

Universidade Federal de Uberlândia

DIEGO GODINA PRADO

**Estudo químico e avaliação da atividade antidiabética dos extratos das  
cascas da *Cassia bakeriana* Craib**

**Uberlândia**

**2021**

DIEGO GODINA PRADO

**Estudo químico e avaliação da atividade antidiabética dos extratos das cascas da *Cassia bakeriana* Craib**

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

**Área de Concentração:** Química Orgânica

**Orientador:** Prof. Dr. Alberto de Oliveira

**Coorientador:** Prof. Dr. Sérgio Antônio Lemos de Moraes

**Uberlândia**

**2021**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

---

P896e  
2021 Prado, Diego Godina.  
Estudo químico e avaliação da atividade antidiabética dos extratos das cascas da *Cassia bakeriana Craib* [recurso eletrônico] / Diego Godina Prado. - 2021.

Orientador: Alberto de Oliveira.  
Coorientador: Sérgio Antônio Lemos de Morais  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia.  
Programa de Pós-Graduação em Química.  
Modo de acesso: Internet.  
Disponível em: <http://doi.org/10.14393/ufu.di.2021.5607>  
Inclui bibliografia.  
Inclui ilustrações.

1. Química. I. Oliveira, Alberto de., (Orient.). II. Morais, Sérgio Antônio Lemos de. III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Química. IV. Título.

---

CDU: 52

Glória Aparecida  
Bibliotecária - CRB-6/2047



## UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Química  
Av. João Naves de Ávila, 2121, Bloco 5I - Bairro Santa Mônica, Uberlândia-MG, CEP  
38400-902  
Telefone: (34) 3239-4385 - www.cpgquimica.iq.ufu.br - cpgquimica@ufu.br



### ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	Química				
Defesa de:	Dissertação de Mestrado Acadêmico, 330, PPGQUI				
Data:	Vinte e sete de agosto de dois mil e vinte e um	Hora de início:	14:00	Hora de encerramento:	16:00
Matrícula do Discente:	11912QMI005				
Nome do Discente:	Diego Godina Prado				
Título do Trabalho:	Estudo químico e avaliação da atividade antidiabética dos extratos das cascas da <i>Cassia bakeriana</i> Craib				
Área de concentração:	Química				
Linha de pesquisa:	Química Medicinal, Química de Produtos Naturais e Síntese Orgânica				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	Estudo químico e biológico de espécies do Cerrado				

Reuniu-se por meio de webconferência, Plataforma Google Meet, link <https://meet.google.com/dek-yzzf-qtg>, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Química, assim composta: Professores Doutores: Marisi Gomes Soares, da Universidade Federal de Alfenas; Bruno Henrique Sacoman Torquato da Silva, da Universidade Federal de Uberlândia e Alberto de Oliveira, orientador do candidato.

Iniciando os trabalhos o presidente da mesa, Dr. Alberto de Oliveira, apresentou a Comissão Examinadora e o candidato, agradeceu a presença do público, e concedeu ao Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa.

A seguir o senhor(a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos(às) examinadores(as), que passaram a arguir o(a) candidato(a). Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o(a) candidato(a):

Aprovado.

Esta defesa faz parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre.

O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação

interna da UFU.



Documento assinado eletronicamente por **Alberto de Oliveira, Professor(a) do Magistério Superior**, em 27/08/2021, às 16:04, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Bruno Henrique Sacoman Torquato da Silva, Professor(a) do Magistério Superior**, em 27/08/2021, às 16:04, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Marisi Gomes Soares, Usuário Externo**, em 27/08/2021, às 16:05, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://www.sei.ufu.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **2964078** e o código CRC **4DBE3869**.

---

**Referência:** Processo nº 23117.052744/2021-31

SEI nº 2964078

## **Agradecimentos**

Agradeço primeiramente a Deus.

Agradeço a minha família, meu pai Raul José, minha mãe Elizabete Godina e minhas irmãs Beatriz Godina e Luciene Aparecida, pelo apoio e suporte.

Agradeço ao pessoal do Nuppen pelo acolhimento e suporte ao longo da realização desse trabalho, e em especial agradeço a Tiara da Costa Silva e o professor Luiz Carlos Scalon Cunha pelas contribuições na realização desse trabalho.

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

Agradeço ao prof. Dr. Foued Salmen Spindola e ao Dr. Allisson Benatti Justino do Instituto de Genética e Bioquímica da UFU pela realização das atividades inibitórias enzimáticas e o prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart e o Dr. Mário Machado do Instituto de Genética e Bioquímica da UFU pelas análises de espectrometria de massas.

Ao Instituto de Química da UFU, o programa de pós graduação em química e a UFU pelo espaço cedido para a realização deste projeto.

A bolsa concedida pela CAPES ao longo do mestrado e o apoio financeiro concedido pela FAPEMIG (Projeto APQ-01612-18) e ao CNPq.

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

## RESUMO

A *Cassia bakeriana* é uma espécie originária da Tailândia pertencente à família Fabaceae e ao gênero *Cassia*, que apresenta grande importância dentro dessa família. Diversos metabólitos secundários (especializados) já foram isolados das espécies de *Cassia*, além de relatos do uso na medicina tradicional de várias partes das plantas para o tratamento da hanseníase, infecções por micose, doenças oftálmicas, de pele e hepáticas. Como a *C. bakeriana* possui poucos estudos publicados na literatura, neste trabalho foi avaliada a composição química e as atividades antioxidante e biológicas das cascas. Dessa forma, foram preparados os extratos hexânico (EH) e etanólico (EE) das cascas por maceração, seguido do fracionamento via extração líquido-líquido do EE com solventes de polaridade crescente, obtendo as frações diclorometano (FD), acetato de etila (FAE), *n*-butanol (FB) e aquosa (FA). Em relação aos ensaios, a capacidade antioxidante foi avaliada pelos métodos da capacidade de absorção do radical de oxigênio (ORAC) e do sequestro do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH). No método ORAC os valores obtidos para o EE e para as FD, FAE e FB foram bem acima dos valores obtidos para o controle ácido ascórbico ( $2498,50 \pm 109,60 \mu\text{mol trolox}_{\text{eq}} \text{g}_{\text{amostra}}^{-1}$ ), sendo o valor mais expressivo para a FD com  $4514,37 \pm 176,03 \mu\text{mol trolox}_{\text{eq}} \text{g}_{\text{amostra}}^{-1}$ . Em relação ao método DPPH, os valores de  $\text{CI}_{50}$  ficaram um pouco acima aos observados para o controle ( $4,07 \pm 1,21 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) e o melhor resultado foi para a FAE com inibição do radical em  $93,30 \pm 0,57\%$  e  $\text{CI}_{50}$  de  $25,90 \pm 3,2 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Também foram avaliadas as atividades antidiabética através da capacidade dos extratos e frações de inibirem as enzimas  $\alpha$ -amilase e  $\alpha$ -glicosidase, com o melhor resultado obtido para a inibição da enzima  $\alpha$ -amilase pela FAE com percentual de inibição de  $94,00 \pm 1,13\%$  e  $\text{CI}_{50}$  de  $1,05 \pm 0,21 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Em relação a inibição da glicação, a FB apresentou valores promissores com inibição de  $85,15 \pm 2,47\%$  e  $\text{CI}_{50}$  de  $76,95 \pm 5,87 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Através da espectrometria de massas (EM) foi possível identificar os compostos presentes no EE e nas FAE, FD e FB, que foram as mais ativas. As principais classes de metabólitos identificados foram flavonoides, proantocianidinas e antraquinonas, que podem ser responsáveis pelas atividades apresentadas. Foi a primeira vez que as atividades antioxidante e antidiabética foram avaliadas para as cascas e também a primeira avaliação da composição química completa do EE e frações. Estes resultados demonstram que os extratos e frações das cascas da *C. bakeriana* são promissores como fontes de compostos bioativos, além da contribuição para a quimiossistemática do gênero.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Cassia*, *Cassia bakeriana*, DPPH, ORAC, antidiabéticos, antioxidante, CLAE-IES-EM, proantocianidinas, flavonoides, antraquinonas.

