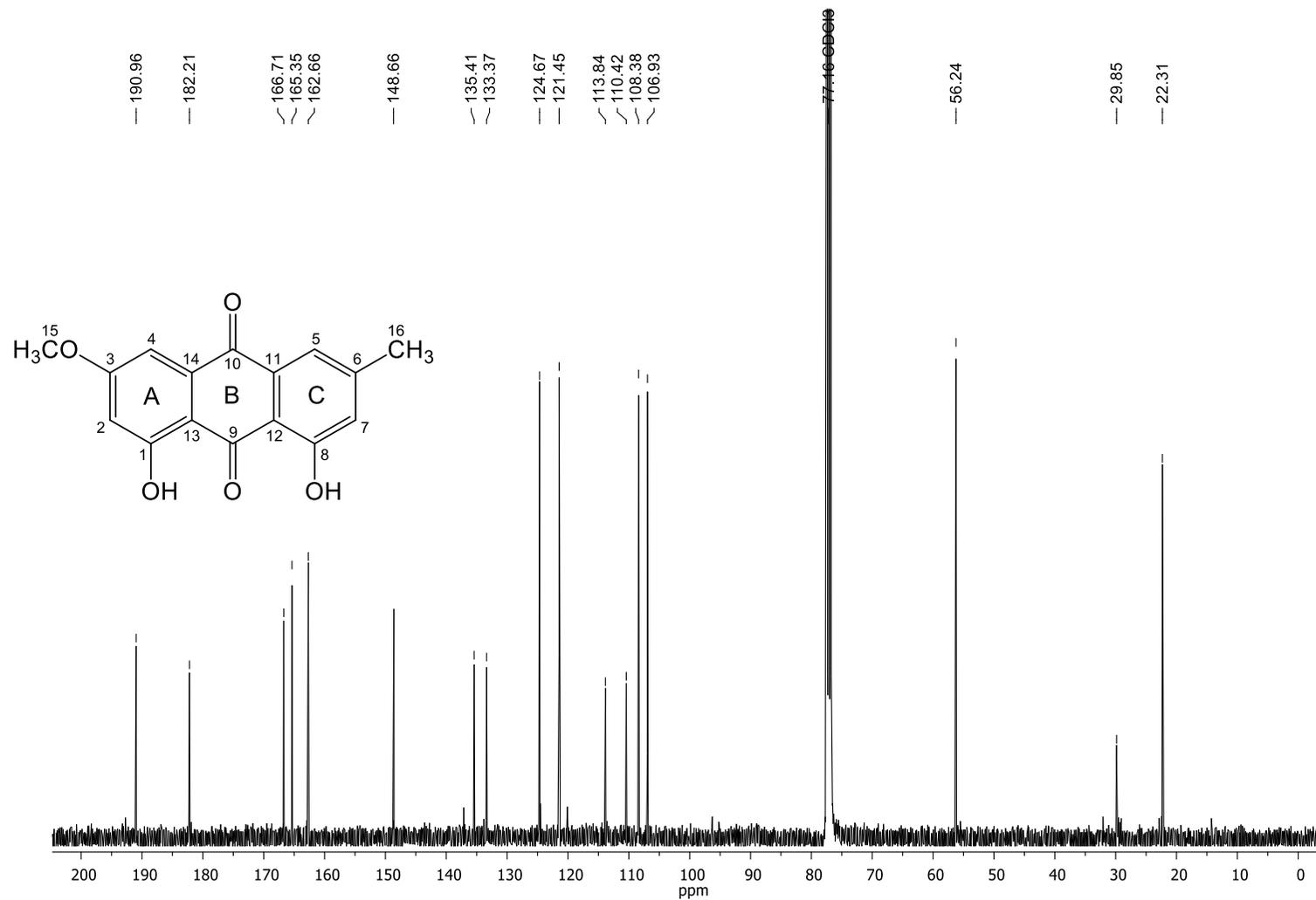
Fonte: autora.

Figura 88 – Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do composto **II**.



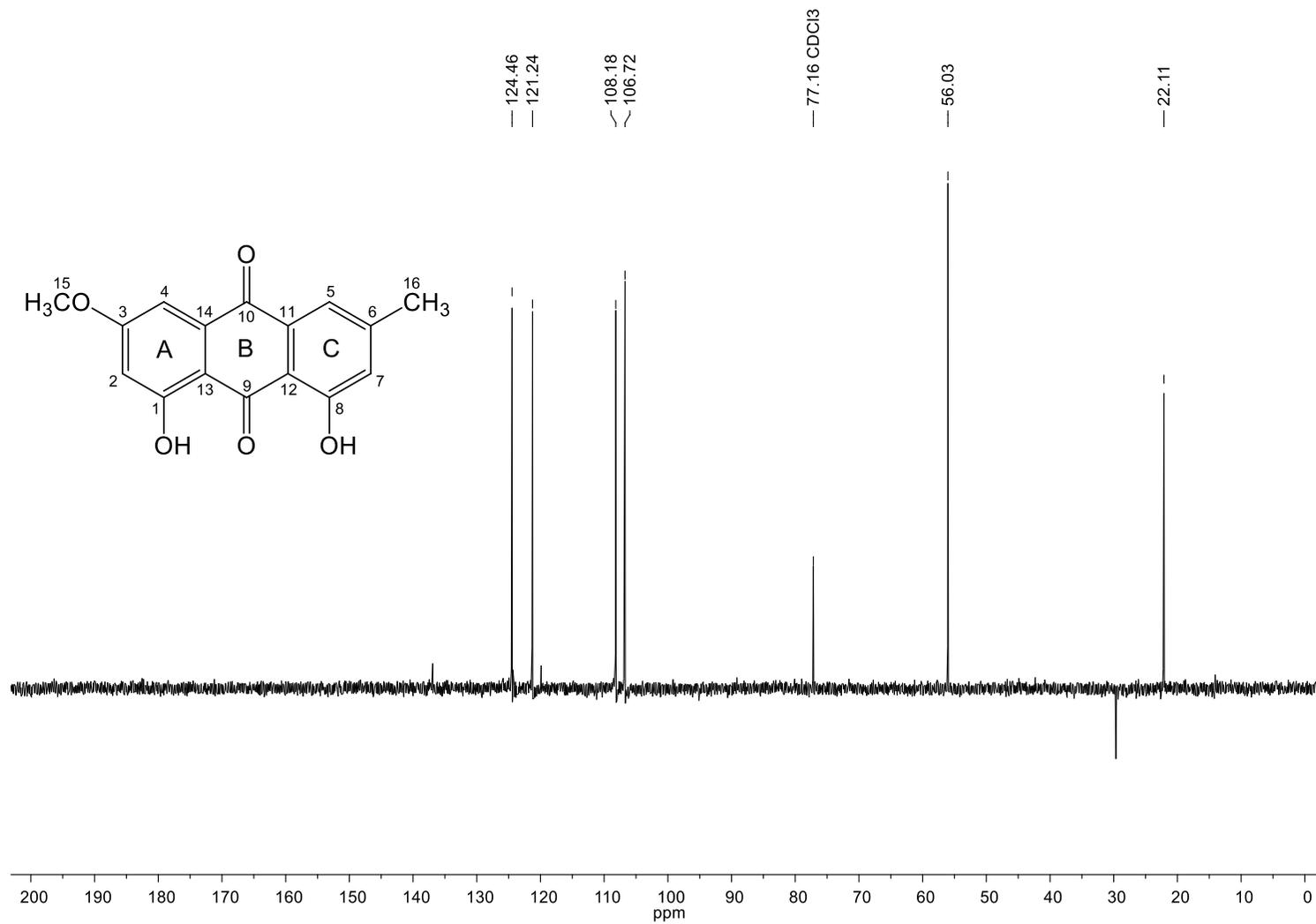
Fonte: autora.

Figura 89 – Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do composto II.



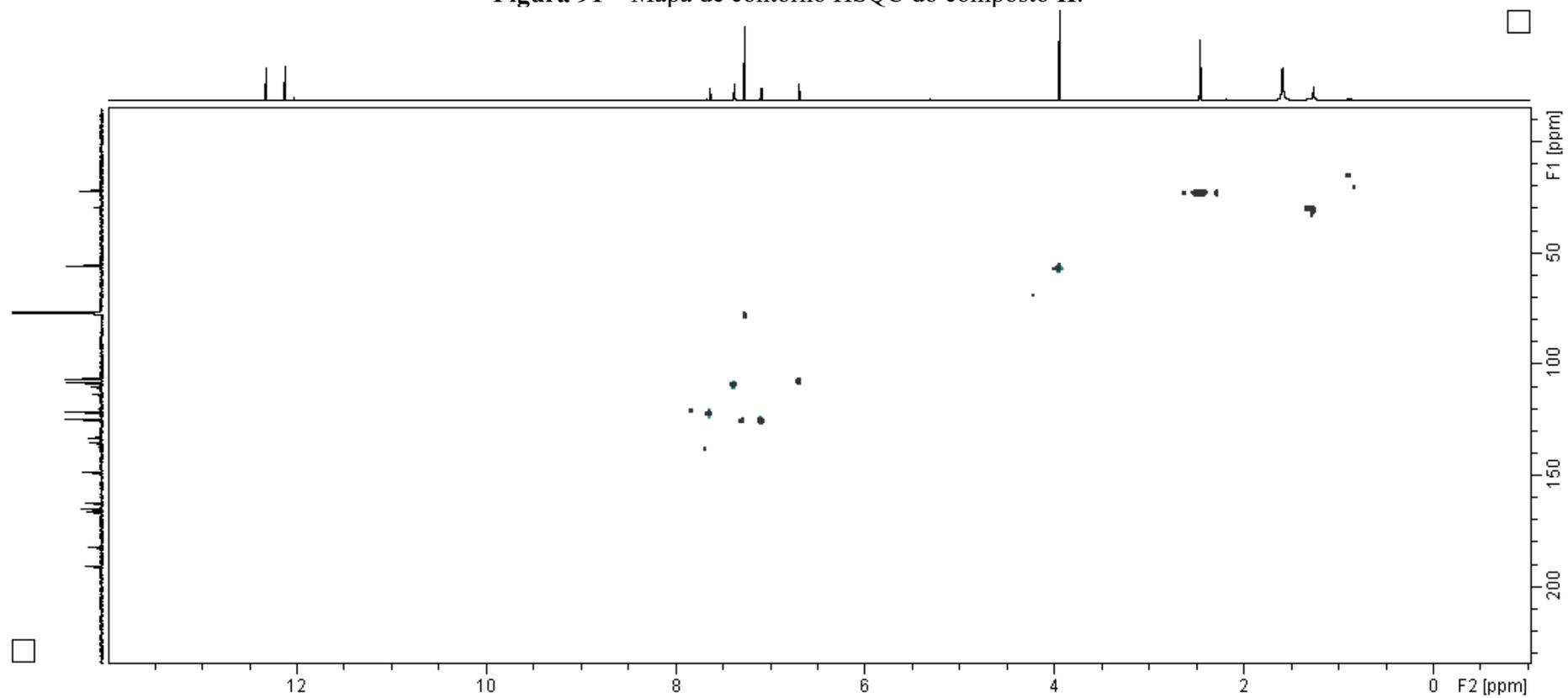
Fonte: autora.

Figura 90 – Espectro de DEPT 135 do composto II.



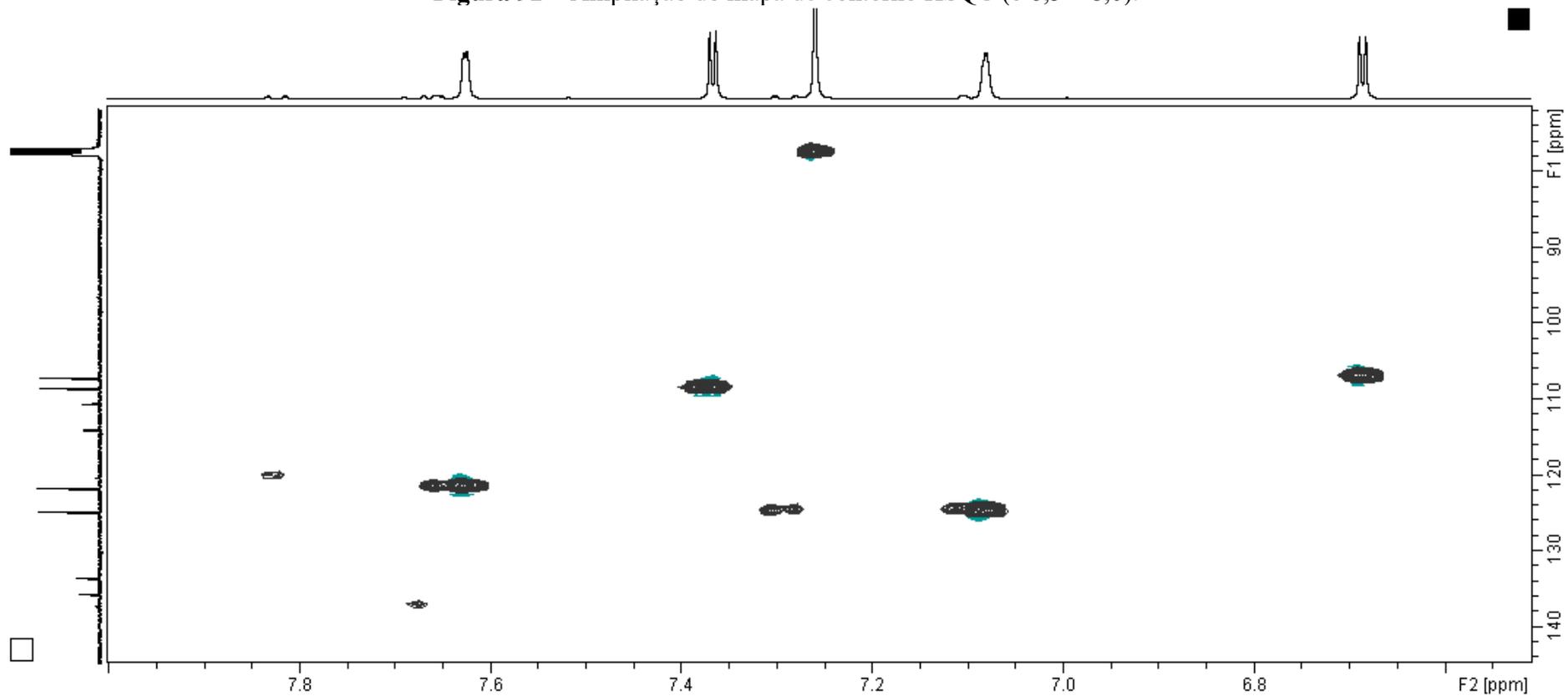
Fonte: autora.

Figura 91 – Mapa de contorno HSQC do composto II.



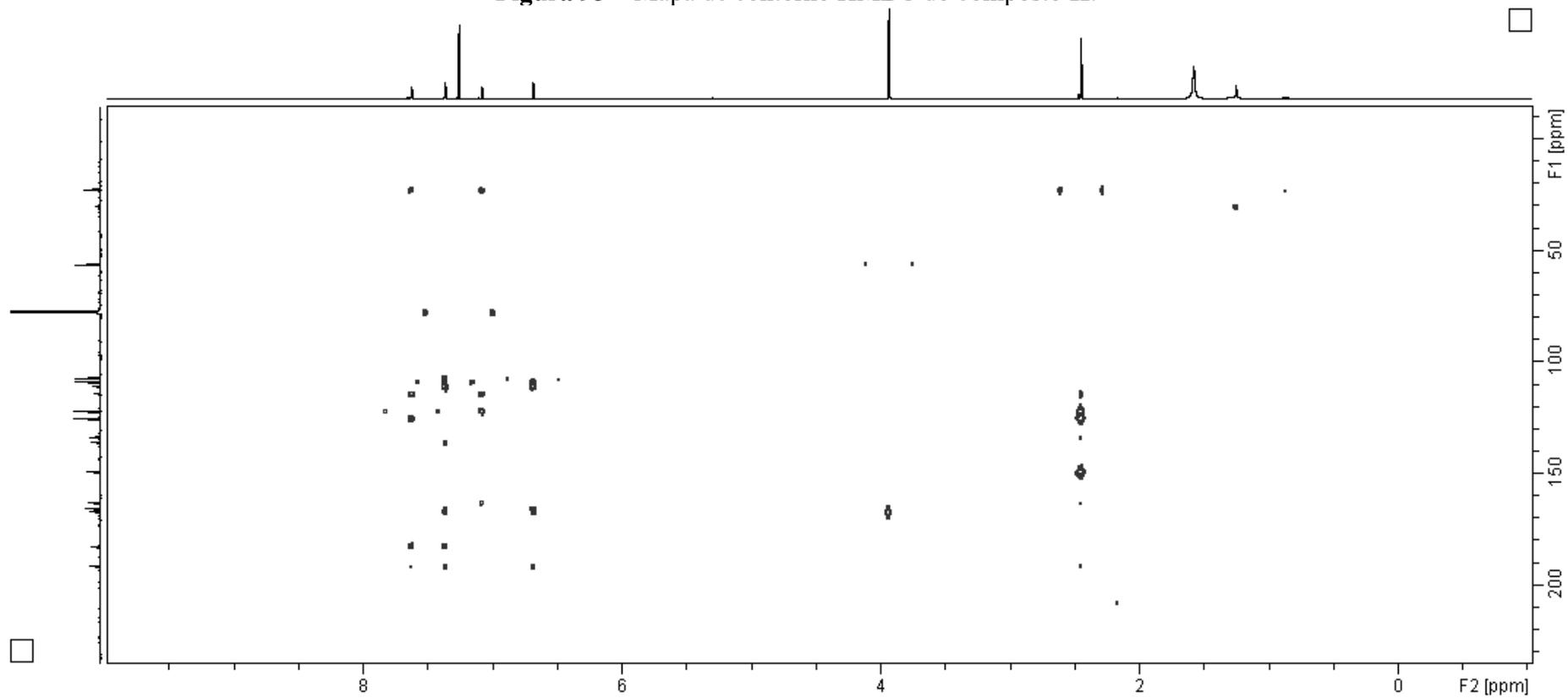
Fonte: autora.

Figura 92 – Ampliação do mapa de contorno HSQC (δ 6,5 – 8,0).



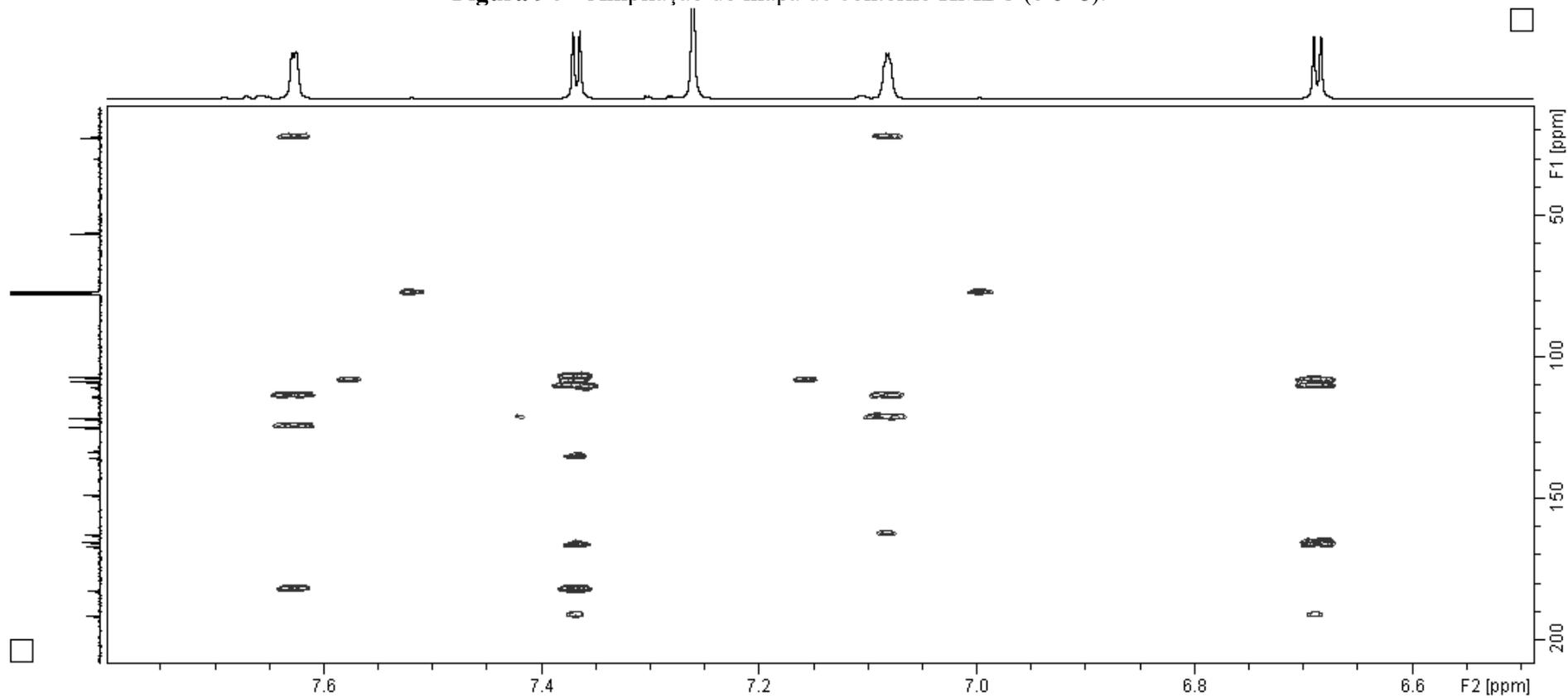
Fonte: autora.

Figura 93 – Mapa de contorno HMBC do composto II.



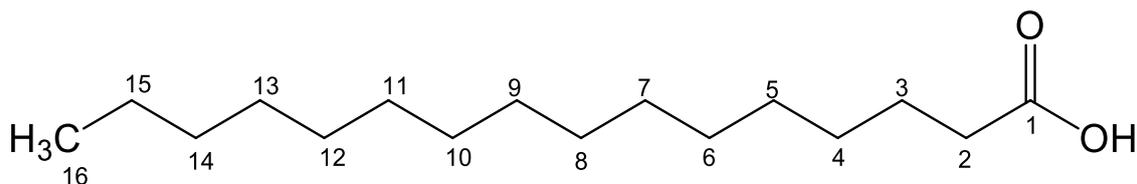
Fonte: autora.

Figura 94 – Ampliação do mapa de contorno HMBC (δ 6–8).



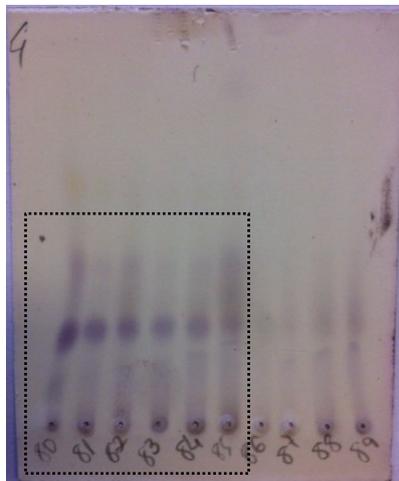
Fonte: autora.

4.9.3 – Elucidação estrutural do composto **III**.



O composto **III** (29,0 mg), isolado da fração hexano das flores de *S. silvestris*, foi obtido como um sólido cristalino branco que não apresentou fluorescência quando observado em câmara com luz UV (254 e 365 nm) na análise por CCD, o que indica a ausência de grupos cromóforos. Adicionalmente, apresentou coloração roxa após aspersão com solução de vanilina sulfúrica (Figura 95), indicativo de um composto da classe dos ácidos graxos (WAGNER, BLADT, 2001).

Figura 95 – CCD do composto **III**. Revelação química com vanilina sulfúrica como revelador.



FM: CH₂Cl₂ 100% e FE: SiO₂.

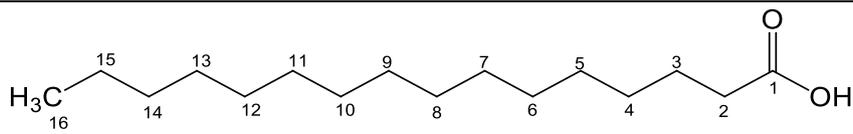
Fonte: autora.

O espectro de RMN de ¹H de **III** (Figura 97; Tabela 20) apresentou, na região dos sinais referentes a hidrogênios alifáticos, um tripleto e um quintupeto em δ 2,34 (2H, $J = 7,5$ Hz, H-2) e 1,63 (2H, $J = 7,5$ Hz, H-3), característico de grupos metileno (CH₂) α e β a carbonila, respectivamente. Também foi observado um simpleto largo referente aos demais grupos metileno, se sobrepondo em δ 1,25 (24H, H-4 a H-15) e um tripleto referente aos hidrogênios do grupo metila terminal em δ 0,88 (3H, $J = 6,8$ Hz, H-16) (GOMEZ et al., 2011).

O mapa de contorno HSQC (Figura 98) permitiu correlacionar os carbonos aos seus respectivos hidrogênios (Tabela 21). No mapa de contorno HMBC (Figura 99), foram observadas as correlações entre δ_H 2,34 (H-2) com δ_C 179,5 (C-1) ($^2J_{H\rightarrow C}$), δ_C 24,9 (C-3) ($^2J_{H\rightarrow C}$) e com δ_C 29,2 (C-4) ($^3J_{H\rightarrow C}$), entre δ_H 1,63 (H-3) com δ_C 179,5 (C-1) ($^3J_{H\rightarrow C}$), δ_C 34,1 (C-2) ($^2J_{H\rightarrow C}$) e com δ_C 29,2 (C-4) ($^2J_{H\rightarrow C}$), entre δ_H 1,25 (H-14) com δ_C 22,8 (C-15) ($^2J_{H\rightarrow C}$), entre δ_H 1,25 (H-15) com δ_C 32,1 (C-14) ($^2J_{H\rightarrow C}$) e com δ_C 14,3 (C-16) ($^2J_{H\rightarrow C}$), e entre δ_H 0,88 (H-16) com δ_C 32,1 (C-14) ($^3J_{H\rightarrow C}$) e com δ_C 22,8 (C-15) ($^2J_{H\rightarrow C}$) (Figuras 96 e 99; Tabela 21).

Os dados de RMN foram similares àqueles encontrados na literatura e são consistentes com a estrutura do ácido hexadecanoico (**III**), também conhecido como ácido palmítico

Tabela 20 – Dados de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do composto **III** em comparação com dados da literatura.



Posição	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$ mult. ^b (<i>J</i> em Hz)	$\delta_{\text{C}}^{\text{a}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{c}}$ mult. ^b (<i>J</i> em Hz)	$\delta_{\text{C}}^{\text{d}}$
1	---	179,5	---	178,0
2	2,34 t (<i>J</i> = 7,5 Hz)	34,1	2,29	34,2
3	1,63 quint (<i>J</i> = 7,5 Hz)	24,9	1,59	25,1
4	1,25 sl	29,2	1,24	29,3
5	1,25 sl	---	1,24	29,5
6	1,25 sl	---	1,24	29,6
7	1,25 sl	---	1,24	29,7
8	1,25 sl	---	1,24	29,4
9	1,25 sl	---	1,24	29,4
10	1,25 sl	---	1,24	29,6
11	1,25 sl	---	1,24	29,6
12	1,25 sl	---	1,24	29,7
13	1,25 sl	---	1,24	29,4
14	1,25 sl	32,1	1,24	31,9
15	1,25 sl	22,9	1,24	22,7
16	0,88 t (<i>J</i> = 6,8 Hz)	14,2	0,86	14,1

^aDeslocamentos químicos estabelecidos em relação ao padrão interno TMS ($\delta_{\text{TMS}} = 0,0$ ppm).

^bMultiplicidade: t (triplete), sl (simpleto largo), quint (quintuplete). ^cDados da literatura: Experimentos de RMN realizados a 400 MHz para ^1H , utilizando CDCl_3 como solvente (USMAN et al., 2016). ^dValores calculados pelo programa MestReNova.

Fonte: autora.

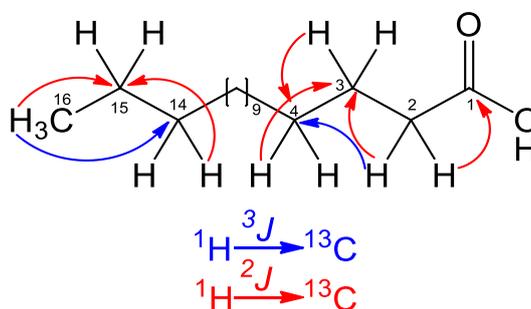
Tabela 21 – Correlações observadas nos mapas de contorno HSQC e HMBC do composto **III**.

Posição	δ_c^a	HSQC	HMBC
1	---	---	H-2, H-3
2	34,1	2,34	H-3
3	24,9	1,63	H-2
4	29,2	1,25	H-2, H-3, H-5
5	---	---	---
6	---	---	---
7	---	---	---
8	---	---	---
9	---	---	---
10	---	---	---
11	---	---	---
12	---	---	---
13	---	---	---
14	32,1	1,25	H-15, H-16
15	22,9	1,25	H-14, H-16
16	14,2	0,88	H-15

^aDeslocamentos químicos (δ em ppm) estabelecidos em relação ao padrão interno TMS ($\delta_{TMS} = 0,0$ ppm).

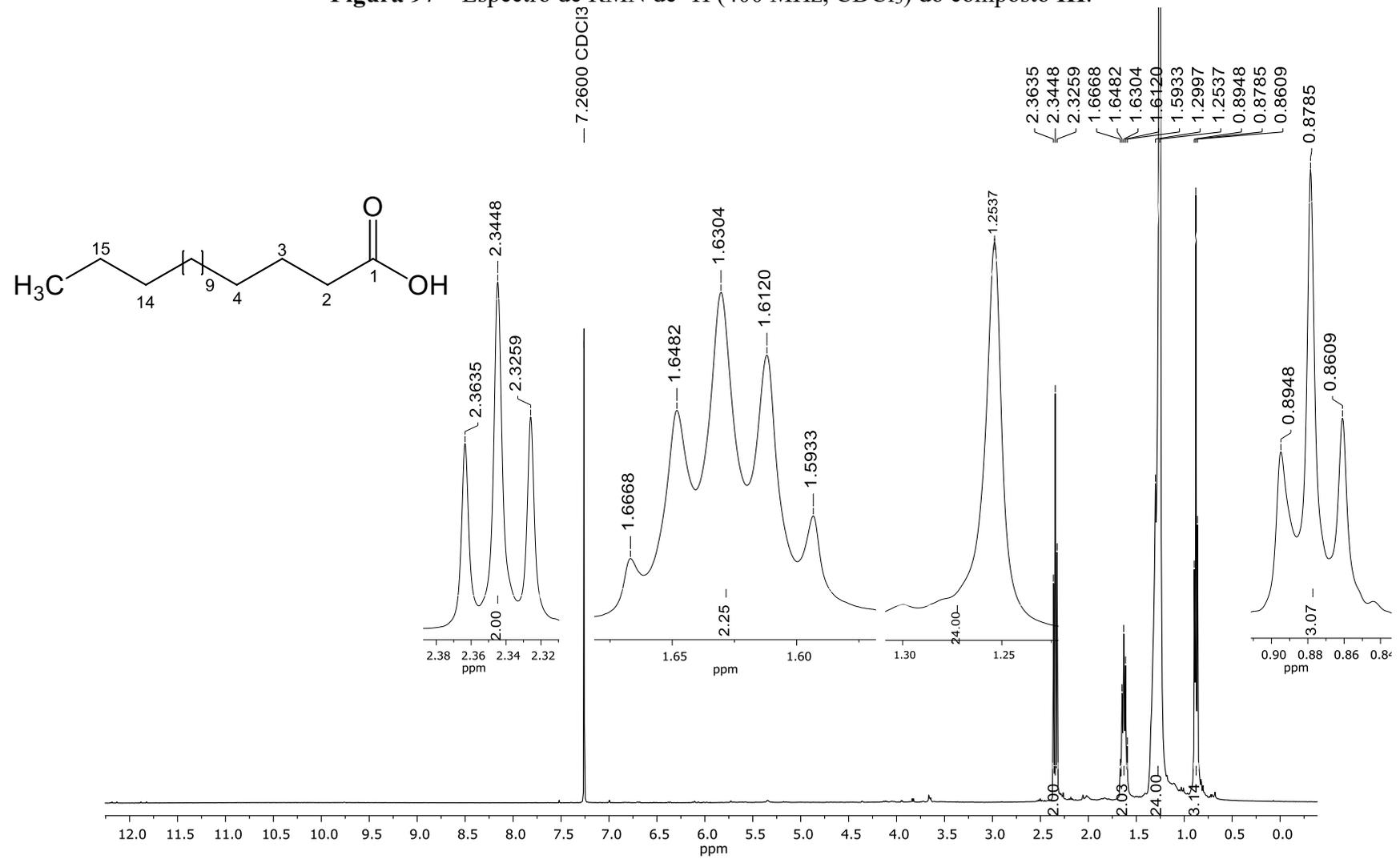
Fonte: autora.

Figura 96 – Principais correlações (H–C) observadas no mapa de contorno HMBC de **III**.



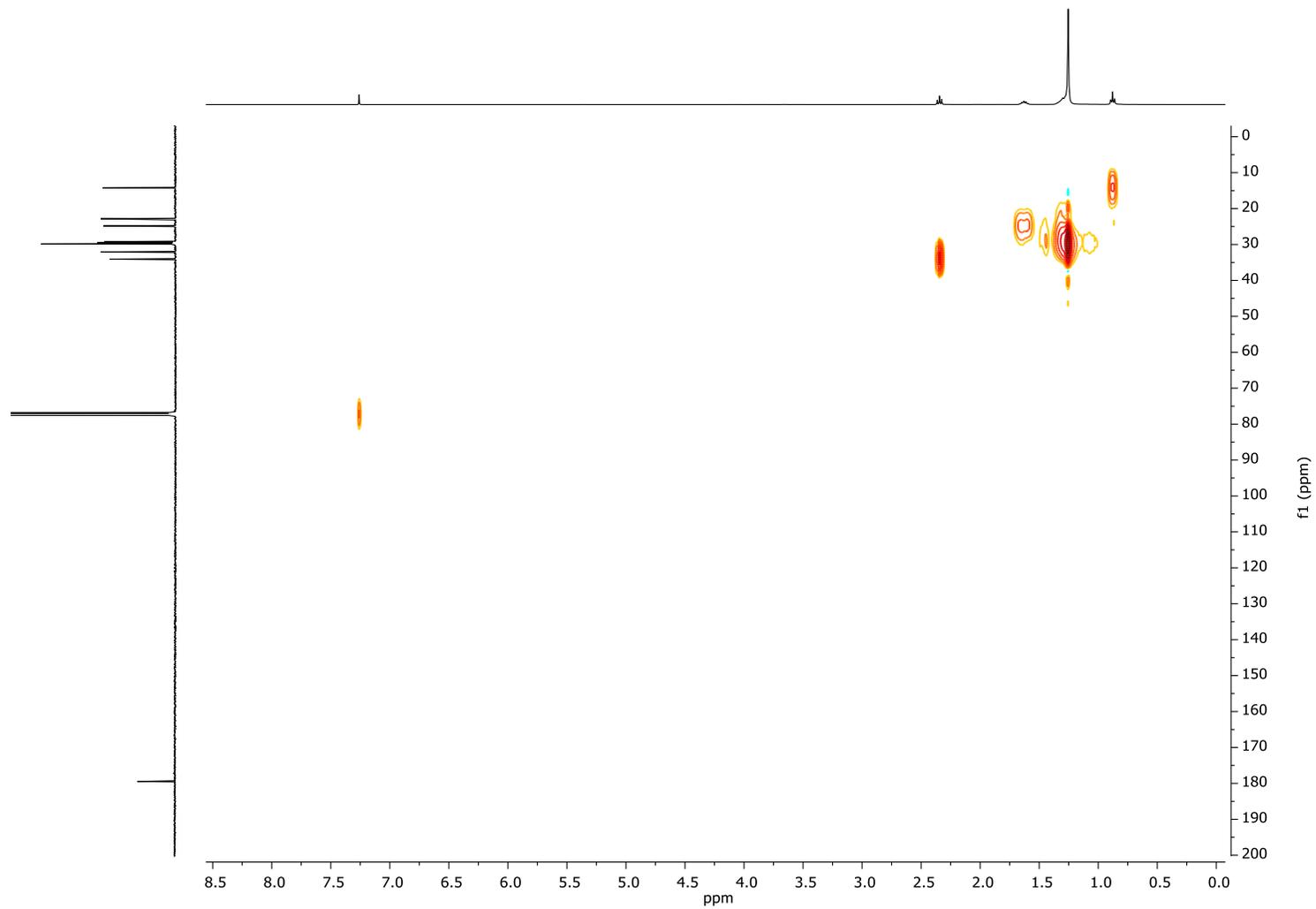
Fonte: autora.

Figura 97 – Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do composto III.



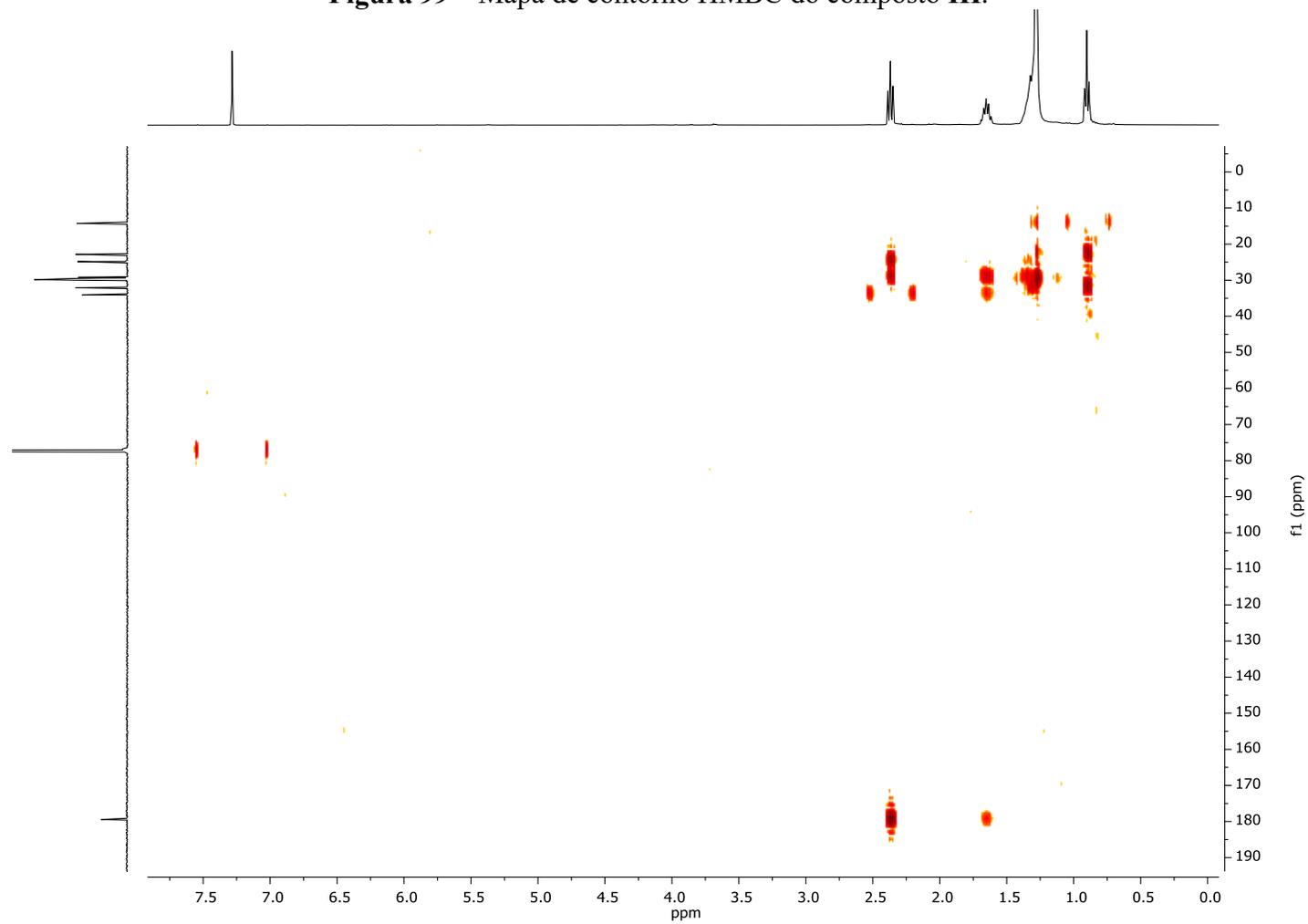
Fonte: autora.

Figura 98 – Mapa de contorno HSQC do composto III.



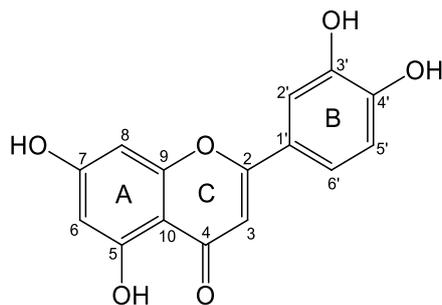
Fonte: autora.

Figura 99 – Mapa de contorno HMBC do composto III.



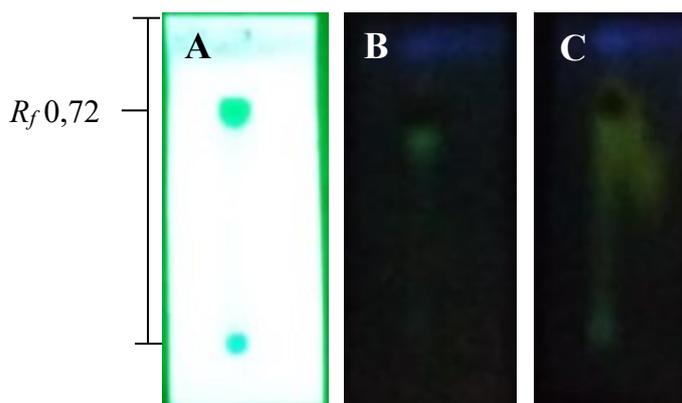
Fonte: autora.

4.9.4 – Elucidação estrutural do composto **IV**



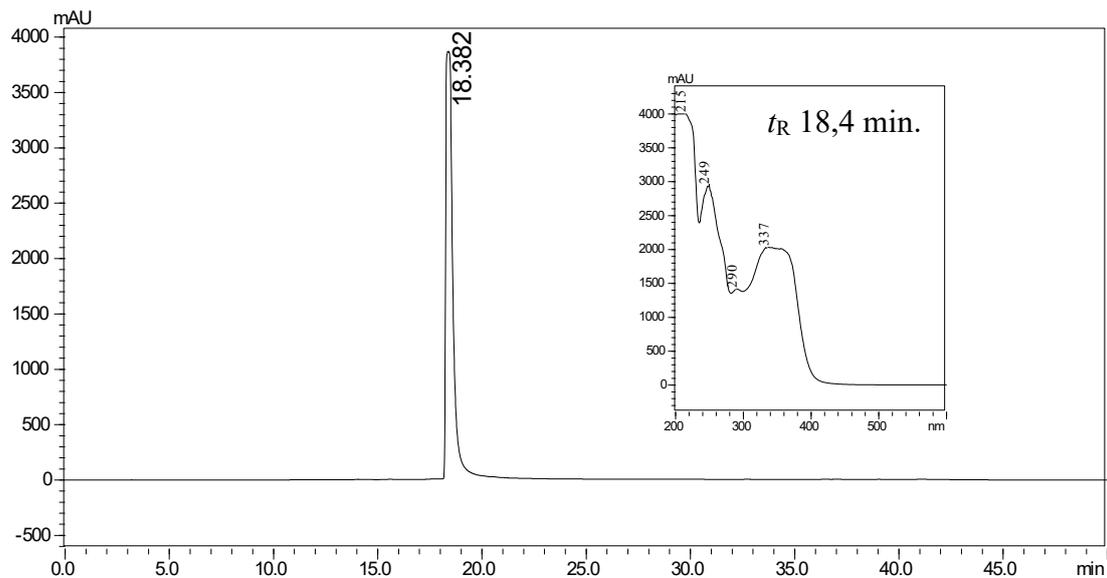
O composto **IV** (15,9 mg), isolado da fração acetato de etila das flores de *S. silvestris*, foi obtido como um sólido amarelo e quando analisado por CCD, apresentou uma mancha com R_f 0,72 de coloração amarela quando analisado por CCD sob luz UV (365 nm) (Figura 100, B), que foi intensificada após pulverização com o revelador NP/PEG (Figura 100 C), sugerindo tratar-se de um flavonoide (WAGNER, BLADT, 2001). Quando analisado por CLAE apresentou um único pico com t_R 18,38 min (Figura 101).

Figura 100 – CCD do composto **IV**. Inspeção em câmara de UV 254 nm (A), 365 nm (B) e 365 nm após tratamento com reagente NP/PEG (C).



FM: CH₂Cl₂/MeOH (4:1) e FE: SiO₂.
Fonte: autora.

Figura 101 – Cromatograma (CLAE-DAD, 254 nm) em coluna analítica da fração MDFAC02 F14.

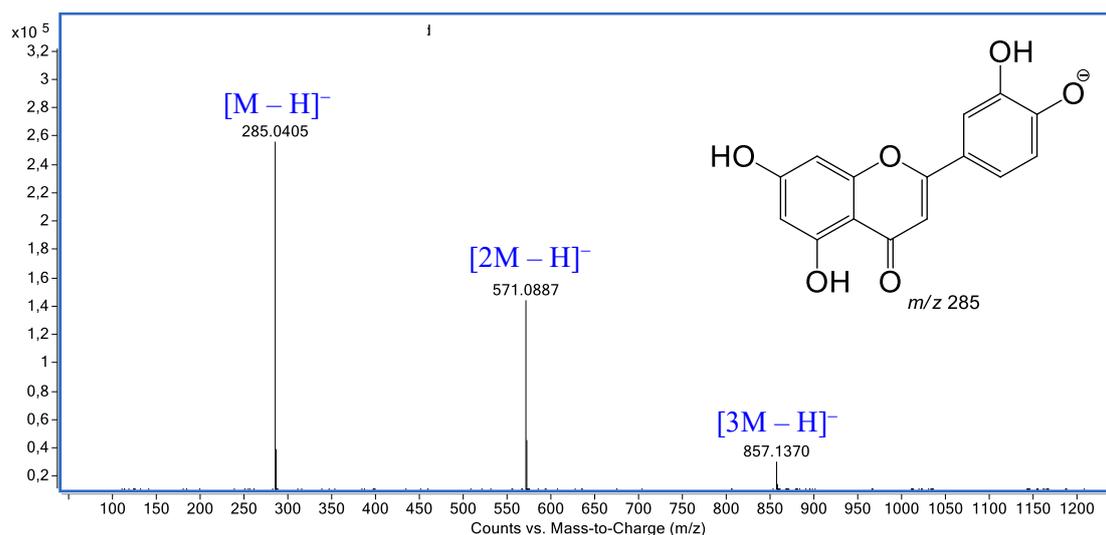


Condições CLAE: Coluna: Phenomenex Lunna C18 (250 mm × 4,6 mm, 5 μm); gradiente (50 min), 5–100% de MeOH-HCO₂H 0,1%; C = 1,0 mg/mL, V_{inj.} = 50 μL, fluxo 1,0 mL/min) e detector DAD.

Fonte: autora.

A análise do composto **IV** por espectrometria de massas em alta resolução, modo negativo, possibilitou estabelecer a fórmula molecular C₁₅H₁₀O₆, com índice de deficiência de hidrogênio igual a onze. O sinal referente à molécula desprotonada foi observado em m/z 285,0405 [M – H][–], calculado para C₁₅H₉O₆, 285,0405 (Δ 0,0 ppm). Os sinais em m/z 571,0887 [2M – H][–] e m/z 857,1370 [3M – H][–] correspondem à adutos, contendo duas e três moléculas, respectivamente (Figura 102).

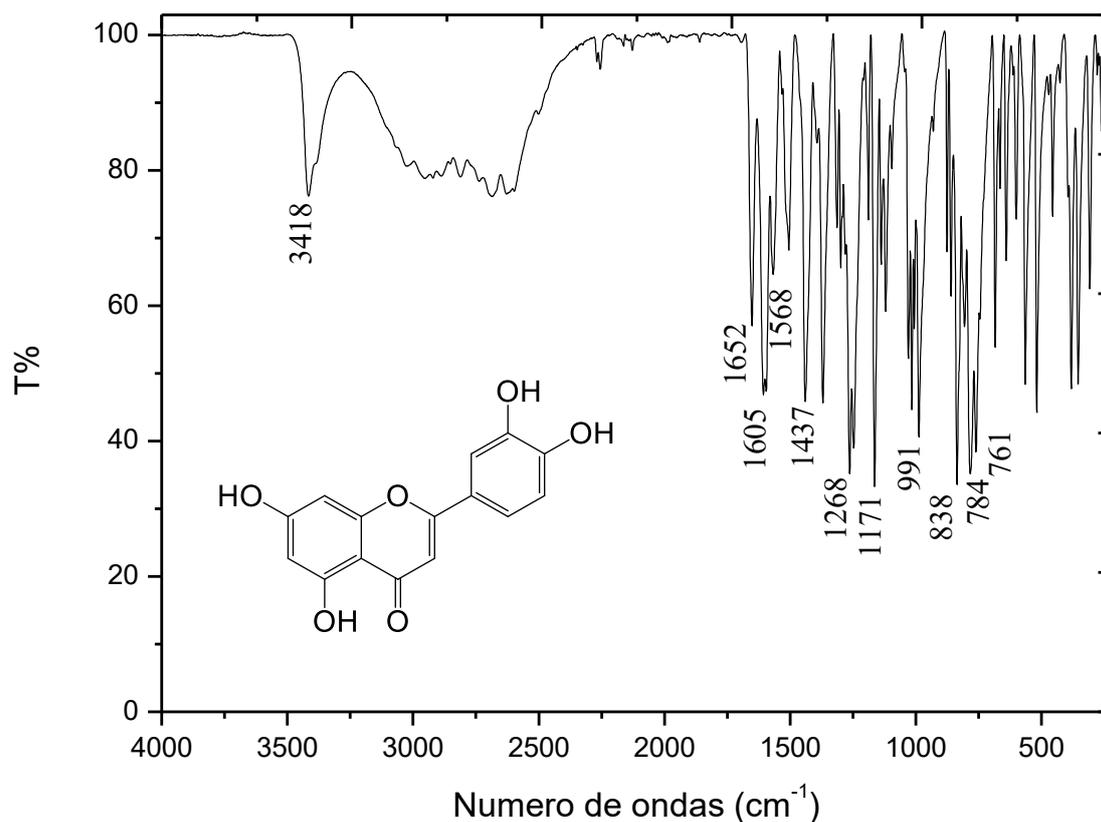
Figura 102 – EM-IES(-) em alta resolução do composto **IV**.



Fonte: autora.

O espectro na região do infravermelho de **IV** (Figura 103) apresentou bandas de absorção características de compostos fenólicos. Foi possível identificar uma banda em ν 3418 cm^{-1} , proveniente do estiramento do grupo OH. A banda relativa ao estiramento da função carbonila (C=O) foi observada em ν 1652 cm^{-1} . As bandas referentes à deformação axial de C=C de anel aromático foram observadas em ν 1605 , 1568 e 1437 cm^{-1} . Os estiramentos simétrico e assimétrico da ligação C–O–C foram identificados em ν 838 e 1268 cm^{-1} , respectivamente, assim como as absorções relativas às deformações angulares fora do plano de C-H em ν 784 , 761 cm^{-1} (ABBAS et al., 2017; SILVERSTEIN, WEBSTER, KIEMLE, 2007)

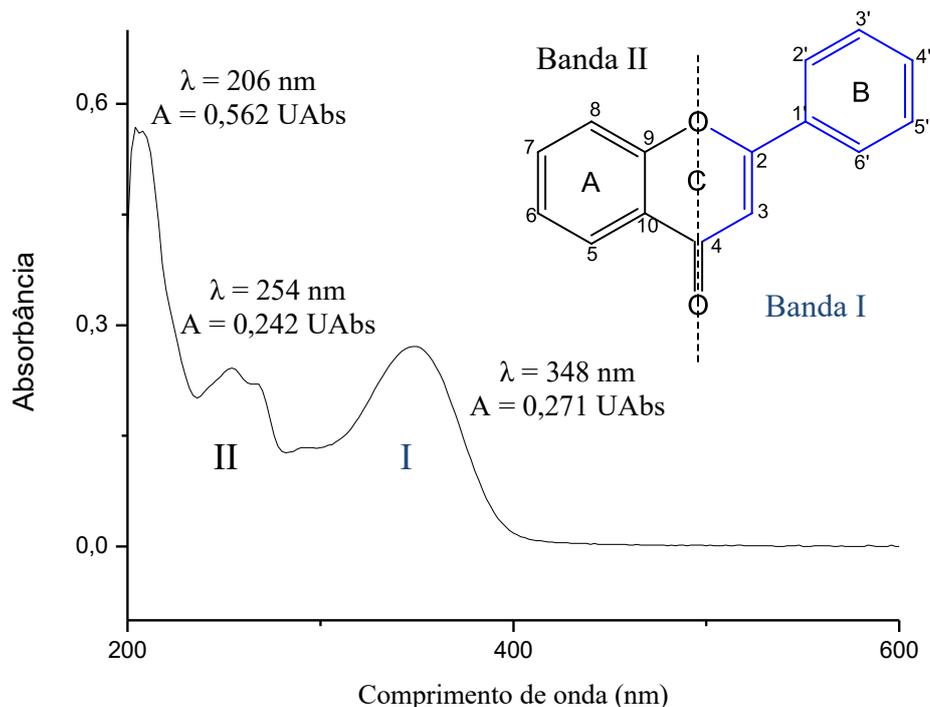
Figura 103 – Espectro de absorção na região do IV do composto **IV**.



Fonte: autora.

A análise do espectro na região do UV-Vis do composto **IV** (Figura 104) permitiu observar três bandas com máximos de absorção em $\lambda_{\text{máx}}$ (log ϵ) 206 (4,94), 254 (4,60) e 348 nm (4,65). A banda em 348 nm (Banda I), está associada a absorção do sistema cinamoil do anel B, e a banda em 254 nm (Banda II), é referente a absorção do sistema benzoil do anel A do esqueleto de flavonoides pertencentes as classes das flavonas e flavonóis (MABRY, MARKHAM, THOMAS, 1970).

Figura 104 – Espectro de absorção na região do UV-Visível de **IV** ($C_{MeOH} = 12,0 \mu M$).



Fonte: autora.

O espectro de RMN de ^1H de **IV** (Figura 108; Tabela 22) apresentou, na região dos sinais referente aos hidrogênios aromáticos, dois dupletos em δ 6,18 (1H, $J = 2,0 \text{ Hz}$, H-6) e 6,44 (1H, $J = 2,0 \text{ Hz}$, H-8), característico de um sistema aromático 1,2,3,5- tetrassubstituído. Também foram observados dois dupletos em δ 6,88 (1H, $J = 8,3 \text{ Hz}$, H-5') e 7,38 (1H, $J = 2,3 \text{ Hz}$, H-2') e um duplo duplete em δ 7,41 (1H, $J = 8,3$ e $2,3 \text{ Hz}$, H-6'), característico de um sistema aromático 1,2,4-trissubstituído. Também foram observados um simpleto em δ 6,66 (1H, H-3), que caracteriza o anel C de uma flavona; além de um simpleto em δ 12,97 (1H, C5-OH), característico de hidrogênio de hidroxila que faz ligação intramolecular com a carbonila (quelado) (PARK et al., 2007; PAVIA et al., 2010).

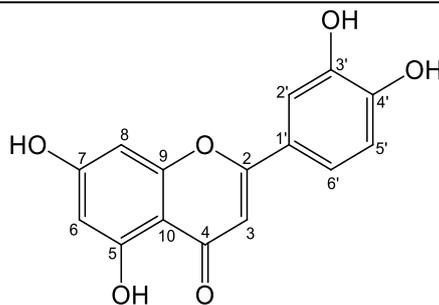
No espectro de RMN de ^{13}C (Figura 109; Tabela 22), foram observados 12 sinais na região de carbonos aromáticos: Anel A, δ 161,5 (C-5), 98,9 (C-6), 164,2 (C-7), 93,9 (C-8), 157,4 (C-9) e 103,7 (C-10); Anel B, δ 121,5 (C1'), 113, 4 (C-2'), 145,8 (C-3'), 149,8 (C-4'), 116,1 (C-5') e 119,1 (C6'); além de um sinal característico de carbonila em δ 181,7 (C-4), um sinal de carbono metínico em δ 102,9 (C-3) e o sinal em δ 164,0 (C-2), que caracterizam o anel C de uma flavona. Os sinais observados no DEPT 135

(Figura 110) corroboram a proposta da flavona e juntamente com o mapa de contorno HSQC (Figura 111 e 112) permitiu correlacionar os carbonos aos seus respectivos hidrogênios (Tabela 23).

As principais correlações, observadas no mapa de contorno HMBC (Figuras 113 e 114), entre δ_H 7,38 (H-2') com δ_C 164,0 (C-2) ($^3J_{H\rightarrow C}$), δ_C 145,8 (C-3') ($^2J_{H\rightarrow C}$), δ_C 149,8 (C-4') ($^3J_{H\rightarrow C}$) e δ_C 119,1 (C-6') ($^3J_{H\rightarrow C}$); entre δ_H 6,88 (H-5') com δ_C 121,5 (C-1') ($^3J_{H\rightarrow C}$), δ_C 145,8 (C-3') ($^3J_{H\rightarrow C}$) e δ_C 149,8 (C-4') ($^2J_{H\rightarrow C}$) e entre δ_H 7,41 (H-6') com δ_C 164,0 (C-2) ($^3J_{H\rightarrow C}$), δ_C 113,4 (C-2') ($^3J_{H\rightarrow C}$) e δ_C 149,8 (C-4') ($^3J_{H\rightarrow C}$); permitiram confirmar o padrão de substituição do anel B. Assim como as correlações entre δ_H 6,18 (H-6) com δ_C 161,5 (C-5) ($^2J_{H\rightarrow C}$), δ_C 164,2 (C-7) ($^2J_{H\rightarrow C}$), δ_C 93,9 (C-8) ($^3J_{H\rightarrow C}$) e δ_C 103,7 (C-10) ($^3J_{H\rightarrow C}$) e entre δ_H 6,44 (H-8) com δ_C 98,9 (C-6) ($^3J_{H\rightarrow C}$), δ_C 164,2 (C-7) ($^2J_{H\rightarrow C}$), δ_C 157,4 (C-9) ($^2J_{H\rightarrow C}$) e δ_C 103,7 (C-10) ($^3J_{H\rightarrow C}$), permitiram confirmar o padrão de substituição do anel A. Também foram observadas correlações entre δ_H 6,66 (H-3) com δ_C 164,0 (C-2) ($^2J_{H\rightarrow C}$), δ_C 181,7 (C-4) ($^2J_{H\rightarrow C}$), δ_C 103,7 (C-10) ($^3J_{H\rightarrow C}$) e δ_C 121,5 (C-1') ($^3J_{H\rightarrow C}$), que permitiram confirmar o padrão de substituição do anel C (Figura 105; Tabela 23).

Os dados de RMN (Tabelas 22 e 23; Figuras 108–114), aliados aos dados de EM, IV e UV-Vis foram similares aos dados publicados na literatura (ABBAS et al., 2017; MABRY, MARKHAM, THOMAS, 1970; PARK et al., 2007) e são consistente com a estrutura da 3',4',5,7-tetrahidroxiflavona (IV), também conhecida como luteolina.

Tabela 22 – Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (400/100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) do composto **IV** em comparação com dados da literatura.



Posição	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$ mult. ^b (<i>J</i> em Hz)	$\delta_{\text{C}}^{\text{a}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{c}}$ mult. ^b (<i>J</i> em Hz)	$\delta_{\text{C}}^{\text{c}}$
2	---	164,0	---	164,0
3	6,66 s	102,9	6,65 s	102,9
4	---	181,7	---	181,7
5	---	161,5	---	161,5
6	6,18 d (<i>J</i> = 2,0 Hz)	98,9	6,18 d (<i>J</i> = 2,1 Hz)	98,9
7	---	164,2	---	164,2
8	6,44 d (<i>J</i> = 2,0 Hz)	93,9	6,43 d (<i>J</i> = 2,1 Hz)	93,9
9	---	157,4	---	157,4
10	---	103,7	---	103,8
1'	---	121,5	---	121,6
2'	7,38 d (<i>J</i> = 2,3 Hz)	113,4	7,39 d (<i>J</i> = 2,2 Hz)	113,4
3'	---	145,8	---	145,8
4'	---	149,8	---	149,8
5'	6,88 d (<i>J</i> = 8,3 Hz)	116,1	6,89 d (<i>J</i> = 9,0 Hz)	116,1
6'	7,41 dd (<i>J</i> = 8,3 e 2,3 Hz)	119,1	7,40 dd (<i>J</i> = 9,0 e 2,2 Hz)	119,1
5-OH	12,97 s	---	12,97 s	-

^aDeslocamentos químicos estabelecidos em relação ao padrão interno TMS ($\delta_{\text{TMS}} = 0,0$ ppm).

^bMultiplicidade: d (duplete), dd (duplo duplete), s (simpleto). ^cDados da literatura: Experimentos de RMN realizados a 400 e 100 MHz para ^1H e ^{13}C , respectivamente, utilizando $\text{DMSO-}d_6$ como solvente (PARK et al., 2007).

Fonte: autora.

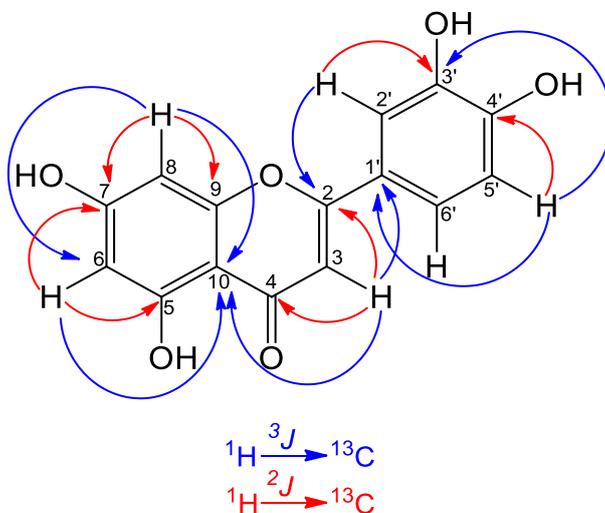
Tabela 23 – Correlações observadas nos mapas de contorno HSQC e HMBC para o composto **IV**.

Posição	δ_C^a	DEPT	HSQC	HMBC
2	164,0	---	---	H-3, H-2', H-6'
3	102,9	CH	6,66	---
4	181,7	---	---	H-3
5	161,5	---	---	H-6
6	98,9	CH	6,18	H-8
7	164,2	---	---	H-6, H-8
8	93,9	CH	6,44	H-6
9	157,4	---	---	H-8
10	103,7	---	---	H-3, H-6, H-8
1'	121,5	---	---	H-3, H-5'
2'	113,4	CH	7,38	H-6'
3'	145,8	---	---	H-2', H-5'
4'	149,8	---	---	H-2', H-5', H-6'
5'	116,1	CH	6,88	---
6'	119,1	CH	7,41	H-2'

^aDeslocamentos químicos (δ em ppm) estabelecidos em relação ao padrão interno TMS ($\delta_{TMS} = 0,0$ ppm).

Fonte: autora.

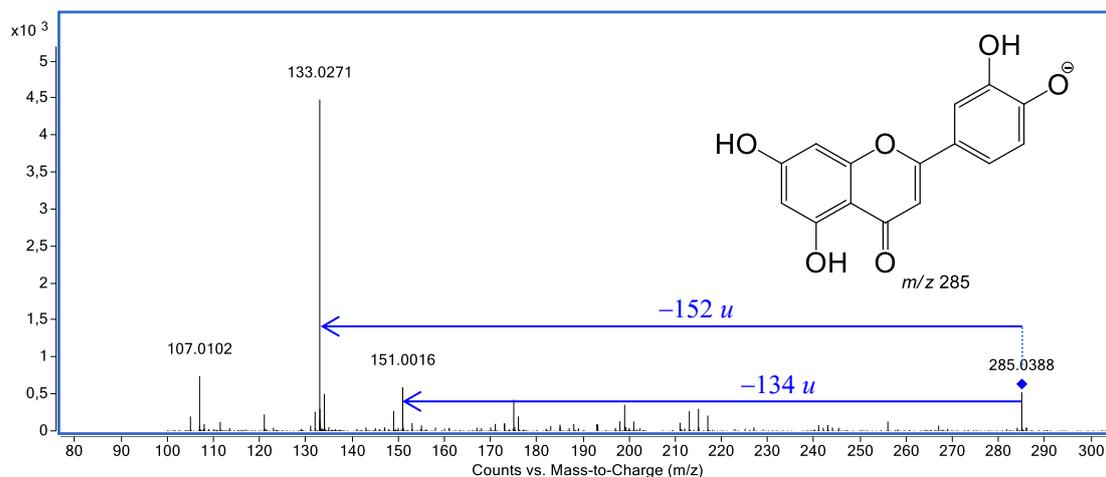
Figura 105 – Principais correlações (H-C) observadas no mapa de contorno HMBC de **IV**.



Fonte: autora.

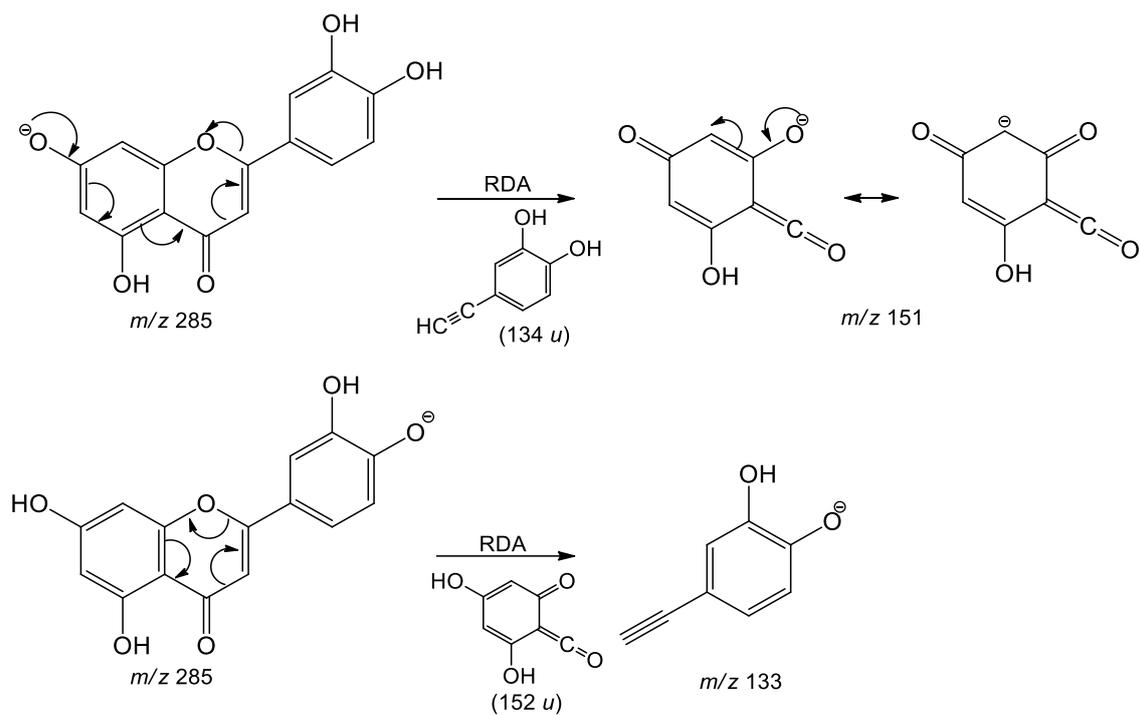
Para confirmar a estrutura proposta do composto **IV**, foi realizada a análise por espectrometria de massas sequencial no modo negativo. O EM-IES obtido da dissociação induzida por colisão do íon molecular m/z 285 $[M - H]^-$, com N_2 , gerou como principais fragmentos os íons em m/z 151, 133 e 107 (Figura 106). A fragmentação do anel C, através de um mecanismo do tipo retro Diels-Alder (RDA), com eliminação neutra de 134 e 152 u , forneceu os fragmentos em m/z 151 e 133, respectivamente. Bastante característica dos flavonoides, as reações de RDA são consideradas como as reações de fragmentação mais importantes para as flavonas, dihidroflavonas, flavonois e isoflavonas (Figura 107) (RIJKE et al., 2006).

Figura 106 – EM/EM-IES(-) do composto **IV** (m/z 285 $[M - H]^-$, energia de colisão 20 eV).



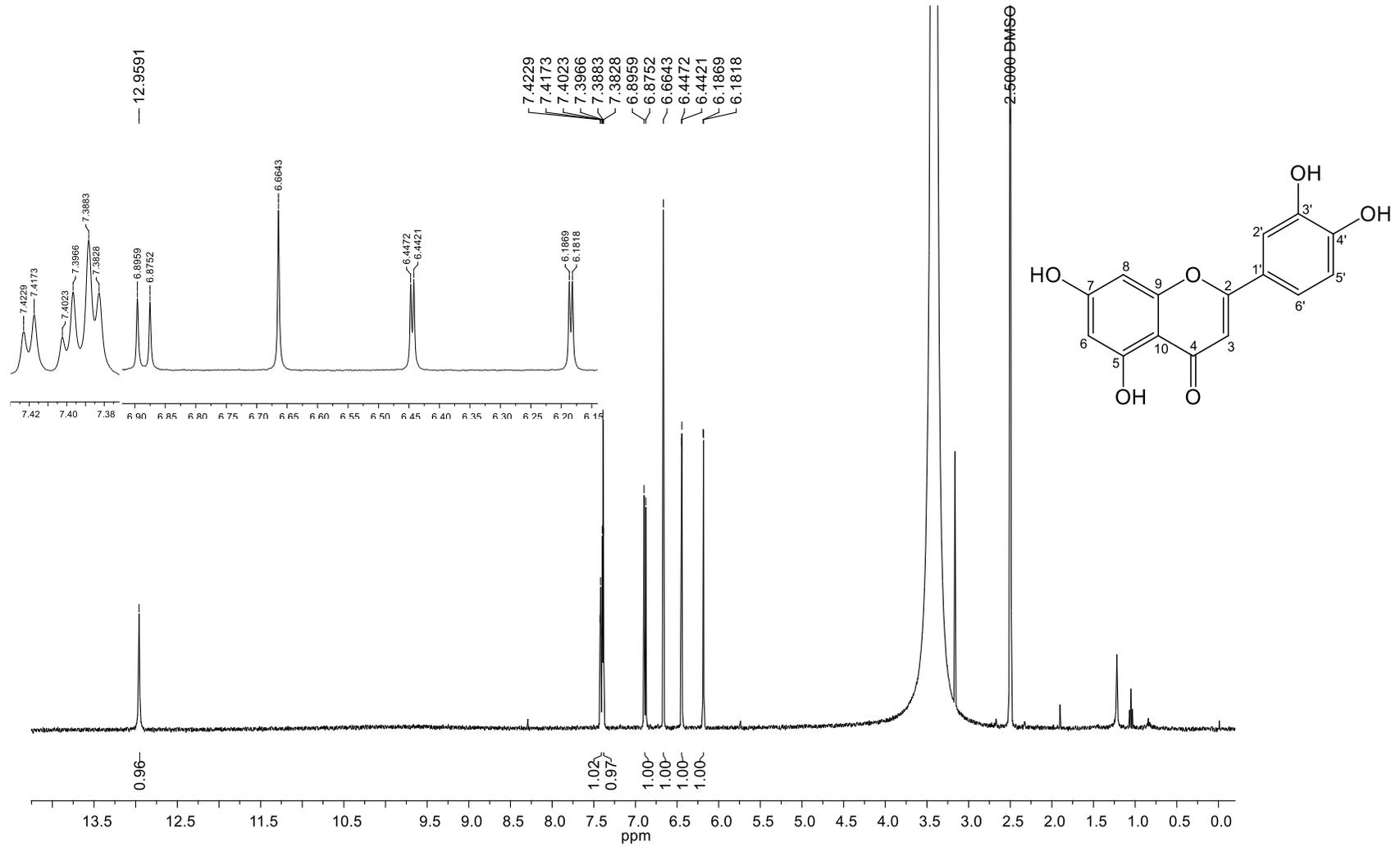
Fonte: autora.

Figura 107 – Proposta de fragmentação do composto **IV** analisado por EM/EM-IES- (-).



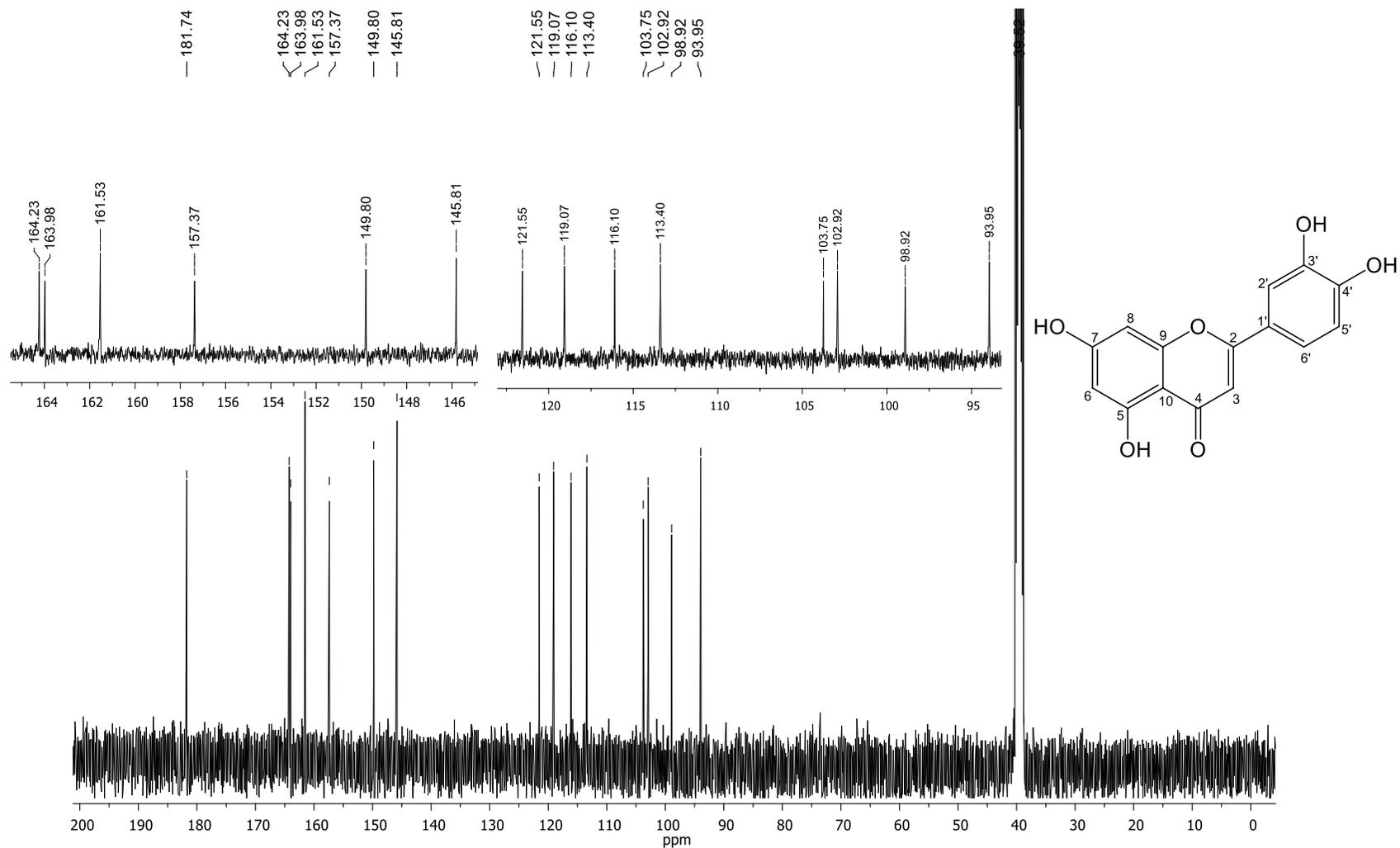
Fonte: autora.

Figura 108 – Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) do composto IV.



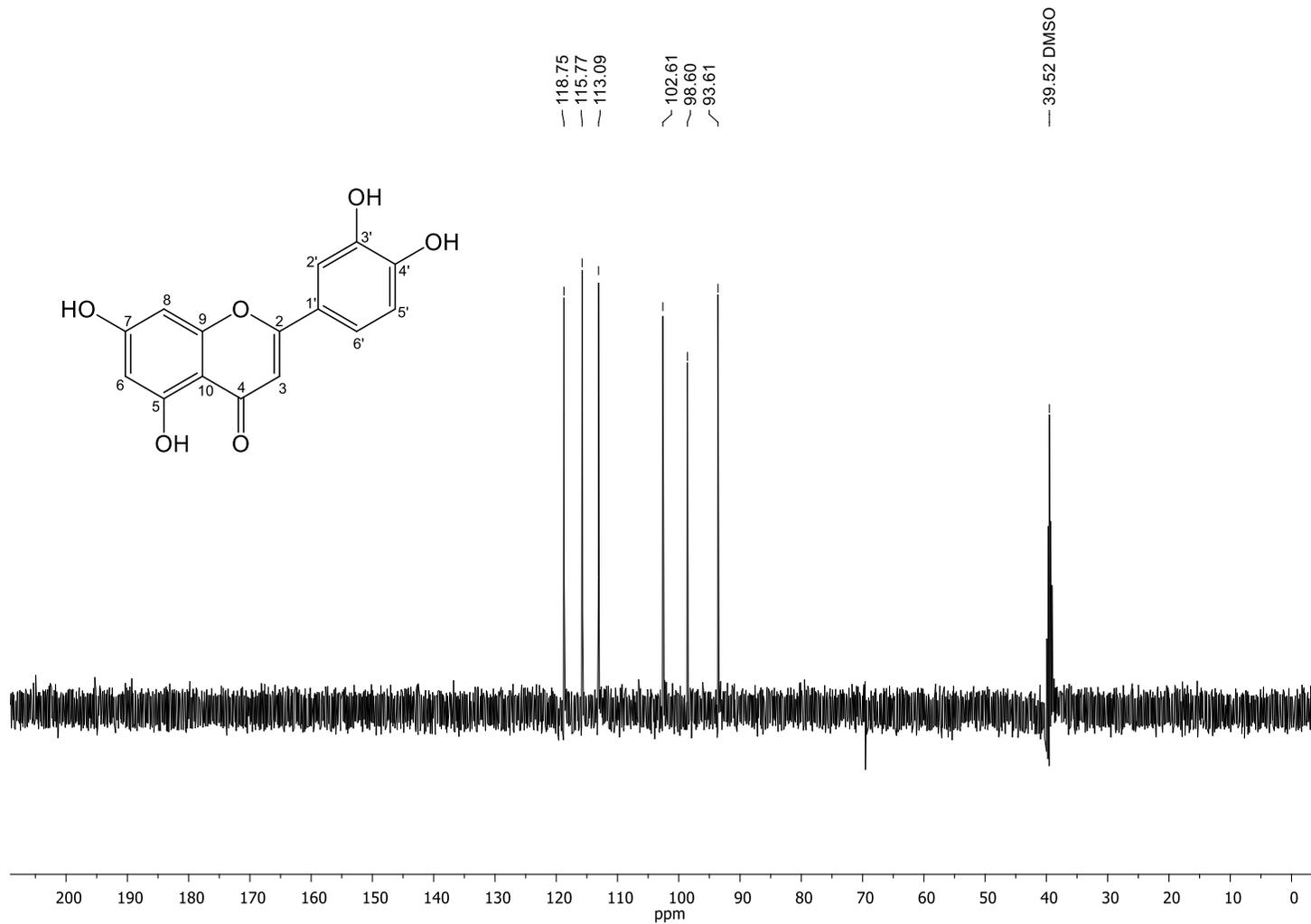
Fonte: autora.

Figura 109 – Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) do composto **IV**.



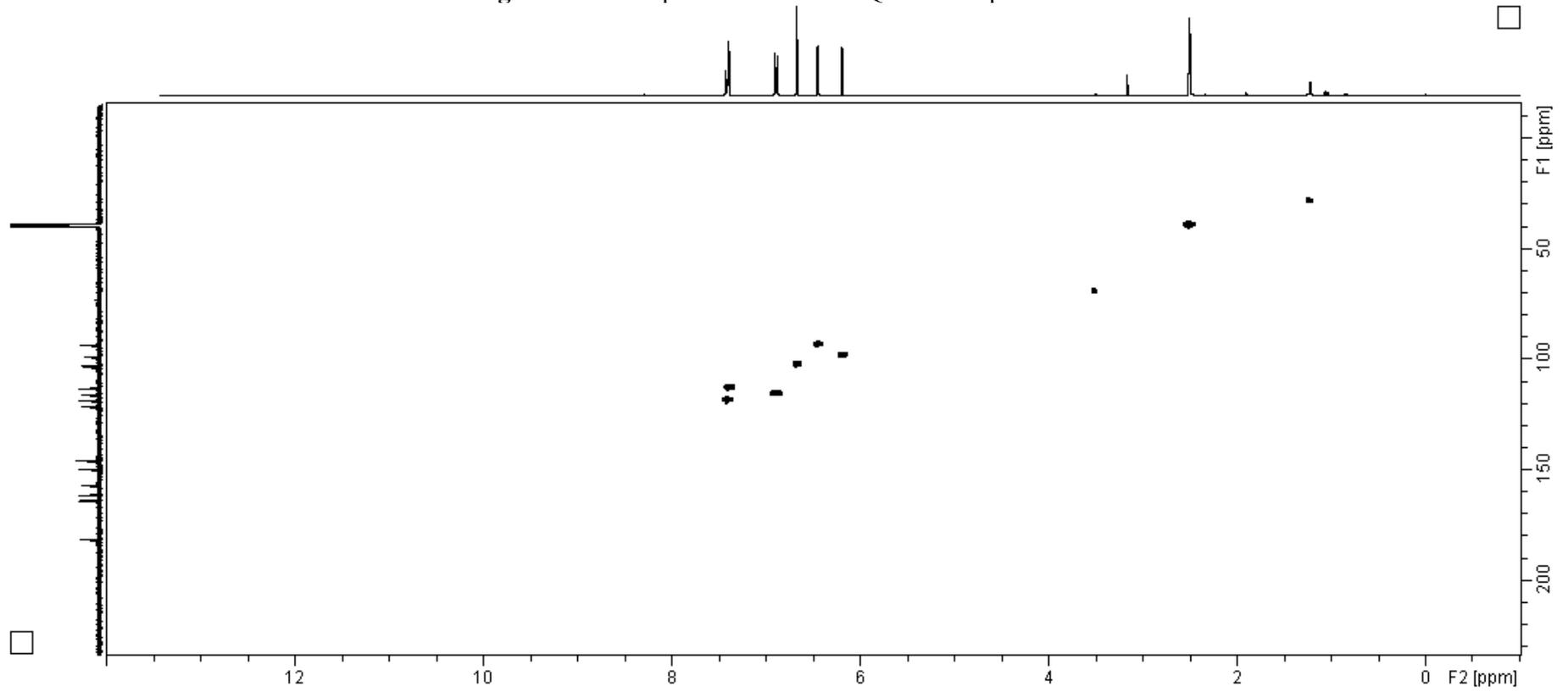
Fonte: autora.

Figura 110 – Espectro de DEPT 135 (100 MHz, DMSO-*d*₆) do composto **IV**.



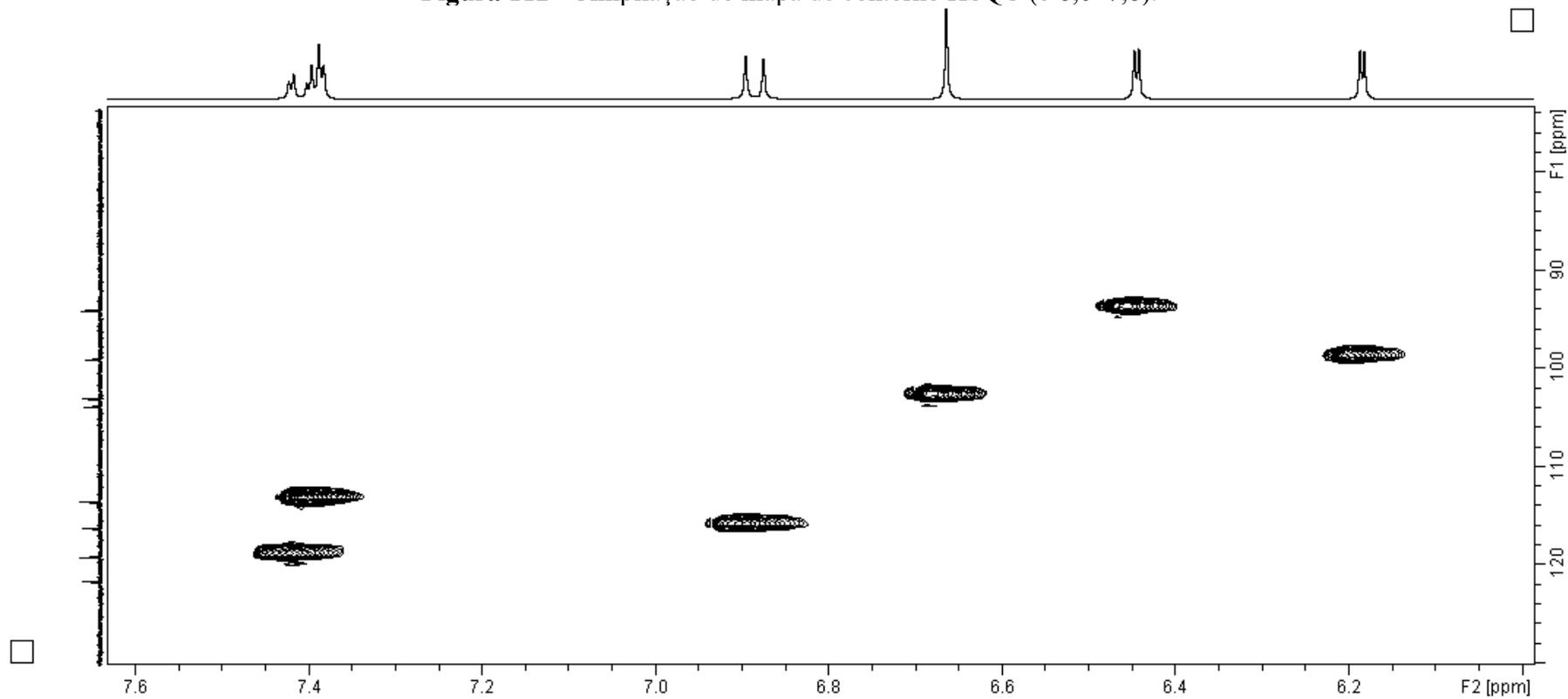
Fonte: autora.

Figura 111 – Mapa de contorno HSQC do composto IV.