## ABSTRACT

*Cassia bakeriana* is a species found in Thailand and belongs to the Fabaceae family and the *Cassia* genus, which has great importance within this family. Several specialized metabolites have been isolated from *Cassia* species, in addition to the reports of the use of many parts of this plant in traditional medicine, for the treatment of hanseniasis, mycoses, eye infections, skin, and hepatic diseases. As *C. bakeriana* does not have many studies published in the literature, in this work, we evaluated the chemical composition, the antioxidant activities, and the biologic activities of the bark. Then, the hexane extract (EH) and ethanol extract (EE) were prepared by maceration, and the fractionation by liquid-liquid extraction of the EE with solvents of increasing polarity, obtaining the dichloromethane fractions (FD), ethyl acetate (FEA), *n*-butanol (FB) and water (FA). Regarding the tests, the antioxidant capacity was evaluated by ORAC and DPPH methods. In the ORAC method, the values obtained for the EE and for FD, FAE and FB were well above the values obtained for the control (ascorbic acid), and the best results were FD with  $4514.37 \pm 176.03 \mu\text{mol trolox}_{\text{eq}} \text{g}_{\text{sample}}^{-1}$ . Regarding the DPPH method, the  $\text{IC}_{50}$  values were slightly above those observed for the control, the best result was FAE with 93,30% of radical inhibition and  $\text{IC}_{50}$  de  $25.90 \pm 3.2 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Also, the capacity inhibitory activities of  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase enzymes from extracts and fractions were evaluated. The most important result was the  $\alpha$ -amylase inhibition by FEA with  $94.00 \pm 1.13\%$  of inhibition and  $\text{IC}_{50}$  of  $1.05 \pm 0.21 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Another activity evaluated was the glycation inhibitory capacity, with FB showing the most promising value with inhibition of  $85.15 \pm 2.47\%$  and  $\text{IC}_{50}$  of  $76.95 \pm 5.87 \mu\text{g mL}^{-1}$ . By Mass Spectrometry (MS) it was possible to identify many of the compounds in the EE, FEA, FD, and FB, which were the most active ones. The main classes of the identified metabolites were flavonoids, proanthocyanidins and anthraquinones, which can be the responsible for the activities shown in the extracts and fractions. It was the first time that the antioxidant and antidiabetic activities for the bark were evaluated and the first complete chemical composition for the EE and other fractions. These studies showed that extracts and fractions on the *C. bakeriana* are promising sources of bioactive compounds, in addition to the contribution to the chemosystematics of the genre.

Keywords: *Cassia*, *Cassia bakeriana*, DPPH, ORAC, antidiabetic, antioxidant, HPLC-ESI-MS, proanthocyanidins, flavonoids, anthraquinone.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Princípio ativo da <i>Papaver somniferum</i> .	14
Figura 2	Ácido acetilsalicílico e seus precursores.	14
Figura 3	Fármaco antitumoral extraído originalmente da <i>Taxus brevifolia</i> e precursor semissintético.	15
Figura 4	Origem dos fármacos aprovados pela FDA de 1981 à 2019.	16
Figura 5	Quercetina.	17
Figura 6	Formação dos intermediários das principais vias metabólicas.	20
Figura 7	Cafeína.	25
Figura 8	Carboidratos resultante da hidrólise de polissacarídeos catalisada pela enzima $\alpha$ -amilase.	30
Figura 9	Substâncias utilizadas no tratamento de diabetes como inibidores das enzimas digestivas.	30
Figura 10	Antioxidantes sintéticos.	33
Figura 11	Formação dos produtos de glicação avançada formados através da reação de Maillard.	34
Figura 12	Estruturas de composto isolados de espécies de <i>Cassia</i> .	41
Figura 13	Estruturas de composto isolados de espécies de <i>Cassia</i> .	42
Figura 14	Compostos isolados da <i>C. bakeriana</i> ,	43
Figura 15	Fluxograma de preparo dos extratos.	46
Figura 16	Preparo das frações via extração líquido-líquido.	47
Figura 17	Reação entre o DPPH <sup>•</sup> e uma substância antioxidante.	59
Figura 18	Reações envolvidas no experimento ORAC.	60
Figura 19	Reação entre a enzima $\alpha$ -amilase e o substrato Gal-G2- $\alpha$ -CNP	61
Figura 20	Reação entre a enzima $\alpha$ -glicosidase e o substrato <i>p</i> -NPG.	62
Figura 21	Cromatogramas em alta resolução no modo negativo do extrato etanólico (1), da fração diclorometano (2) e da fração acetato de etila (3).	66
Figura 22	Compostos identificados no extrato etanólico e frações das cascas da <i>Cassia bakeriana</i> .	70

Figura 23	Proposta de fragmentação para as proantocianidinas identificadas nas cascas da <i>C. bakeriana</i> .	73
Figura 24	Proposta de fragmentação para os flavanóis identificados nas cascas da <i>C. bakeriana</i> .	75
Figura 25	Proposta de fragmentação para o canferol-hexosídeo.	76
Figura 26	Reação entre o revelador NP/PEG e um flavonoide.	76
Figura 27	Proposta de fragmentação para os flavan-3-óis identificados nas cascas da <i>C. bakeriana</i> .	78
Figura 28	Proposta de fragmentação para a reína.	79
Figura 29	Proposta de fragmentação para a sacarose.	80
Figura 30	Estrutura geral de um flavonoide e sua respectiva numeração.	81
Figura 31	Biossíntese das flavanonas.	82
Figura 32	Biossíntese das principais classes de flavonoides.	83
Figura 33	Estrutura dos flavonoides miricetina e quercetina	84

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Classificação dos terpenos.	21
Tabela 2	Exemplos de terpenos com uso medicinal.	22
Tabela 3	Exemplos de compostos fenólicos com uso medicinal.	24
Tabela 4	Exemplos de alcaloides com uso medicinal.	26
Tabela 5	Exemplos de espécies de <i>Cassia</i> usadas na medicina popular com seus respectivos usos.	35
Tabela 6	Espécies de <i>Cassia</i> com atividades biológicas atestadas.	37
Tabela 7	Compostos isolados de espécies de <i>Cassia</i> e atividade biológica.	38
Tabela 8	Rendimento dos extratos das cascas da <i>Cassia bakeriana</i> .	55
Tabela 9	Rendimentos das frações obtidas por extração líquido-líquido.	55
Tabela 10	Prospecção fitoquímica dos extratos e frações das cascas de <i>Cassia bakeriana</i> .	57
Tabela 11	Avaliação da atividade antioxidante pelo método ORAC e DPPH para os extratos e frações das cascas da <i>C. bakeriana</i> .	60
Tabela 12	Atividade inibitória para as enzimas $\alpha$ -glicosidase e $\alpha$ -amilase para os extratos e frações das cascas da <i>C. bakeriana</i> .	62
Tabela 13	Atividade inibitória para as enzimas $\alpha$ -glicosidase e $\alpha$ -amilase por espécies de <i>Cassia</i> .	63
Tabela 14	Atividade inibição de glicação para os extratos e frações das cascas da <i>C. bakeriana</i> .	64
Tabela 15	Propostas de identificação do extrato etanólico e das frações das cascas da <i>Cassia bakeriana</i> .	67

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	Atividade antioxidante
AAPH	2,2'-azobis-(2-amidinopropano) di-hidrocloreto
A.C.	Antes de Cristo
AAS	Ácido acetilsalicílico
AGEs	Produto de glicação avançada (do inglês <i>Advance Glycation end Product</i> )
ATP	Adenosina trifosfato
BHA	Hidroxianisol butilado
BHT	Hidroxitolueno butilado
BSA	Albumina sérica bovina
CCD	Cromatografia em camada delgada
CLAE/EM	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao espectrômetro de massas
CLAE-EM-IES	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas com fonte de ionização por electrospray
CoA	Coenzima A
DMSO	Dimetilsulfoxido
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazila
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EE	Extrato etanólico
EGTA	Ácido egtazico
EH	Extrato hexânico
EM	Espectrometria de massas
EM/EM	Espectrometria de massas sequencial
EO	Estresse oxidativo
ERN	Espécies reativas de nitrogênio
ERO	Espécies reativas de oxigênio
EUA	Estados Unidos da América
FA	Fração aquosa
FAE	Fração acetato de etila
f-AG	Fração enriquecida da enzima $\alpha$ -glicosidase
f-AS	Fração de saliva enriquecida da enzima $\alpha$ -amilase

FB	Fração <i>n</i> -butanol
FD	Fração diclorometano
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
Gal-G2- $\alpha$ -CNP	$\alpha$ -(2-cloro-4-nitrofenil)- $\beta$ -1,4-galactopiranosilmaltosídeo
HIV	Vírus da imunodeficiência humana (do inglês <i>Human immunodeficiency virus</i> )
HRF	Fissão de anel heterocíclico (do inglês <i>Heterocyclic ring fission</i> )
IBTEC-UFU	Laboratório de Nanobiotecnologia do Instituto de Biotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia
IES	Ionização por electrospray
MES	2-( <i>N</i> -morfolino)-etanossulfônico
MIC	Mínima Concentração Inibitória
NP	Difenilboriloxietilamina
NuPPeN	Núcleo de Pesquisa em Produtos Naturais
ORAC	Capacidade de absorção do radical de oxigênio (do inglês <i>oxygen radical absorbance capacity</i> )
PEG4000	Polietilenoglicol-4000
PN	Produtos naturais
<i>p</i> -NPG	4-nitrofenil- $\alpha$ -D-glicopiranosídeo
RDA	<i>Retro Diels-Alder</i>
RF	Fator de retenção
Trolox	Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico).
UFU	Universidade Federal de Uberlândia
UV	Ultravioleta