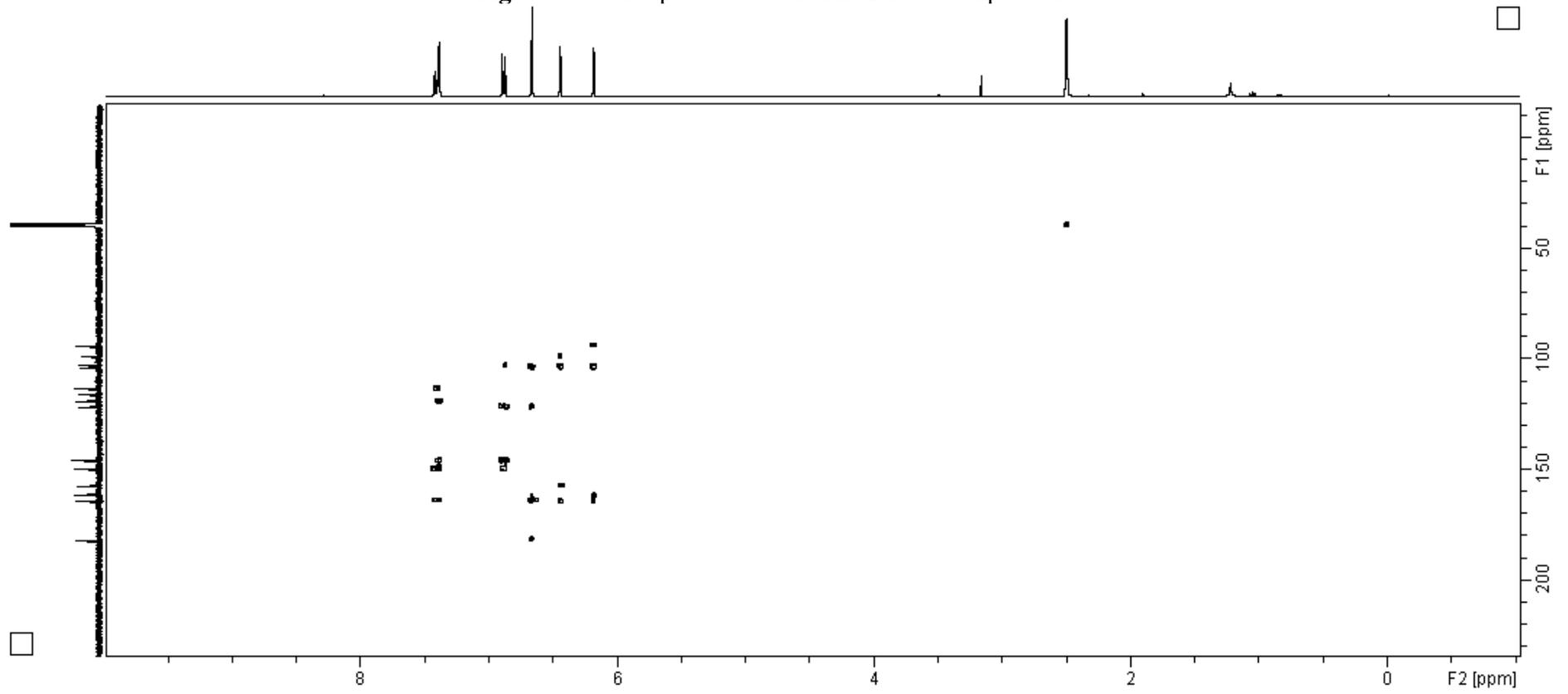
Fonte: autora.

Figura 112 – Ampliação do mapa de contorno HSQC (δ 6,0–7,6).



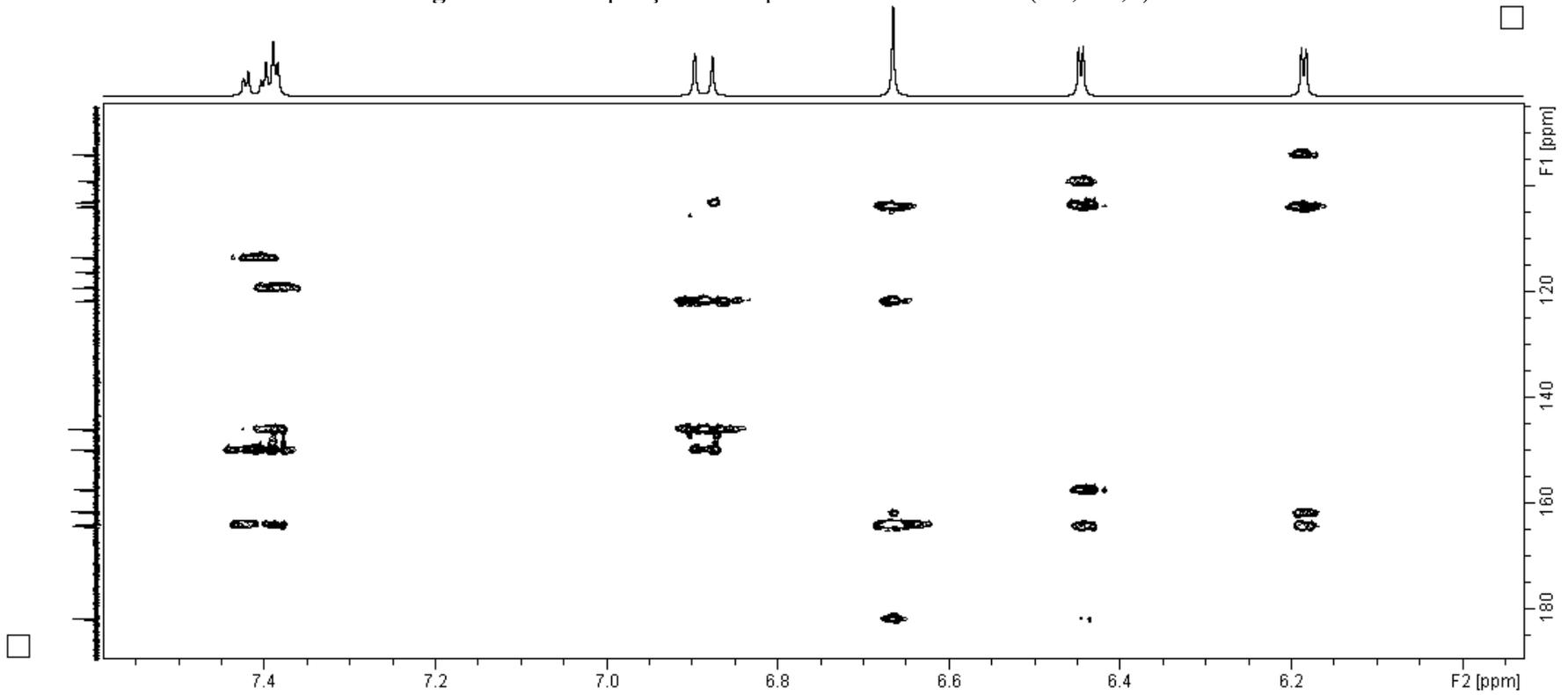
Fonte: autora.

Figura 113 – Mapa de contorno HMBC do composto IV.



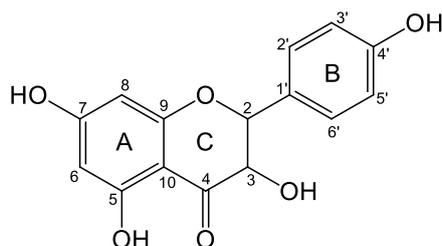
Fonte: autora.

Figura 114 – Ampliação do mapa de contorno HMBC (δ 6,0–7,5).



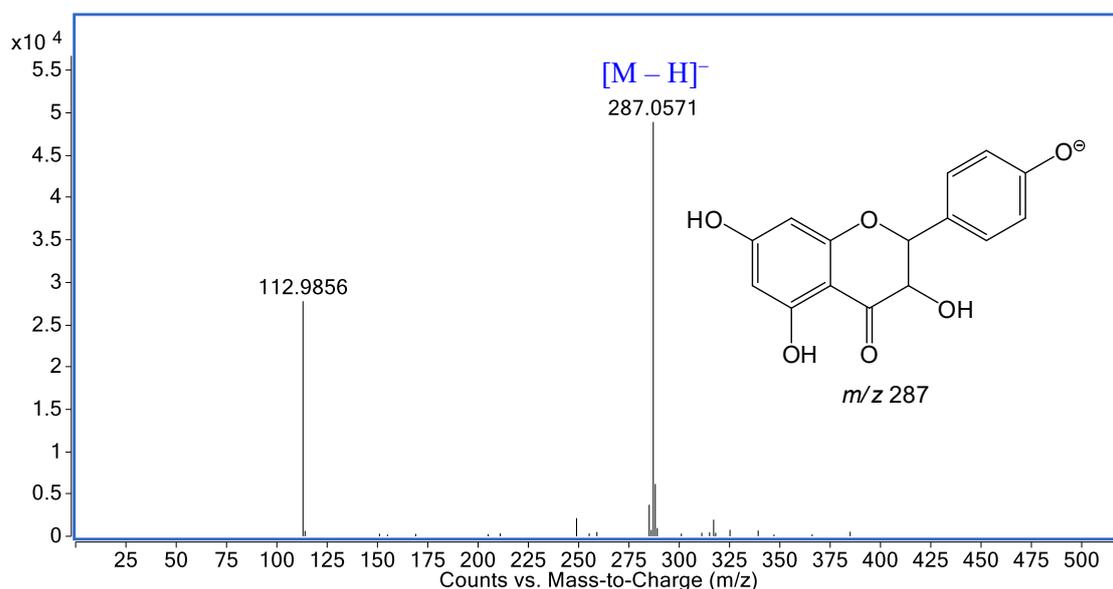
Fonte: autora.

4.9.5 – Elucidação estrutural do composto V



O composto V (2,1 mg), isolado da fração acetato de etila das flores, foi obtido como um sólido amarelo claro que apresentou teste positivo, na análise por CCD, para o reagente NP-PEG (R_f 0,76), e quando submetido à análise por espectrometria de massas em alta resolução, modo negativo, possibilitou estabelecer a fórmula molecular $C_{15}H_{12}O_6$ com índice de deficiência de hidrogênio igual a dez. O sinal referente à molécula desprotonada foi observado em m/z 287,0571 $[M - H]^-$, calculado para $C_{15}H_{11}O_6$, 287,0561 (Δ 3,5 ppm) (Figura 115).

Figura 115 – EM-IES(-) em alta resolução do composto V.

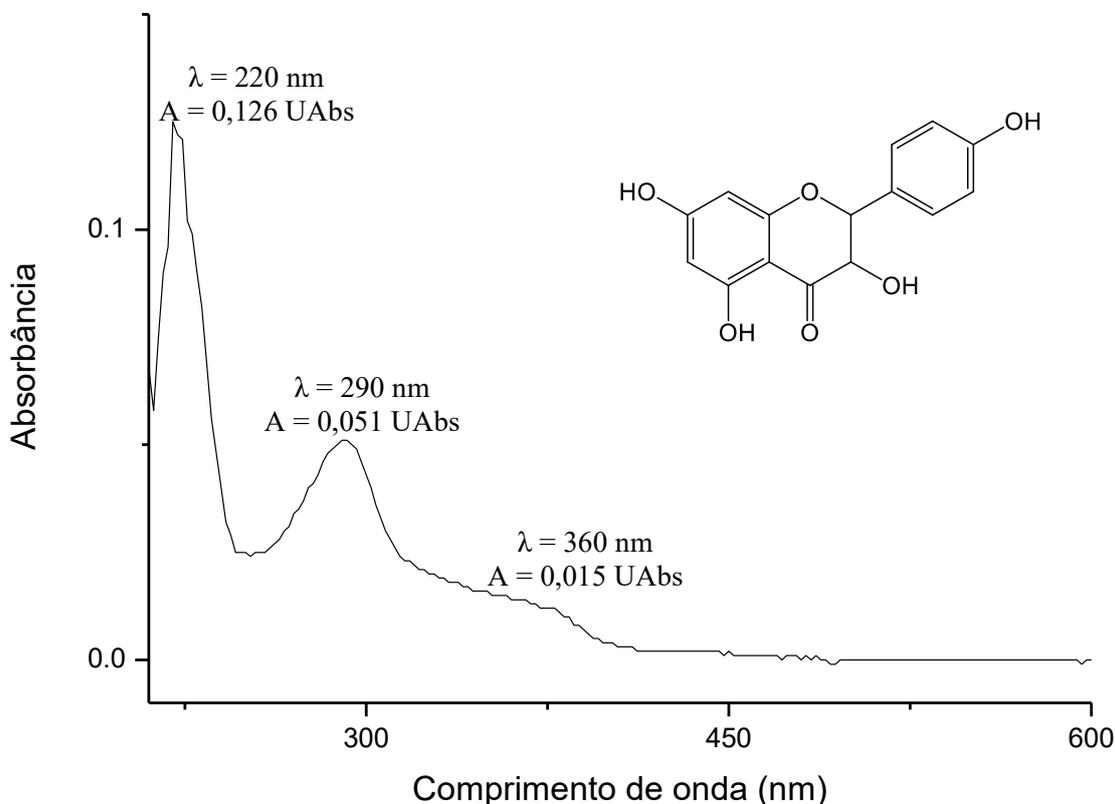


Fonte: autora.

A análise do espectro na região do UV-Vis do composto V (Figura 116) apresentou um perfil diferente do observado para a substância IV. Foram observadas duas bandas na região do ultravioleta, com máximos de absorção em $\lambda_{m\acute{a}x}$ ($\log \epsilon$) 220 (3,73) e 290 nm (3,49) e uma banda de menor intensidade na região de 360 nm. O fato da banda que é associada a absorção do sistema cinamoil do anel B, ser observada com menor

intensidade para a substância **V**, indica a ausência da dupla ligação entre C-2 e C-3, sugerindo que este composto seja uma flavanona ou um dihidroflavonol. De acordo com MABRY e colaboradores (1970), tanto flavanonas quanto dihidroflavonois têm sua principal banda de absorção (Banda II) na faixa de 270–295 nm.

Figura 116 – Espectro de absorção na região do UV-Visível de **V** ($C_{MeOH} = 12,0 \mu M$).



Fonte: autora.

A análise do espectro de RMN de 1H de **V** (Figura 120; Tabela 24) apresentou características similares às do composto **IV**. Na região dos sinais referentes aos hidrogênios aromáticos característicos do anel B, foram observados dois dupletos em δ 6,78 (2H, $J = 8,6$ Hz, H-3' e H-5') e δ 7,30 (2H, $J = 8,6$ Hz, H-2' e H-6') que caracterizam um sistema aromático 1,4-dissubstituído (FOSSEN, ANDERSEN, 2006; PAVIA et al., 2010). Adicionalmente, foi observado um duplete em δ 5,03 (H-2) e um duplo duplete em δ 4,56 (H-3), que caracterizam o anel C de um flavanonol. Conforme descrito por Chiappini e colaboradores (1982), a multiplicidade e constantes de acoplamento observadas para o H-3 (dd, $J = 11,4$ e 6,0 Hz), são características da correlação com H-2 e com o hidrogênio da hidroxila ligada ao C-3. (CHIAPPINI et al., 1982; PAVIA et al., 2010). Além disso, o valor da constante de acoplamento ($J = 11,4$ Hz), observado entre H-2 e H-3 (anel C), indica uma relação *trans*,

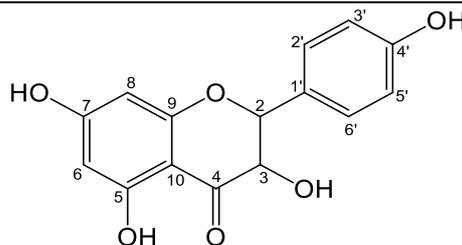
e fornece informações a respeito da estereoquímica em C-2 e C-3. (MARKHAM et al., 1984; PAVIA et al., 2010). A partir destes dados a estereoquímica em C-2 e C-3 estaria restrita aos possíveis estereoisômeros (+)-2*R*,3*R* ou (-)-2*S*,3*S* (CHIAPPINI et al., 1982; LEE et al., 2003; MARKHAM et al., 1984).

A análise do espectro de RMN de ^{13}C (Figura 121; Tabela 24), permitiu observar a presença de dois sinais de carbonos metínicos em δ 83,0 (C-2) e 71,5 (C-3), que caracterizam o anel C de um flavanonol. Os sinais observados no espectro de DEPT 135 (Figura 122) corroboram com a proposta do flavanonol e juntamente com o mapa de contorno HSQC (Figuras 123 e 124), permitiu correlacionar os carbonos aos seus respectivos hidrogênios (Tabela 25).

No mapa de contorno HMBC foi possível observar correlações entre os sinais δ_{H} 6,78 (H-3' e H-5') com δ_{C} 158,0 (C-4') ($^2J_{\text{H}\rightarrow\text{C}}$), e δ_{C} 127,6 (C-1') ($^3J_{\text{H}\rightarrow\text{C}}$), entre δ_{H} 7,30 (H-2' e H-6') com δ_{C} 158,0 (C-4') ($^3J_{\text{H}\rightarrow\text{C}}$), e entre δ_{H} 5,03 (H-2) com δ_{C} 129,5 (C-2') ($^3J_{\text{H}\rightarrow\text{C}}$) (Figuras 117, 125 e 126; Tabela 25).

Os dados de RMN (Tabelas 24 e 25, Figuras 120–126), aliados aos dados de EM e UV-Vis foram similares aos publicados na literatura (LEE et al., 2003; FOSSEN, ANDERSEN, 2006) e são consistentes com a estrutura do dihidrokaempferol (**V**), uma 3,5,7,4'-tetra-hidroxi-flavanona, também conhecida como aromadendrina.

Tabela 24 – Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (400/100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) do composto **V** em comparação com dados da literatura.



Posição	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$ mult. ^b (<i>J</i> em Hz)	$\delta_{\text{C}}^{\text{a}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{c}}$ mult. ^b (<i>J</i> em Hz)	$\delta_{\text{C}}^{\text{c}}$
2	5,03 d (<i>J</i> = 11,4 Hz)	83,0	4,99 d (<i>J</i> = 11,6 Hz)	84,0
3	4,56 dd (<i>J</i> = 11,4 e 6,0 Hz)	71,5	4,55 d (<i>J</i> = 11,6 Hz)	72,7
4	---	197,9	---	197,6
5	---	163,4	---	164,4
6	5,82 d (<i>J</i> = 1,6 Hz)	95,1	5,89 d (<i>J</i> = 2,1 Hz)	96,5
7	---	167,0	---	167,8
8	5,87 d (<i>J</i> = 1,6 Hz)	96,1	5,93 d (<i>J</i> = 2,1 Hz)	95,4
9	---	163,0	---	163,5
10	---	100,5	---	101,0
1'	---	127,6	---	124,3
2'	7,30 d (<i>J</i> = 8,6 Hz)	129,5	7,37 d (<i>J</i> = 8,6 Hz)	129,5
3'	6,78 d (<i>J</i> = 8,6 Hz)	115,0	6,84 d (<i>J</i> = 8,6 Hz)	115,3
4'	---	158,0	---	158,4
5'	6,78 d (<i>J</i> = 8,6 Hz)	115,0	6,84 d (<i>J</i> = 8,6 Hz)	115,3
6'	7,30 d (<i>J</i> = 8,6 Hz)	129,5	7,37 d (<i>J</i> = 8,6 Hz)	129,5

^aDeslocamentos químicos estabelecidos em relação ao padrão interno TMS ($\delta_{\text{TMS}} = 0,0$ ppm).

^bMultiplicidade: d (duplete), dd (duplo duplete). ^cDados da literatura: Experimentos de RMN realizados a 300 e 75 MHz para ^1H e ^{13}C , respectivamente, utilizando CD_3OD como solvente (LEE et al., 2003)

Fonte: autora.

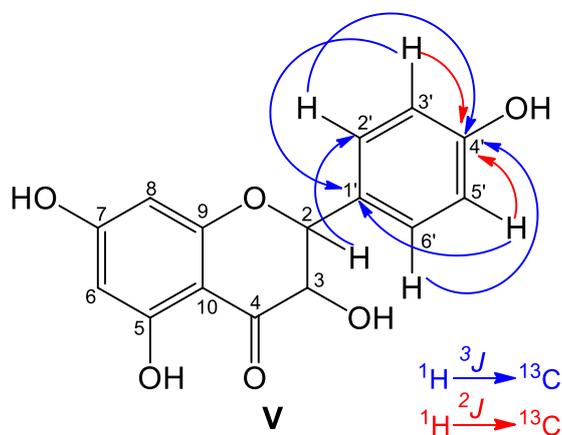
Tabela 25 – Correlações observadas nos mapas de contorno HSQC e HMBC para o composto **V**.

Posição	δ_c^a	DEPT	HSQC	HMBC
2	83,0	CH	5,03	---
3	71,5	CH	4,56	---
4	197,9	---	---	---
5	163,4	---	---	---
6	95,1	CH	5,82	---
7	167,0	---	---	---
8	96,1	CH	5,87	---
9	163,0	---	---	---
10	100,5	---	---	---
1'	127,6	---	---	H-3', H-5'
2'	129,5	CH	7,30	H-2
3'	115,0	CH	6,78	---
4'	158,0	---	---	H-2', H-3', H-5', H-6'
5'	115,0	CH	6,78	---
6'	129,5	CH	7,30	---

^aDeslocamentos químicos (δ em ppm) estabelecidos em relação ao padrão interno TMS ($\delta_{TMS} = 0,0$).

Fonte: autora.

Figura 117 – Principais correlações (H–C) observadas no mapa de contorno HMBC de **V**.

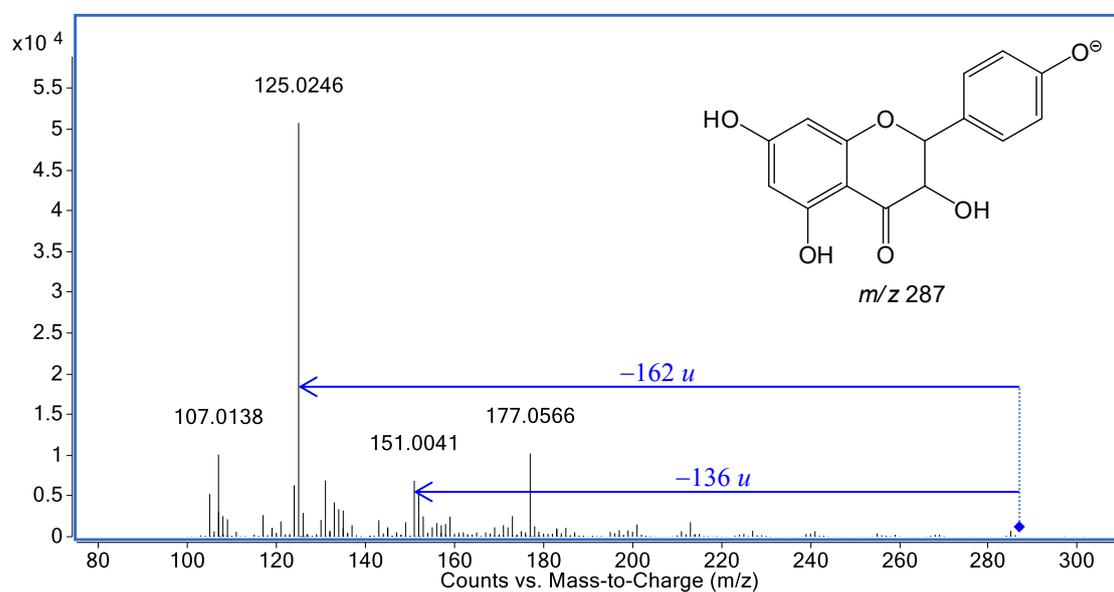


Fonte: autora.

Para confirmar a estrutura proposta do composto **V**, foi realizada a análise por espectrometria de massas sequencial no modo negativo. O EM-IES obtido da dissociação induzida por colisão do íon molecular m/z 287 $[M - H]^-$ com N_2 , gerou como principais

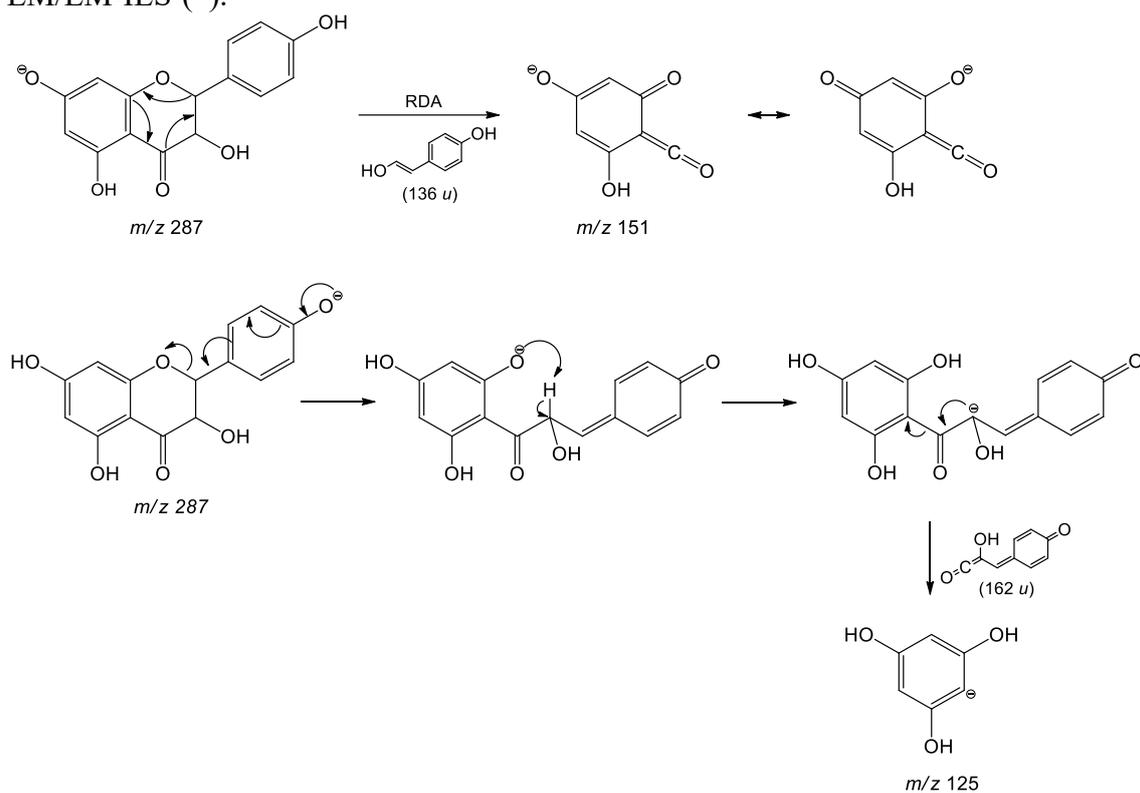
fragmentos os íons em m/z 177, 151, 125 e 107 (Figura 118). O íon fragmento de m/z 151 foi atribuído a um mecanismo do tipo retro-Diels-Alder (RDA) no anel C, também já relatado em outros estudos com flavonoides (OLIVEIRA et al., 2018; RIJKE et al., 2006). O sinal referente ao pico base em m/z 125 foi atribuído à clivagem heterolítica do anel C, auxiliada pela conjugação do par de elétrons do oxigênio (fenóxido) na posição quatro do anel B, com retenção da carga sobre o oxigênio do heterociclo. Em seguida o par de elétrons do íon fenóxido (anel A) captura o hidrogênio carbinólico (H-3), transferindo a carga negativa para o C-3. Na sequência uma ligação dupla, entre o C-3 e C-4 é formada, resultando na eliminação neutra de 162 u (clivagem heterolítica entre C-4 e C-10) e formação do íon fragmento de m/z 125 (Figura 119) (MIKETOVA et al., 2000; OLIVEIRA et al., 2018).

Figura 118 – EM/EM-IES(-) do composto V (m/z 287 $[M - H]^-$, energia de colisão 25 eV).



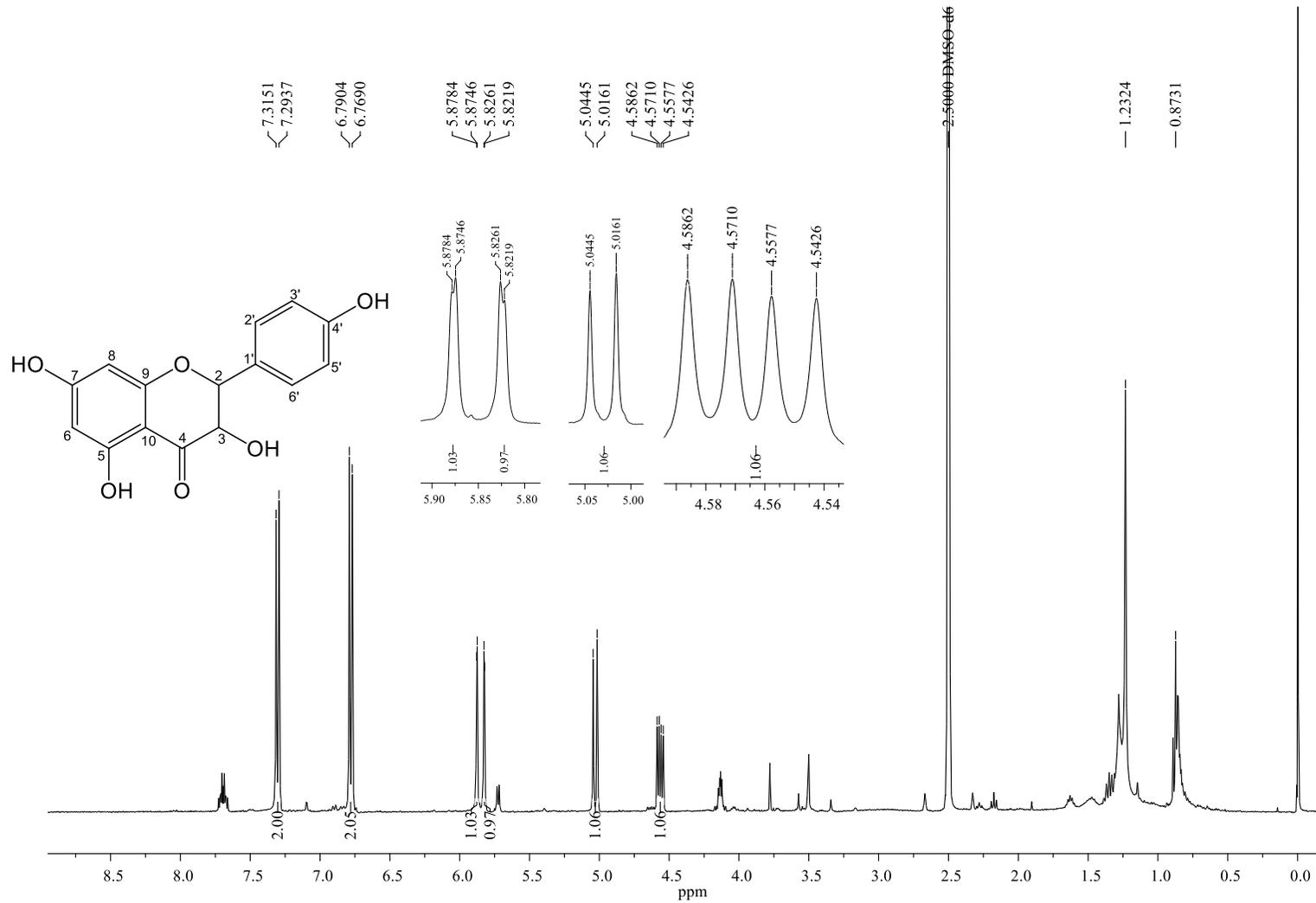
Fonte: autora.

Figura 119 – Proposta de fragmentação para a substância **V** analisado por EM/EM-IES(-).



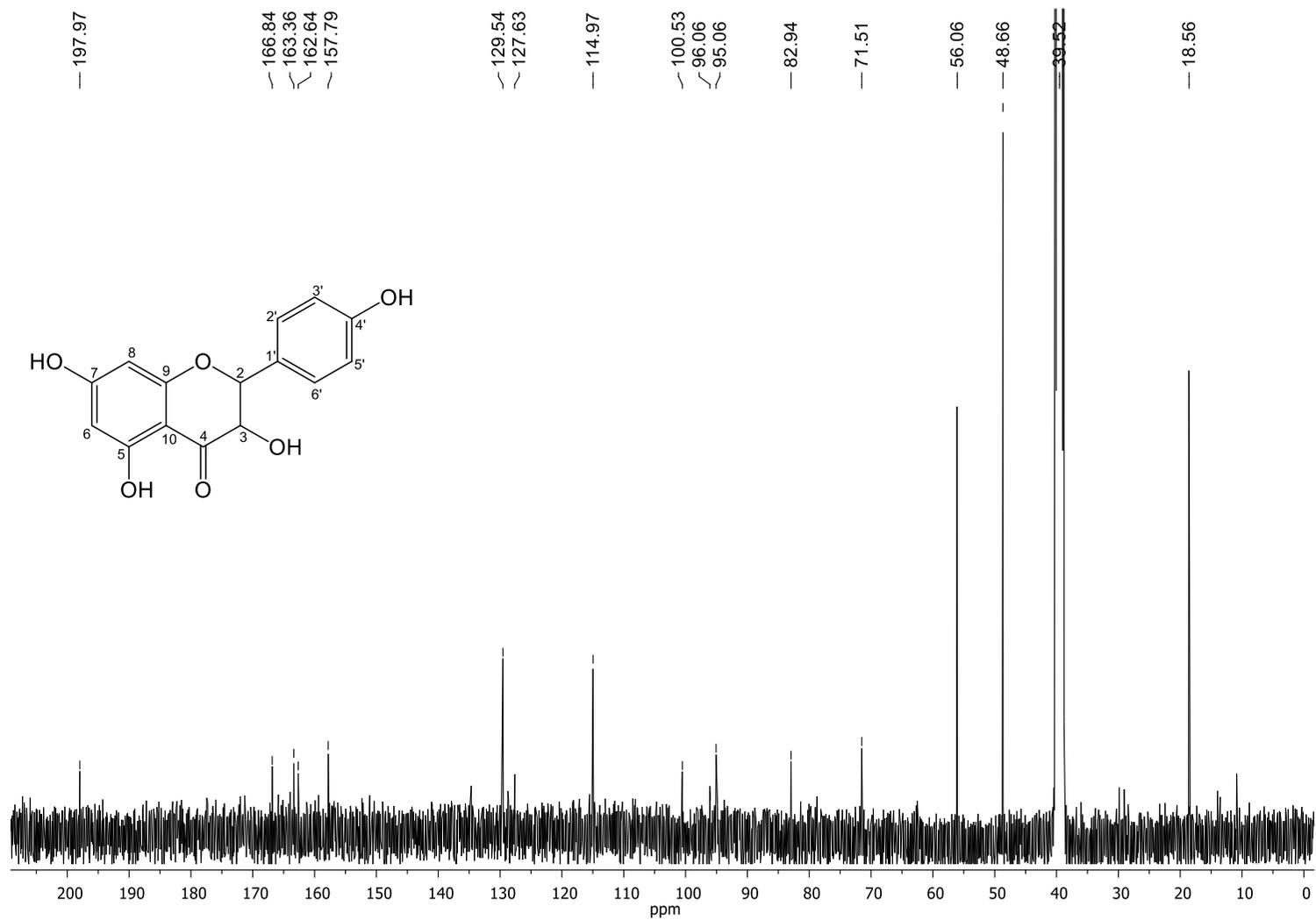
Fonte: autora.

Figura 120 – Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) do composto V.



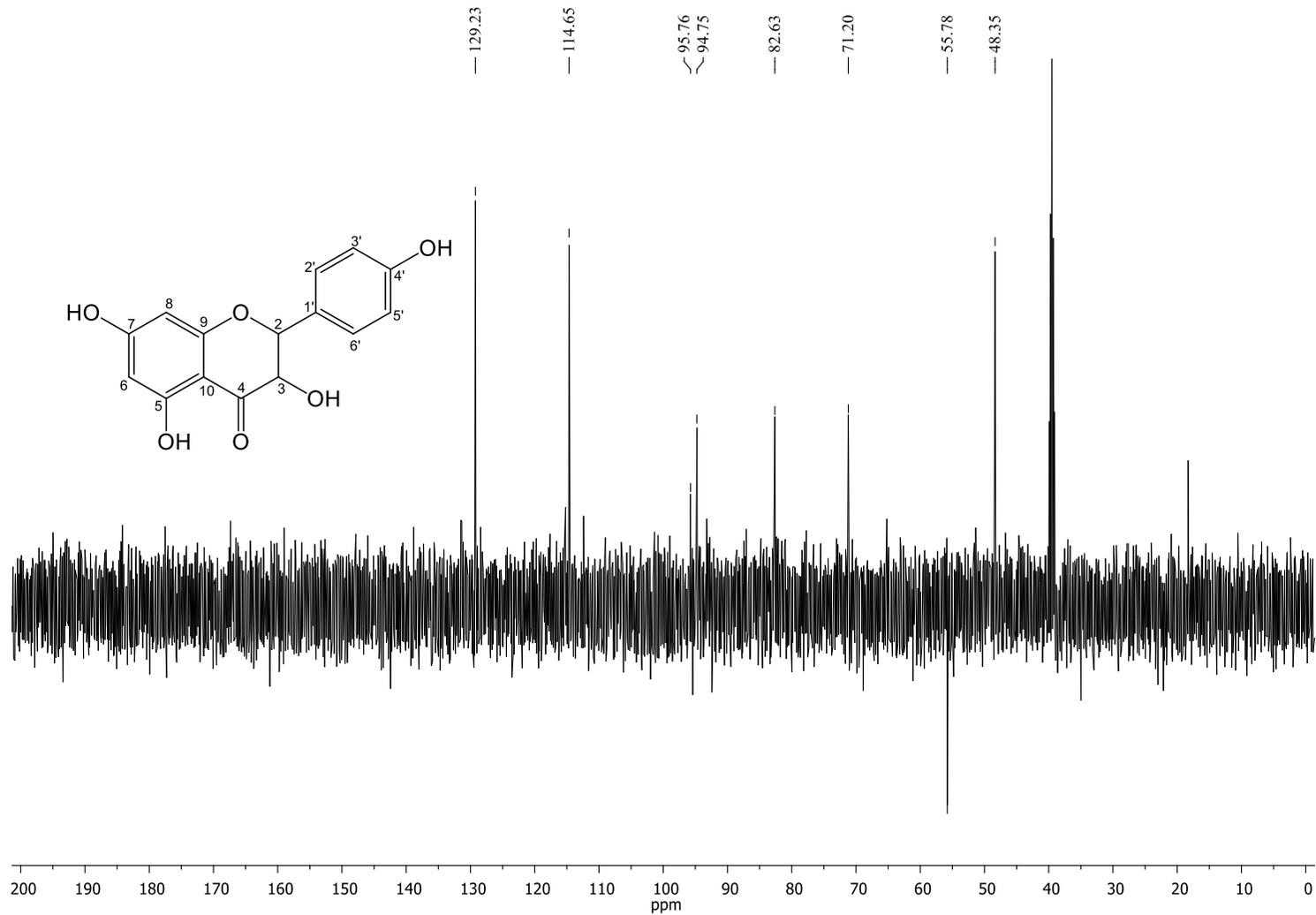
Fonte: autora.

Figura 121 – Espectro de RMN de ^{13}C (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) do composto V.



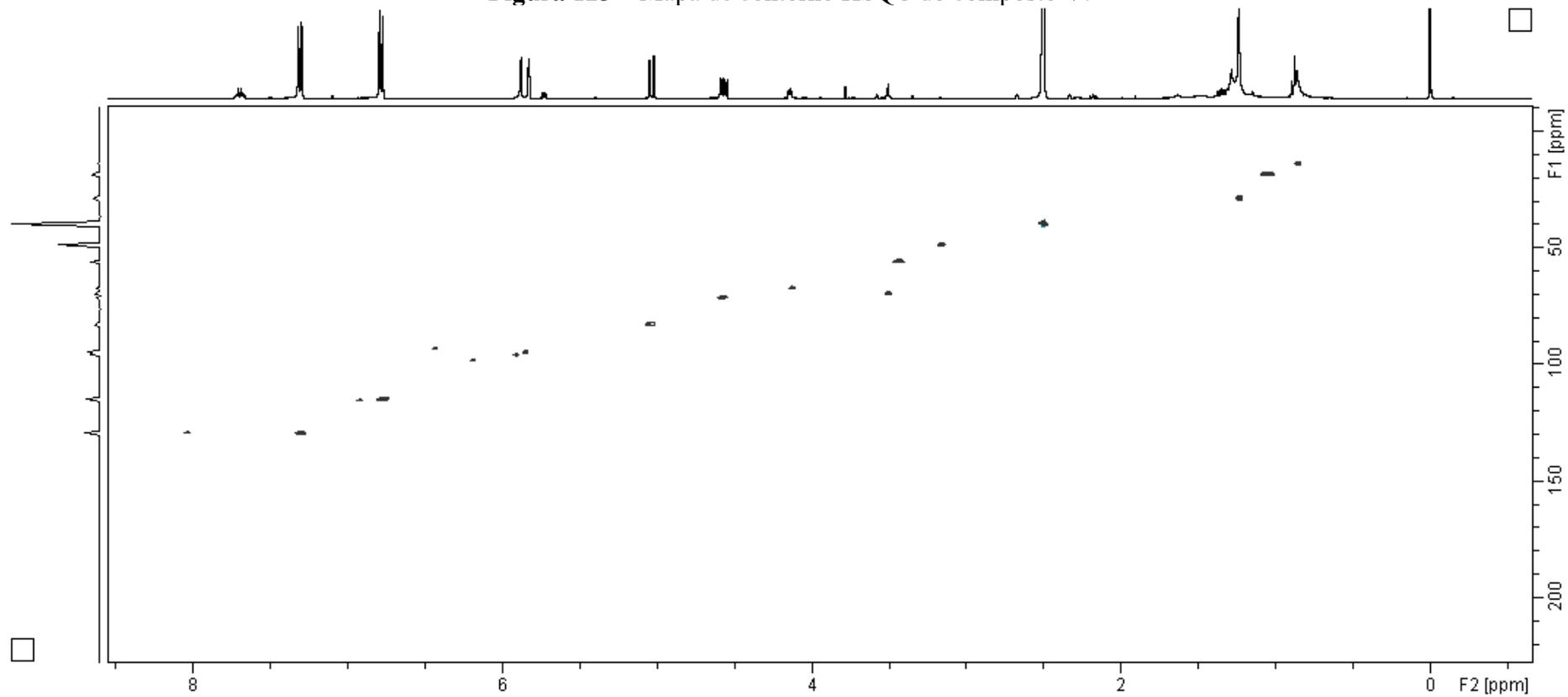
Fonte: autora.

Figura 122 – Espectro de DEPT 135 do composto V.



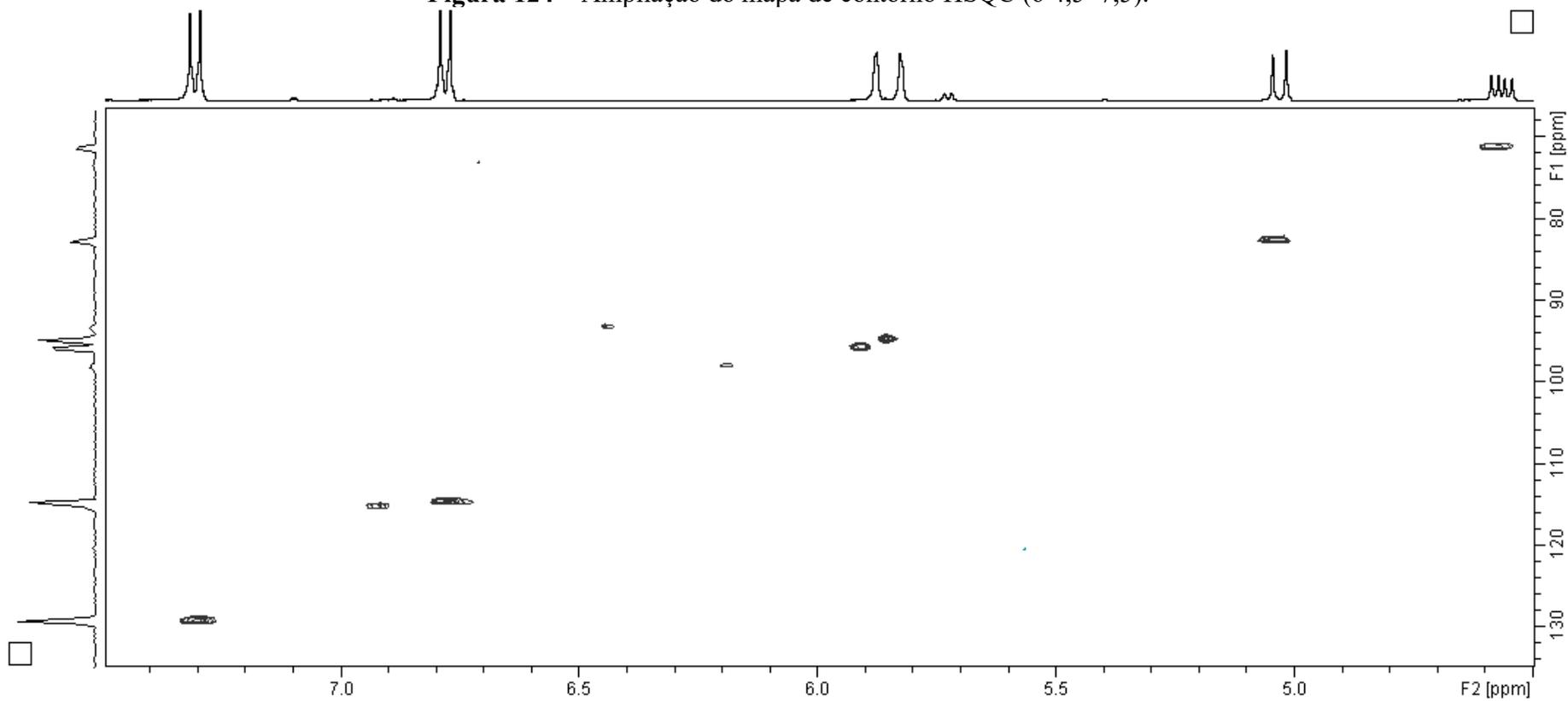
Fonte: autora.