## SUMÁRIO

1.0	<b>INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA</b>	13
2.0	<b>FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b>	18
2.1	<b>Metabolismo especializado (secundário)</b>	18
2.1.1	<i>Terpenos</i>	20
2.1.2	<i>Compostos fenólicos</i>	23
2.1.3	<i>Alcaloides</i>	25
2.2	<b>Atividades biológicas</b>	28
2.2.1	<i>Diabetes</i>	28
2.2.2	<i>Atividade antioxidante</i>	31
2.2.3	<i>Produtos de glicação avançada</i>	33
2.3	<b>Aspectos da família e do gênero da <i>Cassia bakeriana</i></b>	35
3.0	<b>OBJETIVOS</b>	44
3.1	<b>Objetivos gerais</b>	44
3.2	<b>Objetivos específicos</b>	44
4.0	<b>PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS</b>	45
4.1	<b>Instrumentos e reagentes</b>	45
4.1.1	<i>Instrumentação</i>	45
4.1.2	<i>Reagentes</i>	45
4.2	<b>Preparo dos extratos e frações</b>	46
4.3	<b>Prospecção fitoquímica</b>	47
4.3.1	<i>Reveladores para flavonoides</i>	48
4.3.2	<i>Reveladores para alcaloides</i>	48
4.3.3	<i>Reveladores para antraquinonas, antronas e cumarinas</i>	49
4.3.4	<i>Reveladores universais (Terpenos, esteroides, saponinas, açucares, fenóis, taninos, flavonoides)</i>	49
4.4	<b>Análises biológicas</b>	49
4.4.1	<i>Análise inibitória das enzimas <math>\alpha</math>-amilase e <math>\alpha</math>-glicosidase e inibição da glicação</i>	49
4.4.1.1	<i>Inibição de <math>\alpha</math>-amilase</i>	50
4.4.1.2	<i>Inibição de <math>\alpha</math>-glicosidase</i>	51
4.4.1.3	<i>Inibição de glicação</i>	52

4.5	<b>Atividade antioxidante</b>	52
4.5.1	<i>Método do sequestro do DPPH<sup>•</sup></i>	52
4.5.2	<i>Método do sequestro do radical de oxigênio ORAC</i>	53
4.6	<b>Análise por espectrometria de massas</b>	54
5.0	<b>RESULTADOS E DISCUSSÕES</b>	55
5.1	<b>Rendimentos dos extratos</b>	55
5.2	<b>Prospecção fitoquímica</b>	56
5.3	<b>Atividades biológica</b>	58
5.3.1	<i>Atividade antioxidante</i>	58
5.3.2	<i>Inibição de <math>\alpha</math>-amilase e <math>\alpha</math>-glicosidase</i>	61
5.3.3	<i>Atividade de inibição de glicação</i>	64
5.4	<b>Identificação dos metabólitos especializados</b>	65
5.5	<b>Biossíntese das principais classes de compostos fenólicos identificados nas cascas da <i>Cassia bakeriana</i></b>	81
5.6	<b>Relação entre os compostos identificados e as atividades biológicas avaliadas</b>	83
6.0	<b>CONCLUSÕES</b>	86
	<b>REFERÊNCIAS</b>	88

## 1.0 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Os produtos naturais (PN) podem ser definidos como pequenas moléculas produzidas por seres biológicos, como plantas, microrganismos e animais. Estas moléculas são provenientes do metabolismo dos seres vivos e denominadas como metabólitos secundários, (numa definição mais recente como metabólitos especializados), e são resultados de anos de evolução e adaptações desses seres (BRAZ FILHO, 2010; KRAUSE, TOBIN, 2013; BERNARDINI et al., 2018; POTT, OSORIO, VALLARINO, 2019).

O uso de PN pelo homem se mostra presente em diversas civilizações ao longo da história e seu uso se dá das mais diversas formas. Tribos indígenas americanas utilizavam corantes naturais para pintura do corpo e do cabelo, como forma de comunicação. Além de corantes também era comum o uso de plantas como repelentes e odorizadores de ambientes (VIEGAS JR, BOLZANI, BARREIRO, 2006). Porém, ao longo dos anos o uso mais importante se dá para fins medicinais.

O uso de plantas para fins medicinais acompanha o homem desde a antiguidade, com relatos de uso desde o Egito antigo, com data de aproximadamente 2900 A.C. Informações registradas por volta do ano de 1500 A.C. no *Eber Papyrus*, um documento que relata o uso de aproximadamente 700 medicamentos à base de plantas, descrevem prescrições como gargarejos, infusões e pomadas. Há também alguns relatos vindos da Mesopotâmia (2600 A.C.) onde foram encontrados tabletes de argila com escritas indicando óleos das espécies *Cupressus sempervirens* e espécies dos gêneros *Commiphora*, *Cedrus* entre outros, para tratados medicinais, plantas que nos dias atuais ainda são utilizadas para tratar tosse, resfriados e inflamações. A medicina tradicional chinesa também possui uma série de documentos antigos que descreve o uso de PN, como o *Chinese Materia Media* datado de 1100 anos A.C., que possui 52 prescrições (NEWMAN, CRAGG, 2010; DIAS, URBAN, ROESSNER, 2012; BERNARDINI et al., 2018).

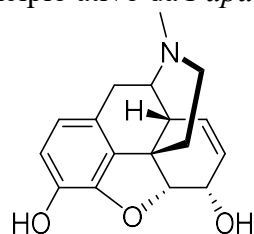
Esse conhecimento popular acumulado e compartilhado entre as civilizações, aliado ao avanço da química e ao desenvolvimento de técnicas de cromatografia, ressonância e técnicas espectroscópicas, possibilitou em séculos mais recentes o isolamento e identificação dos compostos responsáveis pela atividade biológica associada a essas plantas (VIEGAS JR, BOLZANI, BARREIRO, 2006; KABERA et al., 2014).

Vários são os exemplos de compostos que foram isoladas recentemente, porém o uso da planta com o seu princípio ativo vem de civilizações bem mais antigas. Um bom exemplo é a



morfina (**1**), que é o princípio ativo da papoula (*Papaver somniferum*). O uso de um preparado dos bulbos da papoula remete aos sumérios (4000 A.C.), havendo na mitologia grega relatos relacionando à papoula ao Deus grego do sono Morfeu (VIEGAS JR, BOLZANI, BARREIRO, 2006). O isolamento da morfina (**1**) (Figura 1) só ocorreu no início do século XIX e há controvérsias de quem teria isolado primeiramente o composto, mas ambos os trabalhos são do início do século (VIEGAS JR, BOLZANI, BARREIRO, 2006; NEWMAN, CRAGG, 2010; BERNARDINI et al., 2018). A morfina possui excelentes propriedades analgésicas, e é bastante utilizada para controle de dores intensas (VIEGAS JR, BOLZANI, BARREIRO, 2006; BROOK, BENNETT, DESAI, 2017).

Figura 1 – Princípio ativo da *Papaver somniferum*

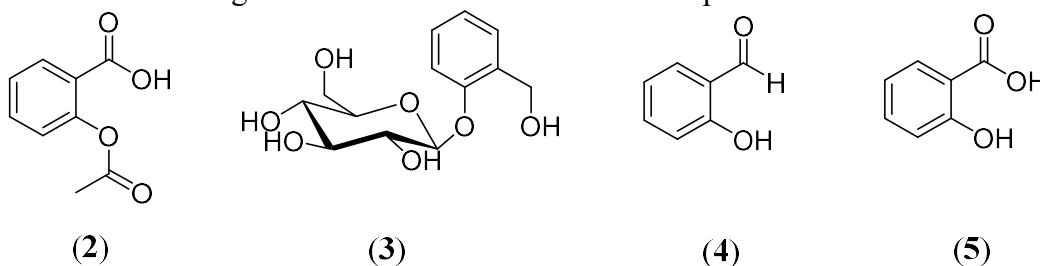


(1)

Fonte: O autor

Outro exemplo importante do uso do conhecimento da química de PN é o ácido acetilsalicílico (**2**) (AAS), que é derivado da salicina (**3**), um composto natural isolado da *Salix alba*. Assim como a morfina há também controvérsias de quem seriam os primeiros trabalhos com os salicilatos, uma vez que Piria em 1839 teria isolado o salicilaldeído (**4**) de espécies de *Spiraea* e preparado o ácido salicílico (**5**). Em 1853, Gerhardt teria sintetizado pela primeira vez o ácido acetilsalicílico, porém sem nenhum teste farmacológico. A Figura 2 mostra a estrutura do ácido acetilsalicílico e de seus precursores (NEWMAN, CRAGG, 2010).