Figura 123 – Mapa de contorno HSQC do composto V.



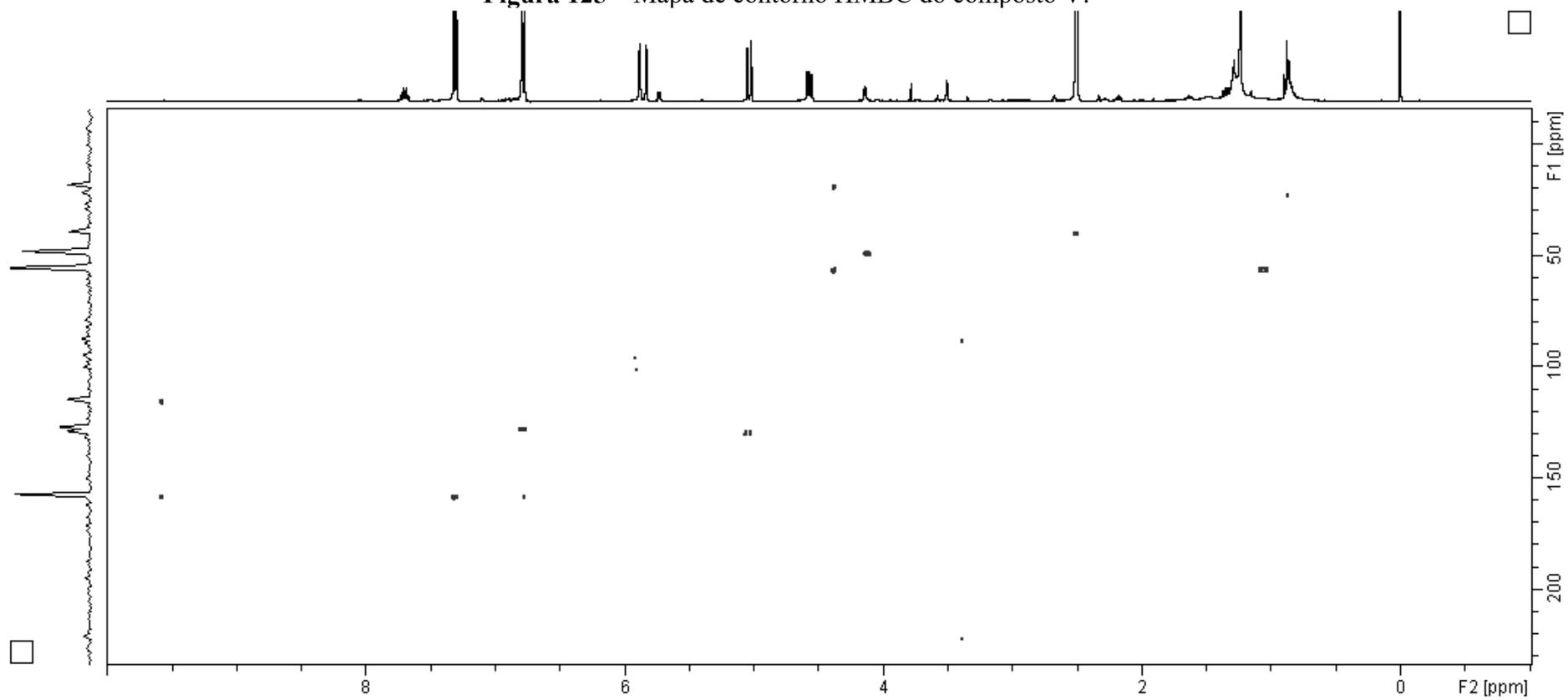
Fonte: autora.

Figura 124 – Ampliação do mapa de contorno HSQC (δ 4,5–7,5).



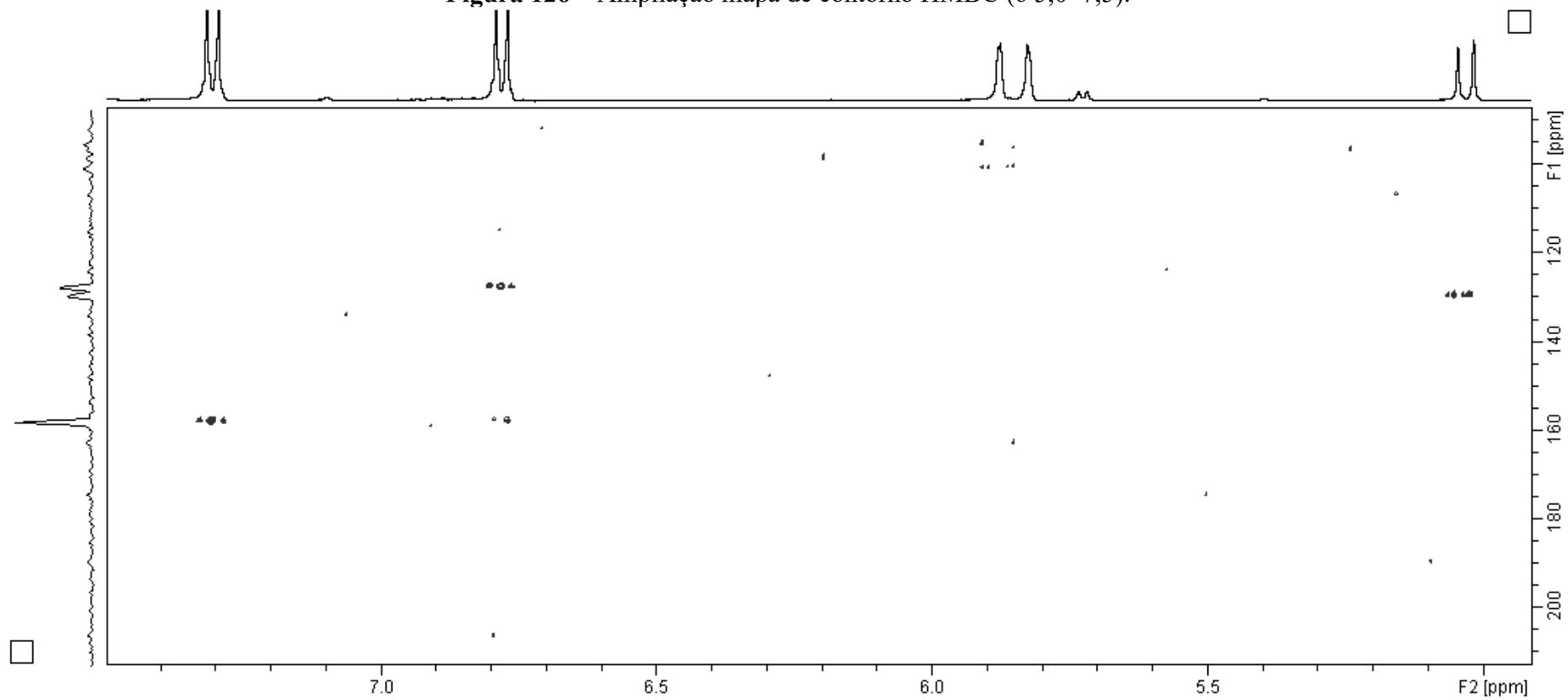
Fonte: autora.

Figura 125 – Mapa de contorno HMBC do composto V.



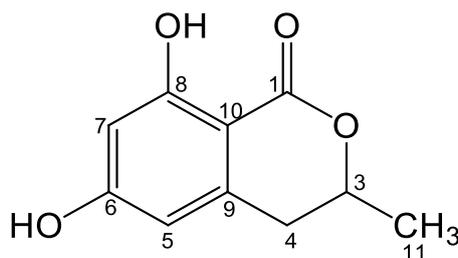
Fonte: autora.

Figura 126 – Ampliação mapa de contorno HMBC (δ 5,0–7,5).



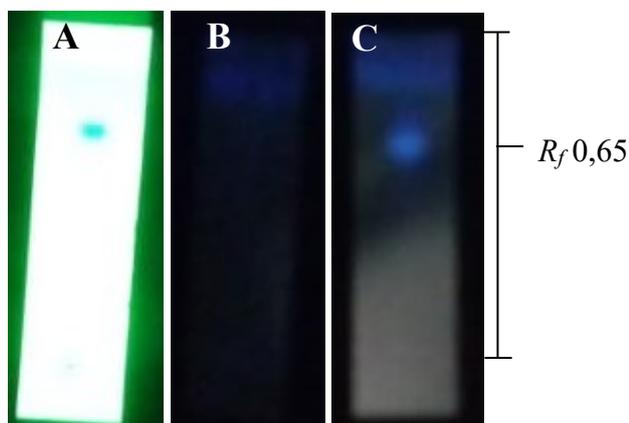
Fonte: autora.

4.9.6 – Elucidação estrutural do composto VI



O composto VI (3,4 mg) foi isolado da fração acetato de etila das flores e quando analisado por CCD, apresentou uma mancha com R_f 0,65 de coloração azul quando analisado sob luz UV (365 nm) somente após tratamento com reagente KOH 5% (Figura 127 C), sugerindo tratar-se de um composto pertencente a classe das cumarinas (WAGNER, BLADT, 2001).

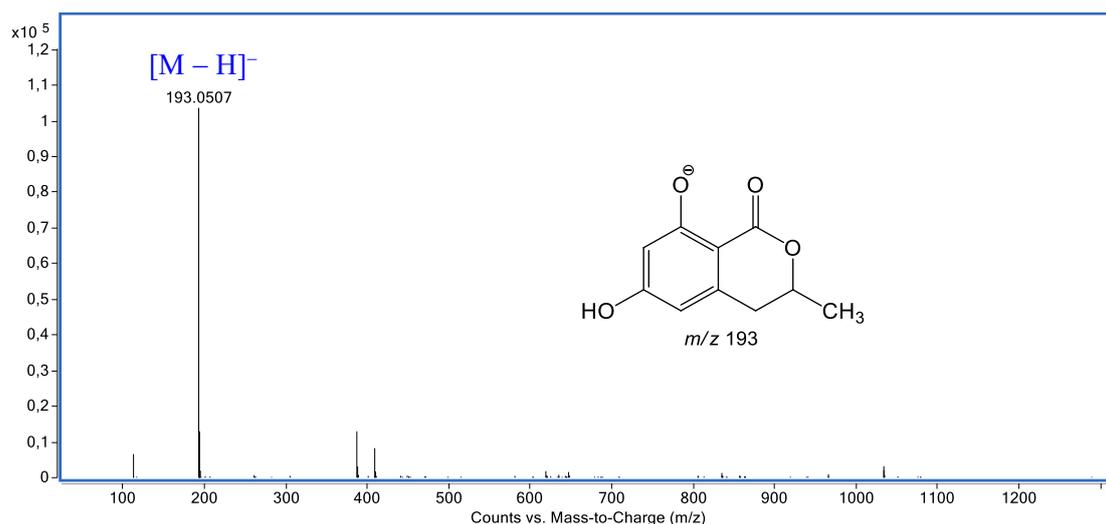
Figura 127 – CCD do composto VI. Inspeção em câmara de UV 254 nm (A), 365 nm (B) e 365 nm após tratamento com solução etanólica de KOH 5% (C).



FM: $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{AcOEt}$ 2:3 e FE: SiO_2 .
Fonte: autora.

A partir da análise do composto VI por espectrometria de massas em alta resolução, modo negativo, foi possível estabelecer a fórmula molecular $\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{O}_4$, com índice de deficiência de hidrogênio igual a seis. O sinal referente à molécula desprotonada foi observado em m/z 193,0507 $[\text{M} - \text{H}]^-$, calculado para $\text{C}_{10}\text{H}_9\text{O}_4$, 193,0506 ($\Delta -0,5$ ppm) (Figura 128).

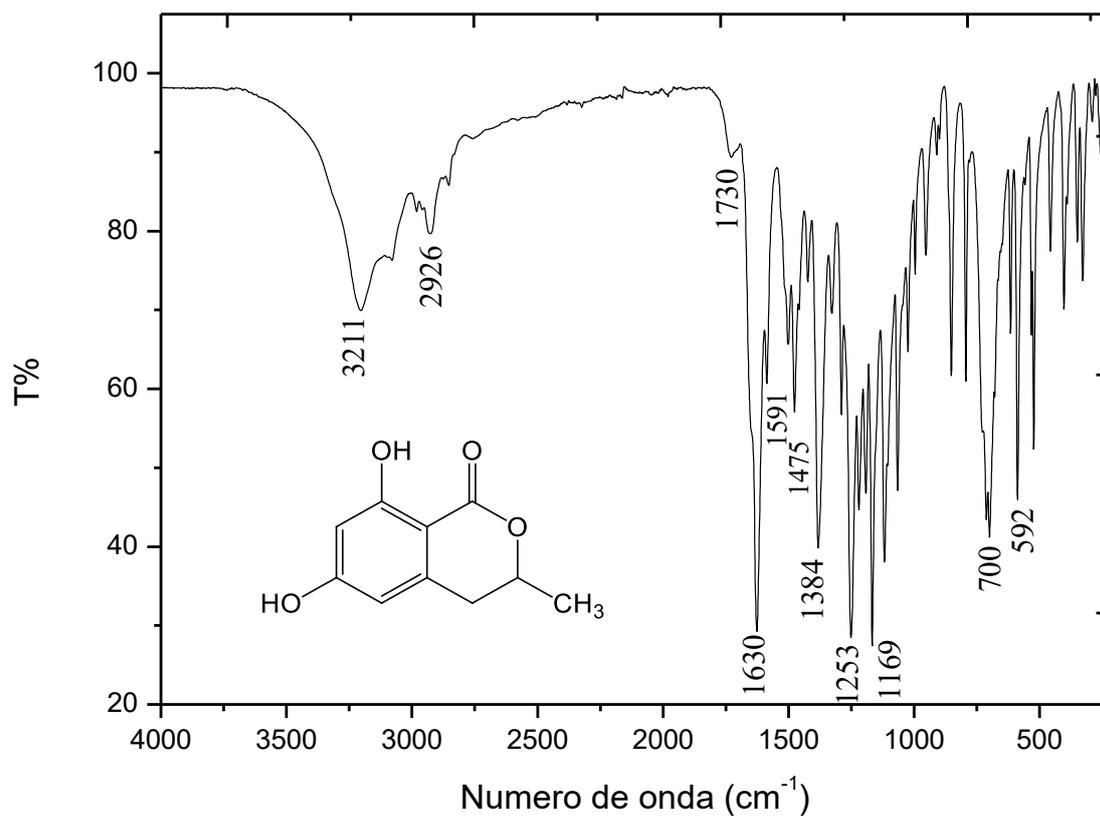
Figura 128 – EM-IES(-) em alta resolução do composto VI.



Fonte: autora.

A análise do espectro na região do infravermelho (Figura 129) permitiu identificar uma banda em ν 3211 cm^{-1} , proveniente do estiramento do grupo O–H com ligação de hidrogênio. O estiramento assimétrico dos C–H alifáticos foram identificados em ν 2926 cm^{-1} . Na faixa de 1300 a 1000 cm^{-1} foram observadas bandas referentes ao estiramento C–O de ésteres; em ν 1591 e 1475 cm^{-1} , bandas referentes ao estiramento C=C de anéis aromáticos; além de um banda com intensidade forte em ν 1630 cm^{-1} , que sugere a presença de carbonila de lactona envolvida em ligação de hidrogênio com uma hidroxila fenólica (MALLABAEV, SIDYAKIN, 1972; PAVIA et al., 2010).

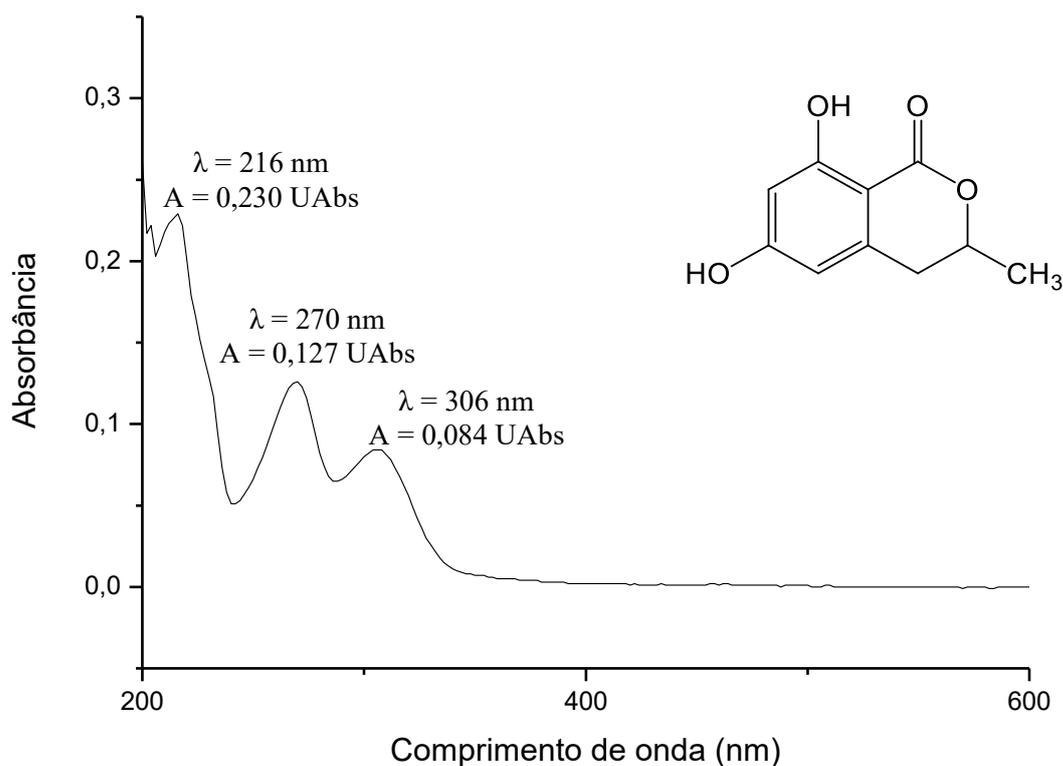
Figura 129 – Espectro na região do infravermelho do composto **VI**.



Fonte: autora.

A análise do espectro obtido na região do UV-Vis do composto **VI** (Figura 130), permitiu observar três bandas com máximos de absorção em $\lambda_{\text{máx}}$ (log ϵ) 216 (4,14), 270 (3,89) e 306 nm (3,69), que quando comparados com a literatura, sugere tratar-se de um derivado pertencente a classe das isocumarinas (SHIMADA et al. 2002).

Figura 130 – Espectro de absorção na região do UV-Visível de **VI** ($C_{EtOH} = 12,0 \mu M$).



Fonte: autora.

O espectro de RMN de ^1H de **VI** (Figura 134; Tabela 26) apresentou, na região dos sinais referente aos hidrogênios aromáticos, dois dupletos em δ 6,18 (1H, $J = 2,0 \text{ Hz}$, H-7) e δ 6,23 (1H, $J = 2,0 \text{ Hz}$, H-5), característico de um sistema aromático 1,2,3,5- tetrassubstituído. Também foram observados sinais de hidrogênios metilênicos benzílicos em δ 2,80 (1H, dd, $J = 11,2; 16,5 \text{ Hz}$, H-4_{ax}) e δ 2,92 (1H, dd, $J = 3,4; 16,5 \text{ Hz}$, H-4_{eq}), ambos correlacionando, no mapa de contorno HSQC (Figura 137 e 138), com o carbono em δ 33,8 (C-4), evidenciando serem diastereotópicos. De acordo com Venkatasubbaiah & Chilton (1991) e Inerney & Taylor (1995) a configuração relativa de C-3 pode ser definida com base no valor da constante de acoplamento vicinal ($^3J_{3,4}$) entre H-3 e H-4. Em geral, valores de $J = 10\text{--}13 \text{ Hz}$ sugerem configuração *trans* e conformação antiperiplanar (H-3_{ax} – H-4_{ax}) preferencial dos hidrogênios H-3 e H-4, enquanto, valores de $^3J_{3,4} = 3\text{--}6$ sugerem uma conformação sinclinal (*cis*) (H-3_{ax} – H-4_{eq} ou H-3_{eq} – H-4_{ax}).

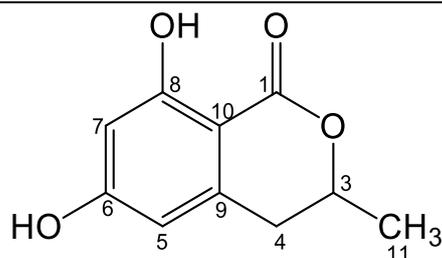
O sinal em δ 4,68 (1H, ddq, $J = 3,4; 6,3$ e $11,2 \text{ Hz}$, H-3) é característico dos espectros de dihidroisocumarinas, e ocorrem na faixa de $\delta_{\text{H}} 4,50\text{--}4,90$ (INERNEY, TAYLOR, 1995). Também foram observados um duplete em δ 1,38 (3H, $J = 6,3 \text{ Hz}$, H-11) e um simpleto em δ 11,12, característico de hidrogênio de hidroxila que faz ligação intramolecular com a carbonila (quelado).

No espectro de RMN de ^{13}C (Figura 135; Tabela 26) foram observados 10 sinais, sendo 6 referentes a carbonos aromáticos em δ 106,7 (C-5), 163,4 (C-6), 101,0 (C-7), 164,5 (C-8), 100,1 (C-9) e 142,3 (C-10); uma carbonila em δ 169,5 (C-1), característica de carbonila de éster; um carbono metínico carbinólico em δ 75,4 (C-3), um carbono benzílico em δ 33,8 (C-4) e um carbono referente a metila em δ 20,3 (C-11). A análise do espectro de DEPT 135 (Figura 136), juntamente com o mapa de contorno HSQC (Figuras 137 e 138), permitiu correlacionar os carbonos aos seus respectivos hidrogênios (Tabela 15) e corroboram com a proposta da dihidroisocumarina.

No mapa de contorno HMBC (Figuras 139 e 140; Tabela 15) foram observadas as correlações entre os sinais δ_{H} 6,18 (H-7) com δ_{C} 169,5 (C-1) ($^4J_{\text{H}\rightarrow\text{C}}$), δ_{C} 106,7 (C-5) ($^3J_{\text{H}\rightarrow\text{C}}$), δ_{C} 163,4 (C-6) ($^2J_{\text{H}\rightarrow\text{C}}$), δ_{C} 164,5 (C-8) ($^2J_{\text{H}\rightarrow\text{C}}$) e δ_{C} 100,1 (C-9) ($^4J_{\text{H}\rightarrow\text{C}}$); entre δ_{H} 6,23 (H-5) com δ_{C} 33,8 (C-4) ($^3J_{\text{H}\rightarrow\text{C}}$) e δ_{C} 100,1 (C-9) ($^2J_{\text{H}\rightarrow\text{C}}$); entre δ_{H} 2,80/2,92 (H-4_{ax/eq}) com δ_{C} 75,4 (C-3) ($^2J_{\text{H}\rightarrow\text{C}}$), δ_{C} 106,7 (C-5) ($^3J_{\text{H}\rightarrow\text{C}}$), δ_{C} 100,1 (C-9) ($^2J_{\text{H}\rightarrow\text{C}}$), δ_{C} 142,3 (C-10) ($^3J_{\text{H}\rightarrow\text{C}}$) e δ_{C} 20,3 (C-11) ($^3J_{\text{H}\rightarrow\text{C}}$) e entre δ_{H} 1,38 (H-11) com δ_{C} 169,5 (C-1) ($^4J_{\text{H}\rightarrow\text{C}}$), δ_{C} 75,4 (C-3) ($^2J_{\text{H}\rightarrow\text{C}}$) e δ_{C} 33,8 (C-4) ($^3J_{\text{H}\rightarrow\text{C}}$) (Figura 131). No mapa de contorno COSY (Figura 141) foram observadas as correlações ^1H - ^1H entre H-3 (δ 4,68) com δ 1,38 (H-11) e δ 2,80 (H-4_{ax}).

Os dados de RMN (Tabelas 14 e 15; Figuras 134–141), aliados aos dados de EM, IV e UV-Vis foram similares aos publicados na literatura (INERNEY, TAYLOR, 1995; MALLABAEV, SIDYAKIN, 1972; SHIMADA et al., 2002; VENKATASUBBAIAH, CHILTON, 1991) e são consistentes com a estrutura da 3,4- dihidro-6,8-dihidroxi-3-metilisocumarina, também conhecida como 6- hidroximeleina.

Tabela 26 – Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (400/100 MHz, DMSO- d_6) do composto **VI** em comparação com dados da literatura.



Posição	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$ mult. ^b (J em Hz)	$\delta_{\text{C}}^{\text{a}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{c}}$ mult. ^b (J em Hz)	$\delta_{\text{C}}^{\text{c}}$
1	---	169,5	---	170,5
3	4,68 ddq ($J = 3,4; 6,3; 11,2$ Hz)	75,4	4,66 dq ($J = 5,5; 6,2$ Hz)	76,2
4 _{ax}	2,80 dd ($J = 11,2; 16,5$ Hz)	33,8	2,84 sl	34,9
4 _{eq}	2,92 dd ($J = 3,4; 16,5$ Hz)		2,85 d ($J = 5,5$ Hz)	
5	6,23 d ($J = 2,0$ Hz)	106,7	6,31 d ($J = 2,3$ Hz)	107,3
6	---	163,4	---	165,1
7	6,18 d ($J = 2,0$ Hz)	101,0	6,20 d ($J = 2,3$ Hz)	101,8
8	---	164,5	---	165,0
9	---	100,1	---	101,5
10	---	142,3	---	143,0
11	1,38 d ($J = 6,3$ Hz)	20,3	1,51 d ($J = 6,2$ Hz)	20,6
8-OH	11,12 s	---	11,22 s	---

^aDeslocamentos químicos estabelecidos em relação ao padrão interno TMS ($\delta_{\text{TMS}} = 0,0$ ppm).

^bMultiplicidade: s (simpleto), d (duplete), dd (duplo duplete), ddq (duplo duplo quadruplete).

^cDados da literatura: Experimentos de RMN realizados a 500 e 125 MHz para ^1H e ^{13}C , respectivamente, utilizando acetona- d_6 como solvente (SHIMADA et al., 2002)

Fonte: autora.

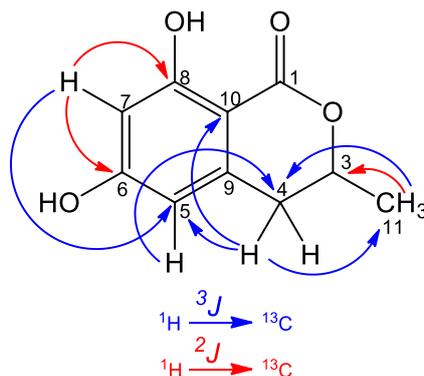
Tabela 27 – Correlações observadas nos mapas de contorno HSQC e HMBC para o composto **VI**.

Posição	δ_C (ppm)	DEPT	HSQC	HMBC
1	169,5	---	---	H-11, H-7
3	75,4	CH	4,68	H-11, H-4 _{ax} , H-4 _{eq}
4	33,8	CH ₂	2,85	H-11, H-5
5	106,7	CH	6,23	H-4 _{ax} , H-4 _{eq} , H-7
6	163,4	---	---	H-7
7	101,0	CH	6,18	---
8	164,5	---	---	H-7
9	100,1	---	---	H-4 _{ax} , H-4 _{eq} , H-5, H-7
10	142,3	---	---	H-4 _{ax} , H-4 _{eq}
11	20,3	CH ₃	1,38	H-4 _{ax} , H-4 _{eq}

^aDeslocamentos químicos (δ em ppm) estabelecidos em relação ao padrão interno TMS ($\delta_{TMS} = 0,0$).

Fonte: autora.

Figura 131 – Principais correlações (H–C) observadas no mapa de contorno HMBC de **VI**.

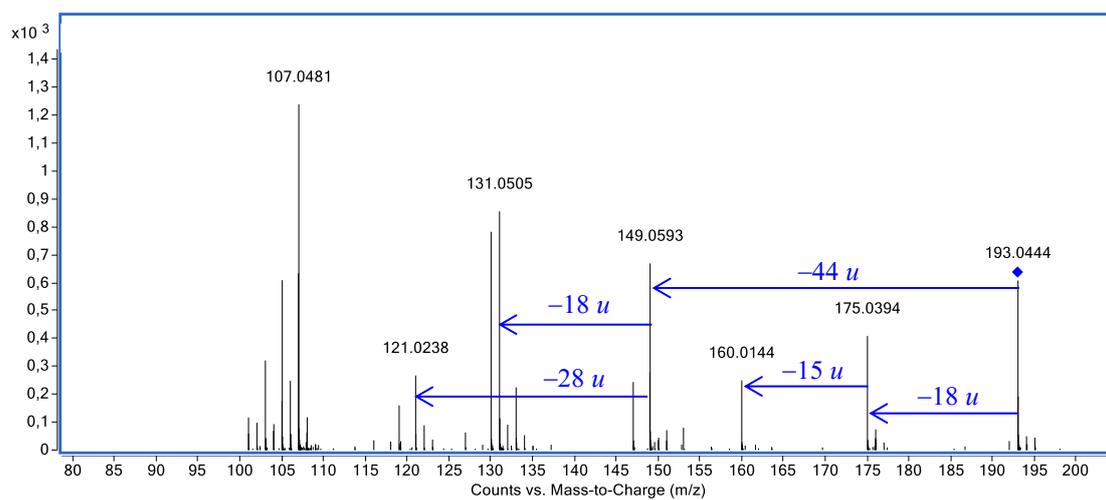


Fonte: autora.

Para confirmar a estrutura proposta do composto **VI**, foi realizada a análise por espectrometria de massas sequencial no modo negativo. O EM-IES obtido da dissociação induzida por colisão do íon molecular m/z 193 $[M - H]^-$ com N_2 , gerou como principais fragmentos os íons m/z 175, 160, 149, 131, 121 e 107 (Figura 132). A fragmentação no anel lactona, através de um mecanismo do tipo retro-Diels-Alder (RDA), com eliminação neutra de 44 u , forneceu o fragmento de m/z 149. A eliminação 1,4 de uma molécula neutra de água a partir do íon molecular leva a formação do íon de m/z 175 que, ao sofrer eliminação radicalar do grupo metila, leva a formação do íon de m/z 160. O íon de m/z 121

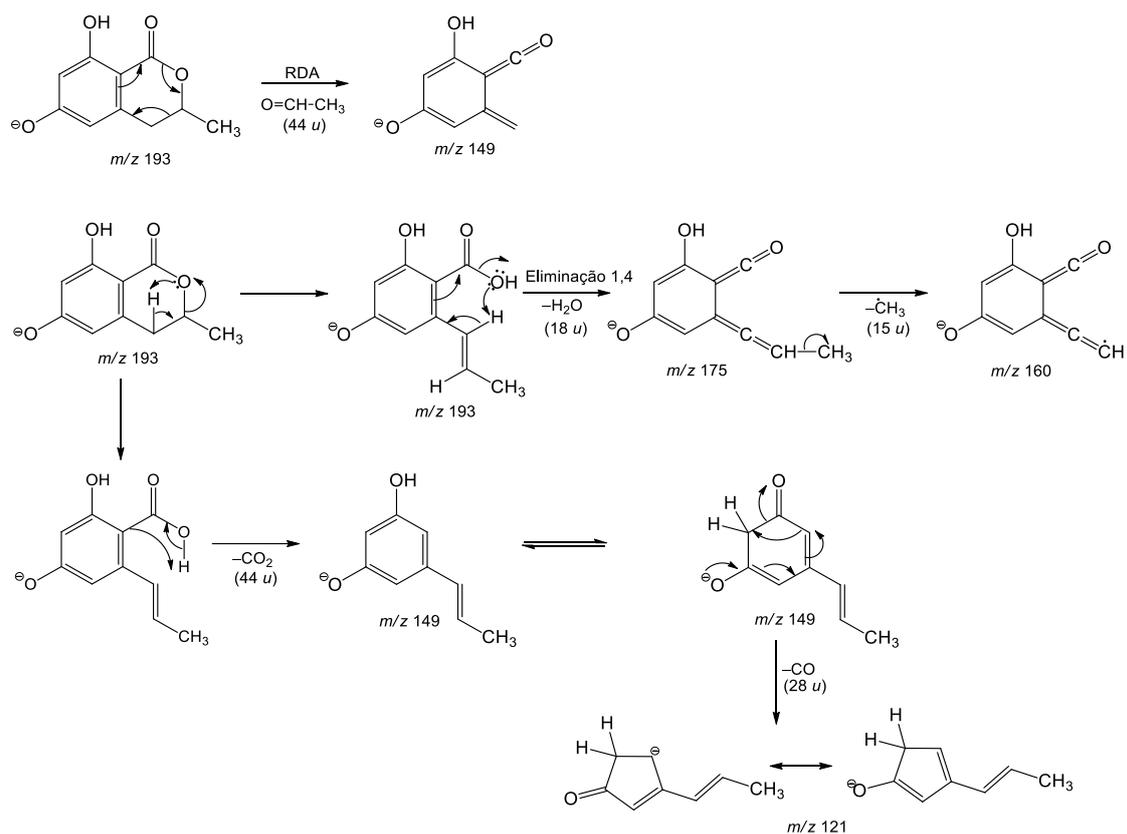
foi atribuído à eliminação neutra de CO (28 u) a partir do íon de m/z 149 (Figura 133). A eliminação de CH₃ é recorrente na literatura para este tipo de composto, assim como a eliminação neutra de CO₂ e CO foram descritas várias vezes para cumarinas e isocumarinas (CISSÉ, 2009; CONCANNON, RAMACHANDRAN, SMYTH, 2000; LOPEZ-AVILA, YEFCHAK, 2011) e corroboram com a estrutura proposta.

Figura 132 – EM/EM-IES(-) do composto VI (m/z 193 [M – H]⁻, energia de colisão 20 eV).



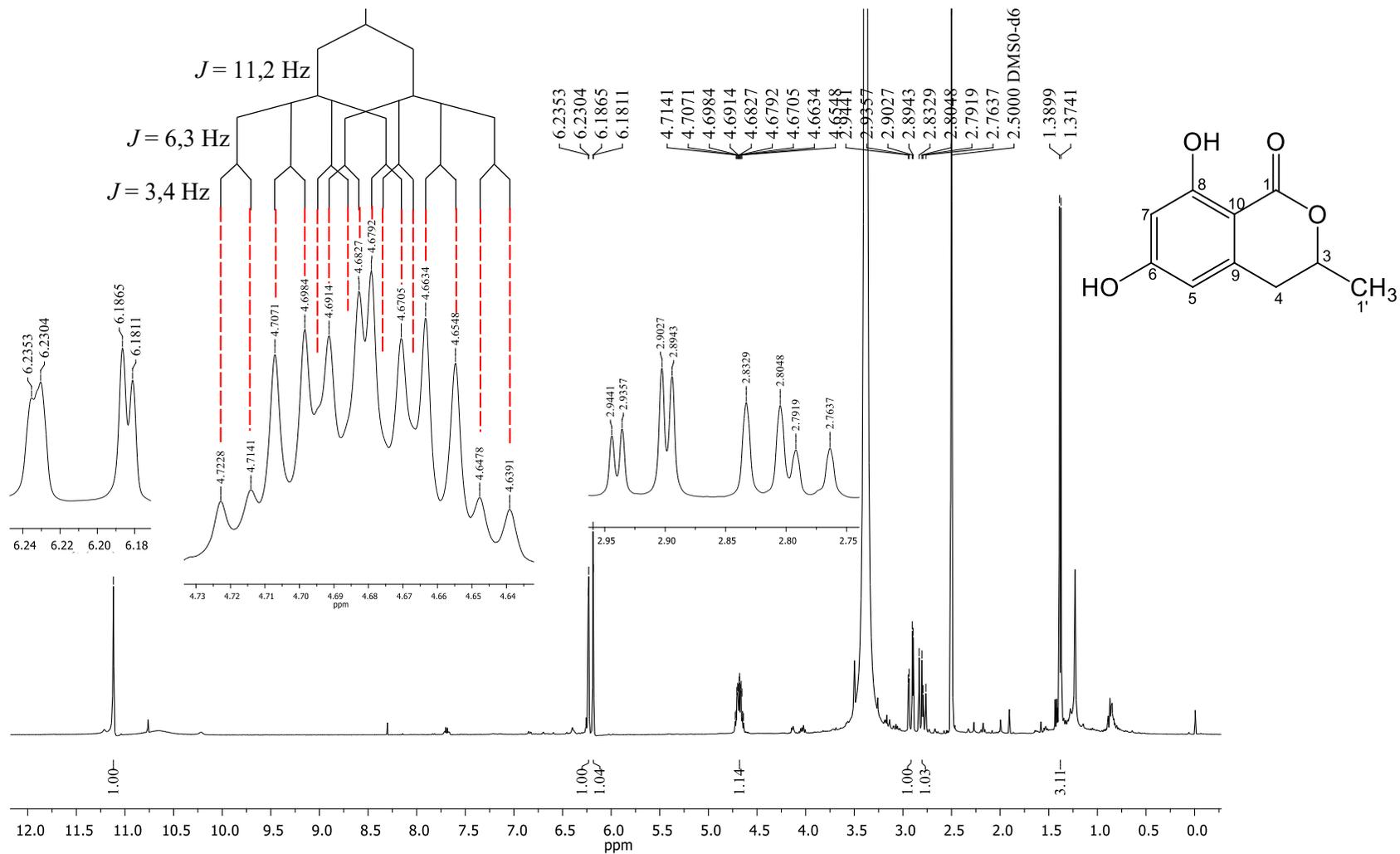
Fonte: autora.

Figura 133 – Proposta de fragmentação para o composto **VI** analisado por EM/EM-IES(-).



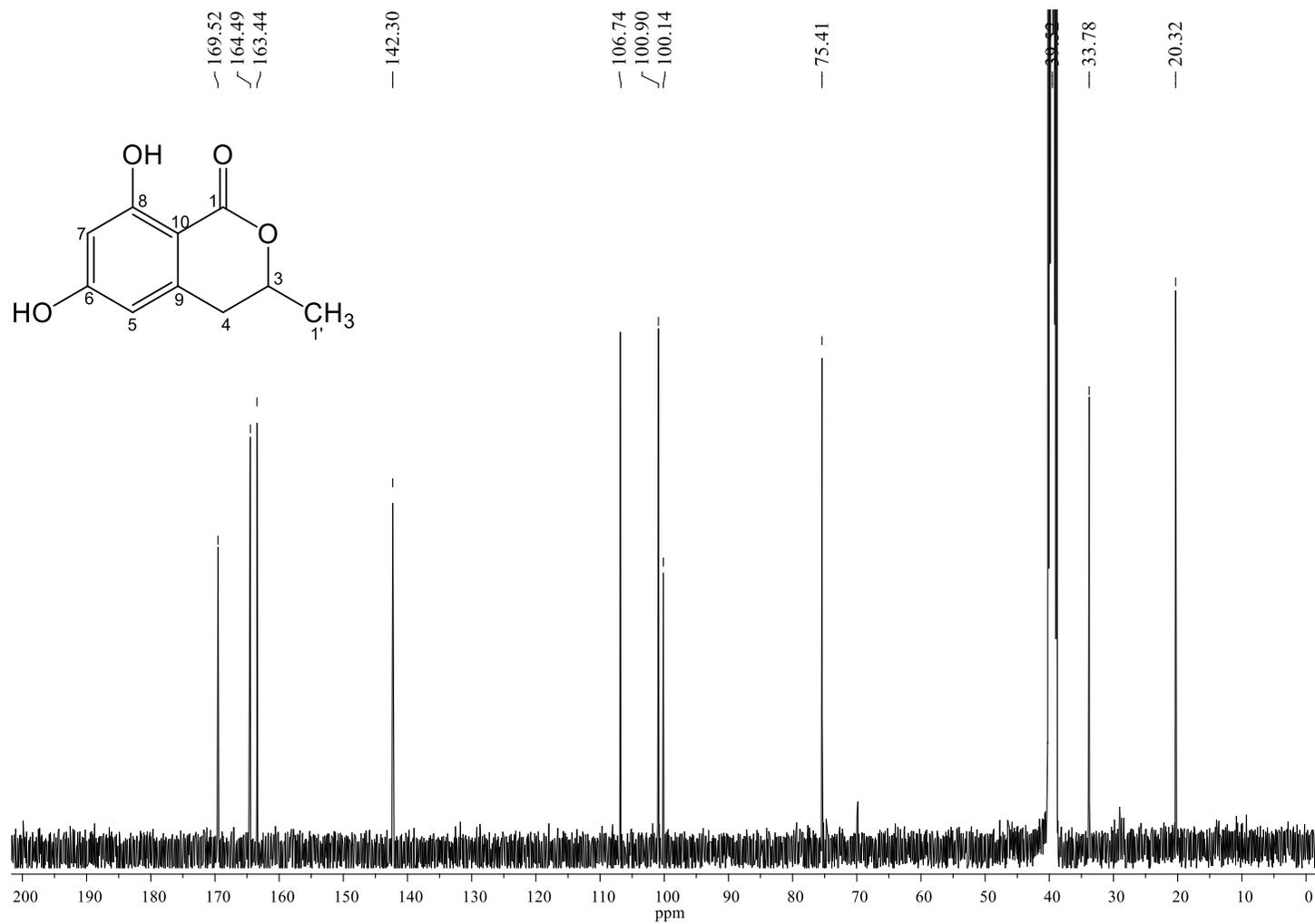
Fonte: autora

Figura 134 – Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) do composto VI.



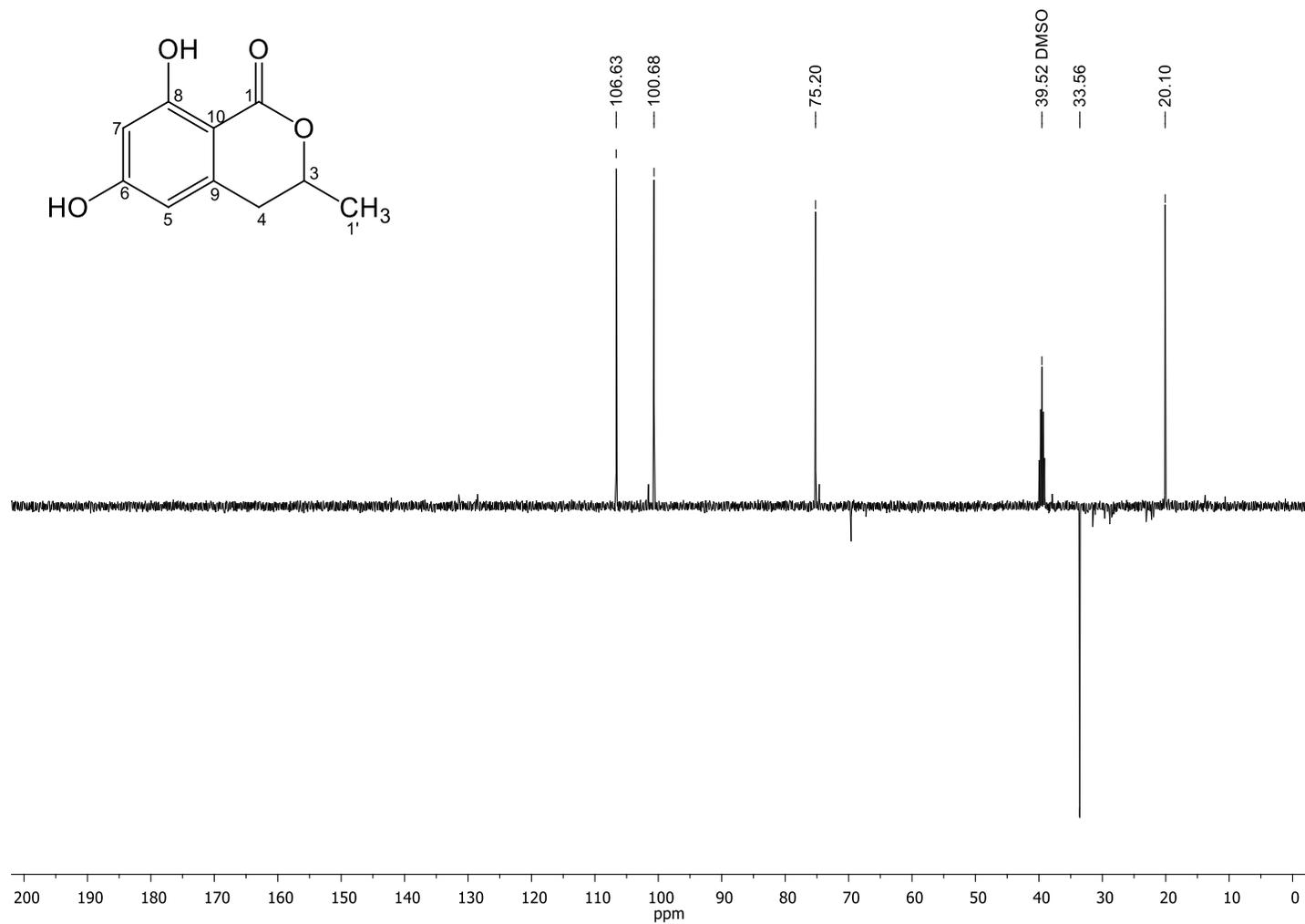
Fonte: autora.

Figura 135 – Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) do composto **VI**.



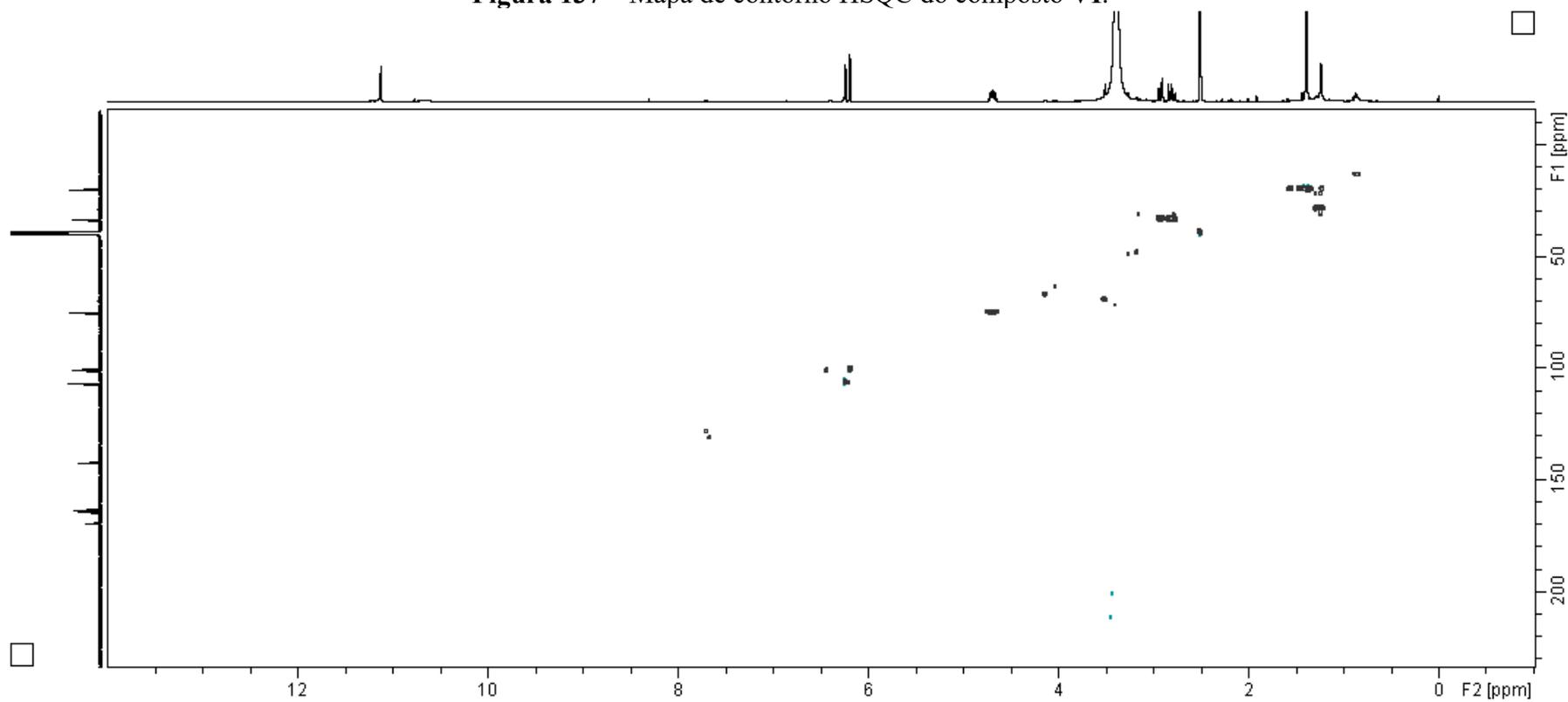
Fonte: autora.

Figura 136 – Espectro de DEPT 135 (100 MHz, DMSO-*d*₆) do composto VI



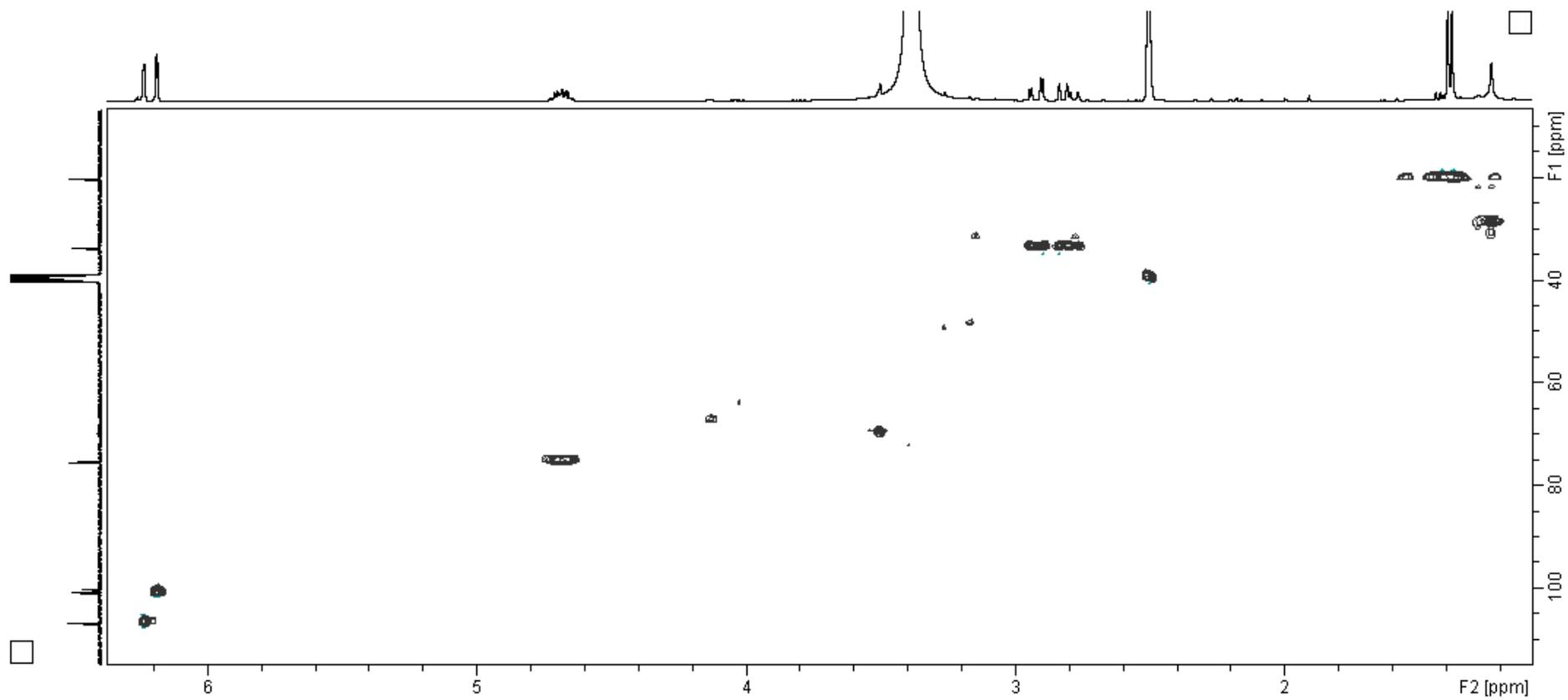
Fonte: autora.

Figura 137 – Mapa de contorno HSQC do composto VI.



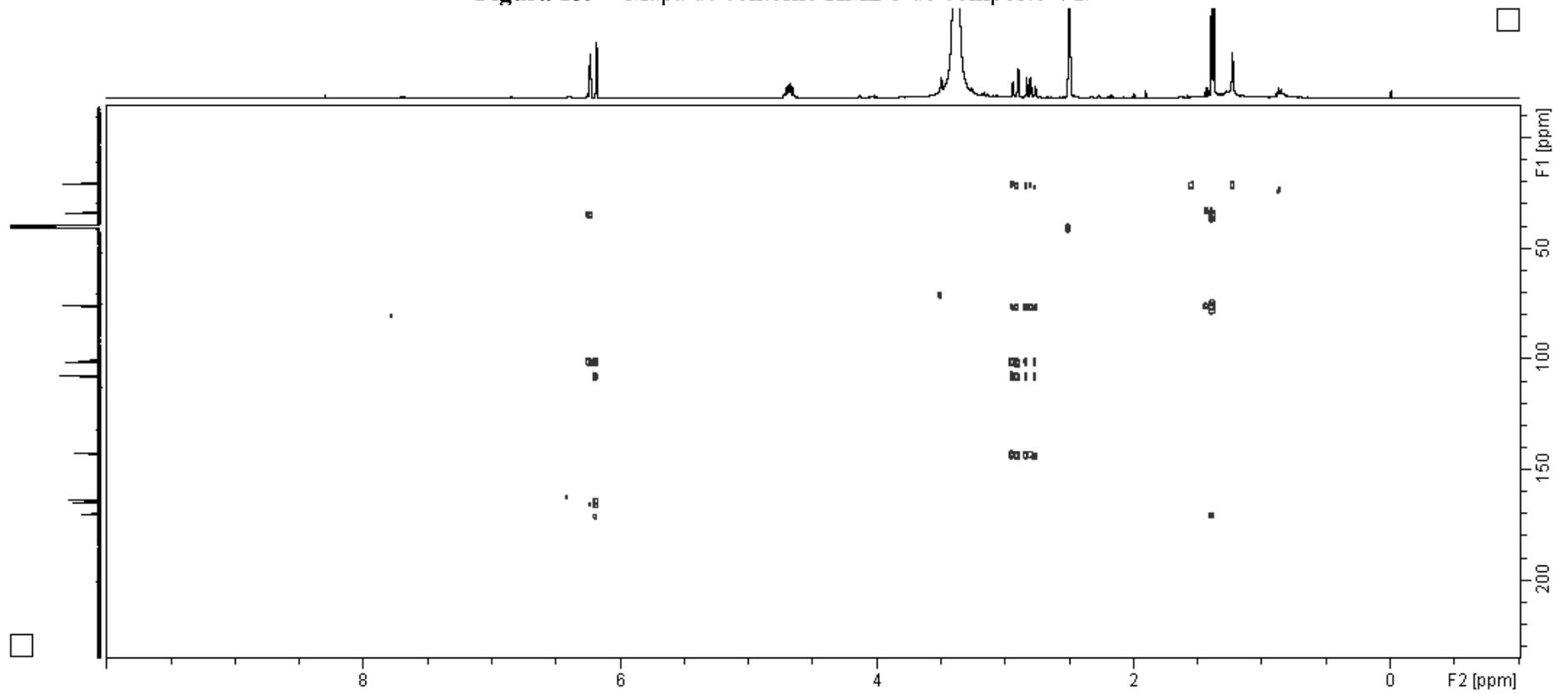
Fonte: autora.

Figura 138 – Ampliação do mapa de contorno HSQC (δ 1,0–6,4).



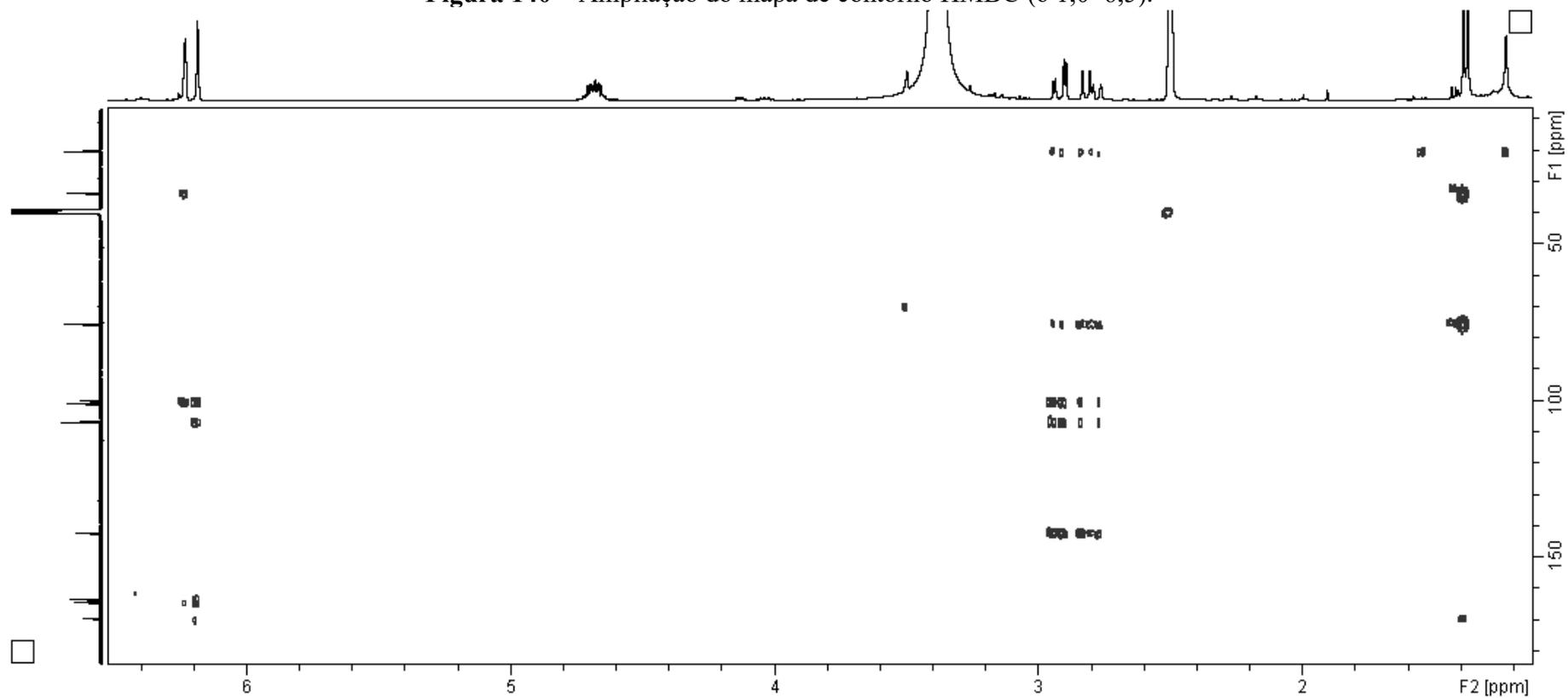
Fonte: autora.

Figura 139 – Mapa de contorno HMBC do composto VI.



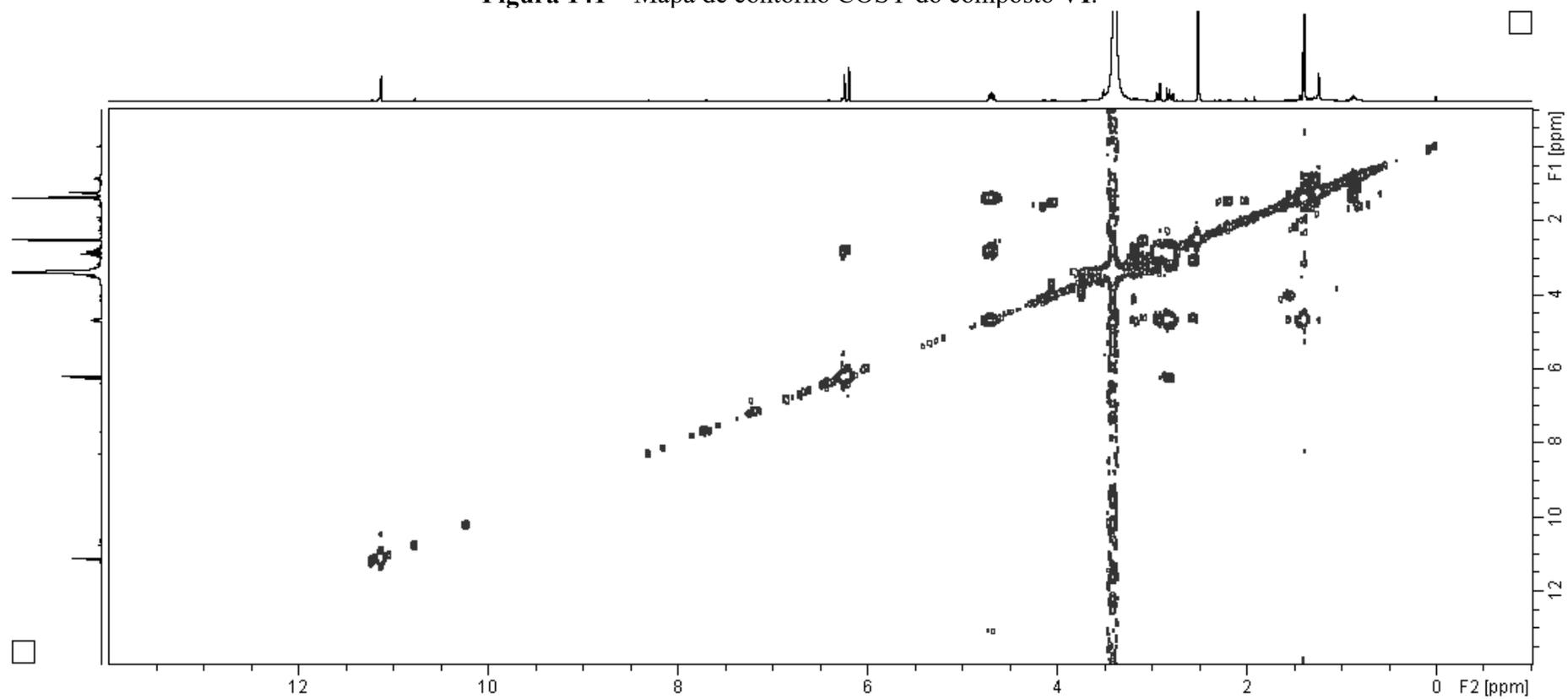
Fonte: autora.

Figura 140 – Ampliação do mapa de contorno HMBC (δ 1,0–6,5).



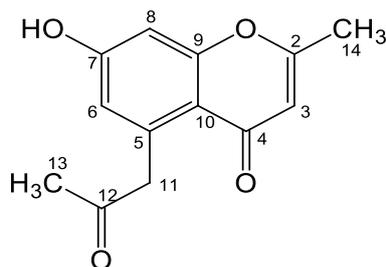
Fonte: autora.

Figura 141 – Mapa de contorno COSY do composto VI.



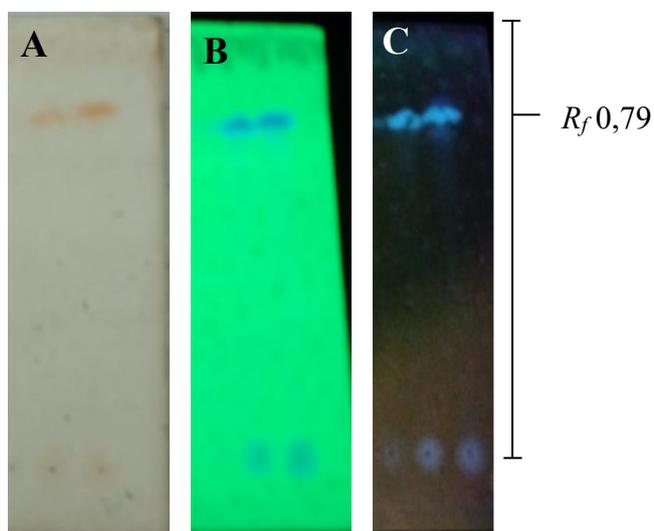
Fonte: autora.

4.9.7 – Elucidação estrutural do composto VII



O composto VII (14,0 mg) foi isolado da fração acetato de etila das flores e quando analisado por CCD, apresentou uma mancha com R_f 0,79 que revelou com vanilina sulfúrica (Figura 142 A) e apresentou coloração azul quando analisada sob luz UV (254 e 365 nm) (Figura 142 B e C), sugerindo tratar-se de um composto pertencente a classe das cromonas (SINGH, 1982).

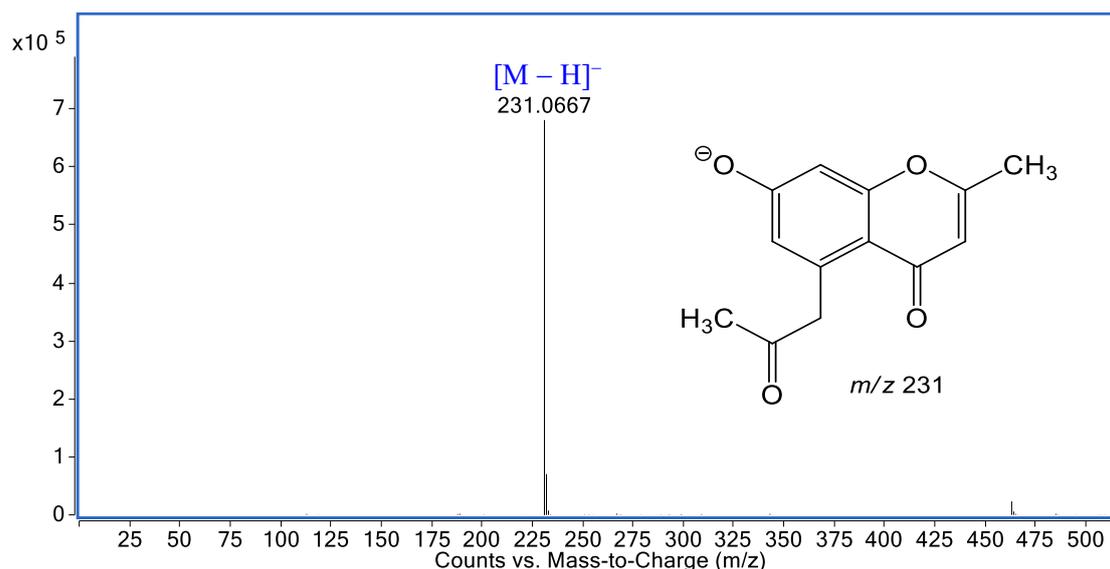
Figura 142 – CCD do composto VII. Após tratamento com solução de vanilina sulfúrica (A); Inspeção em câmara de UV 254 nm (B), e 365 nm (C).



FM: $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{AcOEt}$ 4:1 e FE: Al_2O_3 .
Fonte: autora.

A partir da análise do composto VII por espectrometria de massas em alta resolução, modo negativo, foi possível estabelecer a fórmula molecular $\text{C}_{13}\text{H}_{12}\text{O}_4$, com índice de deficiência de hidrogênio igual a oito. O sinal referente a molécula desprotonada foi observado em m/z 231,0667 $[\text{M} - \text{H}]^-$, calculado para $\text{C}_{13}\text{H}_{11}\text{O}_4$, 231,0663 (Δ 1,7 ppm) (Figura 143).

Figura 143 – EM-IES(-) em alta resolução do composto VII.

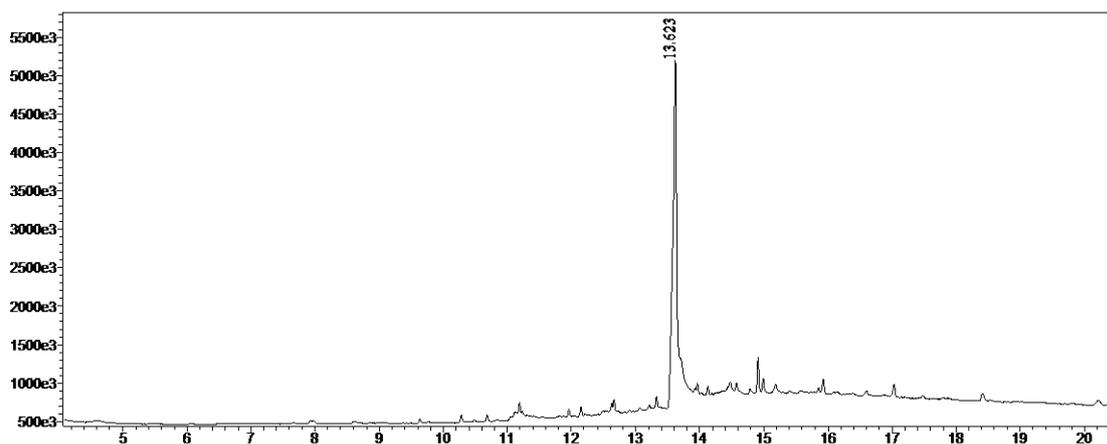


Fonte: autora.

O cromatograma de íons totais da análise por CG-EM (Figura 144), apresentou apenas um sinal com t_R 13,6 min. A comparação do espectro de massas com aqueles da biblioteca do *software* NIST (8, 27 e 147) disponível no equipamento, sugeriu com 78% de similaridade tratar-se de um derivado 7-hidroxicromona. O EM-IE (Figura 145) apresentou o sinal do íon molecular ($[M]^+$, 11%) em m/z 232, compatível com a fórmula molecular, $C_{13}H_{12}O_4$. Também foram observados os íons fragmentos em m/z 215, 190 (100%), 162 e 161.

Os sinais de m/z 215 e 190 foram correlacionados às eliminações de OH (17 u) e $CH_2-C=O$ (42 u), a partir do íon molecular, respectivamente. A partir da análise dos sinais de m/z 162 e 161, que apresentam diferenças de 28 e 29 u , a partir do pico base em m/z 190, foi proposto que uma contração do anel com eliminação de CO, gera o fragmento de m/z 162, e a eliminação de COH, gera o fragmento de m/z 161 (Figura 146). A eliminação de carbonila é característica do sistema γ -pirona, o que corrobora com a estrutura de uma cromona (SINGH, 1982).

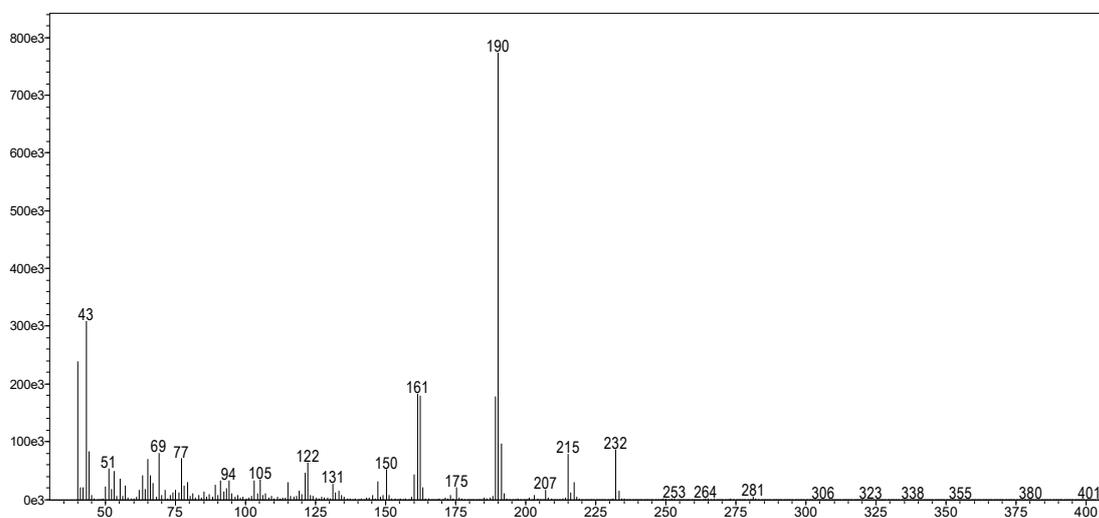
Figura 144 – Cromatograma obtido por CG-EM do composto VII.



Condições: Coluna SBP-5 (5% de fenil e 95% de polidimetilsiloxano, 30 m × 0,25 mm × 0,25 μm), gradiente: 100–280 °C (13 °C/min., 21,0 min); C = 1,0 mg/mL, V_{inj.} = 1,0 μL, fluxo: 3,0 mL/min., gás de arraste: N₂, e detector EM-IE.

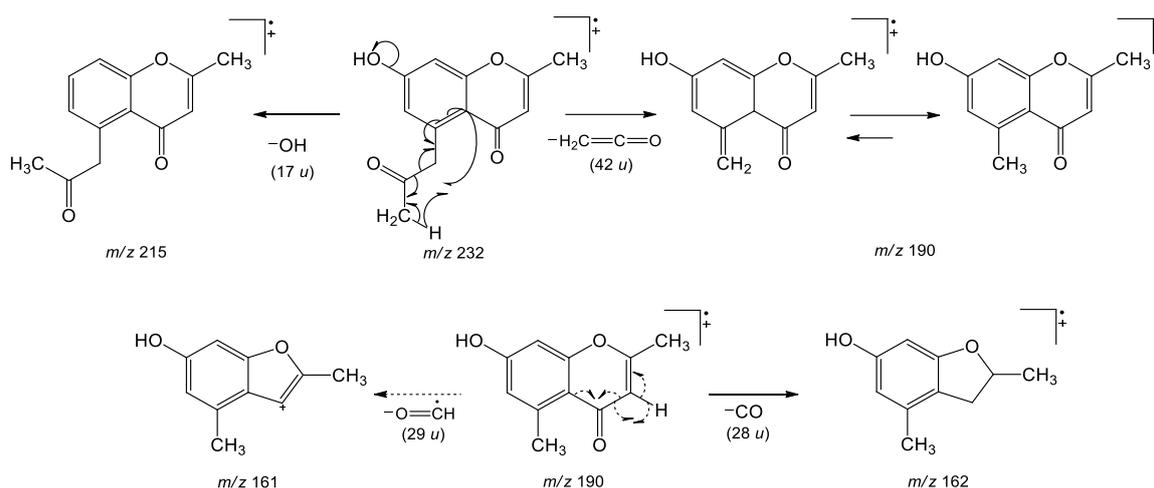
Fonte: autora.

Figura 145 – Espectro de massas com ionização por elétrons (70 eV) do pico com t_R 13,62 min.



Fonte: autora.

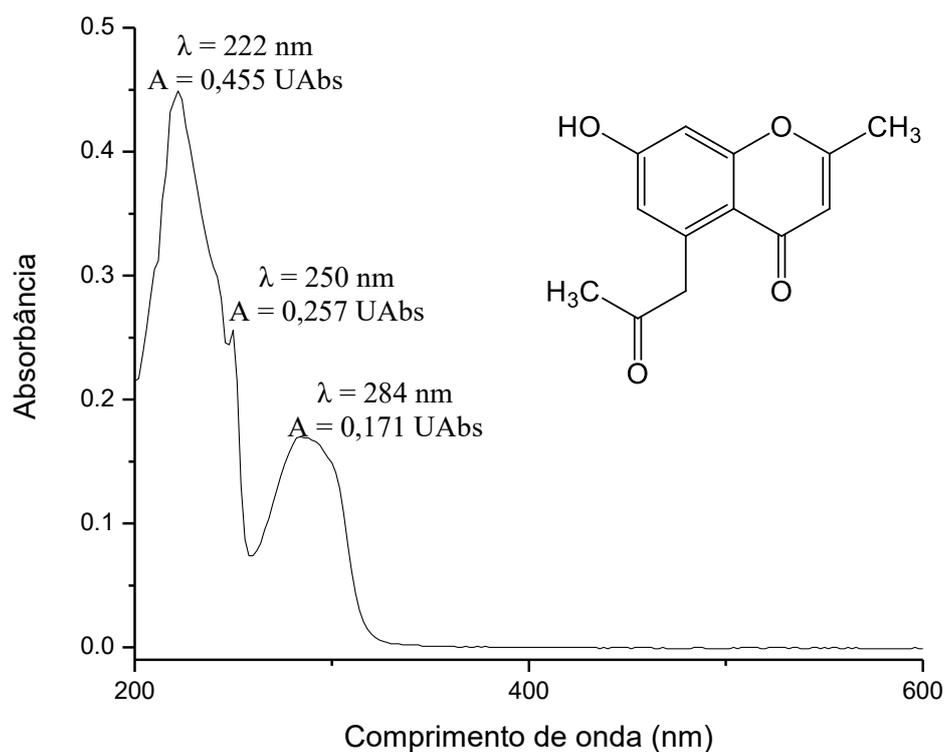
Figura 146 – Proposta de fragmentação do composto **VII** por EM-IE.



Fonte: autora.

A análise do espectro obtido na região do UV-Vis do composto **VII** (Figura 147), permitiu observar duas bandas principais com máximos de absorção em $\lambda_{\text{máx}}$ ($\log \epsilon$) 222 (4,21) e 284 (4,17), que quando comparados com a literatura, apresentou similaridade com derivados 7-hidroxicromonas (HARBORNE, 1964).

Figura 147 – Espectro de absorção na região do UV-Visível de **VII** ($C_{\text{MeOH}} = 12,0 \mu\text{M}$).



Fonte: autora.

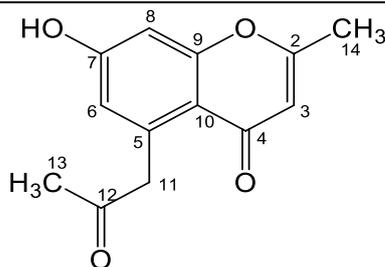
O espectro de RMN de ^1H de **VII** (Figura 151; Tabela 28) apresentou, na região dos sinais referentes aos hidrogênios aromáticos, dois dupletos em δ 6,70 (1H, $J = 2,3$ Hz, H-8) e 6,58 (1H, $J = 2,3$ Hz, H-6), característico de um sistema aromático 1,2,3,5- tetrassubstituído, além de um simpleto em δ 5,95 (1H, H-3), que corrobora com a estrutura de um derivado cromona 5,7-substituído. A região de hidrogênios alifáticos apresentou dois simpletos em δ 2,18 (3H, H-13) e 2,28 (3H, H-14), referentes as metilas do grupo acetnil e do anel γ -pirona, respectivamente. Também foi observado um simpleto em δ 4,11 (2H, H-11), característico de hidrogênios metilênicos benzílicos.

No espectro de RMN de ^{13}C (Figura 152; Tabela 28) foram observados um total de 13 sinais, sendo seis na região de carbonos aromáticos em δ 138,3 (C-5), 118,1 (C-6), 161,1 (C-7), 101,3 (C-8), 159,0 (C-9) e 113,9 (C-10); dois sinais característicos de carbonila em δ 177,7 (C-4) e 204,5 (C-12); um sinal de carbono metínico em δ 110,3 (C-3) e o sinal em δ 164,5 (C-2), que caracteriza o anel γ -pirona; além de um sinal de carbono metilênico em δ 48,9 (C-11) e dois sinais característicos de metila em δ 29,8 (C-13) e 19,4 (C-14). Os sinais observados no espectro de DEPT 135 (Figura 153) corroboram com a estrutura proposta e juntamente com o mapa de contorno HSQC (Figura 154), permitiu correlacionar os carbonos aos seus respectivos hidrogênios (Tabela 29).

As principais correlações observadas no mapa de contorno HMBC (Figuras 155–157; Tabela 29) entre δ_{H} 2,28 (H-14) com δ_{C} 164,5 (C-2) ($^2J_{\text{H}\rightarrow\text{C}}$) e δ_{C} 110,3 (C-3) ($^3J_{\text{H}\rightarrow\text{C}}$); entre δ_{H} 5,95 (H-3) com δ_{C} 164,5 (C-2) ($^2J_{\text{H}\rightarrow\text{C}}$), δ_{C} 113,9 (C-10) ($^3J_{\text{H}\rightarrow\text{C}}$) e δ_{C} 19,4 (C-14) ($^3J_{\text{H}\rightarrow\text{C}}$); permitiram confirmar o padrão de substituição do anel γ -pirona. Assim como as correlações entre δ_{H} 6,58 (H-6) com δ_{C} 161,1 (C-7) ($^2J_{\text{H}\rightarrow\text{C}}$), δ_{C} 101,3 (C-8) ($^3J_{\text{H}\rightarrow\text{C}}$), δ_{C} 113,9 (C-10) ($^3J_{\text{H}\rightarrow\text{C}}$) e δ_{C} 48,9 (C-11) ($^3J_{\text{H}\rightarrow\text{C}}$); entre δ_{H} 6,70 (H-8) com δ_{C} 177,7 (C-4) ($^4J_{\text{H}\rightarrow\text{C}}$), δ_{C} 118,1 (C-6) ($^3J_{\text{H}\rightarrow\text{C}}$), δ_{C} 161,1 (C-7) ($^2J_{\text{H}\rightarrow\text{C}}$), δ_{C} 159,0 (C-9) ($^2J_{\text{H}\rightarrow\text{C}}$) e δ_{C} 113,9 (C-10) ($^3J_{\text{H}\rightarrow\text{C}}$); entre δ_{H} 4,11 (H-11) com δ_{C} 138,3 (C-5) ($^2J_{\text{H}\rightarrow\text{C}}$), δ_{C} 118,1 (C-6) ($^3J_{\text{H}\rightarrow\text{C}}$), δ_{C} 113,9 (C-10) ($^3J_{\text{H}\rightarrow\text{C}}$) e δ_{C} 204,5 (C-12) ($^2J_{\text{H}\rightarrow\text{C}}$); entre δ_{H} 2,18 (H-13) com δ_{C} 138,3 (C-5) ($^4J_{\text{H}\rightarrow\text{C}}$), δ_{C} 48,9 (C-11) ($^3J_{\text{H}\rightarrow\text{C}}$), δ_{C} 204,5 (C-12) ($^2J_{\text{H}\rightarrow\text{C}}$), que permitiram confirmar o padrão de substituição do anel aromático (Figura 148; Tabela 29).

Os dados de RMN (Tabelas 28 e 29; Figuras 151–157), aliados aos dados de EM e UV-Vis foram similares aos publicados na literatura (CHANTONG et al., 2009; SINGH, 1982) e são consistentes com a estrutura da 5-acetnil-7-hidroxi-2-metilcromona (**VII**), também conhecida como cassiacromona.

Tabela 28 – Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (400/100 MHz, DMSO-*d*6) do composto **VII** em comparação com dados da literatura.



Posição	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$ mult. ^b (<i>J</i> em Hz)	$\delta_{\text{C}}^{\text{a}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{c1}}$ mult. ^b (<i>J</i> em Hz)	$\delta_{\text{C}}^{\text{c2}}$
2	---	164,5	---	164,6
3	5,95 s	110,3	5,93 sl	110,4
4	---	177,7	---	179,2
5	---	138,3	---	137,4
6	6,58 d (<i>J</i> = 2,3 Hz)	118,1	6,68 d (<i>J</i> = 2,0 Hz)	118,2
7	---	161,1	---	161,0
8	6,70 d (<i>J</i> = 2,3 Hz)	101,3	6,55 d (<i>J</i> = 2,0 Hz)	102,1
9	---	159,0	---	159,5
10	---	113,9	---	114,1
11	4,11 s	48,9	4,10 s	49,7
12	---	204,5	---	206,5
13	2,18 s	29,8	2,18 s	29,9
14	2,28 s	19,4	2,27 sl	19,9

^aDeslocamentos químicos estabelecidos em relação ao padrão interno TMS ($\delta_{\text{TMS}} = 0,0$ ppm).

^bMultiplicidade: d (duplete), s (simpleto) sl (simpleto largo). ^cDados da literatura: ¹Experimentos de RMN realizados a 100 MHz para ^1H , utilizando CDCl_3 como solvente (SINGH, 1982);

²Experimentos de RMN realizados a 75 MHz para ^{13}C , utilizando CDCl_3 como solvente (CHANTONG et al., 2009)

Fonte: autora

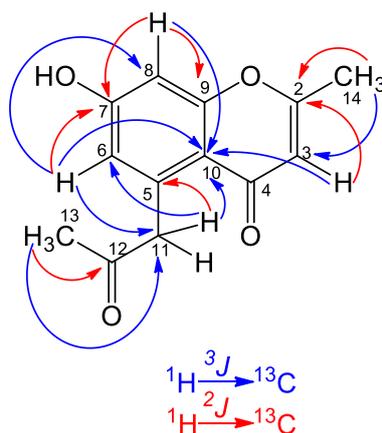
Tabela 29 – Correlações observadas nos mapas de contorno HSQC e HMBC para o composto **VII**.

Posição	δ_C^a	DEPT	HSQC	HMBC
2	164,5	---	---	H-3, H-14
3	110,3	CH	5,95	H-14
4	177,7	---	---	H-8
5	138,3	---	---	H-11, H-13
6	118,1	CH	6,58	H-8, H-11
7	161,1	---	---	H-6, H-8
8	101,3	CH	6,70	H-6
9	159,0	---	---	H-8
10	113,9	---	---	H-3, H-6, H-8, H-11
11	48,9	CH ₂	4,11	H-6, H-13
12	204,5	---	---	H-13, H-11
13	29,8	---	---	---
14	19,4	---	---	H-3

^aDeslocamentos químicos (δ em ppm) estabelecidos em relação ao padrão interno TMS ($\delta_{TMS} = 0,0$ ppm).

Fonte: autora.

Figura 148 – Principais correlações (H–C) observadas no mapa de contorno HMBC de **VII**.

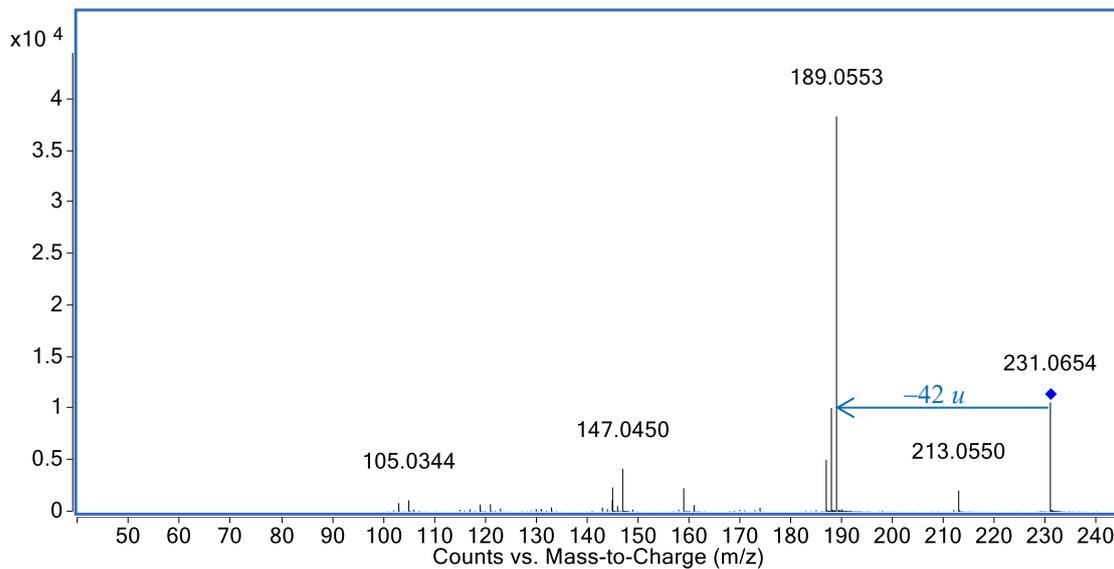


Fonte: autora.