Figura 2 - Ácido acetilsalicílico e seus precursores



(2)

(3)

(4)

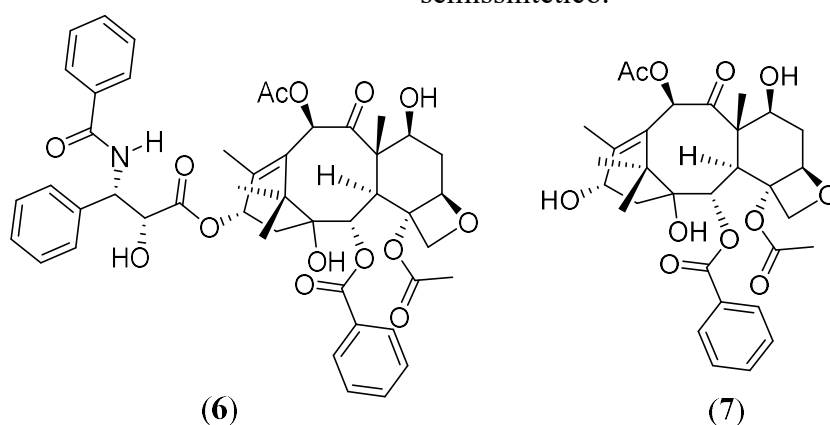
(5)

Fonte: O autor

Porém, a história mais conhecida quanto à primeira síntese do AAS, começa com o isolamento da salicina em 1828 por Johann A. Buchner no Instituto de Farmacologia de Munique. Vários cientistas então passaram a trabalhar na tentativa de melhorar a extração ou os efeitos da própria salicina, até que Kolbe juntamente com seus alunos sintetizaram o ácido salicílico e seu sal sódico a partir do fenol. Em 1898, Hofmann ao observar efeitos colaterais do sal no tratamento de artrite aplicado ao seu pai, sintetizou o AAS que possui menores efeitos colaterais que o ácido salicílico, porém com as mesmas propriedades analgésicas. O AAS passou então a ser comercializado pela Bayer com o nome de aspirina, sendo então o primeiro fármaco sintético baseado em um produto natural (VIEGAS JR, BOLZANI, BARREIRO, 2006; NEWMAN, CRAGG, 2010; DIAS, URBAN, ROESSNER, 2012).

Outra substância com bastante relevância nos dias atuais, talvez o PN de maior importância em aspectos medicinais é o taxol (6) (Figura 3), que é um antitumoral que foi extraído pela primeira vez das cascas da *Taxus brevifolia*, porém o rendimento da extração é extremamente baixo e a complexidade da molécula dificulta a síntese desse composto. Assim, uma alternativa foi investir na extração de percussores, como a bacatina III (7) (Figura 3), e em seguida submetê-la a uma semissíntese para obtenção de maiores quantidades do taxol (DIAS, URBAN, ROESSNER, 2012; KRAUSE, TOBIN, 2013; LI et al., 2017).

Figura 3 – Fármaco antitumoral extraído originalmente da *Taxus brevifolia* e precursor semissintético.

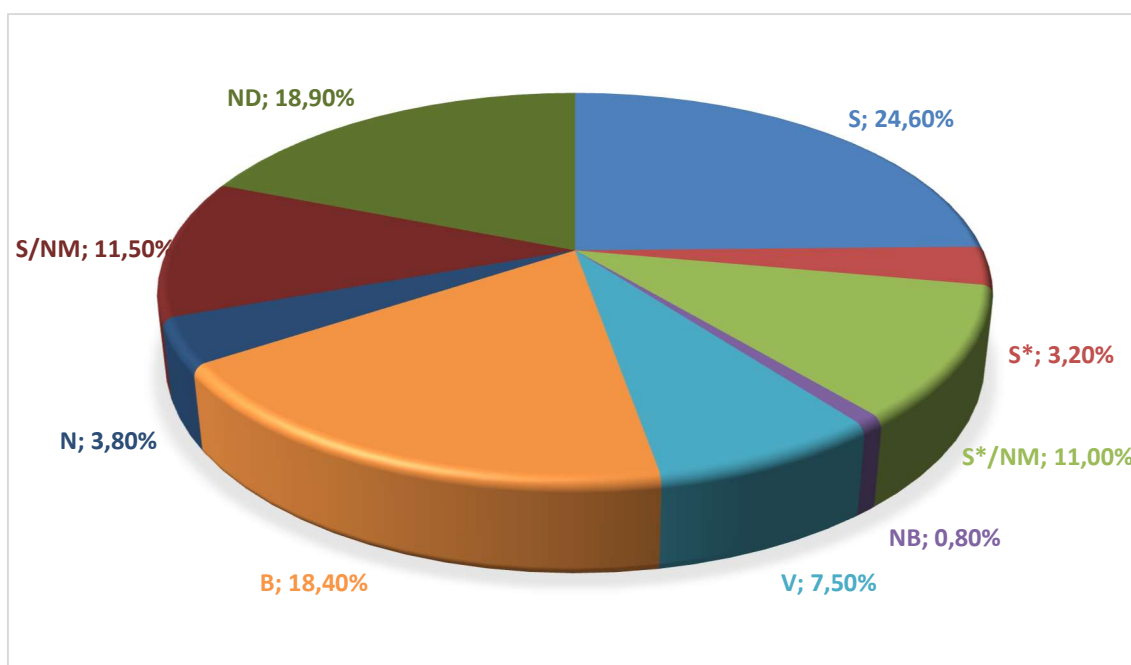


Fonte: O autor

Estes exemplos mostram a importância do estudo de PN ao longo do tempo, e que mesmo recentemente continua com bastante relevância, como também relatam os estudos realizados por Newman e Cragg (2020), que classificam a origem de fármacos aprovados pelo FDA (*Food and Drug Administration*) de 1981 a 2019 (Figura 4).

Neste estudo, a origem dos fármacos foram classificadas da seguinte forma: macromoléculas biológicas como proteínas ou peptídeos (B); produto natural sem nenhuma modificação estrutural, mesmo que semi ou totalmente sintético (N); produto natural “botânico” (NB); derivado de produto natural, geralmente com modificação sintética (ND); fármaco puramente sintético (S); produzido de forma totalmente sintética, porém com um grupo farmacóforo vindo de um produto natural (S\*) e vacinas (V), além de duas subcategorias nomeadas de “NM”, que seriam substâncias mimicas de produto natural, foram colocados nessa subcategoria S/NM e S\*/NM (NEWMAN, CRAGG, 2020).

Figura 4 - Origem dos fármacos aprovados pela FDA de 1981 à 2019.



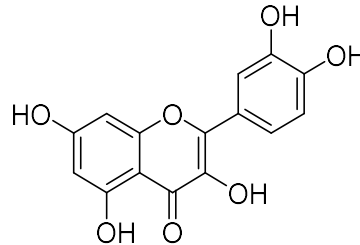
Fonte: adaptado de Newman e Cragg (2020)

O estudo mostra que apenas 24,6% desses fármacos é de origem puramente sintética, enquanto a porcentagem de fármacos totalmente naturais ou que tem sua origem baseado na estrutura de produtos naturais é de 49,2%, não considerando as macromoléculas biológicas (B) e vacinas (V) nessas porcentagens. Ao considerar somente moléculas pequenas, tirando assim as vacinas e macromoléculas biológicas, a porcentagem de puramente sintéticos é de 33,3% e a de fármacos com alguma ligação à química de produtos naturais representa os outros 66,7%, mostrando assim a importância da química de PN nos dias atuais.

Essa importância também pode ser vista nos estudos da química de PN relacionados ao covid-19, doença causada por um vírus que apareceu na China no final de 2019 e se espalhou pelo mundo tornando-se uma pandemia. Um estudo de revisão feito por Prasansuklab e outros

(2020), traz uma série de compostos naturais que vêm sendo testados como possíveis fármacos para covid-19 e que tiveram algum resultado promissor. Os autores consideraram 24 compostos promissores, com destaque para o flavonoide quercetina (8) (Figura 5).

Figura 5- Quercetina.



(8)

Fonte: o autor

Todos esses trabalhos mostram a importância da química de PN e a necessidade da continuidade desses estudos, uma vez que novas doenças podem aparecer a qualquer momento, além da possibilidade de mutação de microrganismos causadores de doenças conhecidas, criando resistência aos fármacos já utilizados ou então a ocorrência de efeitos indesejados por medicamentos empregados.

Neste contexto, o Brasil pode ter um papel de destaque nessa busca por novas substâncias bioativas, visto que o país possui a maior biodiversidade do planeta, cerca de 20% das espécies (BIODIVERSIDADE, 2021), tendo aproximadamente 61% do território coberto por vegetação nativa (FLORESTAS, 2021). Em relação a flora, o país possui 43.020 espécies conhecidas. Devido a esta vasta extensão e a diversidade de espécies, o Brasil é dividido em 6 biomas: Amazônia, Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica, Pampas e o Pantanal (BIODIVERSIDADE, 2021).

Porém, mesmo com essa biodiversidade presente no Brasil, boa parte dos biomas correm riscos, graças a destruição ambiental causada pela ação antropogênica.

Um exemplo disso é o Cerrado, o segundo maior bioma da América do Sul sendo considerado um *hotspots* mundial de biodiversidade, ou seja, uma área rica em biodiversidade com grande quantidade de espécies endêmicas e com elevado grau de ameaça de degradação. É reconhecido como a savana mais rica do mundo, com cerca de 11.627 espécies nativas já catalogadas, sendo grande parte endêmica. Mesmo com toda essa relevância, somente 8,21% desse território encontra-se legalmente protegido dentro de unidades de conservação. Outro fator preocupante é que aproximadamente 20% das espécies presentes já não ocorrem em áreas

de proteção, e cerca de 137 espécies estão ameaçadas de extinção (O BIOMA CERRADO, 2021). Acredita-se que 50% da extensão do bioma já havia sido devastado até o ano de 2010 (GARCEZ et al., 2016).

O risco de uma perda significativa de possíveis agentes bioativos devido a destruição causada pelo homem, reforça a necessidade do estudo das mais diversas espécies evitando assim a possível perda desse conhecimento ainda disponível na natureza.

## **2.0 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA**

### **2.1 Metabolismo especializado (secundário)**

O metabolismo é a forma pela qual os organismos se mantêm vivos. Trata-se de uma atividade celular altamente coordenada onde muitos sistemas enzimáticos (conhecidos por vias metabólicas) cooperam para a manutenção da vida do organismo. O metabolismo é responsável pela obtenção de energia, seja captando energia solar ou degradando substâncias altamente energéticas obtidas do meio ambiente. Além da obtenção de energia, o metabolismo também é responsável pela conversão de nutrientes em moléculas com características próprias de cada célula, incluindo precursores de macromoléculas, além de atuar na polimerização destes precursores em macromoléculas como proteínas. O metabolismo também é responsável por sintetizar ou degradar biomoléculas necessárias para funções celulares especializadas (DEWICK, 2002; NELSON, COX, 2015).

Em organismos vegetais o metabolismo costuma ser dividido em dois, metabolismo primário, que em artigos mais recentes vem sendo chamado de metabolismo central, e o metabolismo secundário, que vem sendo substituído por metabolismo especializado (DEWICK, 2009; BRAZ FILHO, 2010; NELSON, COX, 2014; POTT, OSORIO, VALLARINO, 2019)

O metabolismo primário compreende a produção de substâncias vitais para a sobrevivência dos seres vivos, sendo praticamente o mesmo em todos os organismos, com pequenas variações. É o responsável por modificar e sintetizar carboidratos, proteínas, ácidos graxos e ácidos nucleicos, substâncias que são encontradas em praticamente todo ser vivo (DEWICK, 2009; POTT, OSORIO, VALLARINO, 2019)

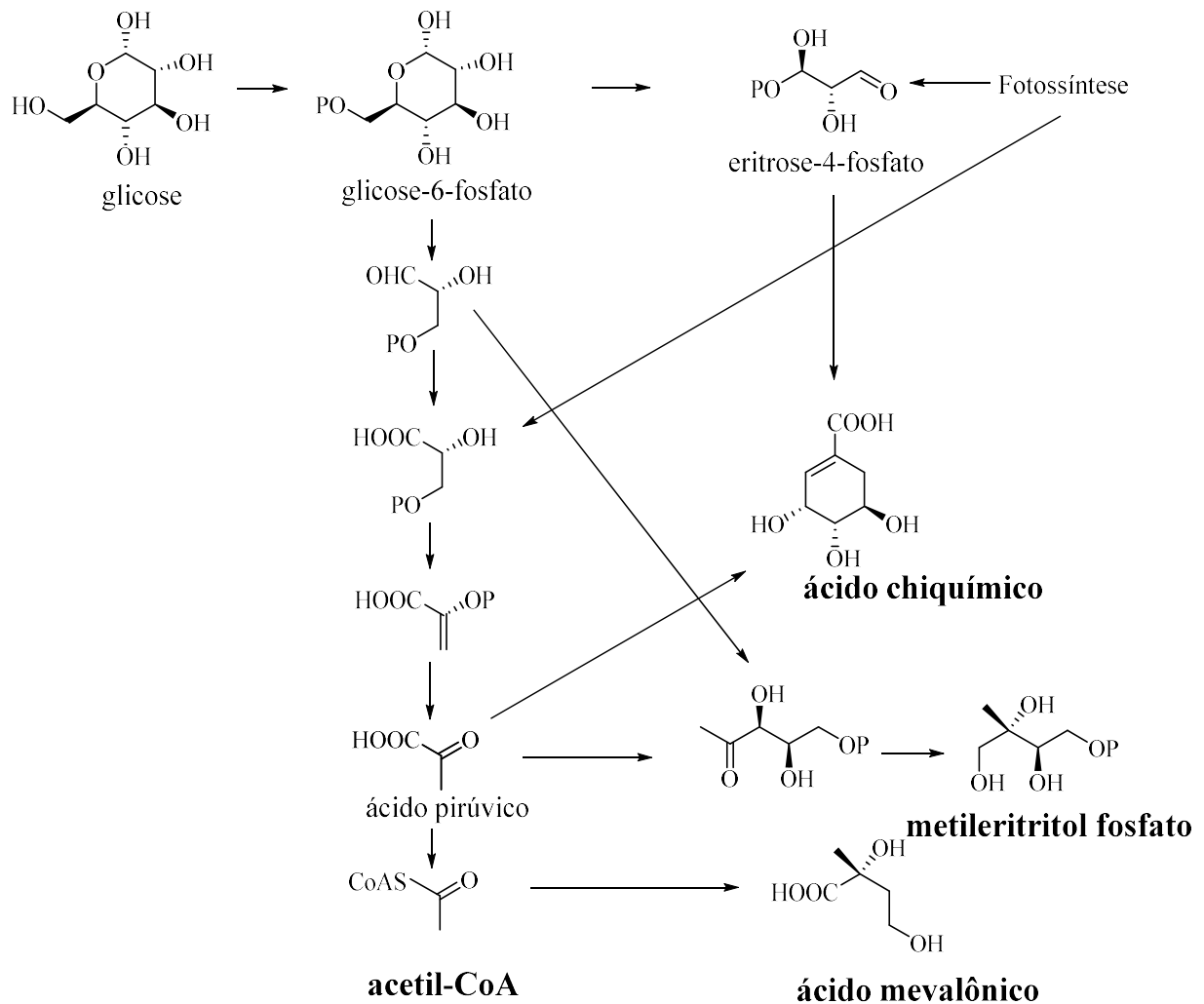
Já o metabolismo especializado (secundário) possui importantes funções ligadas ao desenvolvimento e crescimento das plantas. Alguns desses metabólitos auxiliam na proteção das plantas contra agentes externos, sejam herbívoros ou microrganismos, na defesa contra

estresses abióticos, como exposição a raios UV-B, e na comunicação da planta com outros organismos, para atrair polinizadores por exemplo. Ao contrário dos metabólitos primários, esses não são encontrados em todos os seres e são resultados de anos da evolução dos vegetais, podendo ser encontrados em algum ser específico ou em um grupo, sendo uma expressão da individualidade das espécies e pode ser até fonte de estudos taxonômicos (DEWICK, 2009; SCHÄFER, WINK, 2009; KABERA et al., 2014; POTT, OSORIO, VALLARINO, 2019)

Além da importância desses metabólitos especializados para a planta, como já foi citado no item 1.1, muitos desses metabólitos possuem importantes usos para o ser humano, como drogas relaxantes, aromatizantes, corantes e principalmente no desenvolvimento de novos fármacos ou fitoterápicos (KABERA et al., 2014).

Os metabólitos especializados são derivados do metabolismo primário e são provenientes de quatro principais intermediários: a acetil coenzima A (acetil-CoA), o ácido chiquímico, o ácido mevalônico e o metileritritol fosfato, tais intermediários formam respectivamente as quatro principais vias metabólicas: a via do acetato; do chiquimato; do mevalonato e do metileritritol fosfato (Figura 6). Além dessas 4 vias de formação de metabólitos, alguns aminoácidos como triptofano, fenilalanina, lisina e outros, também participam da construção de alguns metabólitos especializados, sendo derivados da via glicolítica, do ciclo de Krebs e alguns da via do chiquimato (DEWICK, 2009).

Figura 6 - Formação dos intermediários das principais vias metabólicas.



Fonte: adaptado de Dewick (2009)

Esses metabólitos são comumente divididos em três principais classes: alcaloides, terpenos e compostos fenólicos. Os terpenos são sintetizados pelas vias do mevalonato e do metileritritol fosfato, vias onde são produzidos também esteroides. Alcaloides são derivados de aminoácidos, podendo ter também parte de sua estrutura vinda das vias do acetato, chiquimato ou metileritritol fosfato. Já os compostos fenólicos contemplam uma enorme variedade de compostos que são biossintetizados pelas vias do acetato e chiquimato, podendo ser gerados por uma só via ou por ambas, como o caso dos flavonoides (DEWICK, 2009).

### 2.1.1 Terpenos

Terpenos ou terpenoides são a classe de metabólitos secundários com maior quantidade e variedade, com aproximadamente 30 mil compostos já listados. Apesar da enorme variedade

de compostos, essas estruturas são caracterizadas por serem formadas por monômeros de cinco átomos de carbonos, o isopentano (2-metilbutano). Essas unidades são comumente chamadas de unidades de isopreno (2-metilbuta-1,3-dieno), pois muitos terpenos se decompõem em altas temperaturas em gás isopreno (BUCHANAN, GRUISSEM, JONES, 2015).