Para confirmar a estrutura proposta, do composto **VII**, foi realizada a análise por espectrometria de massas sequencial no modo negativo. O EM-IES obtido da dissociação induzida por colisão do íon m/z 231 $[\text{M} - \text{H}]^-$ com N_2 , gerou como principal fragmento o íon em m/z 189 (Figura 149), que pode ser atribuído a uma eliminação neutra de ceteno

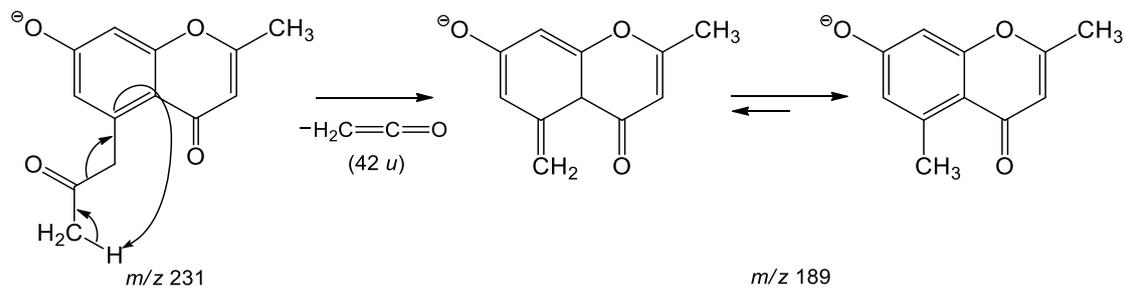
(CH₂-C=O, 42 *u*) a partir do íon molecular (Figura 150), que é consistente com a estrutura da cassiacromona (**VII**).

Figura 149 – EM/EM-IES(-) do composto **VII** (*m/z* 231 [M – H]⁻, energia de colisão 20 eV).



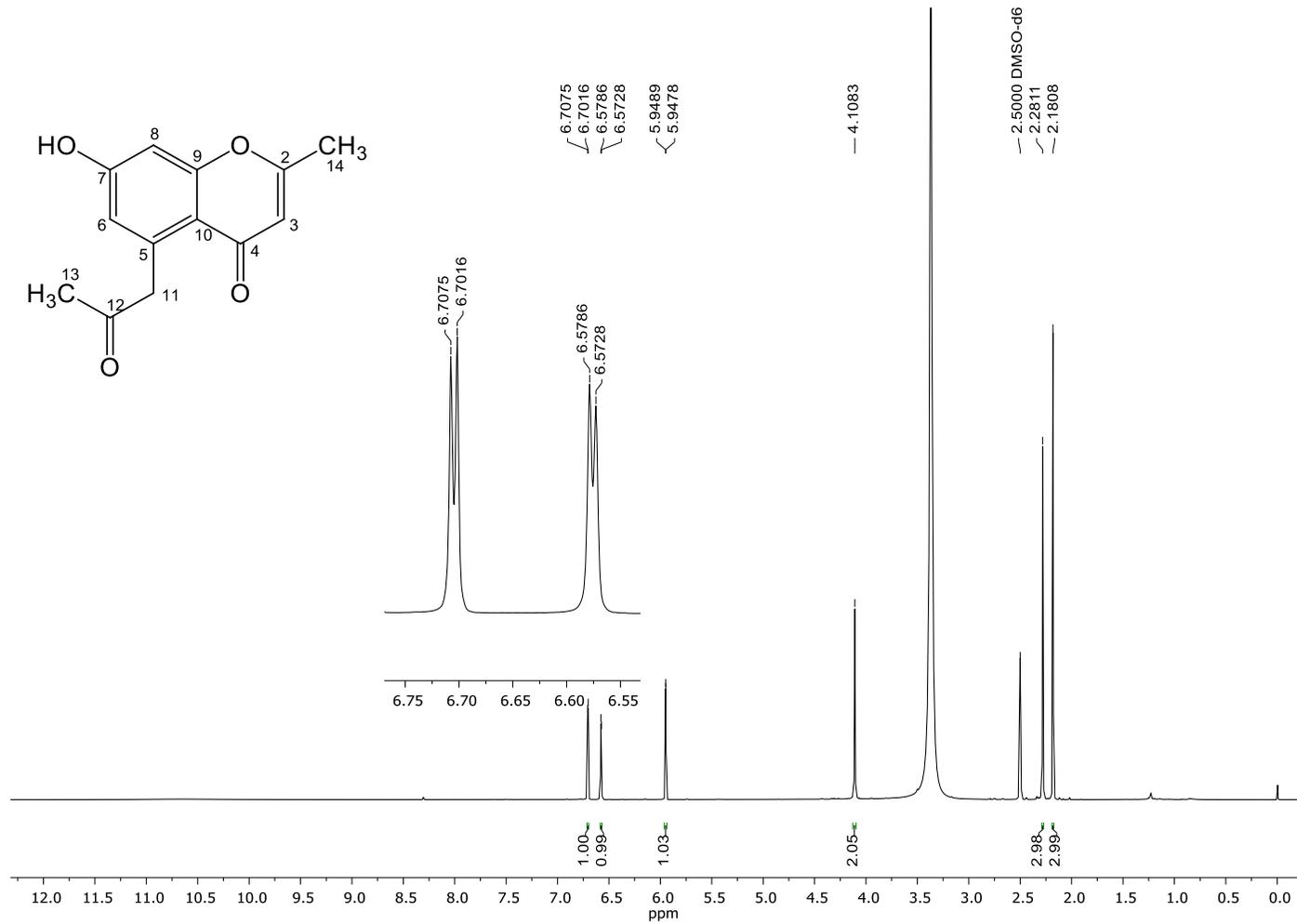
Fonte: autora.

Figura 150 – Proposta de fragmentação do composto **VII** analisado por EM/EM-IES(-).



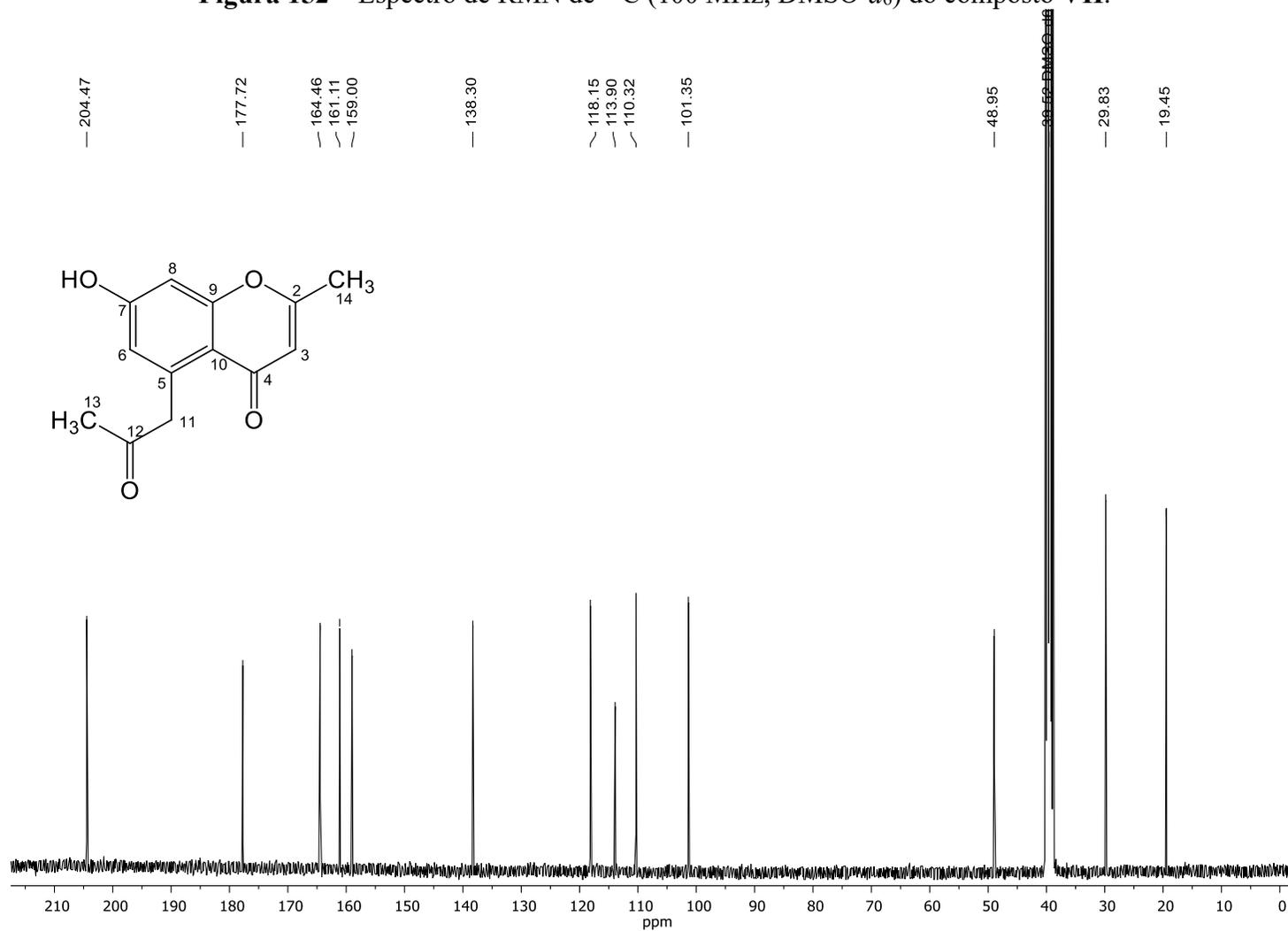
Fonte: autora.

Figura 151 – Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) do composto VII.



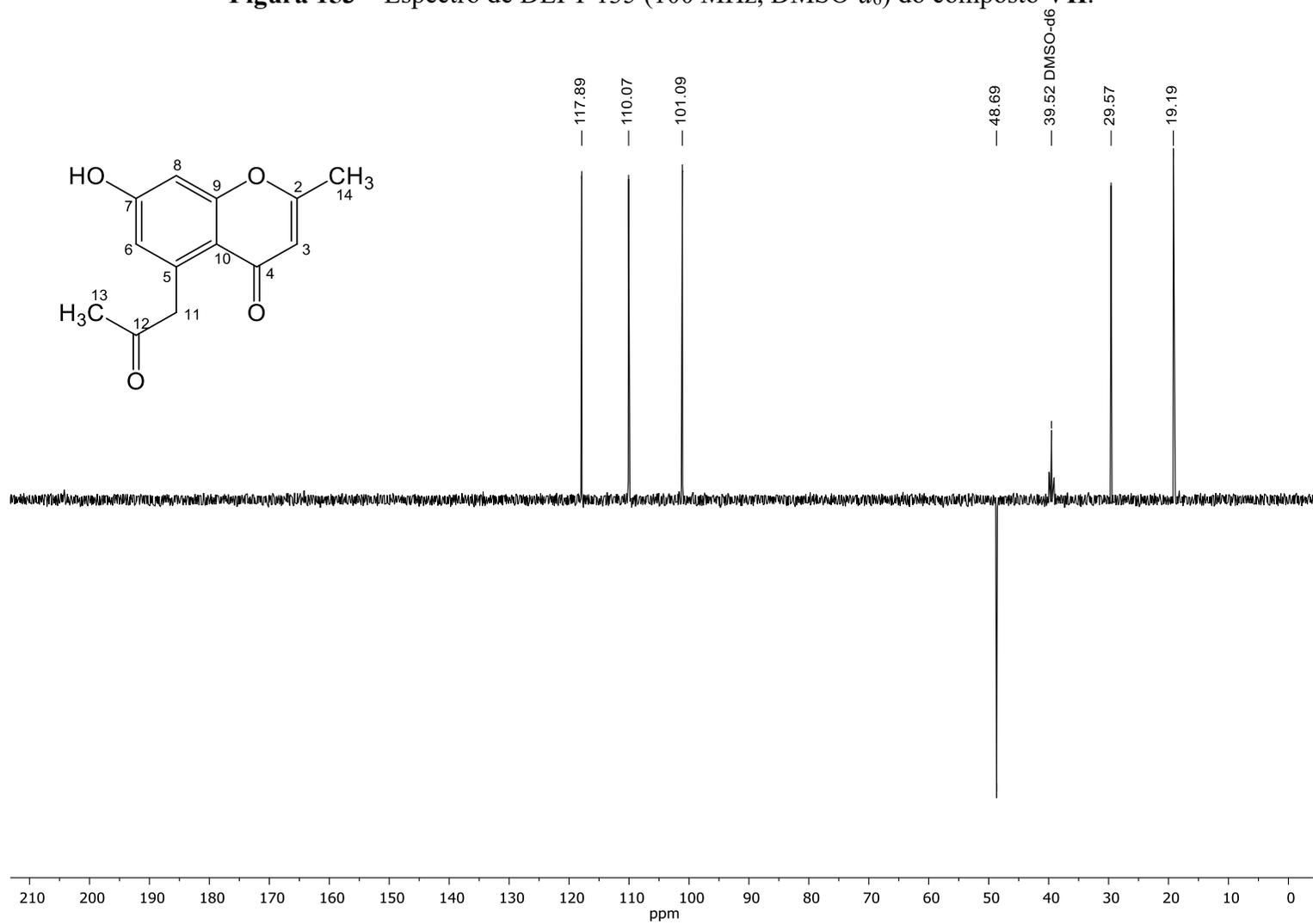
Fonte: autora.

Figura 152 – Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) do composto VII.



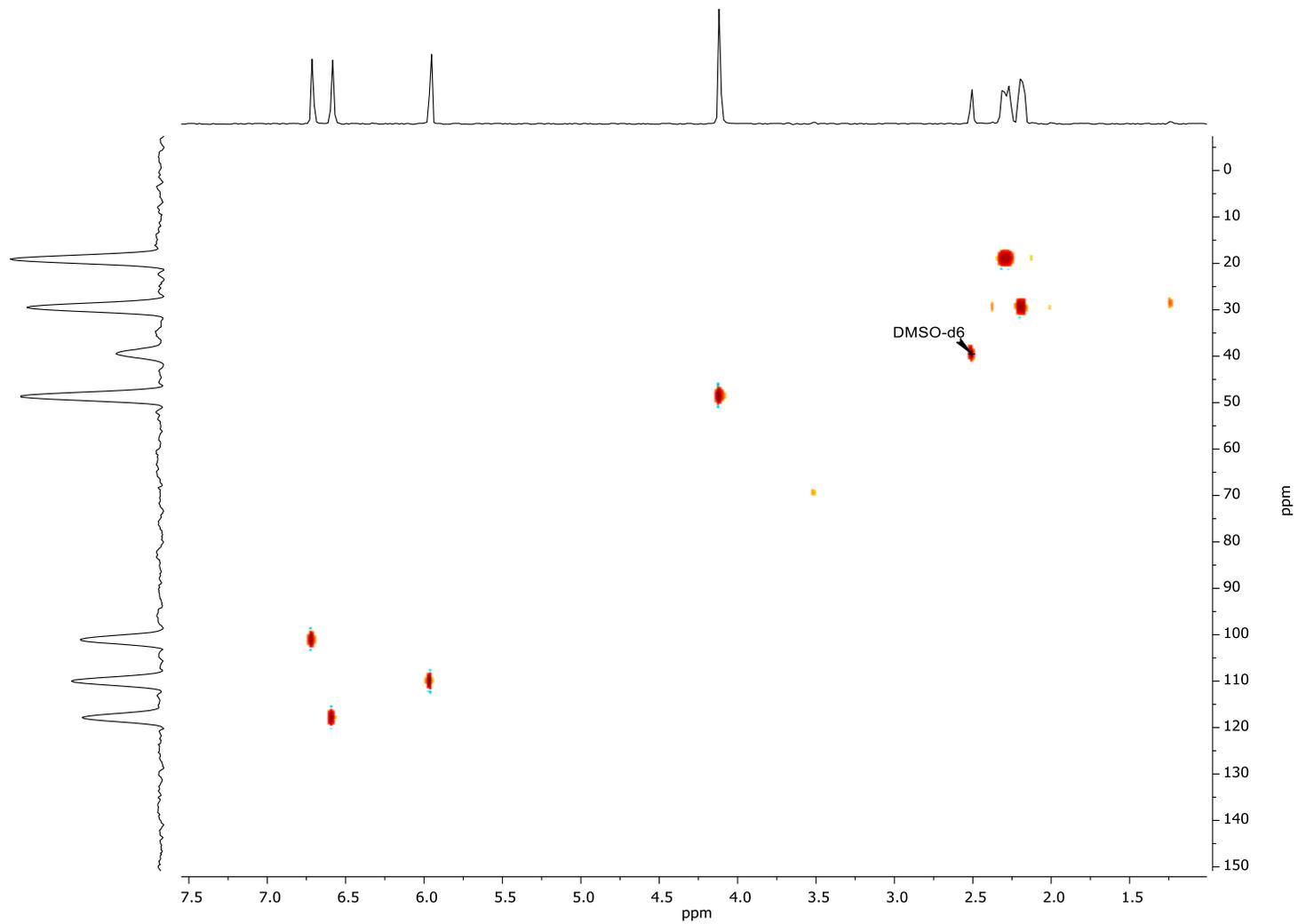
Fonte: autora.

Figura 153 – Espectro de DEPT 135 (100 MHz, DMSO-*d*₆) do composto VII.



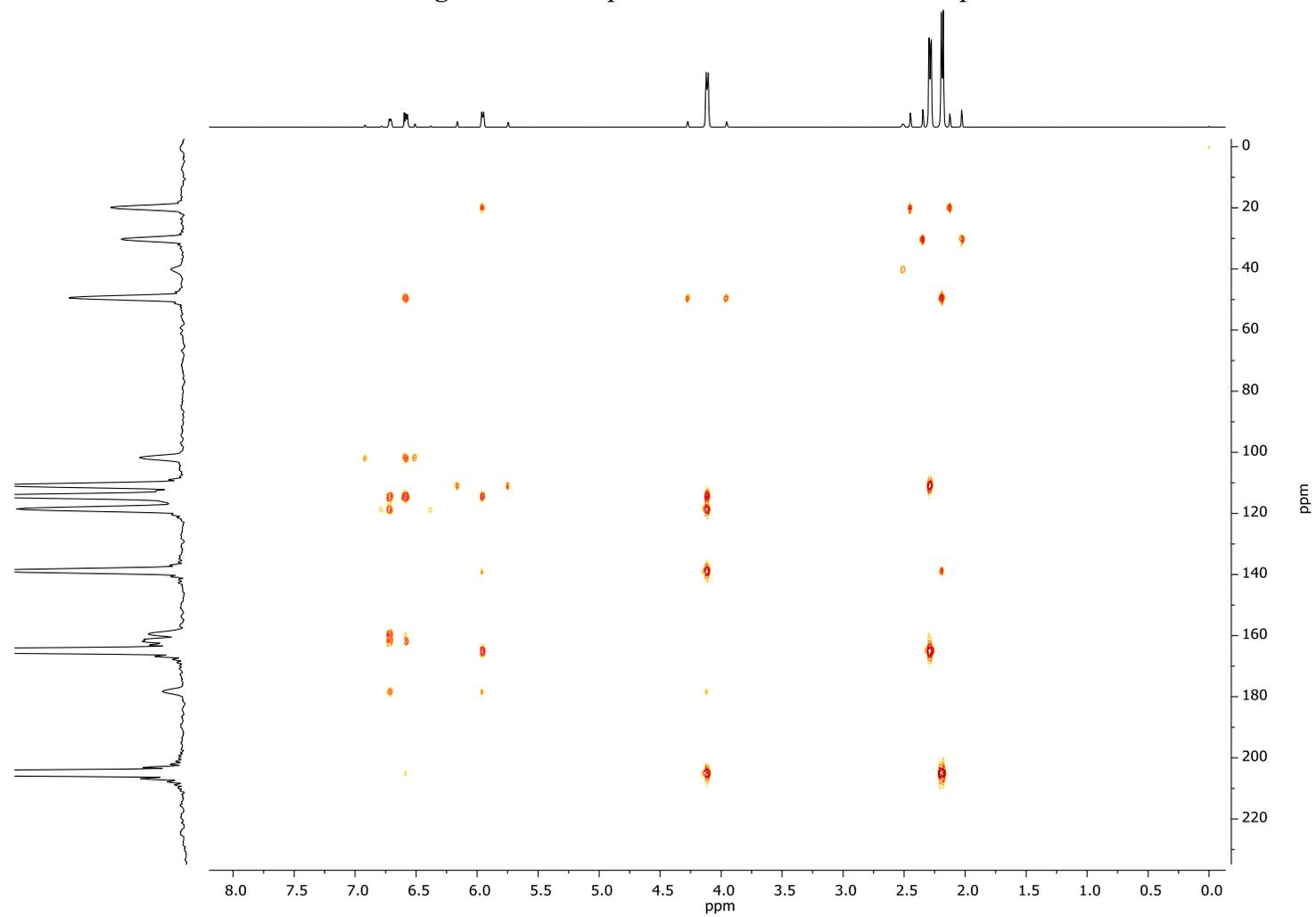
Fonte: autora.

Figura 154 – Mapa de contorno HSQC do composto **VII**.



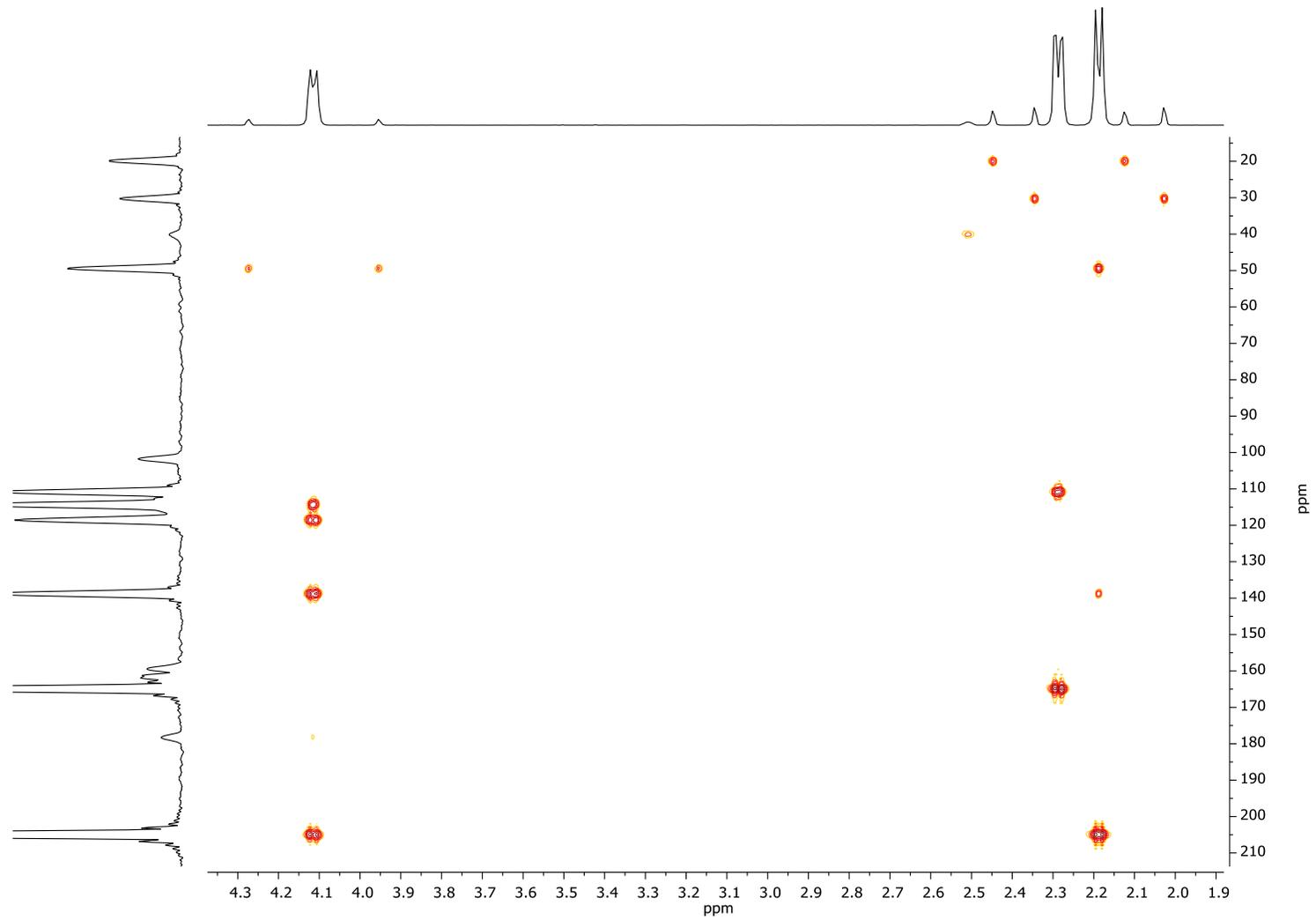
Fonte: autora.

Figura 155 – Mapa de contorno HMBC do composto VII.



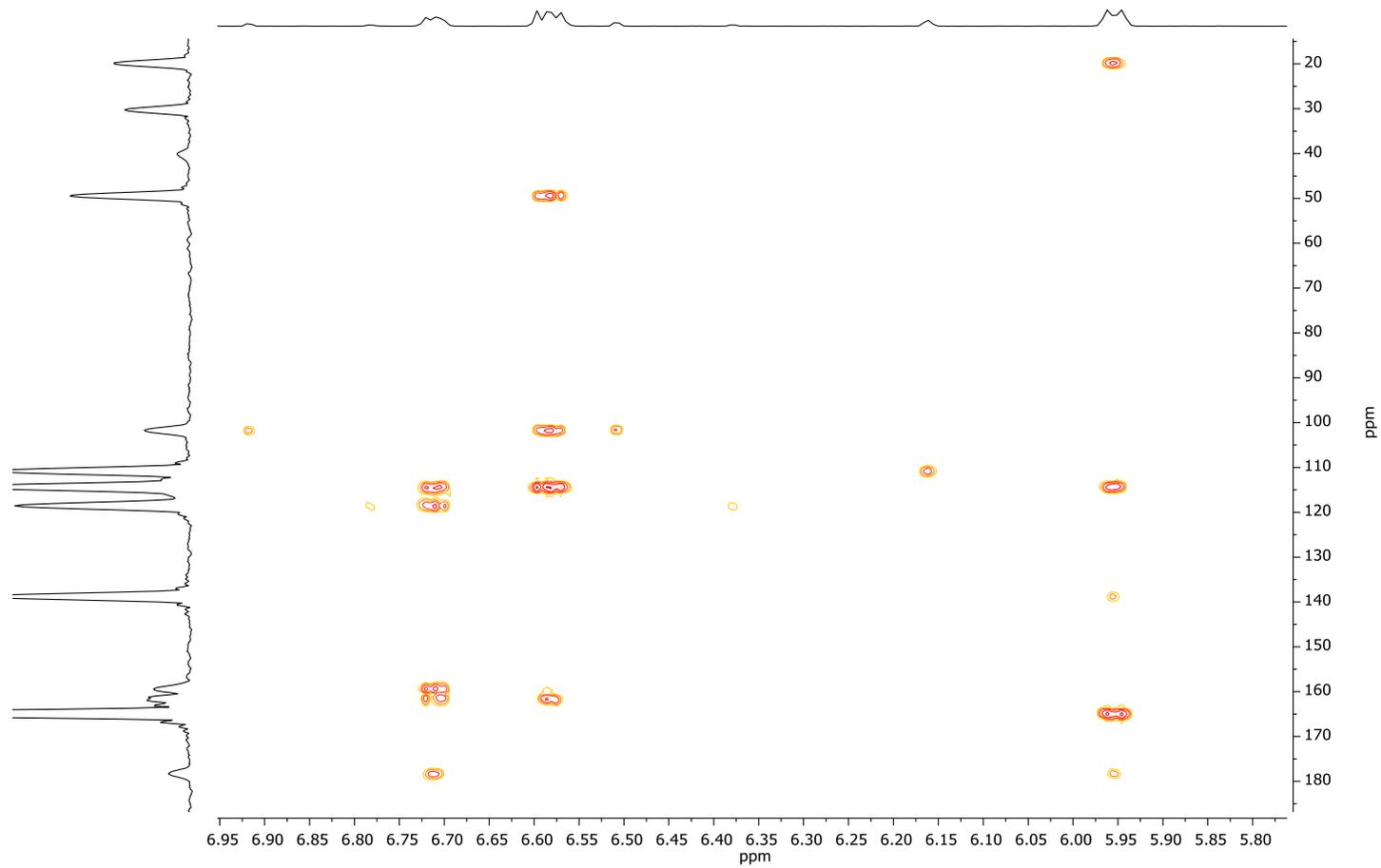
Fonte: autora.

Figura 156 – Ampliação do mapa de contorno HMBC (δ 1,9–4,4).



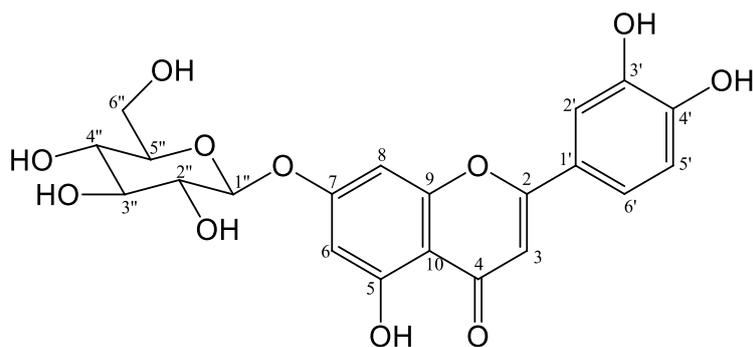
Fonte: autora.

Figura 157 – Ampliação do mapa de contorno HMBC (δ 5,7–7,0).



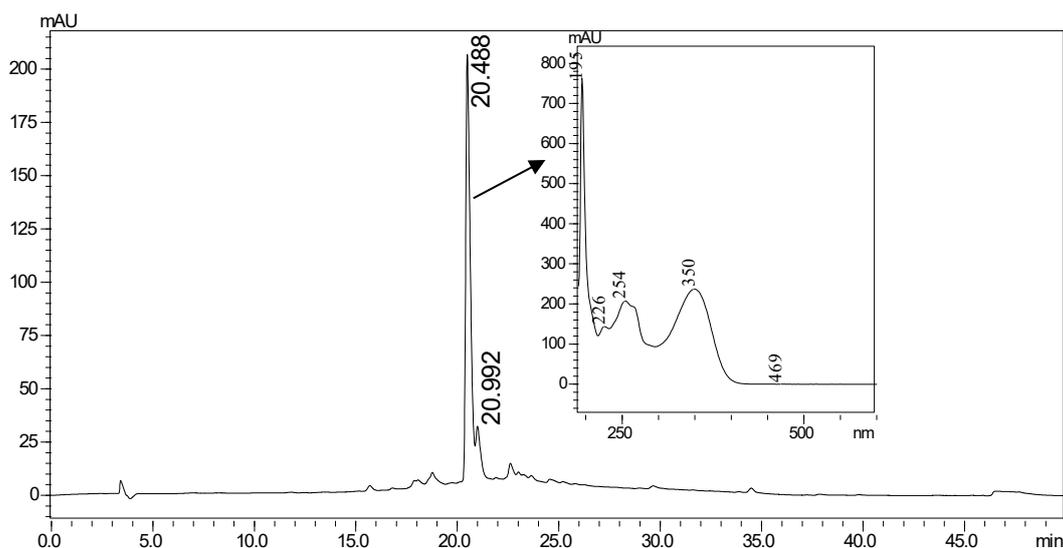
Fonte: autora.

4.9.8 – Elucidação estrutural do composto VIII



O composto VIII (2,1 mg) foi isolado da fração acetato de etila das flores. Quando analisado por CLAE apresentou um pico majoritário com t_R 20,49 min (Figura 158) e espectro na região do UV-Vis característico de flavonoides pertencentes as classes das flavonas e flavonois. Foram observadas duas bandas principais com máximos de absorção em $\lambda_{m\acute{a}x}$ 350 (Banda I) e 254 nm (Banda II), que estão associadas as absorções dos sistemas cinamoil e benzoil, respectivamente (MABRY, MARKHAM, THOMAS, 1970).

Figura 158 – Cromatograma (CLAE-DAD, 254 nm) em coluna analítica da fração MDFAC04 F6.

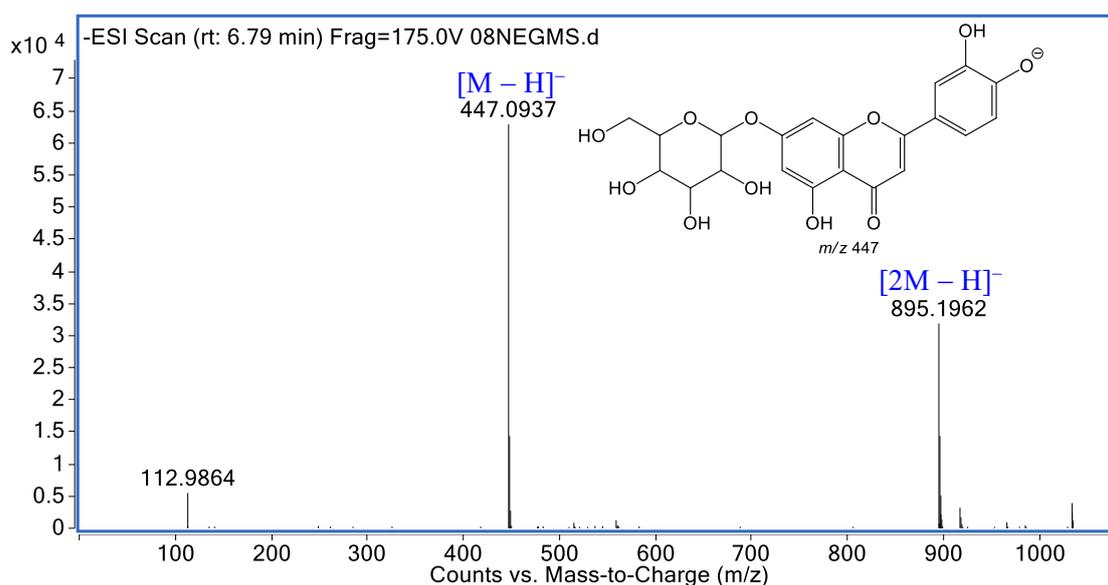


Condições CLAE: Coluna: Phenomenex Lunna C18 (250 mm × 4,6 mm, 5 μ m); gradiente (50 min), 5–100% de MeOH-HCO₂H 0,1%; C = 1,0 mg/mL, $V_{inj.}$ = 50 μ L, fluxo 1,0 mL/min) e detector DAD.

Fonte: autora.

A análise da fração MDFAC04 F6 por espectrometria de massas em alta resolução, modo negativo, possibilitou estabelecer a fórmula molecular $C_{21}H_{20}O_{11}$, com índice de deficiência de hidrogênio igual a doze. O sinal referente a molécula desprotonada foi observado em m/z 447,0937 $[M - H]^-$, calculado para $C_{21}H_{19}O_{11}$, 447,0933 (Δ 0,9 ppm). O sinal em m/z 895,1962 corresponde ao adulto contendo duas moléculas (Figura 159).

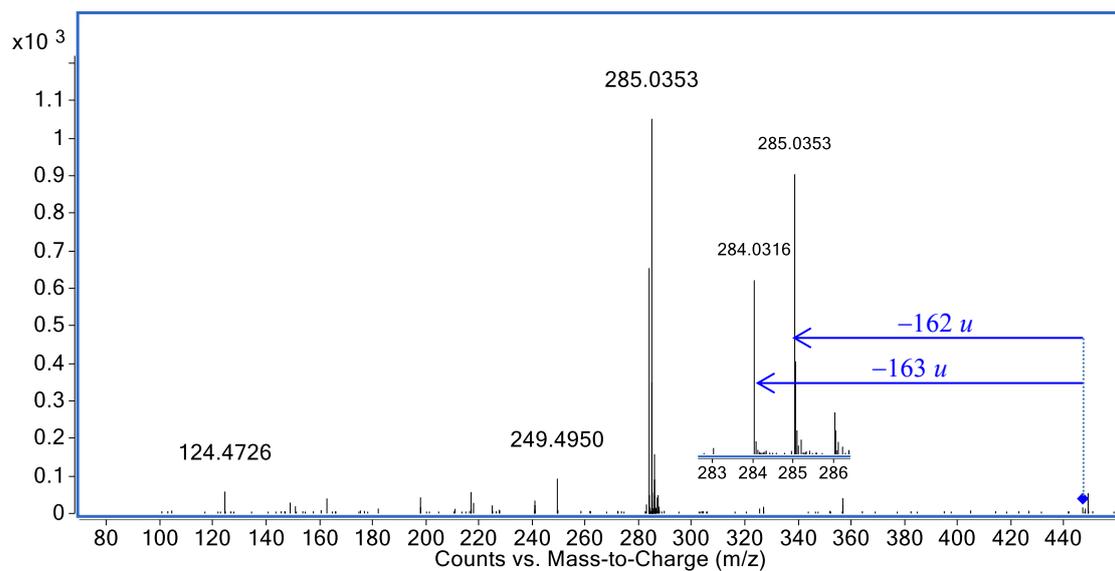
Figura 159 – EM-IES(-) em alta resolução do composto **VIII**.



Fonte: autora.

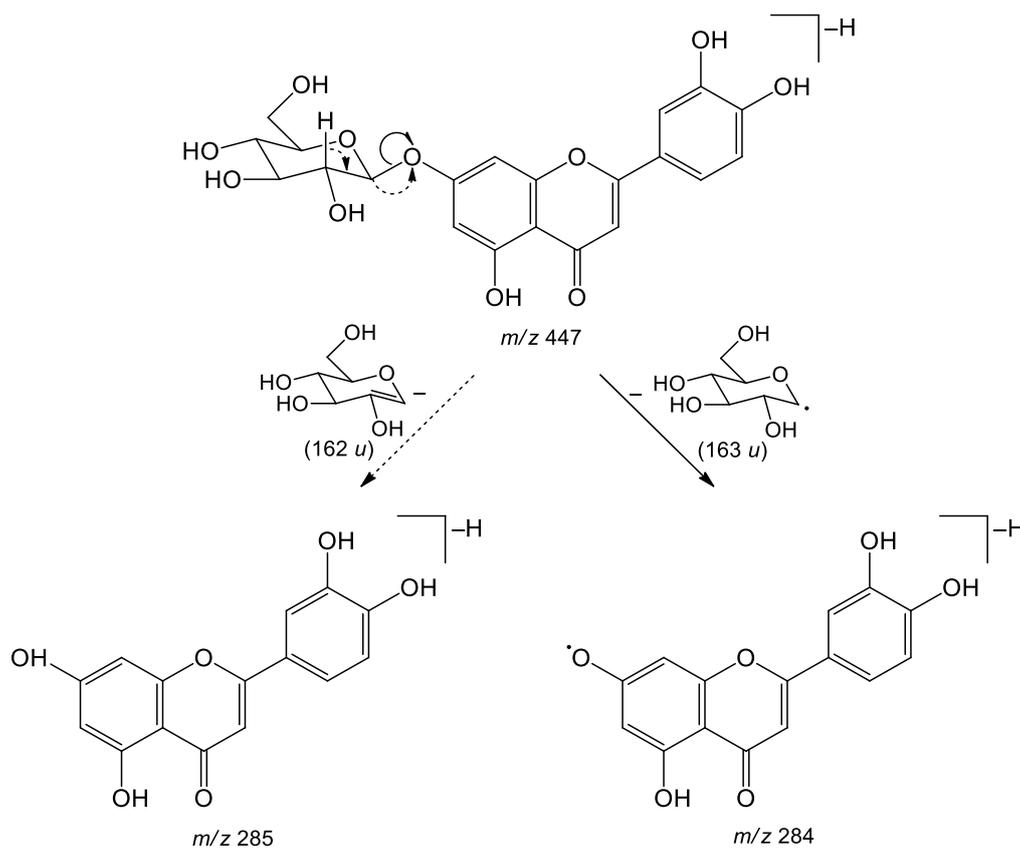
Quando submetida a análise por espectrometria de massas sequencial no modo negativo, a dissociação induzida por colisão do íon molecular m/z 447 $[M - H]^-$, com N_2 , gerou como principais fragmentos os íons em m/z 285 e 284 (Figura 160). A eliminação neutra da unidade monossacarídica (162 u), na posição C-7, forneceu o fragmento em m/z 285, enquanto a clivagem homolítica entre a aglicona e o glicosídeo, com eliminação de 163 u , gerou o fragmento em m/z 284 (Figura 161), que é consistente com os dados descritos na literatura para a estrutura da luteolina-7-*O*-glicosídeo (**VIII**). A abundância relativa do íon aglicona radicalar (m/z 284) em comparação ao íon aglicona desprotonado (m/z 285) é um bom indicativo para inferir em qual posição a unidade monossacarídica está ligada. Estudos demonstram que a presença de uma unidade glicosídica na posição C-7 direciona a formação do íon aglicona desprotonado no modo negativo (GONZALES et al., 2014; HVATTUM, EKEBERG, 2003).

Figura 160 – EM/EM-IES(-) do composto **VIII** (m/z 447 $[M - H]^-$, energia de colisão 20 eV).



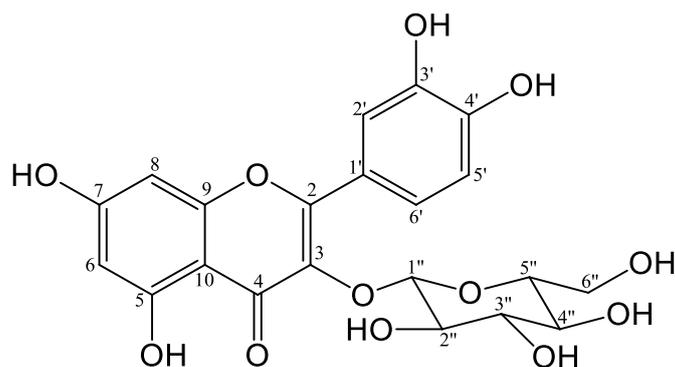
Fonte: autora.

Figura 161 – Proposta de fragmentação do composto **VIII** analisado por EM/EM-IES(-).



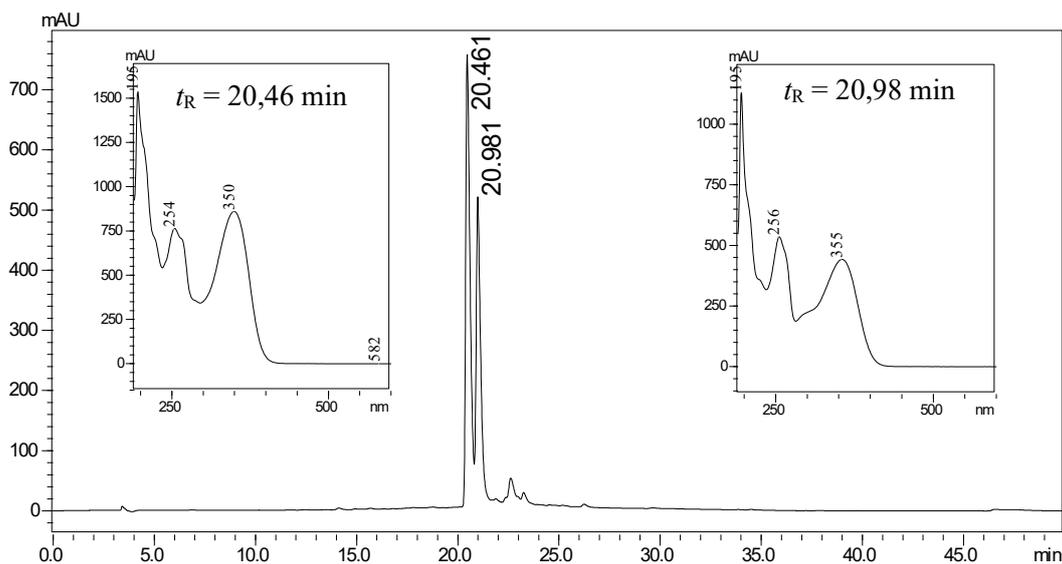
Fonte: autora.