Assim os terpenos são classificados de acordo com a quantidade de unidades de 5 carbonos que compõe a estrutura (Tabela 1) (DEWICK, 2009; BUCHANAN, GRUISSEM, JONES, 2015).

Tabela 1 – Classificação dos terpenos.

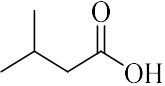
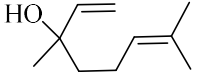
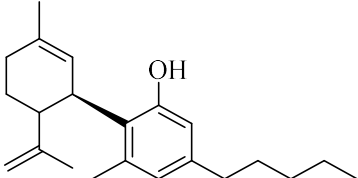
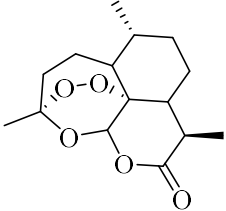
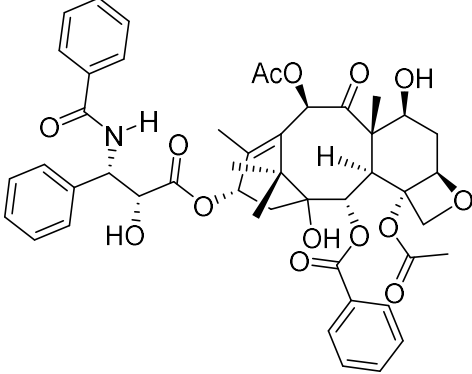
<b>Terpeno</b>	<b>Unidades de isopreno</b>	<b>Nº de carbonos</b>
Hemiterpenos	1	5
Monoterpenos	2	10
Sesquiterpenos	3	15
Diterpenos	4	20
Triterpenos	6	30
Tetraterpenos	8	40

Nas plantas, os terpenos estão ligados a diversas funções importantes. Terpenos menores e voláteis, como monoterpenos e sesquiterpenos, estão ligados a interações com o ambiente em que a planta se encontra, atuando na regularização de possíveis estresses abióticos e também atuando na proteção contra microrganismos ou mesmo contra herbívoros. Também atuam em interações de mutualismo, por exemplo atraindo seres polinizadores. Já os carotenoides, que são pigmentos e participam diretamente da fotossíntese e esteroides são triterpenos que fazem parte da composição da membrana celular (KABERA et al., 2014; BUCHANAN, GRUISSEM, JONES, 2015; THOLL, 2015)

Os terpenos também são bastante importantes para o homem, pois muitos desses compostos são usados como fragrâncias, pigmentos, inseticidas, entre outros. Alguns possuem importância nutricional como as vitaminas A, D, E e K, e outros são usados no âmbito farmacêutico (BUCHANAN, GRUISSEM, JONES, 2015). A Tabela 2 traz alguns exemplos de terpenos usados como fármacos.



Tabela 2 – Exemplos de terpenos com uso medicinal.

Substância	Estrutura	Espécie extraída	Uso medicinal	Referência
Ácido isovalérico		Óleos essenciais de algumas espécies	Agente anticonvulsivante	(KABERA et al., 2014)
Linalol		Óleos essenciais de algumas espécies	Antibactericida	
Canabidiol		<i>Cannabis sativa</i>	Epilepsia e alívio de dores	(BERGMAN, DAVIS, PHILLIPS, 2019)
Artemisinina		<i>Artemisia annua</i>	Malária	
Taxol		<i>Taxus brevifolia</i>	Antineoplásico	

### 2.1.2 *Compostos fenólicos*

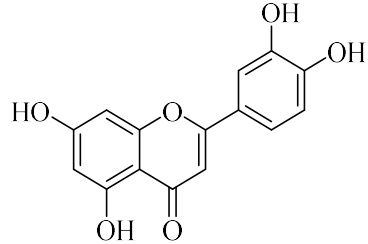
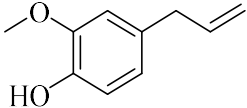
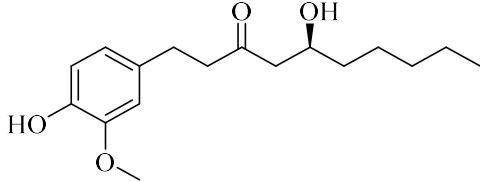
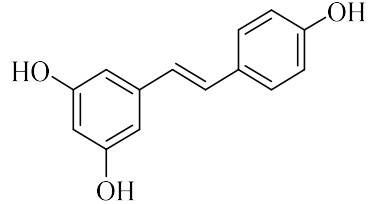
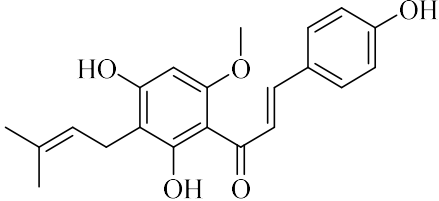
Os compostos fenólicos compõem uma classe bastante variada de metabólitos secundários, porém possuem em comum a presença do grupo hidroxila em um anel benzênico (um fenol), ou são derivados de produtos que possuíam esse grupo em sua estrutura.

Devido à complexidade e variedade desses compostos existem algumas formas de classifica-los, podendo ser tanto pelo grupo funcional ligado ao anel aromático ou em relação a quantidade de grupos fenólicos presentes na estrutura. Algumas das principais subclasses incluem flavonoides, antraquinonas, antocianinas, ligninas, entre outros (HUSSEIN, EL-ANSSARY, 2019)

Graças a essa variedade estrutural, os compostos fenólicos também estão ligados a diversas funções nos organismos vegetais. As ligninas por exemplo fazem parte da estrutura da parede celular, já os flavonoides são responsáveis pela pigmentação de flores e também atuam na filtração de raios UV, entre outras funções (KABERA et al., 2014; BUCHANAN, GRUISSEM, JONES, 2015).

Assim como os terpenos, os compostos fenólicos também possuem uma vasta utilização pelo homem, principalmente como fármacos. Várias dessas substâncias estão relacionadas a atividades biológicas como antivirais, antimicrobianos, anticancerígenos, entre outros. A presença desses compostos nos alimentos proporciona algumas atividades importantes, como atividade antioxidante. A Tabela 3 mostra alguns compostos fenólicos e suas respectivas atividades biológicas (DEWICK, 2009; KABERA et al., 2014; BUCHANAN, GRUISSEM, JONES, 2015).

Tabela 3 – Exemplos de compostos fenólicos com uso medicinal.

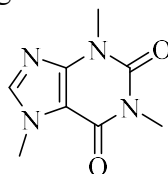
Substância	Estrutura	Espécie extraída	Uso medicinal	Referência
Luteolina		<i>Mentha crispata</i>	Antioxidante	
Eugenol		Óleo essencial de cravos	Antibactericida usado em odontologia	
Gingerol		<i>Zingiber officinale</i>	Anti-inflamatório	(BUCHANAN, GRUISSEM, JONES, 2015)
Rerverastrol		Casca de uva vermelha	Melhora na saúde do coração	
Xanthohumol		<i>Humulus lupulus</i>	Anticâncer	

### 2.1.3 Alcaloides

Alcaloides são produtos naturais que contém em sua estrutura um ou mais átomos de nitrogênio. São comumente aminas primárias, secundárias ou terciárias, o que lhes confere, na maioria dos casos, a característica de compostos com caráter básico. Porém, há também alcaloides neutros ou levemente ácidos, dependendo da estrutura do composto e das demais funções presentes (DEWICK, 2009; KABERA et al., 2014).

Grande parte desses compostos são tóxicos para outros seres, como herbívoros, insetos e microrganismos. Muitos alcaloides possuem função de defesa dos organismos que a produzem, a cafeína (9) (Figura 7), por exemplo, é um composto encontrado nos grãos do café (*Coffea arábica*) e em algumas folhas usadas para chás como o mate (*Ilex paraguariensis*). Esse composto possui excelente atividade inseticida protegendo a planta de ataques (BUCHANAN, GRUISSEM, JONES, 2015; DEBNATH et al., 2018).

Figura 7 - Cafeína.



(9)

Fonte: O autor

Assim como as demais classes de metabólitos especializados, os alcaloides também são bastante utilizados pelas sociedades ao longo da história para os mais diversos fins. A própria cafeína descrita acima com propriedade inseticida, é usada pelos seres humanos como estimulante, sendo provavelmente o mais utilizado no mundo. Outro alcaloide com grande relevância é a morfina, como já exemplificado na sessão 1.1. A Tabela 4 mostra alguns alcaloides com seus respectivos usos (DEWICK, 2009; BUCHANAN, GRUISSEM, JONES, 2015; DEBNATH et al., 2018).

Tabela 4 – Exemplos de alcaloides com uso medicinal.