4.9.9 – Elucidação estrutural do composto **IX**.



O composto **IX** foi identificado em mistura com **VIII**, na fração acetato de etila das flores. Quando analisado por CLAE apresentou dois picos com t_R 20,46 min (**VIII**) e 20,98 min (**IX**) (Figura 162). Os espectros na região de UV-Vis obtidos a partir da análise por CLAE, apresentou as duas bandas principais características dos flavonoides (MABRY, MARKHAM, THOMAS, 1970).

Figura 162 – Cromatograma (CLAE-DAD, 254 nm) em coluna analítica da fração MDFAC04F5.



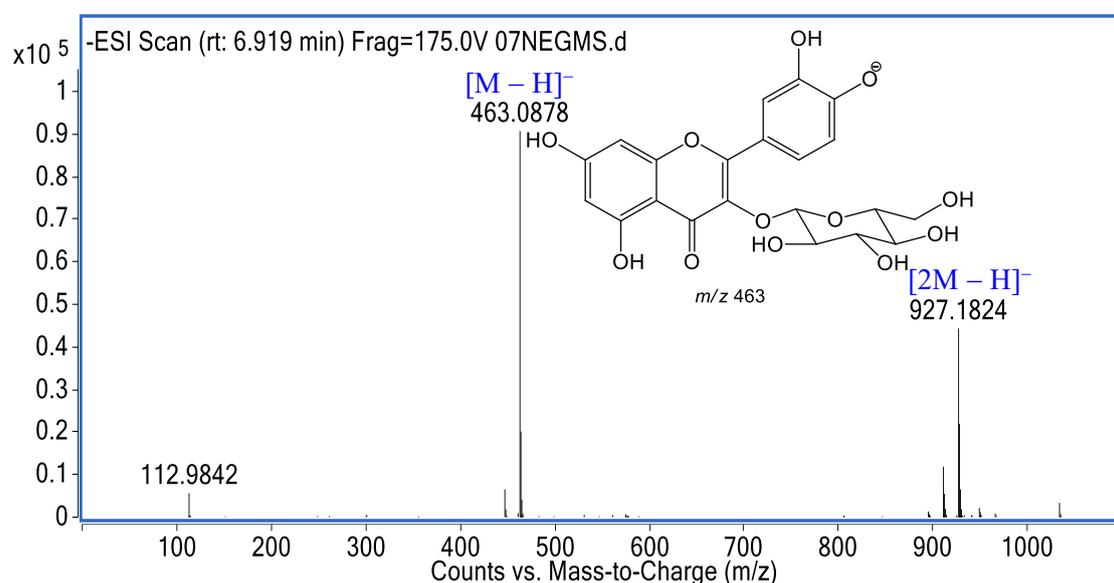
Condições CLAE: Coluna: Phenomenex Lunna C18 (250 mm × 4,6 mm, 5 μm); gradiente (50 min.), 5–100% de MeOH-HCO₂H 0,1%; C = 1,0 mg/mL, V_{inj.} = 50 μL, fluxo 1,0 mL/min) e detector DAD.

Fonte: autora.

A análise da fração MDFAC04 F5 por espectrometria de massas em alta resolução, modo negativo, possibilitou estabelecer a fórmula molecular C₂₁H₂₀O₁₂, com

índice de deficiência de hidrogênio igual a doze. O sinal referente a molécula desprotonada foi observado em m/z 463,0878 $[M - H]^-$, calculado para $C_{21}H_{19}O_{12}$, 463,0882 (Δ 0,9 ppm). O sinal em m/z 927,1824 corresponde ao adulto contendo duas moléculas (Figura 163).

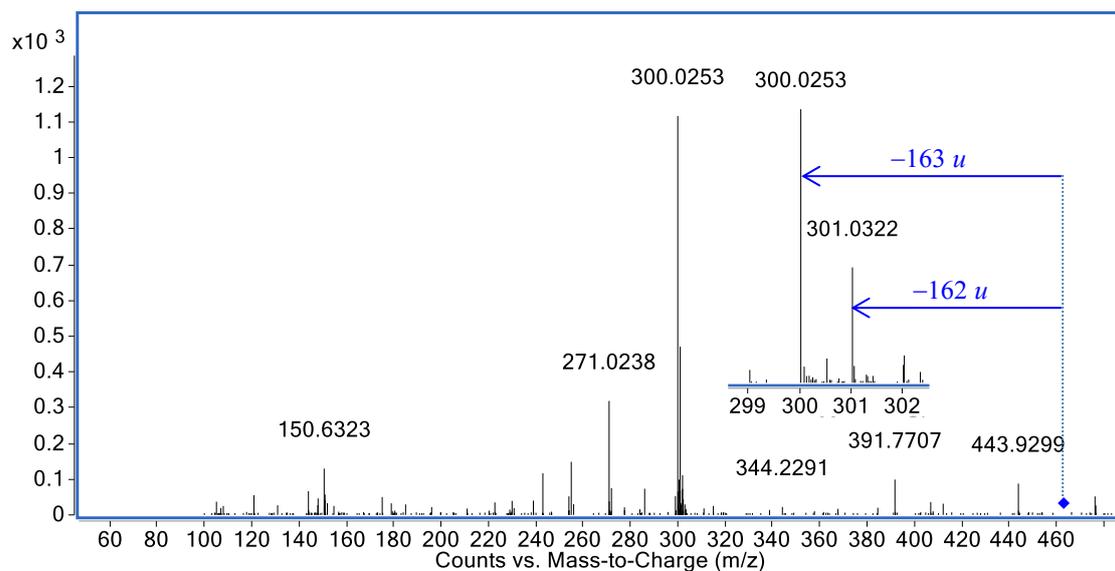
Figura 163 – EM-IES(-) em alta resolução do composto **IX**.



Fonte: autora.

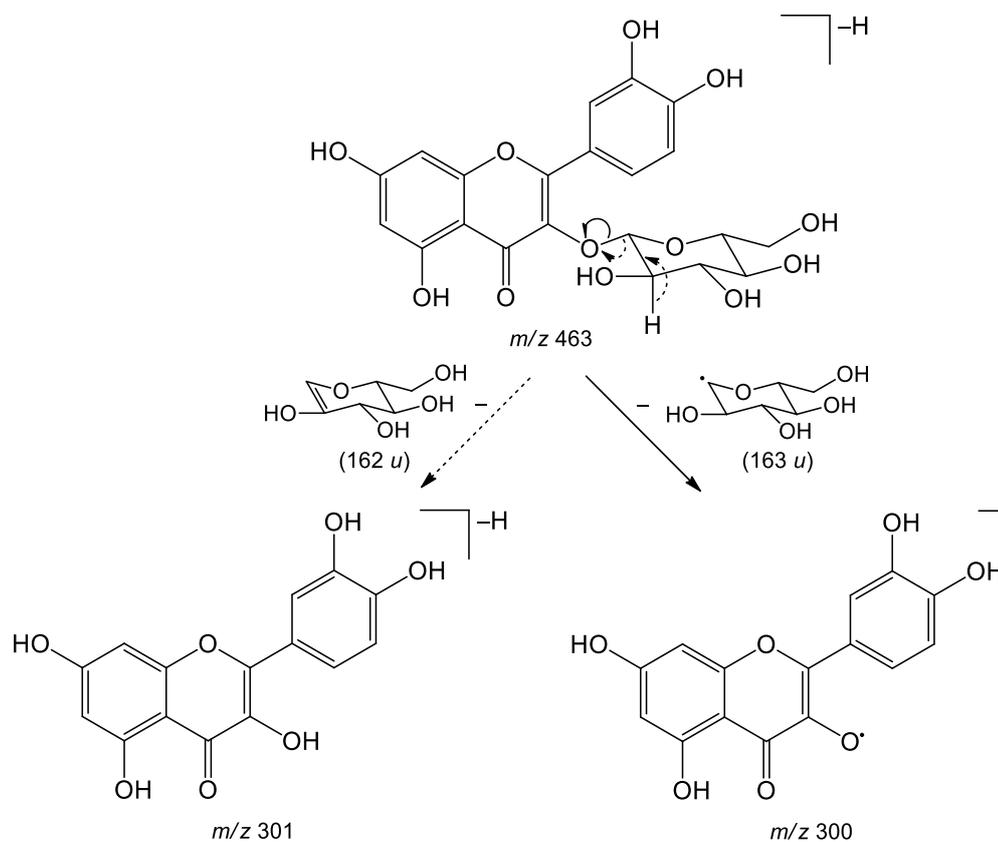
Quando submetido a análise por espectrometria de massas sequencial no modo negativo, a dissociação induzida por colisão do íon molecular m/z 463 $[M - H]^-$, com N_2 , gerou como principais fragmentos os íons em m/z 301 e 300 (Figura 164), que foram atribuídos à eliminações neutra e radicalar, respectivamente, da unidade monossacarídica na posição C-3. Diferentemente do que foi observado em **VIII**, a abundância do íon aglicona radicalar (m/z 300) é maior do que o íon aglicona desprotonado (m/z 301) em **IX**, o que é consistente com os dados descritos na literatura para compostos com unidade glicosídica na posição C-3 (Figura 165) e, corrobora com a estrutura da quercetina-3-*O*-glucosídeo (**IX**) (GONZALES et al., 2014; HVATTUM, EKEBERG, 2003).

Figura 164 – EM/EM-IES(-) do composto **IX** (m/z 463 $[M - H]^-$, energia de colisão 20 eV).



Fonte: autora.

Figura 165 – Proposta de fragmentação do composto **IX** analisado por EM/EM-IES(-).



Fonte: autora.

5 – CONCLUSÕES

Espécies pertencentes aos gêneros *Senna* e *Cassia*, representam uma alternativa promissora na medicina tradicional, sendo que várias são utilizadas no tratamento de diferentes enfermidades. Estudos científicos comprovam que espécies de ambos os gêneros são capazes de produzir uma vasta diversidade de classes de substâncias, que foram relacionadas as atividades laxativas, antibacterianas, antifúngicas, hepatoprotetora, antimalárica, antidiabética, entre outras. Estes dados mostram a importância de estudos direcionados para espécies dos gêneros *Senna* e *Cassia*, visando sua utilização como fonte de recursos terapêuticos. Assim, foram selecionadas dez espécies (*C. fistula*, *C. bakeriana*, *S. macranthera*, *S. occidentalis*, *S. siamea*, *S. pendula*, *S. obtusifolia*, *S. spectabilis*, *S. silvestris* e *S. alata*), que são frequentemente utilizadas na medicina tradicional e preparados os extratos etanólicos das flores e folhas, que foram avaliados frente as atividades antimicrobiana, citotóxica e inibidora da lipase pancreática.

Na avaliação da atividade de inibição da lipase pancreática, os extratos das flores de *C. fistula* e *S. macranthera* apresentaram os melhores resultados, com percentual de inibição de $67,10 \pm 0,58\%$ e $72,81 \pm 9,08\%$, respectivamente, quando avaliados na concentração de $240 \mu\text{g mL}^{-1}$. Na análise seriada o extrato etanólico das flores de *C. fistula* apresentou inibição de 50% da enzima (IC_{50}) na concentração de $25,68 \pm 1,72 \mu\text{g mL}^{-1}$. No que diz respeito a composição química das flores de *C. fistula*, foram identificados por EM/EM-IES, diversos compostos fenólicos, a maioria pertencente a classe dos flavonoides, entre estes kaempferol-3-*O*-rutinosídeo, presente em elevada abundância na espécie, e pode estar relacionado à atividade inibidora da lipase pancreática observada no ensaio com o extrato.

A análise dos resultados da avaliação da atividade antimicrobiana (bactérias bucais aeróbias, anaeróbias e leveduras) dos extratos, permitiu observar que os melhores resultados foram do extrato etanólico das flores de *S. macranthera* frente às leveduras *C. tropicalis*, *C. albicans* e *C. glabrata*, com valores de CIM variando de 5,86 a $23,43 \mu\text{g mL}^{-1}$. Quando as frações (hexano, diclorometano, acetato de etila e hidroalcoólica) obtidas do extrato das flores de *S. macranthera*, foram avaliadas contra as três cepas de *Candida*, a fração acetato de etila apresentou pronunciada atividade antifúngica, frente as três leveduras testadas, com valores de CIM de 5,86, 23,43 e $23,43 \mu\text{g mL}^{-1}$ para *C. glabrata*, *C. albicans* e *C. tropicalis*, respectivamente. Estes resultados indicam que as substâncias presentes nesta fração têm polaridade semelhante

à do solvente utilizado (AcOEt), e de acordo com relatos da literatura para espécies destes gêneros, é possível observar uma predominância de compostos fenólicos.

Na avaliação da atividade citotóxica, os melhores resultados também foram observados para o extrato etanólico e fração acetato de etila das flores de *S. macranthera*, com valores de IS variando entre 1,34 e 1,94. Estes resultados mostram que as flores de *S. macranthera* são uma fonte promissora de novos agentes antifúngicos, uma vez que apresentou elevada atividade antifúngica associada com baixa citotoxicidade. Estes resultados nos direcionaram para um estudo mais detalhado desta espécie o que permitiu associar a atividade biológica à presença de vários compostos fenólicos, principalmente proantocianidinas, evidenciados através da técnica de CLAE-IES-EM/EM. Foram identificados, na fração acetato de etila, dezoito compostos, sendo um ácido orgânico (**1**), dois flavan-3-ol (**2** e **3**), uma flavona (**4**), dois flavonóis glicosilados (**5** e **6**), cinco dímeros (**7–11b**) e sete trímeros de proantocianidinas (**12–18**).

Na análise do perfil metabólico das diferentes espécies de *Senna* e *Cassia*, o uso da espectrometria de massas (EM-ESI e EM/EM-ESI), tanto por infusão direta, quanto acoplada a CLAE permitiu confirmar a predominância dos alcaloides piperidídicos em *S. spectabilis*. Também permitiu, com base no padrão de fragmentação e nos dados de EM de alta resolução, realizar a identificação estrutural de algumas classes de compostos típicos para os gêneros *Cassia* e *Senna*. Foram identificados principalmente flavonoides C- e O-glicosilados. Um alcaloide da classe das cassiarinas (cassiarina A) foi identificado nas flores e folhas de *S. siamea* e flores de *S. silvestris*, sendo este o primeiro relato deste metabólito em *S. silvestris*. Vale destacar que em ensaios por cromatografia em camada delgada, utilizando reveladores específicos como o iodocloroplatinato e Dragendorff, não foi possível observar resultado positivo, o que indica que este composto esteja presente em concentrações abaixo do limite de detecção desta técnica, mas que foi detectado por EM, evidenciando a sensibilidade da técnica. Também foram identificados compostos pertencentes a classe das antraquinonas, cromonas, dihidroisocumarinas e ácidos fenólicos.

A análise quimiométrica dos espectros de massas permitiu observar que em todos os modelos, *S. macranthera* se mantém separada das demais espécies, o que indica uma composição (tanto da flor quanto da folha) diferenciada em relação as outras espécies analisadas. O mesmo comportamento foi observado para *S. spectabilis*, o que corrobora com a presença majoritária dos alcaloides piperidínicos somente nesta espécie. A análise das flores e folhas de *S. siamea* e *S. silvestris*, nos modos positivo e negativo, mostrou que

ambas se mantêm próximas, o que sugere uma composição química semelhante. No entanto, a análise das flores de *S. obtusifolia*, no modo negativo, apresentou uma maior separação das demais espécies. As análises das demais espécies, indicam que existe uma grande similaridade na composição química.

S. silvestris foi selecionada para o estudo químico por não apresentar relatos na literatura. Através do fracionamento cromatográfico, realizado com o extrato etanólico das flores, foram isolados e identificados as antraquinonas crisofanol (I) e fisciona (II), o ácido palmítico (III), os flavonoides luteolina (IV) e aromadendrina (V), a dihidroisocumarina 6-hidroximeleina (VI) e a cromona cassiacromona (VII). Também foi possível identificar por CLAE-DAD e EM/EM-IES, os flavonoides glicosilados luteolina-7-*O*-glucosídeo (VIII) e quercetina-3-*O*-glucosídeo (IX). Estes resultados contribuem para o conhecimento químico desta espécie, realizado pela primeira vez neste trabalho.

REFERÊNCIAS

- AAS, J. A.; PASTER, B. J.; STOKES, L. N.; OLSEN, I.; DEWHIRST, F. E. Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 11, p. 5721–5732, 2005. [https://doi.org/10.1128/JCM.43.11.5721–5732](https://doi.org/10.1128/JCM.43.11.5721-5732)
- ABBAS, O.; COMPÈRE, G.; LARONDELLE, Y.; POMPEU, D.; ROGEZ, H.; BAETEN, V. Phenolic compound explorer: a mid-infrared spectroscopy database. **Vibrational Spectroscopy**, v. 92, p. 111–118, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.vibspec.2017.05.008>
- ABIAN, O.; ALFONSO, P.; VELAZQUEZ-CAMPOY, A.; GIRALDO, P.; POCOVI, M.; SANCHO, J. Therapeutic strategies for gaucher disease: miglustat (NB-DNJ) as a pharmacological chaperone for glucocerebrosidase and the different thermostability of velaglucerase alfa and imiglucerase. **Molecular Pharmaceutics**, v. 8, p. 2390–2397, 2011. <https://doi.org/10.1021/mp200313e>
- ADAMU, H.M.; ABAYEH, O. J.; IBOK, N.U.; KAFU, S.E. Antifungal activity of extracts of some *Cassia*, *Detarium* and *Ziziphus* species against dermatophytes. **Natural Product Radiance**, v. 5, n. 5, p. 357–360, 2006.
- AGRA, M. F.; FREITAS, P. F.; BARBOSA-FILHO, J. M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 17, n. 1, p. 114 – 140, 2007. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-695X2007000100021>
- ALLAKER, R. P.; DOUGLAS, C. W. I. Novel anti-microbial therapies for dental plaque-related diseases. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 33, n. 1, p. 8–3, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2008.07.014>
- ALEXANDRE-MOREIRA, M. S.; VIEGAS JÚNIOR, C.; MIRANDA, A. L. P.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J. Antinociceptive profile of (–)-spectaline: a piperidine alkaloid from *Cassia leptophylla*. **Planta Medica**, v. 69, p. 795–799, 2003. <https://doi.org/10.1055/s-2003-43201>
- AL-SUWAILEM, A. 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. 2, n. 4, p. 205–298, 2006.
- ÁLVAREZ-FERNÁNDEZ, M. A.; HORNEDO-ORTEGA, R.; CERESO, A. B.; TRONCOSO, A. M.; GARCÍA-PARRILHA, C. Determination of nonanthocyanin phenolic compounds using high-resolution mass spectrometry (UHPLC-Orbitrap-MS/MS) and impact of storage conditions in a beverage made from strawberry by fermentation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 64, p. 1367–1376, 2016. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b05617>

ALVES, D. S.; PÉREZ-FONS, L.; ESTEPA, A.; MICOL, V.; Membrane-related effects underlying the biological activity of the anthraquinones emodin and barbaloin.

Biochemical Pharmacology, v. 68, p. 549–561, 2004.

<https://doi.org/10.1016/j.bcp.2004.04.012>

ANDERSEN, Ø. M.; MARKHAM, K. R. **Flavonoids: chemistry, biochemistry and applications**. Boca Raton: CRC Press, 2006, 1256 p.

<https://doi.org/10.1201/9781420039443>

ANDRADE, F. I.; PURGATO, G. A.; MAIA, T. F.; SIQUEIRA, R. P.; LIMA, S.; DIAZ, G.; DIAZ, M. A. N. Chemical constituents and an alternative medicinal veterinary herbal soap made from *Senna macranthera*. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2015, p. 1-6, 2015.

<https://doi.org/10.1155/2015/217598>

ARYA, V.; YADAV, S.; KUMAR, S.; YADAV, J. P. Antimicrobial activity of *Cassia occidentalis* L. (leaf) against various human pathogenic microbes. **Life sciences and Medicine Research**, v. 2010, p. 1–11, 2010.

ASSELEIH, L. M. C.; HERNANDEZ, O. H.; SANCHEZ, J. R. Seasonal variations in the content of sennosides in leaves and pods of two *Cassia fistula* populations.

Phytochemistry, v. 29, n. 10, p. 3095–3099, 1990.

[https://doi.org/10.1016/0031-9422\(90\)80164-C](https://doi.org/10.1016/0031-9422(90)80164-C)

AUGUSTINO, S.; HALL, J. B.; MAKONDA, F. B. S.; ISHENGOMA, R. C. Medicinal resources of the Miombo woodlands of Urumwa, Tanzania: plants and its uses. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 5, n. 27, p. 6352–6372, 2011.

<https://doi.org/10.5897/JMPR10.517>

BAKER, D. D.; CHU, M.; OZA, U.; RAJGARHIA, V. The value of natural products to future pharmaceutical discovery. **Natural Product Reports**, v. 24, p. 1225–1244, 2007.

<https://doi.org/10.1039/b602241n>

BACHMANN, S. P.; WALLE, K. V.; RAMAGE, G.; PATTERSON, T. F.; WICKES, B. L.; GRAYBILL, J. R.; LÓPEZ-RIBOT, J. L. In vitro activity of Caspofungin against *Candida albicans* biofilms. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 11, p. 3591–3596, 2002.

<https://doi.org/10.1128/AAC.46.11.3591-3596.2002>

BARNARD, D. L.; FAIRBAIRN, D. W.; O'NEILL, K. L.; GAGE, T. L.; SIDWELL, R. W. Anti-human cytomegalovirus activity and toxicity of sulfonated anthraquinones and anthraquinones derivatives. **Antiviral Research**, v. 28, p. 317–329, 1995.

[https://doi.org/10.1016/0166-3542\(95\)00057-7](https://doi.org/10.1016/0166-3542(95)00057-7)

BARREIRO, E. J. Produtos naturais bioativos de origem vegetal e o desenvolvimento de fármacos. **Química Nova**, v. 13, n. 1, p. 29–39, 1990.

BASSETTI, M.; MERELLI, M.; RIGHI, E.; DIAZ-MARTIN, A.; ROSELLE, E. M.; LUZZATI, R.; PARRA, A.; TRECARCHI, E. M.; SANGUINETTI, M.; POSTERARO, B.; GARNACHO-MONTERO, J.; SARTOR, A.; RELLO, J.; TUMBARELLO, M. Epidemiology, species distribution, antifungal susceptibility, and outcome of candidemia across five sites in Italy and Spain. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 51, n. 12, p. 4167–4172, 2013.

<https://doi.org/10.1128/JCM.01998-13>

BELINATO, J. R.; BAZIOLI, J. M.; SUSSULINI, A.; AUGUSTO, F.; FILL, T. P. Metabolômica microbiana: inovações e aplicações. **Química Nova**, v. 42, n. 5, p. 546–559, 2019. <http://dx.doi.org/10.21577/0100-4042.20170324>

BENTHAM, G. XVIII Revision of the genus *Cassia*. **Transactions of the Linnean Society of London**, v. 27, n. 4, p. 503–591, 1871.

<https://doi.org/10.1111/j.1096-3642.1871.tb00220.x>

BFG. Growing knowledge: an overview of seed plant diversity in Brazil. **Rodriguésia**, v.66, n.4, p.1085–1113. 2015. <https://doi.org/10.1590/2175-7860201566409>

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.

<https://doi.org/10.4103/2231-4040.82956>

BISWAS, K. M.; MALLIK, H. Cassiadinine, a chromone alkaloid and (+)- 6- hydroxymellein, a dihydroisocoumarin from *Cassia siamea*. **Phytochemistry**, v. 25, n. 7, p. 1727–1730, 1986. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)81245-5](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)81245-5)

BOONKERD, T.; PECHSRI, S.; BAUM, B. R. A phonetic study of *Cassia* sensu lato (Leguminosae-Caesalpinioideae: Cassieae: Cassiinae) in Thailand. **Plant Systematics and Evolution**, v. 252, p. 153, 2005. <https://doi.org/10.1007/s00606-004-0278-0>

BOORHEM, R. L.; LAGE, E. B. Drogas e extratos vegetais utilizados em fitoterapia. **Revista Fitos**, v. 4, n. 1, p. 37–55, 2009.

BRACA, A.; BADER, A.; TOMMASI, N. **3,4-dihydroisocoumarins**: structures, biological activity, and taxonomic relationships. In: Bioactive natural products (Part L). v. 32, p. 3–1252, 2005.

BRAZ-FILHO, R. Contribuição da fitoquímica para o desenvolvimento de uma país emergente. **Química Nova**, v. 33, n. 1, p. 229–239, 2010.

<https://doi.org/10.1590/S0100-40422010000100040>

BRITO, A.; RAMIREZ, J. E.; ARECHE, C.; SEPÚLVEDA, B.; SIMIRGIOTIS, M. J. 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. <https://doi.org/10.3390/molecules191117400>

BROWN, G. D.; DENNING, D. W.; GOW, N. A. R.; LEVITZ, S. M.; NETEA, M. G.; WHITE, T. C. Hiddens killers: human fungal infections. **Medical Mycology**, v. 4, n. 165, p. 1–10, 2012. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3004404>

BRUNKE, S.; HUBE, B. Two unlike cousins: *Candida albicans* and *C. glabrata* infection strategies. **Cellular Microbiology**, v. 15, n. 5, p. 701–708, 2013. <https://doi.org/10.1111/cmi.12091>. [https://doi.org/10.1016/S0304-3835\(97\)00261-9](https://doi.org/10.1016/S0304-3835(97)00261-9)

CAI, Q.; RAHN, R. O.; ZHANG, R. Dietary flavonoids, quercetin, luteolin and genistein, reduce oxidative DNA damage and lipid peroxidation and quench free radicals. **Cancer Letters**, v. 119, p. 99–107, 1997. [https://doi.org/10.1016/S0304-3835\(97\)00261-9](https://doi.org/10.1016/S0304-3835(97)00261-9)

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 Ethnopharmacol**, v. 106, n. 1, p. 82–89, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.12.005>

CHA, T.; QIU, L.; CHEN, C.; WEN, Y.; HUNG, M. Emodin down-regulates androgen receptor and inhibits prostate cancer cell growth. **Cancer Research**, v. 65, n. 6, p. 2287–2295, 2005. <https://doi.org/10.1158/0008-5472>

CHANDA, S.; KANERIA, M.; BARAVALIA, Y. Antioxidant and antimicrobial properties of various polar solvent extracts of stem and leaves of four *Cassia* species. **African Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 10, p. 2490–2503, 2012. <https://doi.org/10.5897/AJB10.855>

CHANTONG, B.; WONGTONGTAIR, S.; NUSUETRONG, P.; SOTANAPHUN, U.; CHAICHANTIPYUTH, C.; MEKSURIYEN, D. Stability of barakol under hydrolytic stress conditions its major degradation product. **Planta Medica**, v. 75, n. 4, p. 346–350, 2009. <https://doi.org/10.1055/s-0028-1112206>

CHAUHAN, D.; CHAUHAN, J. S.; SIDDIQUI, I. R.; SINGH, J. Two new anthraquinone glycosides from the leaves of *Cassia occidentalis*. **Indian Journal of Chemistry**, v. 40b, p. 860–863, 2001.

CHAVES, D. N. B.; ALBERTI, L. R.; PETROIANU, A. Estudo comparativo dos efeitos da talidomida, da ciclosporina e do diclofenaco na sobrevida de aloenxertos cutâneos em coelho. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 54, n. 1, p. 42–47, 2008. <https://doi.org/10.1590/S0104-42302008000100019>

CHEN, Y.; YU, H.; WU, H.; PAN, Y.; WANG, K.; JIN, Y.; ZHANG, C. Characterization and quantification by LC-MS/MS of the chemical components of the healing products of the flavonoids extract in pollen typhae for transformation rule exploration. **Molecules**, v. 20, n. 10, p. 18352–18366, 2015. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules201018352>

CHEUKA, P. M.; MAYOKA, G.; MUTAI, P.; CHIBALE, K. The role the natural products in drug discovery and development against neglected tropical diseases. *Molecules*, v. 22, n. 58, p. 2–41, 2017. <https://doi.org/10.3390/molecules22010058>

CHIAPPINI, I.; FARDELLA, G.; MENGHINI, A.; ROSSI, C. Flavonoids from *Dittrichia viscosa*. *Planta Medica*, v. 44, p. 159–161, 1982. <https://doi.org/10.1055/s-2007-971429>

CHIEN, S.; WU, Y.; WU, Y.; CHEN, Z.; YANG, W. Naturally occurring anthraquinones: chemistry and therapeutic potential in autoimmune diabetes. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, v. 2015, p. 1–13, 2015. <http://dx.doi.org/10.1155/2015/357357>

CHUMBALOV, T. K.; CHANY SHEVA, I. S.; MUZYCHKINA, R. A. UV and IR spectra of anthraquinone and chrysophanol derivatives. *Zhurnal Prikladnoi Spektroskopii*, v. 6, n. 6, p. 832–836, 1967. <https://doi.org/10.1007/BF00606188>

CISSÉ, L.; TINE, A.; KABORÉ, L.; SABA, A.; Mass spectrometry study of coumarins: correlation between charges of atoms and fragmentation processes. *Spectroscopy Letters*, v. 42, n. 2, p. 95–99, 2009. <https://doi.org/10.1080/00387010802428666>

CLSI Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeast; Approved standard – third edition. CLSI document M27-A3. 3 ed. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008. 27 p.

CLSI Methods for antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria. CLSI Document M11-A8. 8. ed. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012a. 39 p.

CLSI Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. CLSI Document M7-A9. 9. ed. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012b. 63 p.

COETZEE, J.; MCITEKA, L.; MALAN, E.; FERREIRA, D. Structure and synthesis of butiniflavan-epicatechin and –epigallocatechin probutinidins. *Phytochemistry*, v. 52, p. 737–743, 1999. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(99\)00261-7](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(99)00261-7)

COETZEE, J.; MCITEKA, L.; MALAN, E.; FERREIRA, D. Structure and synthesis of the first procassinidin dimers based on epicatechin, and gallo- and epigallocatechin. *Phytochemistry*, v. 53, p. 795–804, 2000. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)00017-0](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)00017-0)

CONCANNON, S.; RAMACHANDRAN, V. N.; SMYTH, W. F. A study of the electrospray ionization of selected coumarin derivatives and their subsequent fragmentation using an ion trap mass spectrometer. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, v. 14, p. 1157–1166, 2000. [https://doi.org/10.1002/1097-0231\(20000730\)14:14<1157::AID-RCM4>3.0.CO;2-V](https://doi.org/10.1002/1097-0231(20000730)14:14<1157::AID-RCM4>3.0.CO;2-V)

- COOK, N.C.; SAMMAN, S. Flavonoids: chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 7, n. 2, p. 66–76, 1996. [https://doi.org/10.1016/S0955-2863\(95\)00168-9](https://doi.org/10.1016/S0955-2863(95)00168-9)
- CORREIA, P. R. M.; FERREIRA, M. M. C. Reconhecimento de padrões por métodos não supervisionados: explorando procedimentos quimiométricos para tratamento de dados analíticos. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 481–487, 2007. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422007000200042>
- CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural products: a continuing source of novel drug leads. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1830, n. 6, p. 3670–3695, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.02.008>
- CUNHA, L.C.S.; MORAIS, S.A.L.; AQUINO, F.J.T.; CHANG, R.; OLIVEIRA, A.; MARTINS, M.M.; MARTINS, C.H.G.; SOUSA, L.C.F.; BARROS, 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, p. 91–98, 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjp.2016.08.002>
- DALEY, D. K. Plant Crude Drugs. In: BADAL, S.; DELGODA, R. (Ed.) **Pharmacognosy: fundamentals, applications and strategy**. London: Academic Press, 2017. Cap. 6, p. 81–89. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802104-0.00006-8>
- DANISH, M.; SINGH, P.; MISHRA, G.; SRIVASTAVA, S.; JHA, K. K.; KHOSA, R. R. *Cassia fistula* Linn. (Amulthus) – An important medicinal plant: A review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacological properties. **Journal of Natural Product and Plant Resources**, v. 1, n. 1, p. 101–118, 2011.
- DANIYAN, S.Y.; OLORUNTIMELEHIN, J.B.; IFEADI, O. Antibacterial activity of *Cassia occidentalis* flower vegetable extract on selected bacteria. **Asian Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences**, v. 1, n. 1, p. 23–27, 2011.
- DAS, A. M. Clinical utility of nitisinone for the treatment of hereditary tyrosinemia type-I (HT-I). **The Application of Clinical Genetics**, v.10, p. 43–48, 2017. <https://doi.org/10.2147/TACG.S113310>
- DELEU, D.; HANSSSENS, Y.; NORTHWAY, M. G. Subcutaneous apomorphine an evidence-based review of this use in Parkinsons´s disease. **Drugs Aging**, v. 21, n. 11, p. 687–709, 2004. <https://doi.org/10.2165/00002512-200421110-00001>
- DEMARQUE, D. P.; CROTTI, A. E. M.; VESSECCHI, R.; LOPES, J. L. C.; LOPES, N. P. Fragmentation reactions using electrospray ionization mass spectrometry: an important tool for the structural elucidation and characterization of synthetic and natural products. **Natural Product Reports**, v. 33, n. 3, p. 367–524, 2016. <https://doi.org/10.1039/C5NP00073D>
- DEVI, S.; GUPTA, A. K.; SINGH, M. Ethano-medicinal use of plants belonging to families Fabaceae and Solanaceae, Hamirpur district (H.P.). **International Journal of Scientific and Research Publications**, v. 2, n. 11, p. 1–4, 2012.

DEWICK, P. M. **Medicinal natural products**: a biosynthetic approach. 2 ed. Chichester: John Wiley & Sons, 2002. 507 p.

DIAZ, A. N. Absorption and emission spectroscopy and photochemistry of 1,10- anthraquinone derivatives: a review. **Journal of Photochemistry and Photobiology A**, v. 52, n. 2, p. 141–167, 1990. [https://doi.org/10.1016/1010-6030\(90\)87120-Z](https://doi.org/10.1016/1010-6030(90)87120-Z)

DURAI PANDIYAN, V.; IGNACIMUTHU, S. Antibacterial and antifungal activity of *Cassia fistula* L.: an ethnomedicinal plant. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 112, n. 3, p. 590–594, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2007.04.008>

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

DUTRA, V. F.; LIMA, L. C. P.; GARCIA, F. C. P.; LIMA, H. C.; SARTORI, A. L. B. Geographic distribution patterns of Leguminosae and their relevance for the conservation of the Itacolomi State Park, Minas Gerais, Brazil. **Biota Neotropica**, v. 14, n. 1, p. 1–15, 2014. <https://doi.org/10.1590/S1676-06033937>

FABRE, N.; RUSTAN, I.; 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. [https://doi.org/10.1016/S1044-0305\(01\)00226-4](https://doi.org/10.1016/S1044-0305(01)00226-4)

FABRICANT, D. S.; FASRNWORTH, N. R. The value of plants used in traditional medicine of drug discovery. **Environmental health perspectives**, v. 109, n. 1, p. 69–75, 2001. <https://doi.org/10.1289/ehp.01109s169>

FARAG, M. A.; PORZEK, A.; MAHROUS, E. A.; EL-MASSRY, A.; WESSJOHANN, L. A. Integrated comparative metabolite profiling via MS and NMR techniques for *Senna* drug quality control analysis. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 40, n. 7, p. 1937–1949, 2015. <https://doi.org/10.1007/s00216-014-8432-1>

FENNER, R.; BETTI, A. H.; MENTZ, L. A.; RATES, S. M. K. Plantas utilizadas na medicina popular brasileira com potencial atividade antifúngica. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 3, p. 369–394, 2006. <https://doi.org/10.1590/S1516-93322006000300007>.

FOSSEN, T.; ANDERSEN, O. M. Spectroscopic Techniques Applied to Flavonoids. In: **Flavonoids: chemistry, biochemistry and applications**. Boca Raton: Taylor & Francis Group, 2006. Cap. 2, p. 37–142. <https://doi.org/10.1201/9781420039443.ch2>

FRANCISCO, W.; PIVATTO, M.; DANUELLO, A.; REGASINI, L. O.; BACCINI, L. R.; YOUNG, M. C. M.; LOPES, N. P.; LOPES, J. L. C.; BOLZANI, V. S. Pyridine alkaloids from *Senna multijuga* as Acetylcholinesterase inhibitors. **Journal of Natural Products**, v. 75, p. 408–423, 2012. <https://doi.org/10.1021/np200814j>

- FUNARI, C. S.; CASTRO-GAMBOA, I.; CAVALHEIRO, A. J.; BOLZANI, V. S. Metabolômica, uma abordagem otimizada para a exploração da biodiversidade brasileira: estado da arte perspectivas e desafios. **Química Nova**, v. 36, n. 10, p. 1605–1609, 2013. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422013001000019>
- GAN, K.; TENG, C.; LIN, H.; CHEN, K.; CHEN, Y.; HSU, M.; WANG, J.; TENG, C.; LIN, C. Antiplatelet effect and selective binding to cyclooxygenase by molecular docking analysis of 3-alkylaminopropoxy-9,10-anthraquinone derivatives. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 31, n. 8, p. 1547–1551, 2008. <https://doi.org/10.1248/bpb.31.1547>
- GAO, T.; YAO, H.; SONG, J.; LIU, C.; ZHU, Y.; MA, X.; PANG, X.; XU, H.; CHEN, S. Identification of medicinal plants in the family Fabaceae using a potential DNA barcode ITS2. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 130, p. 116–121, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2010.04.026>
- GAO, X.; SHEN, Y.; HUANG, X.; YANG, L.; SHU, L.; HU, Q.; LI, G. 2''-ethyl-furanoflavone derivatives from the stems of *Cassia fistula* and their cytotoxicity. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 24, n. 4, p. 685–689, 2013. <https://doi.org/10.5935/0103-5053.20130091>
- GOMEZ, N. A.; ABONIA, R.; CADAVID, H.; VARGAS, I. H. Chemical and spectroscopic characterization of a vegetable oil used as dielectric coolant in distribution transformers. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 22, n. 12, p. 2292–2303, 2011. <https://doi.org/10.1590/S0103-50532011001200009>
- GONZALES, G.B.; RAES, K.; COELUS, S.; STRUIJS, K.; SMAGGHE, G.; CAMP, J.V. Ultra(high)-pressure liquid chromatography–electrospray ionization-time-of-flight-ion mobility-high definition mass spectrometry for the rapid identification. and structural characterization of flavonoid glycosides from cauliflower waste. **Journal of Chromatography A**, v. 1323, p. 39–48, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.10.077>
- GOPINATH, K.; SUDHANDIRAN, G. Naringin modulates oxidative stress and inflammation in 3-nitropropionic acid-induced neurodegeneration through the activation of nuclear factor-erythroid 2-related factor-2 signalling pathway. **Neuroscience**, v. 227, p. 134–143, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2012.07.060>
- GOULD, K. S.; LISTER, C. Flavonoid functions in plants. In: *Flavonoids: chemistry, biochemistry and applications*. Boca Raton: CRC Press. 2006, 1256 p. <https://doi.org/10.1201/9781420039443.ch8>
- 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. [https://doi.org/10.1016/S0003-2697\(02\)00379-2](https://doi.org/10.1016/S0003-2697(02)00379-2)
- GRAHAM, J. G.; PENDLAND, S. L.; PRAUSE, J. L.; DANZINGER, L. H.; VIGO, J. S.; CABIESES, F.; FARNSWORTH, N. R. Antimycobacterial evaluation of Peruvian plants. **Phytomedicine**, v. 10, p. 528–535, 2003. <https://doi.org/10.1078/094471103322331502>

GUERIN, T. F.; MONDIDO, M.; MCCLENN, B.; PEASLEY, B. Application of resazurin for estimating abundance of contaminant-degrading micro-organisms. **Letters in Applied Microbiology**, v. 32, p. 340–345, 2001.

<https://doi.org/10.1046/j.1472-765X.2001.00916.x>

HABTEMARIAM, S. Antihyperlipidemic components of *Cassia auriculata* aerial parts: identification through *in vitro* studies. **Phytotherapy Research**, v. 27, n. 1, p. 152–155, 2012. <https://doi.org/10.1002/ptr.4711>

HARBORNE, B. J. Ultraviolet spectroscopy of polyphenols. IN: Methods in polyphenol chemistry, Pergamon, 1964, p. 13–36.

<https://doi.org/10.1016/B978-0-08-010887-2.50006-2>

HARBORNE, B. J.; WILLIAMS, A. C. Advances in flavonoids research since 1992. **Phytochemistry**, v. 55, p. 481–504, 2000.

[https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)00235-1](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)00235-1)

HATANO, T.; YAMASHITA, A.; HASHIMOTO, T.; ITO, H.; KUBO, N.; YOSHIYAMA, M.; SHIMURA, S.; ITOH, Y.; OKUDA, T.; YOSHIDA, T. Flavan dimers with lipase inhibitory activity from *Cassia nomame*. **Phytochemistry**, v. 46, n. 5, p. 893–900, 1997. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(97\)00367-1](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(97)00367-1)

HENDRIKS, M. M. W. B.; CRUZ-JUAREZ, L.; BONT, D.; HALL, R. D. Preprocessing and exploratory analysis of chromatographic profiles of plant extracts. **Analytica Chimica Acta**, v. 545, p. 53–64, 2005.

<https://doi.org/10.1016/j.aca.2005.04.026>

HOLETZ, F. B., PESSINI, G. L., SANCHES, N. R., CORTEZ, D. A. G., NAKAMURA, C. V., FILHO, B. P. D. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 7, p. 1027–1031, 2002.

<https://doi.org/10.1590/S0074-02762002000700017>

HUANG, R.; LI, M.; GREGORY, R. L. Bacterial interactions in dental biofilm.

Virulence, v. 2, n. 5, p. 435–444, 2011. <https://doi.org/10.4161/viru.2.5.16140>

HUGHES, R. J.; CROLEY, T. R.; METCALFE, C. D.; MARCH, R. E. A tandem mass spectrometric study of selected characteristic flavonoids. **International Journal of Mass Spectrometry**, v. 210/211, p. 371–385, 2001.

[https://doi.org/10.1016/S1387-3806\(01\)00451-1](https://doi.org/10.1016/S1387-3806(01)00451-1)

HVATTUM, E., EKEBERG, D. Study of the collision-induced radical cleavage of flavonoid glycosides using negative electrospray ionization tandem quadrupole mass spectrometry. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 38, n. 1, p. 43–49, 2003.

<https://doi.org/10.1002/jms.398>

INERNEY, B. V. M.; TAYLOR, W. C. The xenocoumarins and related biologically active dihydroisocoumarins. In: Studies in natural products chemistry, v. 15, part C. Attur-Rahman, 1995, p. 393.

INGKANINAN, K.; IJZERMAN, A. P.; VERPOORTE, R. Luteolin, a compound with Adenosine A₁ receptor-binding activity, and chromone and dihydronaphthalenone constituents from *Senna siamea*. **Journal of Natural Products**, v. 63, n. 3, p. 315–317, 2000. <https://doi.org/10.1021/np9904152>

IRWIN, H. S.; BARNEBY, R. C. The American Cassiinae. A synoptical revision of Leguminosae tribe Cassieae subtribe Cassiinae in the new world. v. 35, part 1. The New York Botanical Garden, 1982, 465 p.