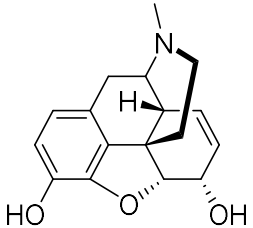
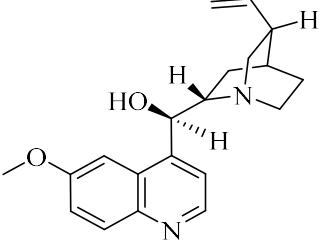
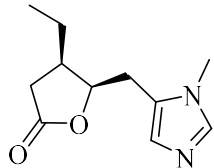
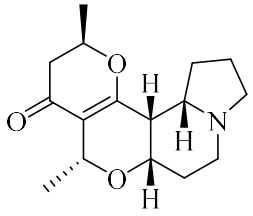
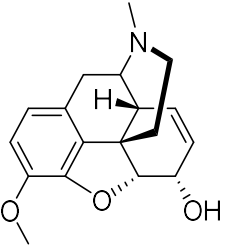
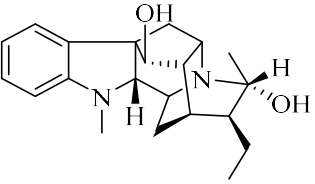
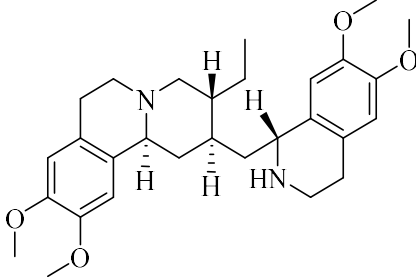
Substância	Estrutura	Espécie extraída	Uso medicinal	Referência
Morfina	 The chemical structure of morphine is a complex pentacyclic alkaloid. It features a morphine ring system with a phenolic hydroxyl group at position 3 and an allylic hydroxyl group at position 6. The nitrogen atom is tertiary and is part of a five-membered ring fused to the morphine core.	<i>Papaver somniferum</i>	Analgésico	
Quinina	 The chemical structure of quinine is a complex alkaloid. It consists of a quinoline ring system with a methoxy group at position 8 and a quinuclidine ring system at position 4. The quinuclidine ring has a hydroxyl group at position 1 and a vinyl group at position 2.	<i>Cinchona officinalis</i>	Antimalárico	(DIAS, URBAN, ROESSNER, 2012)
Pilocarpina	 The chemical structure of pilocarpine is a tropane alkaloid. It features a tropane ring system with a methyl group at position 3 and a propyl group at position 1. The nitrogen atom is tertiary and is part of a five-membered ring fused to the tropane core.	<i>Pilocarpus jaborandi</i>	Glaucoma	
Grandisine A	 The chemical structure of grandisine A is a complex alkaloid. It features a tropane ring system with a methyl group at position 3 and a propyl group at position 1. The nitrogen atom is tertiary and is part of a five-membered ring fused to the tropane core.	<i>Elaeocarpus grandis</i>	Analgésico	

Tabela 4 – Exemplos de alcaloides com uso medicinal (*continua*).

Codeína		<i>Papaver somniferum</i>	Antitussígeno e analgésico
Ajmalina		<i>Rauwolfia serpentina</i>	Antiarrítmicos (BUCHANAN, GRUISSEM, JONES, 2015)
Emetina		<i>Rauwolfia serpentina</i>	Amebicida

Estes compostos possuem uma grande variedade estrutural, o que dificulta sua classificação. Uma possível classificação se dá pela origem do nitrogênio presente na estrutura, como pirrolidina, piperidina, quinolina, isoquinolina, etc. Grande parte dos alcaloides possuem como precursores aminoácidos (os principais são ornitina, lisina, ácido nicotínico, tirosina, triptofano, ácido antranílico, histidina, entre outros), levando em sua estrutura final parte do esqueleto do aminoácido, justamente a que compõe a parte nitrogenada. Alguns alcaloides também podem ter em sua estrutura além da parte do esqueleto vinda de um aminoácido, partes oriundas das vias metabólicas do acetato, chiquimato ou metileritritolfosfato. Já alguns alcaloides possuem apenas o átomo de nitrogênio vindo de um aminoácido e o restante da molécula vinda de umas das quatro vias metabólicas, estes também são as vezes chamados de pseudoalcaloides (DEWICK, 2009; BUCHANAN, GRUISSEM, JONES, 2015).

## **2.2 Atividades biológicas**

### **2.2.1 Diabetes**

O número de pessoas com diabetes vem aumentando ao longo dos anos segundo o *Diabetes Atlas* disponibilizado pela *International Diabetes Federation*. Em 2019 a porcentagem de pessoas com diabetes no mundo era estimada em 9,3% da população (463 milhões de pessoas) e calcula-se que esses números irão aumentar ao longo dos anos, com previsão de 10,9% da população em 2045 (700 milhões de pessoas). Esse aumento está relacionado ao envelhecimento da população e a adoção de estilos de vida não saudáveis, levando a quadros de obesidade (ASCHNER et al., 2021).

O diabetes mellitus é uma doença crônica caracterizada pela alta concentração de glicose no sangue (hiperglicemia), e está entre as doenças crônicas que mais causam deficiências e mortes. Longos quadros de níveis altos de glicose no sangue levam a várias complicações como problemas cardiovasculares, retinopatia, envelhecimento e neuropatia (KIM et al., 2019; ZHANG et al., 2019). Além dos problemas de saúde aos portadores da doença, o diabetes também gera um gasto alto com seu próprio tratamento e com o tratamento de suas complicações. Estima-se que o gasto mundial seja de 825 bilhões de dólares anualmente (FAGHERAZZI, RAVAUD, 2019).

Os riscos atribuídos a essa doença ficaram evidenciados com a pandemia causada pelo SARS-CoV-2. Estudos indicam que caso contraia o vírus, o risco de hospitalização para uma

pessoa com diabetes é até três vezes maior, e que o diabetes associado a obesidade, faz o risco de hospitalização ser até 4,5 vezes maior em pessoas que não possuem essas condições (GIORGINO et al., 2021).

Entre os casos de diabetes, o mais comum é o diabetes classificado como tipo 2, sendo em torno de 90% dos casos (KIM et al., 2019). O diabetes tipo 1 (dependente de insulina) é causado por reações autoimunes em proteínas de células do pâncreas, provocando a sua destruição, assim levando a uma deficiência de insulina. Já o diabetes tipo 2 (não dependente de insulina) é caracterizada principalmente pela resistência à insulina, e é causado pela diminuição da sensibilidade dos tecidos alvos à insulina e pode ser provocada ou agravada por fatores externos, como obesidade, estresse, falta de exercícios físicos, entre outros (OZOUGWU et al., 2013; ASMAT, ABAD, ISMAIL, 2016).

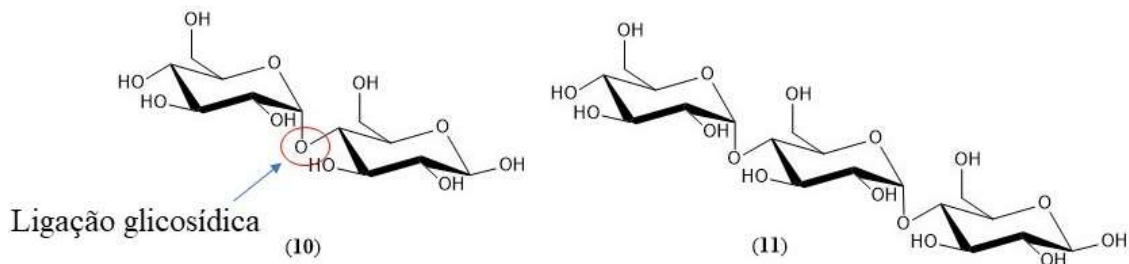
A insulina é uma proteína (hormônio) produzida no pâncreas em resposta a alguns estímulos, como a glicose. Quando há a realização de uma refeição, a concentração de glicose no sangue aumenta, este aumento estimula o pâncreas a produzir e secretar insulina, o que leva ao transporte, biotransformação e armazenamento da glicose em músculos e tecidos adiposos. Na ausência da insulina ou em quadros de resistência, reduz-se a captação de glicose pelo tecido, resultando em hipoglicemia intracelular e hiperglicemia extracelular. A hipoglicemia intracelular causa neoglicogênese levando a degradação de gorduras ocasionando a cetoacidose diabética. Já a hiperglicemia extracelular, pode levar a coma hiperglicêmico e diérese osmótica (OZOUGWU et al., 2013; ASMAT, ABAD, ISMAIL, 2016).

Como foi mostrado, o alto nível de glicose no sangue traz complicações para a saúde dos portadores de diabetes, com isso a busca por novas formas de tratamento para essa doença se faz necessário. Para o diabetes tipo 2, que é a mais comum, a maior parte dos tratamentos se dão pela tentativa de diminuir a concentração de glicose no paciente (VEELEN et al., 2020). Uma forma de diminuir essa concentração é interferir na absorção da glicose através da inibição das enzimas  $\alpha$ -amilase e  $\alpha$ -glicosidase (THILAGAM et al., 2013; HUI et al., 2020).

A  $\alpha$ -amilase catalisa a hidrólise da ligação glicosídica de polissacarídeos, como o amido, transformando-os em carboidratos menores como maltose (**10**) e maltotriose (**11**) (Figura 8) (SOUZA, 2010; DEVECI et al., 2021). Já a  $\alpha$ -glicosidase catalisa a hidrólise da ligação glicosídica de oligossacarídeos, transformando-os em monossacarídeos absorvíveis no final do processo de digestão (YOSHIMIZU et al., 2008; DEVECI et al., 2021).