JACKSON, T. C.; VERRIER, J. D.; KOCHANNEK, P. M. Anthraquinone-2-sulfonic acid (AQ2S) is a novel neurotherapeutic agent. **Cell Death and Disease**, v. 4, p. 1–12, 2013. <https://doi.org/10.1038/cddis.2012.187>

JAISWAL, R.; JAYASINGHE, L.; KUHNERT, N. Identification and characterization of proanthocyanidins of 16 members of the *Rhododendron* genus (Ericaceae) by tandem LC-MS. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 47, n. 4, p. 502–515, 2012. <https://doi.org/10.1002/jms.2954>

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. 120, p. 25–32, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2018.04.004>

JAYASURIYA, H.; KOONCHANOK, N. M.; GEAHLEN, R. L.; MCLAUGHLIN, J. L.; CHANG, C. Emodin, a protein tyrosine kinase inhibitor from *Polygonum cuspidatum*. **Journal of Natural Products**, v. 55, n. 5, p. 696–698, 1992. <https://doi.org/10.1021/np50083a026>

JIN, W.; WANG, Y.; GE, R.; SHI, H.; JIA, C.; TU, P. Simultaneous analysis of multiple bioactive constituents in *Rheum tanguticum* Maxim, ex Balf. by high-performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 21, n. 14, p. 2351–2360, 2007. <https://doi.org/10.1002/rcm.3086>

JOLY, C. A.; HADDAD, C. F. B.; VERDADE, L. M.; OLIVEIRA, M. C.; BOLZANI, V. S.; BERLINCK, R. G. S. Diagnóstico da pesquisa em biodiversidade no Brasil. **Revista USP**, n. 89, p. 114–133, 2011. <https://doi.org/10.11606/issn.2316-9036.v0i89p114-133>

JUDD, W. S.; CAMPBELL, C. S.; KELLOGG, E. A.; STEVENS, P.; DONOGHUE M. J. **Plant systematics: a phylogenetic approach**. 3. ed. Massachusetts: Sinauer Associates, 2008. 612 p.

KAMAGATÉ, M.; KOFFI, C.; KOUAMÉ, N. M.; AKOUBET, A.; YAO, N. A. R.; DIE-KAKOU, H. M. Ethnobotany, phytochemistry, pharmacology and toxicology profiles of *Cassia siamea* Lam. **The Journal of Phytopharmacology**, v. 3, n. 1, p. 57–76, 2014.

KANNO, M.; SHIBANO, T.; TAKIDO, M.; KITANAKA, S. Antiallergic agent from natural sources: structures and leukotriene release-inhibitory effect of toroside B and Torosachryson 8-O-6''-malonyl β -gentiobioside from *Cassia torosa* CAV. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 47, n. 7, p. 915–918, 1999.
<https://doi.org/10.1248/cpb.47.915>

KAPOOR, V. P.; TARAVEL, F. R.; JOSELEAU, J. P.; MILAS, M.; CHANZY, H.; RINAUDO, M. *Cassia spectabilis* DC seed galactomannan: structural, crystallographical and rheological studies. **Carbohydrate Research**, v. 306, p. 231–241, 1998. <https://doi.org/10.1128/AAC.46.11.3591-3596.2002>

KARRI, S.; SHARMA, S.; HATWARE, K.; PATIL, K. Natural anti-Obesity agents and their therapeutic role in management of obesity: a future trend perspective. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 110, p. 224–238, 2019.
<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.11.076>

KASHIWADA, Y.; LIZUKA, H.; YOSHIOKA, K.; CHEN, R.; NONAKA, G.; NISHIOKA, I. Tannins and related compounds. XCIII. Occurrence of enantiomeric proanthocyanidins in the Leguminosae plants, *Cassia fistula* L. and *C. javanica* L. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 38, n. 4, p. 888–893, 1990.
<https://doi.org/10.1248/cpb.38.888>

KETER, L. K.; MUTISO, P. Ethnobotanical studies of medicinal plants used by traditional health practitioners in the management of diabetes in Lower Eastern province, Kenya. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 139, p. 74–80, 2012.
<https://doi.org/10.1016/j.jep.2011.10.014>

KHAN, N.; KARODI, R.; SIDDIQUI, A.; THUBE, S.; RUB, R. Development of anti-acne gel formulation of anthraquinones rich fraction from *Rubia cordifolia* (Rubiaceae). **International Journal of Applied Research in Natural Products**, v 4, n. 4, p. 28–36, 2012.

KILIAN, M.; CHAPPLE, I. L. C.; HANNIG, M.; MARSH, P. D.; MEURIC, V.; PEDERSEN, A. M. L.; TONETTI, M. S.; WADE, W. G.; ZAURA, E. The oral microbiome – an update for oral healthcare professionals. **British Dental Journal**, v. 221, n. 10, p. 657–666, 2016. <https://doi.org/10.1038/sj.bdj.2016.865>

KITANAKA, S.; TAKIDO, M. Studies on the constituents of the seeds of *Cassia obtusifolia*: the structures of two new lactones, isotoralactone and cassialactone. **Phytochemistry**, v. 20, n. 8, p. 1951–1953, 1981.
[https://doi.org/10.1016/0031-9422\(81\)84042-3](https://doi.org/10.1016/0031-9422(81)84042-3)

KITANAKA, S.; TAKIDO, M. Studies on the constituents of the leaves of *Cassia torosa* CAV. II. The structure of two novel flavones, torosaflavone C and D. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 39, n. 12, p. 3254–3257, 1991.
<https://doi.org/10.1248/cpb.39.3254>

KITANAKA, S.; TAKIDO, M. (*S*)-5,7'-biphyscion 8-glucoside from *Cassia torosa*. **Phytochemistry**, v. 39, n. 3. p. 717–718, 1995.
[https://doi.org/10.1016/0031-9422\(94\)00955-S](https://doi.org/10.1016/0031-9422(94)00955-S)

KLIKA, K.; RICARTE, I.; TREVISAN, M. T. S.; SILVA, M. G. V.; OWEN, R. W. (2*R**,3*S**,4*S**,2''*R**,3''*S**)-guibourtinidol-(4*α*→8)-catechin, a biflavonoid procyanidin of the proguibourtinidin group from *Senna macranthera*: its relative stereochemistry and conformation. **Tetrahedron: asymmetry**, v. 26, p. 247–250, 2015.
<https://doi.org/10.1016/j.tetasy.2015.01.013>

KONISHI, Y.; KIYOTA, T.; DRAGHICI, C.; GAO, J.; YEBOAH, F.; ACOCA, S.; JARUSSOPHON, S.; PURISIMA, E. Molecular formula analysis by an MS/MS/MS technique to expedite dereplication of natural products. **Analytical Chemistry**, v. 79, n. 3, p. 1187–1197, 2007. <https://doi.org/10.1021/ac061391o>

KUO, Y.; LEE, P.; WEIN, Y. Four new compounds from the seeds of *Cassia fistula*. **Journal of Natural Products**, v. 65, n. 8, p. 1–3, 2002.
<https://doi.org/10.1021/np020003k>

KUMAR, D.; KARMASE, A.; JAGTAP, S.; SHEKHAR, R.; BHUTANI, K. K. Pancreatic lipase inhibitory activity of cassiamin A, a bianthraquinone from *Cassia siamea*. **Natural Product Communications**, v. 8, n. 0, p. 1–4, 2013.
<https://doi.org/10.1177/1934578x1300800216>

LAY-KEOW, N.; LAFONTAINE, P.; VANIER, M. Characterization of Cigarette Tobacco by Direct Electrospray Ionization-Ion Trap Mass Spectrometry (ESI-ITMS) Analysis of the Aqueous Extract – A Novel and Simple Approach. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 24, p. 7251–7257, 2004.
<https://doi.org/10.1021/jf040203x>

LEE, C.; LEE, P.; KUO, Y. The chemical constituents from the aril of *Cassia fistula* L. **Journal of the Chinese Chemical Society**, v. 48, n. 6A, p. 1053–1058, 2001.
<https://doi.org/10.1002/jccs.200100154>

LEE, E. H.; KIM, H. J.; SONG, Y. S.; JIN, C.; LEE, K.; CHO, J.; LEE, Y. S. Constituents of the stems and fruits of *Opuntia ficus-indica* var. *saboten*. **Archives of Phamarcal Research**, v. 26, n. 12, p. 1018–1023, 2003.
<https://doi.org/10.1007/BF02994752>

LI, Z.; GUO, H.; XU, W.; GE, J.; LI, X.; ALIMU, M.; HE, D. Rapid identification of flavonoid constituents directly from PTP1B inhibitive extract of raspberry (*Rubus idaeus* L.) leaves by HPLC-ESI-QTOF-MS-MS. **Journal of Chromatographic Science**, v. 54, n. 5, p. 805–810, 2016. <https://doi.org/10.1093/chromsci/bmw016>

LIN, S.; LAI, W.; HO, C.; YU, F.; CHEN, G.; YANG, J.; LIU, K.; LIN, M.; WU, P.; FAN, M.; CHUNG, J. Emodin induces apoptosis of human tongue squamous cancer SCC-4 cells through reactive oxygen species and mitochondria-dependent pathways. **Anticancer Research**, v. 29, p. 327, 2009.

- LIN, L.; SUN, J.; CHEN, P.; MONAGAS, M.J.; HARNLY, J.M. UHPLC-PDA-ESI/HRMSⁿ profiling method to identify and quantify oligomeric proanthocyanidins in plant products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n. 39, p. 9387–9400, 2014. <https://doi.org/10.1021/jf501011y>
- LOPEZ-AVILA, V.; YEFCHAK, G.; Mass spectral fragmentation studies of coumarin-type compounds using GC High-Resolution MS. **The Open Analytical Chemistry Journal**, v. 5, n. 1, p. 27–36, 2011. <https://doi.org/10.2174/187406500115010027>
- LORENZI, H. **Plantas daninhas do Brasil: terrestres, aquáticas, parasitas e tóxicas**. 3 ed. Nova Odessa, São Paulo: Instituto Plantarum, 608p., 2000.
- LORENZI, H. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. 2. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2008. 544 p.
- LORENZI, H. **Brazilian Trees: A Guide to the Identification and Cultivation of Brazilian Native Trees**. 1ed. Volume 3. Nova Odessa, São Paulo: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2009. 384 p.
- 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, p. 897–921, 2014.
- LUXIMON-RAMMAN, A.; BAHORUN, T.; SOBRATTEE, M. A.; ARUOMA, O. I. Antioxidant activities of phenolic, proanthocyanidin, and flavonoid components in extracts of *Cassia fistula*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 18, p. 5042–5047, 2002. <https://doi.org/10.1021/jf0201172>
- LYTHGOE, D.; VERNENGE, M. J. Alkaloids from *Cassia carnavall* Speng.: cassine and carnavaline. **Tetrahedron Letters**, v. 12, p. 1133–1137, 1967. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(00\)90651-8](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(00)90651-8)
- LYTHGOE, D.; BUSCH, A.; SCHVARZBERG, N.; VERNENGE, M. J. Minor alkaloids from *Cassia carnavall*. **Anales de La Asociación Química Argentina**, v. 60, p. 317–321, 1972.
- MABRY, T. J.; MARKHAM, K.R.; THOMAS, M.B. The ultraviolet spectra of flavones and flavonols. IN: *The systematic Identification of Flavonoids*. Springer-Verlag, 1970. https://doi.org/10.1007/978-3-642-88458-0_5
- MACEDO, M.; FERREIRA, A. R. Plantas medicinais usadas para tratamentos dermatológicos, em comunidades da Bacia do Alto Paraguai, Mato Grosso. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 14, n. 01, p. 40–44, 2004. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2004000300016>
- MAHASNEH, S. A.; MAHASNEH, A. M. Probiotics: a promising role in dental health. **Dentistry Journal**, v. 5, n. 4, p. 1–10, 2017. <https://doi.org/10.3390/dj5040026>
- MAHESH, V. K.; SHARMA, R.; SINGH, R. S. Anthraquinones and kaempferol from *Cassia* species section *fistula*. **Journal of Natural Products**, v. 47, n. 4, p. 733–751, 1984. <https://doi.org/10.1021/np50034a033>

MAKUNDI, E. A.; MALEBO, H. M.; MHAME, P.; KITUA, A.; WARSAME, M. Role of traditional healers in the management of severe malaria among children below five years of age: the case of Kilosa and Handeni Districts, Tanzania. **Malaria Journal**, v. 5, n. 58, p. 1–9, 2006. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-5-58>

MALLABAEV, A.; SIDYAKIN, G. P. Some features of the IR spectra of isocoumarins. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 8, n. 3, p. 276–277, 1972. <https://doi.org/10.1007/BF00563727>

MALIK, E. M.; MÜLLER, C. Anthraquinones as pharmacological tools and drugs. **Medicinal Research Reviews**, v. 36, n. 4, p. 705–748, 2016. <https://doi.org/10.1002/med.21391>

MANE, V.D.; RAJPUT, P.R.; MALPANI, M.O.; BHOKARE, D.D. Phytochemical investigation and antibacterial activity of various extract of *Cassia fistula* plant. **International Journal of Chemistry Research**, v. 3, n. 1, p. 13–16, 2012.

MARAZZI, B.; ENDRESS, P. K.; QUEIROZ, L. P.; CONTI, E. Phylogenetic relationships within *Senna* (Leguminosae, Cassiinae) based on three chloroplast DNA regions: patterns in the evolution of floral symmetry and extrafloral nectaries. **American Journal of Botany**, v. 93, n. 2, p. 288–302, 2006. <https://doi.org/10.3732/ajb.93.2.288>

MARKHAM, K. R.; WEBBY, R. F.; VILAIN. 7-*O*-methyl-(2*R*:3*R*)-dihydroquercetin 5-*O*- β -D-glucose and other flavonoids from *Podocarpus nivalis*. **Phytochemistry**, v. 23, n. 9, p.2049–2052, 1984. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)84968-7](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)84968-7)

MARKOVIĆ, Z.; MANOJLOVIĆ, N.; ZLATANOVIĆ, S. Electronic absorption spectra of substituted anthraquinones and their simulation using ZINDO/S method. **Journal of Serbian Society of Computational Mechanics**, v. 2, n. 2, p. 73–79, 2008.

MARTÍNEZ-ÁVILA, G. C. G.; CASTRO-LÓPEZ, C.; ROJAS, R. Screening of the *Cassia fistula* phytochemical constituents by UPLC-ESI-QTOF-MS². **Annals of Nutrition & Food Science**, v. 2, n. 2, p. 1–3, 2018.

MARTINS, Mário Machado. **Estudo fitoquímico e atividades antioxidante, antimicrobiana, antiprotozoária e citotóxica da espécie *Banisteriopsis oxyclada* (A. Juss.) B. Gates**. 2018. Tese de doutorado (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia,

MASIKE, K.; MHLONGO, M. I.; MUDAU, S. P.; NOBELA, O.; NCUBE, E. N.; TUGIZIMANA, F.; GEORGE, M. J.; MADALA, N. E. Highlighting mass spectrometric fragmentation differences and similarities between hydroxycinnamoyl-quinic acids and hydroxycinnamoyl-isocitric acids. **Chemistry Central Journal**, v. 11, n. 29, p. 1–7, 2017. <https://doi.org/10.1186/s13065-017-0262-8>

MASS BANK, High resolution mass spectral database. 2006 - disponível em <https://massbank.eu/MassBank/>

MCNICHOLL, B. P.; MCGRATH, J. W.; QUINN, J. P. Development and application of a resazurin-based biomass activity test for activated sludge plant management. **Water Research**, v. 41, p. 127–133, 2007. <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2006.10.002>

MDACHI, S. J. M. Naturally occurring mellein-type 3,4-dihydroisocoumarins and related lactones: synthetic approaches – a review. **Tanzania Journal of Science**, v. 42, p. 24–63, 2016

MELO, G. M. A.; SILVA, M. C. R.; GUIMARÃES, T. P.; PINHEIRO, K. M.; MATTA, C. B. B.; QUEIROZ, A. C.; PIVATTO, M.; BOLZANI, V. S.; ALEXANDRE-MOREIRA, M. S.; VIEGAS JÚNIOR, C. Leishmanicidal activity of the crude extract, fractions and major piperidine alkaloids from the flowers of *Senna spectabilis*. **Phytomedicine**, v. 21, p. 277–281, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2013.09.024>

MENDEZ, A. M. Aliphatic alcohols, β -sitosterol and alkaloids in *Cassia Jahnii*. **Phytochemistry**, v. 10, n. 9, p. 2255–2256, 1971. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)97241-8](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)97241-8)

MESELHY, M. R. Constituents from Moghat, the roots of *Glossostemon bruguieri* (Desf.). **Molecules**, v. 8, p. 624–621, 2003. <https://doi.org/10.3390/80800614>

MESQUITA, M. L.; GRELLIER, P.; MAMBU, L.; PAULA, J. E.; ESPINDOLA, L. S.; In vitro antiplasmodial activity of Brazilian Cerrado plants used as traditional remedies. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 110, n. 1, p. 165–170, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2006.09.015>

METLIN MS/MS *metabolite database*. 2018– disponível em www.lipidmaps.org; <https://metlin.scripps.edu>

MIKETOVA, P.; SCHRAM, K. H.; WHITNEY, J.; LI, M.; HUANG, R.; KERNS, E.; VALCIC, S.; TIMMERMANN, B. N.; ROURICK, R.; KLOHR, S. Tandem mass spectrometry studies of green tea catechins. Identification of three minor components in the polyphenolic extract of green tea. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 35, p. 860–869, 2000. [https://doi.org/10.1002/1096-9888\(200007\)35:7<860::AID-JMS10>3.0.CO;2-J](https://doi.org/10.1002/1096-9888(200007)35:7<860::AID-JMS10>3.0.CO;2-J)

MISHRA, B. B.; TIWARI, V. K. Natural products: an evolving role in future drug discovery. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, p. 4769–4807, 2011. <http://doi.org/10.1016/j.ejmech.2011.07.057>

MISHRA, S.; UPADHAYA, K.; MISHRA, K. B.; SHUKLA, A. K.; TRIPATHI, R. P.; TIWARI, V. K. In: Studies Natural products chemistry: bioactive natural products (Part XII), v. 49, Elsevier, 2016, p. 342.

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. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bfopcu.2014.05.001>

- MONGALO, N. I.; MAFOKO, B. J. *Cassia abbreviata* Oliv. A review of this ethnomedicinal use, toxicology, phytochemistry possible propagation techniques and pharmacology. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 7, n. 45, p. 2901–2906, 2013. <https://doi.org/10.5897/AJPP12.1017>
- MORITA, H.; OSHIMI, S.; HIRASAWA, Y.; KOYAMA, K.; HONDA, T.; EKASARI, W.; INDRAYANTO, G.; ZAINI, N. C. Cassiarins A and B, novel antiplasmodial alkaloids from *Cassia siamea*. **Organic Letters**, v. 9, n. 18, p. 3691–3693, 2007. <https://doi.org/10.1021/ol701623n>
- MUSCHIETTI, L. V.; MARTINO, V. S. Atividades biológicas dos flavonoids naturais. In: YUNES, R. A. & CECHINEL-FILHO, V. (Orgs.). **Química de produtos naturais, novos fármacos e a moderna farmacognosia**. Itajaí: Univale, 2012. p. 193–226.
- MUTHAURA, C. N.; RUKUNGA, G. M.; CHHABRA, S. C.; MUNGAI, G. M.; NJAGI, E. N. M. Traditional antimalarial phytotherapy remedies used by the Kwale community of the Kenyan Coast. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 114, p. 377–386, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2007.08.033>
- NAVARRO-NÚÑEZ, L.; LOZANO, M. L.; MARTÍNEZ, C.; VICENTE, V.; RIVERA, J. Effect of quercetin on platelet spreading on collagen and fibrinogen and on multiple platelet kinases **Fitoterapia**, v. 81, p. 75–80, 2010. <http://doi.org/10.1016/j.fitote.2009.08.006>
- NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the nearly four decades from 01/1981 to 09/2019. **Journal of Natural Products**, v. 83, p. 770–803, 2020. <http://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.9b01285>
- NG, K.; SCHORR, C.; REBOLI, A. C.; ZANOTTI, S.; TSIGRELIS, C. Incidence and mortality of sepsis, severe sepsis, and septic shock in intensive care unit patients with candidemia. **Infectious Diseases**, v. 47, n. 8, p. 584–587, 2015. <https://doi.org/10.3109/23744235.2015.1028100>
- ODEJA, O.; OBI, G.; OGWUCHE, C.E.; ELEMIKE, E.E.; ODERINLO, Y. Phytochemical screening, antioxidant and antimicrobial activities of *Senna occidentalis* (L.) leaves extract. **Clinical Phytoscience**, v. 1, p. 1–6, 2015. <https://doi.org/10.1186/s40816-015-0007-y>
- OLIVEIRA, D. M.; SILVA, T. F. R.; MARTINS, M. M.; MORAIS, S. A. L.; CHANG, R.; AQUINO, F. J. T.; SILVA, C. V.; TEIXEIRA, T. L.; MARTINS, C. H. G.; MORAES, T. S.; CUNHA, L. C. S.; PIVATTO, M.; OLIVEIRA, A. Antifungal and cytotoxicity activities of *Banisteriopsis argyrophylla* leaves. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 70, n. 11, p. 1541–1552, 2018. <https://doi.org/10.1111/jphp.12996>
- OSHIMI, S.; TOMIZAWA, Y.; HIRASAWA, Y.; HONDA, T.; EKASARI, W.; WIDYAWARUYANTI, A.; RUDYANTO, M.; INDRAYANTO, G.; ZAINI, N. C.; MORITA, H. Chrobisiamone A, a new bischromone from *Cassia siamea* and a biomimetic transformation of a 5-acetyl-7-hydroxy-2-methylchromone into cassiarin A. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 18, n. 13, p.3761–3763, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2008.05.041>

PARK, Y.; MOON, B.; LEE, E.; LEE, Y.; YOON, Y.; AHN, J.; LIM, Y. Spectra assignments and reference data. ^1H and ^{13}C -NMR data of hydroxyflavone derivatives. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 45, n. 8, p. 674–679, 2007.

<https://doi.org/10.1002/mrc.2010>

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; VYVYAN, J. R. **Introdução à espectroscopia**. 4. ed. São Paulo: Cengage Learning, 2010. 700 p.

PEREIRA, M. N.; JUSTINO, A. B.; MARTINS, M. M.; PEIXOTO, L. G.; VILELA, D. D.; SANTOS, P. S.; TEIXEIRA, T. L.; SILVA, C. V.; GOULART, L. R.; PIVATTO, M.; ESPINDOLA, F. S. Stephalagine, an alkaloid with pancreatic lipase inhibitory activity isolated from the fruit peel of *Annona crassiflora* Mart. **Industrial crops and products**, v. 97, p. 324–329, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.12.038>

PETERS, R. H.; SUMNER, H. H. Spectra of anthraquinone derivatives. **Journal of the Chemical Society**, v. 0, p. 2101–2110, 1953. <https://doi.org/10.1039/JR9530002101>

PFALLER, M. A. Antifungal drug resistance: mechanisms, epidemiology, and consequences for treatment. **The American Journal of Medicine**, v. 125, p. 3–13, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2011.11.001>

PICCINELLI, A. L.; MESA, M. G.; ARMENTEROS, D. M.; ALFONSO, M. A.; AREVALO, A. C.; CAMPONE, L.; RASTRELLI, L. HPLC-PDA-MS and NMR characterization of C-glycosyl flavones in a hydroalcoholic extract of *Citrus aurantifolia* leaves with antiplatelet activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 1574–1581, 2008. <https://doi.org/10.1021/jf073485k>

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

PIVATTO, M.; CROTTI, A. E. M.; LOPES, N. P.; CASTRO-GAMBOA, I.; REZENDE, A.; VIEGAS JÚNIOR, C.; YOUNG, M. C. M.; FURLAN, M.; BOLZANI, V. S. Electrospray ionization mass spectrometry screening of piperidine alkaloids from *Senna spectabilis* (Fabaceae) extracts: Fast identification of new constituents and co-metabolites. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 16, n. 6B, p. 1431–1438, 2005. <https://doi.org/10.1590/S0103-50532005000800023>

PIVATTO, M.; BACCINI, L. R.; SHARMA, A. NAKABASHI, M.; DANUELLO, A.; VIEGAS JÚNIOR, C.; GARCIA, C. R. S.; BOLZANI, V. S. Antimalarial activity of piperidine alkaloids from *Senna spectabilis* and semisynthetic derivatives. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 25, n. 10, p. 1900–1906, 2014. <https://doi.org/10.5935/0103-5053.20140195>

PRATA, V. M.; EMÍDIO, E. S.; DÓREA, H. S. Aplicação de métodos quimiométricos na caracterização de charutos utilizando extração por dispersão da matriz em fase sólida e análise por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas. **Química Nova**, v. 34, n. 1, p. 53–58, 2011. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422011000100011>

QUEIROZ, E. F.; WOLFENDER, J.; HOSTETTMANN, K.; VIEIRA, P. C. **Princípios ativos de plantas superiores**. 2 ed. São Carlos: EdUFScar, 2014. 232 p.

QUINTERO, A.; FABBRO, R.; MAILLO, M.; BARRIOS, M.; MILANO, M. B.; FERNÁNDEZ, A.; WILLIAMS, B.; MICHELANGELI, F.; RANGEL, H. R.; PUJOL, F. H. Inhibition of hepatitis B virus and human immunodeficiency virus (HIV-1) replication by *Warscewiczia coccinea* (Vahl) Kl. (Rubiaceae) ethanol extract. **Natural product research**, v. 25, n. 16, p. 1565–1569, 2011. <http://dx.doi.org/10.1080/14786419.2010.535164>

QU, J.; WANG, Y.; LUO, G.; WU, Z. Identification and determination of glucuronides and their aglycones in *Erigeron breviscapus* by liquid chromatography – tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 928, n. 2, p. 155–162, 2001.

RAHMAN, A. H. M. M.; PARVIN, M. I. A. Study of medicinal uses on Fabaceae family at Rajshahi, Bangladesh. **Research in Plant Sciences**, v. 2, n. 1, p. 6–8, 2014. <https://doi.org/10.12691/plant-2-1-2>

RAHMAN, M. O.; RAHMAN, M. Z.; BEGUM, A. Numerical taxonomy of the genus *Senna* Mill from Bangladesh. **Bangladesh Journal of Plant Taxonomy**, v. 20, n. 1, p. 77–83, 2013. <https://doi.org/10.3329/bjpt.v20i1.15467>

RAJNI, GAUTAM, S.S., NAVNEET. Antibacterial and phytochemical analysis of *Cassia occidentalis* L. seeds against respiratory tract pathogens. **Indian Journal of Natural Products and Resources**, v. 5, n. 1, p. 52–55, 2014.

RIJKE, E.; OUT, P.; NIESSE, W. M. A.; ARIESE, F.; GOOIJER, C.; BRINKMAN, U. A. T. Analytical separation and detection methods for flavonoids. **Journal of Chromatography A**, v. 1112, p. 31–63, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.01.019>

RÍOS, J. L.; RECIO, M. C. Medicinal plants and antimicrobial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, p. 80–84, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.04.025>

ROCHFORT, S. Metabolomics reviewed: a new “Omics” platform technology for systems biology and implications for natural products research. **Journal of Natural Products**, v. 68, n. 12, p. 1813–1820, 2005. <https://doi.org/10.1021/np050255w>

RODRIGUES, C. M.; RINALDO, D.; SANTOS, L. C.; MONTORO, P.; PIACENTE, S.; PIZZA, C.; HIRUMA-LIMA, C. A.; BRITO, A. R. M. S.; VILEGAS, W. Metabolic fingerprinting using direct flow injection electrospray ionization tandem mass spectrometry for the characterization of proanthocyanidins from the barks of *Hancornia speciosa*. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 21, n. 12, p. 1907–1914, 2007. <https://doi.org/10.1002/rcm.3036>

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, p. 103–107, 2006. <https://doi.org/10.1007/s00436-006-0126-y>

- SAEED, A. Isocoumarins, miraculous natural products blessed with diverse pharmacological activities. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 166, p. 290–317, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.03.025>
- SAMY, R. P.; IGNACIMUTHU, S.; SEN, A. Screening of 34 Indian medicinal plants for antibacterial properties. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 62, p. 173–182, 1998. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(98\)00057-9](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(98)00057-9)
- SANTOS, R. N.; SILVA, M. G. V.; BRAZ-FILHO, R. Constituintes químicos do caule de *Senna reticulata* Willd. (Leguminosae). **Química Nova**, v. 31, n. 8, p. 1979–1981, 2008. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422008000800011>
- SANTRA, S.; BAUMANN, U. Experience of nitisinone for the pharmacological treatment of hereditary tyrosinaemia type 1. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v. 9, n. 7, p. 1229–1236, 2008. <https://doi.org/10.1517/14656566.9.7.1229>
- SARDI, J. C. O.; SCORZONI, L.; BERNARDI, T.; FUSCO-ALMEIDA, A. M.; GIANNINI, M. J. S. M. *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. **Journal of Medicinal Microbiology**, v. 62, n. 1, p. 10–24, 2013. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.045054-0>
- SAVI, L.A.; CAON, T.; OLIVEIRA, A. P.; SOBOTTKA, A. M.; WERNER, W.; REGINATTO, F. H.; SCHENKEL, E. P.; BARARDI, C. R. M.; SIMÕES, C. M. O. Evaluation of antirotavirus activity of flavonoids. **Fitoterapia**, v. 81, p. 1142, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2010.07.017>
- SCIO, E.; MENDES, R. F.; MOTTA, E. V. S.; BELLOZI, P. M. Q.; ARAGÃO, D. M. O.; MELLO, J.; FABRI, R. L.; MOREIRA, J. R.; ASSIS, I. V. L.; BOUZADA, M. L. M. Antimicrobial and antioxidante activities of some plant extracts. In: Phytochemicals as nutraceuticals – global approaches to their role in nutritional and health. InTech: Croatia, 2012. 278 p. <https://doi.org/10.5772/27308>
- SHIMADA, A.; KUSANO, M.; TAKEUCHI, S.; FUJIOKA, S.; INOKUCHI, T.; KIMURA, Y. Aspteric acid and 6-hydroxymellein, inhibitors of pollen development in *Arabidopsis thaliana*, produced by *Aspergillus terreus*. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 57, n. 5–6, p. 459–464, 2002. <https://doi.org/10.1515/znc-2002-5-610>
- SILVA, J. G. A.; MONTEIRO, J. A.; FERREIRA, E. B.; FERNANDES, M. I. B.; PESSOA, C. O.; SAMPAIO, C. G.; SILVA, M. G. V. Total phenolic content, antioxidant and anticancer activities of four species of *Senna* Mill. From northeast Brazil. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 6, n. 7, p. 199–202, 2014.
- SILVA, F. O.; OLIVEIRA, I. R.; SILVA, M. G. V.; BRAZ-FILHO, R. Constituintes químicos das folhas de *Senna spectabilis* (DC) Irwin & Barneby var. *excelsa* (Schrad.) Irwin & Barneby. **Química Nova**, v. 33, n. 9, p. 1874–1876, 2010. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422010000900010>

SILVA, J. G. A.; SILVA, A. A.; COUTINHO, I. D.; PESSOA, C. O.; CAVALHEIRO, A. J.; SILVA, M. G. V. Chemical profile and cytotoxic activity of leaf extracts from *Senna* spp. from northeast of Brazil. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 27, n. 10, p. 1872–1880, 2016. <https://doi.org/10.5935/0103-5053.20160073>

SILVA, T. C.; JUSTINO, A. B.; PRADO, D. G.; KOCH, G. A.; MARTINS, M. M.; SANTOS, P. S.; MORAIS, S. A. L.; GOULART, L. R.; CUNHA, L. C. S.; SOUSA, R. M. F.; ESPINDOLA, F. S.; OLIVEIRA, A. Chemical composition, antioxidant activity and inhibitory capacity of α -amylase, α -glucosidase, lipase and non-enzymatic glycation, *in vitro*, of the leaves of *Cassia bakeriana* Craib. **Industrial Crops & Products**, v. 140, p. 1–13, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.111641>

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 7. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2007. 490 p.

SIMPSON, D.; AMOS, S. **Other plant metabolites**. In: BADAL, S.; DELGODA, R. (Ed.) **Pharmacognosy: fundamentals, applications and strategy**. London: Academic Press, 2017. Cap. 12, p. 267–280. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802104-0.00012-3>

SINGH, J. Two chromone glycosides from *Cassia multijuga*. **Phytochemistry**, v. 21, n. 5, p. 1177–1179, 1982. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)82449-8](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)82449-8)

SINGH, M.; SINGH, J. Phytochemical investigation of *Cassia spectabilis* seeds isolation and structural studies of two new flavone glycosides. **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 40b, p. 550–552, 1985. <https://doi.org/10.1515/znb-1985-0419>

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, p. 7999–8002, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2008.05.125>

SOB, S. V. T.; WABO, H. K.; TCHINDA, A. T.; TANE, P.; NGADJUI, B. T.; YE, Y. Anthraquinones, sterols, triterpenoids and xanthenes from *Cassia obtusifolia*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 38, p. 342–345, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2010.02.002>

SOBEH, M.; MAHMOUD, M.F.; HASAN, R.A.; CHENG, H.; EL-SHAZLY, A.; WINK, M. *Senna singueana*: antioxidant, hepatoprotective, antiapoptotic properties and phytochemical profiling of a methanol bark extract. **Molecules**, v. 22, p. 1–15, 2017. <https://doi.org/10.3390/molecules22091502>

SOBEH, M.; MAHMOUD, M.F.; ABDELFAH, M.A.O.; CHENG, H.; EL-SHAZLY, A.; WINK, M. A proanthocyanidin-rich extract from *Cassia abbreviata* exhibits antioxidant and hepatoprotective activities *in vivo*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 213, p. 38–47, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2017.11.007>

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, p. 1230–1236, 2008. <https://doi.org/10.1002/bmc.1050>

SOUZA, A. M.; POPPI, R. J. Experimento didático de quimiometria para a análise exploratória de óleos vegetais comestíveis por espectrometria no infravermelho médio e análise de componentes principais: um tutorial, parte I. **Química Nova**, v. 35, n 1, p. 223–229, 2012. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422012000100039>

SOUZA, S. P.; PEREIRA, L. L. S.; SOUZA, A. A.; SANTOS, C. D. Seleção de extratos brutos de plantas com atividade antiobesidade. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, n. 4, p. 643–648, 2012. <https://doi.org/10.1590/S1516-05722012000400011>

SOUZA, V. C.; BORTOLUZZI, R. L. C. Cassia In: **Catálogo de plantas e fungos do Brasil**, v. 2, Rio de Janeiro: Andrea Jakobsson Estúdio: Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2010, p. 828.

SPRENT, J.I. **Legume Nodulation: A Global Perspective**. Ames. Iowa: Wiley-Blackwell, 2009. 183 p. <https://doi.org/10.1002/9781444316384>

TAN, J.; ZHENG, M.; DUAN, S.; ZENG, Y.; ZHANG, Z.; CUI, Q.; ZHANG, J.; HONG, T.; BAI, J.; DU, S. Chemical profiling and screening of the marker components in the fruit of *Cassia fistula* by HPLC and UPLC/LTQ-Orbitrap MSⁿ with chemometrics. **Molecules**, v.23, p. 1–18, 2018. <https://doi.org/10.3390/molecules23071501>

TANDON, V. K.; CHHOR, R. B.; SINGH, R. V.; RAI, S.; YADAV, D. B. Design, synthesis and evaluation of novel 1,4-naphthoquinone derivatives as antifungal and anticancer agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 14, p. 1079–1083, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2004.01.002>

TEANGPOOK, C.; PUMINAT, W.; TITATARN, Y.; ONHEM, S.; PAOSANGTONG, U. Effect of boiling on anhydrobarakol content of khilek (*Siamese cassia*) young flowers. **Pakistan Journal of Nutrition**, v. 11, n. 12, p.1125–1130, 2012. <https://doi.org/10.3923/pjn.2012.1125.1130>

TIWARI, R. D.; SINGH, J. Anthraquinone pigments from *Cassia occidentalis*. **Planta Medica**, v. 32, p. 375–377, 1977. <https://doi.org/10.1055/s-0028-1097616>

TRENTIN, D. S.; GIORDANI, R. B.; ZIMMER, K. R.; SILVA, A. G. SILVA, M. V.; CORREIA, M. T. S.; BAUMVOL, I. J. R.; MACEDO, A. J. Potential of medicinal plants from the Brazilian semi-arid region (Caatinga) against *Staphylococcus epidermidis* planktonic and biofilm lifestyles. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 137, n. 1, p. 327–335, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2011.05.030>

USMAN, A.; THOSS, V.; DARKO, G.; ITODO, A. U. Determination of triacylglycerol composition of *Trichilia emetica* seed oil using GC-MS and ¹H-NMR spectroscopy. **Advances in Analytical Chemistry**, v. 6, n. 1, p. 10–16, 2016. <https://doi.org/10.5923/j.aac.20160601.02>

VALLI, M.; PIVATTO, M.; DANUELLE, A.; CASTRO-GAMBOA, I.; SILVA, D. H. S.; CAVALHEIRO, A. J.; ARAÚJO, A. R.; FURLAN, M.; LOPES, M. N.; BOLZANI, V. S. Tropical biodiversity: has it been a potential source of secondary metabolites useful for medicinal chemistry? **Química Nova**, v. 35, n. 11, p. 2278–2287, 2012. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422012001100036>

VAN GORKOM, B. A. P.; DE VRIES, E. G. E.; KARRENBELD, A.; KLEIBEUKER, J. H. Review article: anthranoid laxatives and their potential carcinogenic effects. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v. 13, p. 443–452, 1999. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2036.1999.00468.x>

VARGHESE, G. K.; BOSE, L. V.; HABTEMARIAM, S. Antidiabetic componentes of *Cassia alata* leaves: identification through α -glucosidase inhibition studies. **Pharmaceutical Biology**, v. 51, n. 3, p. 345–349, 2013. <https://doi.org/10.3109/13880209.2012.729066>

VENKATASUBBAIAH, P.; CHILTON, W. S. Toxins produced by the dogwood anthracnose fungus *Discula* sp. **Journal of Natural Products**, v. 54, n. 5, p. 1293–1297, 1991. <https://doi.org/10.1021/np50077a009>

VIACAVA, G. E.; ROURA, S. I.; BERRUETA, L. A.; IRIONDO, C.; GALLO, B.; ALONSO-SALCES, R. M. Characterization of phenolic compounds in green and red oak-leaf lettuce cultivars by UHPLC-DAD-ESI-QTOF/MS using MS^E scan mode. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 52, n. 12, p. 873 – 902, 2017. <https://doi.org/10.1002/jms.4021>

VIEGAS JÚNIOR, C.; BOLZANI, V. S.; FURLAN, M.; BARREIRO, E. J.; YOUNG, M. C. M.; TOMAZELA, D.; EBERLIN, M. N. Further bioactive piperidine alkaloids from the flowers and green fruits of *Cassia spectabilis*. **Journal of Natural Products**, v. 67, p. 908–910, 2004. <https://doi.org/10.1021/np0303963>

VIEGAS JÚNIOR, C.; BOLZANI, V. S.; PIMENTEL, L. S. B.; CASTRO, N. G.; CABRAL, R. F.; COSTA, R. S.; FLOYD, C.; ROCHA, M. S.; YOUNG, M. C. M.; BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. New selective acetylcholinesterase inhibitors designed from natural piperidine alkaloids. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 13, n. 13, p. 4184–4190, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2005.04.030>

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

VIEGAS JÚNIOR, C.; PIVATTO, M.; REZENDE, A.; HAMERSKI, L.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S. (–)-7-hydroxycassine: a new 2,6-dialkylpiperidin-3-ol alkaloid and other constituents isolated from flowers and fruits of *Senna spectabilis* (Fabaceae). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 24, n. 2, p. 230–235, 2013. <https://doi.org/10.5935/0103-5053.20130029>

- VILLASEÑOR, I. M.; SANCHEZ, A. C. Cassiaindoline, a new analgesic and anti-inflammatory alkaloid from *Cassia alata*. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 64c, p. 335–338, 2009. <https://doi.org/10.1515/znc-2009-5-605>
- WAGNER H.; BLADT S. **Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas**, 2nd ed. Berlin: Springer, 2001. 384 p.
- WANG, H.; FENG, F. Identification of components in Zhi-Zi-Da-Huang decoction by HPLC coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry, photodiode array and fluorescence detectors. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 49, p. 1157–1165, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2009.02.023>
- WANG, T.; LI, Q.; BI, K. Bioactive flavonoids in medicinal plants: structure, activity and biological fate. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 13, p. 12–23, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.ajps.2017.08.004>
- WANG, Y.; YANG, L.; HE, Y.; WANG, C.; WELBECK, E. W.; BLIGH, S. W.; WANG, Z. 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. <https://doi.org/10.1002/rcm.3536>
- WHIBLEY, N.; GAFFEN, S. L. Beyond *Candida albicans*: mechanisms of immunity to non-*albicans* *Candida* species. **Cytokine**, v. 76, n. 1, p. 42–52, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2015.07.025>
- WHITMORE, S. E.; LAMONT, R. J. Oral bacteria and cancer. **PLoS Pathogens**, v. 10, n. 3, p. 1–3, 2014. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003933>
- WINTER, R. W.; CORNELL, K. A.; JOHNSON, L. L.; ISABELLE, L. M.; HINRICHS, D. J.; RISCOE, M. K. Hydroxy-anthraquinones as antimalarial agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 5, n. 17, p. 1927–1932, 1995. [https://doi.org/10.1016/0960-894X\(95\)00326-O](https://doi.org/10.1016/0960-894X(95)00326-O)
- WISHART, D. S.; FEUNANG, Y. D.; MARCU, A.; GUO, A. C.; LIANG, K. HMDB 4.0 – The Human Metabolome Database for 2018. **Nucleic Acids Research**, v. 46, n. 1, p. 608–617. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1089>
- WOJCIECHOWSKI, M. F.; LAVIN, M.; SANDERSON, M. J. A phylogeny of legumes (Leguminosae) based on analysis of the plastid matK gene resolves many well-supported sub clades within the family. **American Journal of Botany**, v. 91, n. 11, p. 1846–1862, 2004. <https://doi.org/10.3732/ajb.91.11.1846>
- WOJTANOWSKI, K. K.; MROCZEK, T. Study of a complex secondary metabolites with potent anti-radical activity by two dimensional TLC/HPLC coupled to electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry and bioautography. **Analytica Chimica Acta**, v. 1029, p. 104–115, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2018.03.066>

WU, W.; MASSART, D. L.; JONG, S. The kernel PCA algorithms for wide data. Part I: theory and algorithms. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 36, p. 165–172, 1997. [https://doi.org/10.1016/S0169-7439\(97\)00010-5](https://doi.org/10.1016/S0169-7439(97)00010-5)

WUTHI-UDOMLERT, M.; KUPITTAYANANT, P.; GRITSANAPAN, W. In vitro evaluation of antifungal activity of anthraquinone derivatives of *Senna alata*. **Journal of Health Research**, v. 24, n. 3, p. 117–122, 2010.

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, p. 758–764, 2000. <https://doi.org/10.1038/sj.ijo.0801222>

YANG, W.; QIAO, X.; BO, T.; WANG, Q.; GUO, A.; YE, M. Low energy induced hemolytic fragmentation of flavonol 3-*O*-glycosides by negative electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 28, n. 4, p. 385–395, 2014. <https://doi.org/10.1002/rcm.6794>

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, p. 82–91, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.jasms.2006.08.009>

YEON, J.; BAE, Y. J.; KIM, E.; LEE, E. Association between flavonoid intake and diabetes risk among the Koreans. **Clinica Chimica Acta**, v. 439, p. 225–230, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2014.10.042>

ZAID, A. N.; ZOHUD, N.; E'LAYAN, B.; ABURADI, T.; JARADAT, N.; ALI, I.; HUSSEIN, F.; GHANEM, M.; QADDOMI, A.; ZAAROR, Y. A. Pharmacodynamic testing and new validated HPLC method to assess the interchangeability between multi-source orlistat capsules. **Drug Design Development and Therapy**, v. 11, p. 3291–3298, 2017. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S138926>

ZHANG, X.; HUANG, H.; ZHAO, X.; LU, Q.; SUN, C.; LI, X.; CHEN, K. Effects of flavonoids-rich Chinese bayberry (*Myrica rubra* Sieb. et Zucc.) pulp extracts on glucose consumption in human HepG2 cells. **Journal of Functional Foods**, v. 14, p. 144–153, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.01.030>