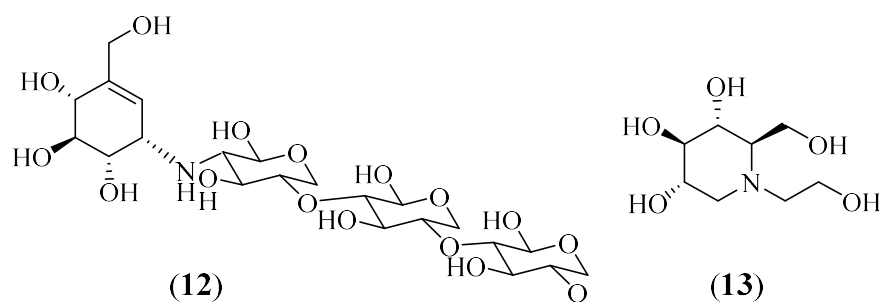
Figura 8 - Carboidratos resultante da hidrólise de polissacarídeos catalisada pela enzima  $\alpha$ -amilase.



Fonte: O autor

Há alguns fármacos usados para inibir a ação destas enzimas no tratamento do diabetes, entre eles os mais usados são a acarbose (12) e o miglitol (13) (Figura 9), porém ambos possuem alguns efeitos colaterais, como por exemplo distúrbios gastrointestinais (DEVECI et al., 2021). Com isso há a necessidade de se buscar novas substâncias ou até mesmo extratos vegetais que possam ser usados no tratamento do diabetes. O caminho pelo uso de PN pode ser interessante, devido a quantidade de espécies relatadas na literatura com atividades inibitórias para essas enzimas, e também pela possibilidade de uma menor toxicidade dessas substâncias quando são provenientes ou baseadas em PN (RÍOS, FRANCINI, SCHINELLA, 2015; HUI et al., 2020).

Figura 9 - Substâncias utilizadas no tratamento de diabetes como inibidores das enzimas digestivas.



Fonte: O autor

Na literatura há alguns estudos com PN para a inibição de ambas as enzimas, como o descrito por de Souza (2012), que traz a atividade inibitória de algumas espécies do Cerrado contra as duas enzimas. Algumas espécies como a *Eugenia dysenterica*, *Stryphnodendron adstringens*, *Pouteria caimit*, entre outras, mostraram boas atividades inibitórias, quando comparados com os controles positivos utilizados.

Algumas espécies de *Cassia*, gênero o qual pertence a espécie estudada neste trabalho, também demonstraram boa atividade inibitória. Extratos das sementes das espécies *C. auriculata* e *C. angustifolia* apresentaram boa atividade para ambas as enzimas, para a  $\alpha$ -amilase os valores de  $CI_{50}$  foram de  $149,6 \pm 0,21$  e  $228,8 \pm 1,25 \mu\text{g mL}^{-1}$  respectivamente, já para a  $\alpha$ -glicosidase os valores foram de  $134,9 \pm 0,54$  e  $170,53 \pm 0,59 \mu\text{g mL}^{-1}$  respectivamente (NANUMALA, TULASI, SUJITHA, 2015). Extratos das cascas da *C. abbreviata* inibiram a enzima  $\alpha$ -glicosidase com  $CI_{50}$  de  $600 \mu\text{g mL}^{-1}$  (SHAI et al., 2010).

A própria *C. bakeriana* foi avaliada recentemente no trabalho de Costa Silva (2019), em relação a atividade inibitória das enzimas  $\alpha$ -glicosidase e  $\alpha$ -amilase dos extratos e frações das folhas. Para a  $\alpha$ -amilase o extrato etanólico foi o mais ativo com  $CI_{50}$  de  $5,00 \pm 0,85 \mu\text{g mL}^{-1}$  e para a  $\alpha$ -glicosidase a fração diclorometano foi a mais ativa com  $CI_{50}$  de  $359,55 \pm 2,90 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Esses resultados promissores despertam interesse para a avaliação da atividade de outras partes da planta, bem como o estudo da composição química.

### 2.2.2 Atividade antioxidante

Na seção anterior foram mostrados os problemas de saúde atrelados ao diabetes, e muitos estudos têm relacionado algumas complicações oriundas dessa doença como o acidente vascular cerebral, neuropatia, retinopatia e nefropatia ao estresse oxidativo (EO) (ASMAT, ABAD, ISMAIL, 2016).

O EO é causado por uma falta de equilíbrio entre a formação de radicais livres ou espécies altamente reativas, e a remoção das mesmas. Essas espécies no corpo humano normalmente são de dois tipos. As espécies reativas de oxigênio (ERO), incluem radicais livres como o superóxido ( $\cdot\text{O}_2^-$ ), o radical hidroxil ( $\cdot\text{OH}$ ) e até espécies neutras reativas como o peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). O outro tipo são espécies reativas de nitrogênio (ERN), e incluem radicais livres como o óxido nítrico  $\cdot\text{NO}$ , o dióxido de nitrogênio ( $\cdot\text{NO}_2^-$ ), entre outras espécies (JOHANSEN et al., 2005; KANG, YANG, 2020)

Esse desbalanço redox pode ser causado pelo excesso da formação das espécies radicalares e, esse excesso, pode ser causado por exposição à radiação UV e estilo de alimentação, como consumo de alimentos processados, excesso de gordura ou açúcar, além de hábitos não saudáveis, como consumo de bebidas alcoólicas, cigarro, entre outros fatores (VATNER et al., 2020). No caso de pessoas com diabetes, o quadro de hiperglicemia também contribui para a formação de espécies radicalares. A glicose pode sofrer autooxidação gerando

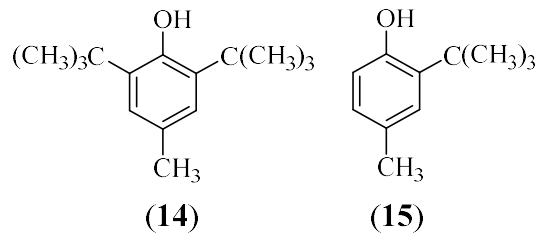
espécies radicalares  $\cdot\text{OH}$  e o excesso de metabolismo de glicose pode levar a geração de espécies  $\cdot\text{O}_2$ . Além disso, outro fator associado a hiperglicemia que contribui para o aumento do EO é a formação de produtos de glicação avançada (AGEs). Durante o processo de formação dos AGEs há a geração de algumas ERO, contribuindo para o EO (JOHANSEN et al., 2005).

O corpo humano possui formas de neutralizar essas espécies formadas, algumas são endógenas como enzimas antioxidantes, tais com a superóxido dismutase, catalase, glutatona, peroxidase, entre outras. Também podem ser neutralizados por metais quelantes na forma de proteínas e por algumas moléculas pequenas, como ácido úrico, ácido alfalipóico, entre outros. Esse processo também pode ser feito por antioxidantes exógenos, que são adquiridos via alimentação ou suplementação, como vitaminas A, C e E, carotenoides e compostos fenólicos. Como já falado, quando há excesso de formação ou falha em algum desses mecanismos, ocorre o estresse oxidativo (KANG, YANG, 2020; PISOSCHI et al., 2020; NANDA, MADAN, 2021). Além de estar ligado diretamente às complicações do diabetes, o EO também está relacionado a várias outras patologias, como câncer, Alzheimer, asma, bronquite crônica, entre várias outras (ASMAT, ABAD, ISMAIL, 2016; PISOSCHI et al., 2020).

Assim, uma forma de se combater os problemas relacionados ao EO pode ser pela ingestão de substâncias antioxidantes para restabelecer o equilíbrio no corpo. Essas substâncias são capazes de inibir a oxidação, eliminando as espécies reativas transformando-as em espécies menos reativas (NANDA, MADAN, 2021).

Na indústria, principalmente alimentícia, o uso de antioxidantes é bem comum, principalmente em alimentos ricos em gordura que podem facilmente se oxidar, sendo este efeito combatido por alguns antioxidantes sintéticos, como o hidroxitolueno butilado (BHT) (14) e o hidroxianisol butilado (BHA) (15) (Figura 10). Há estudos que mostram a possibilidade desses antioxidantes possuírem alguns efeitos toxicológicos, como efeito carcinogênico. Assim o uso desses antioxidantes sintéticos vem sendo substituído por antioxidantes naturais ou baseados em produtos naturais (RAMALHO, JORGE, 2006; LOBO et al., 2010; DAWIDOWICZ, OLSZOWY, JÓŻWIK-DOŁĘBA, 2015). Já os naturais seriam aqueles encontrados em vegetais como frutas, folhas, verduras, raízes e chás, como por exemplo vitaminas (C, E), carotenoides, flavonoides e compostos fenólicos em geral (YADAV et al., 2016; PISOSCHI et al., 2020; SIDDEEG et al., 2021).

Figura 10 - Antioxidantes sintéticos.



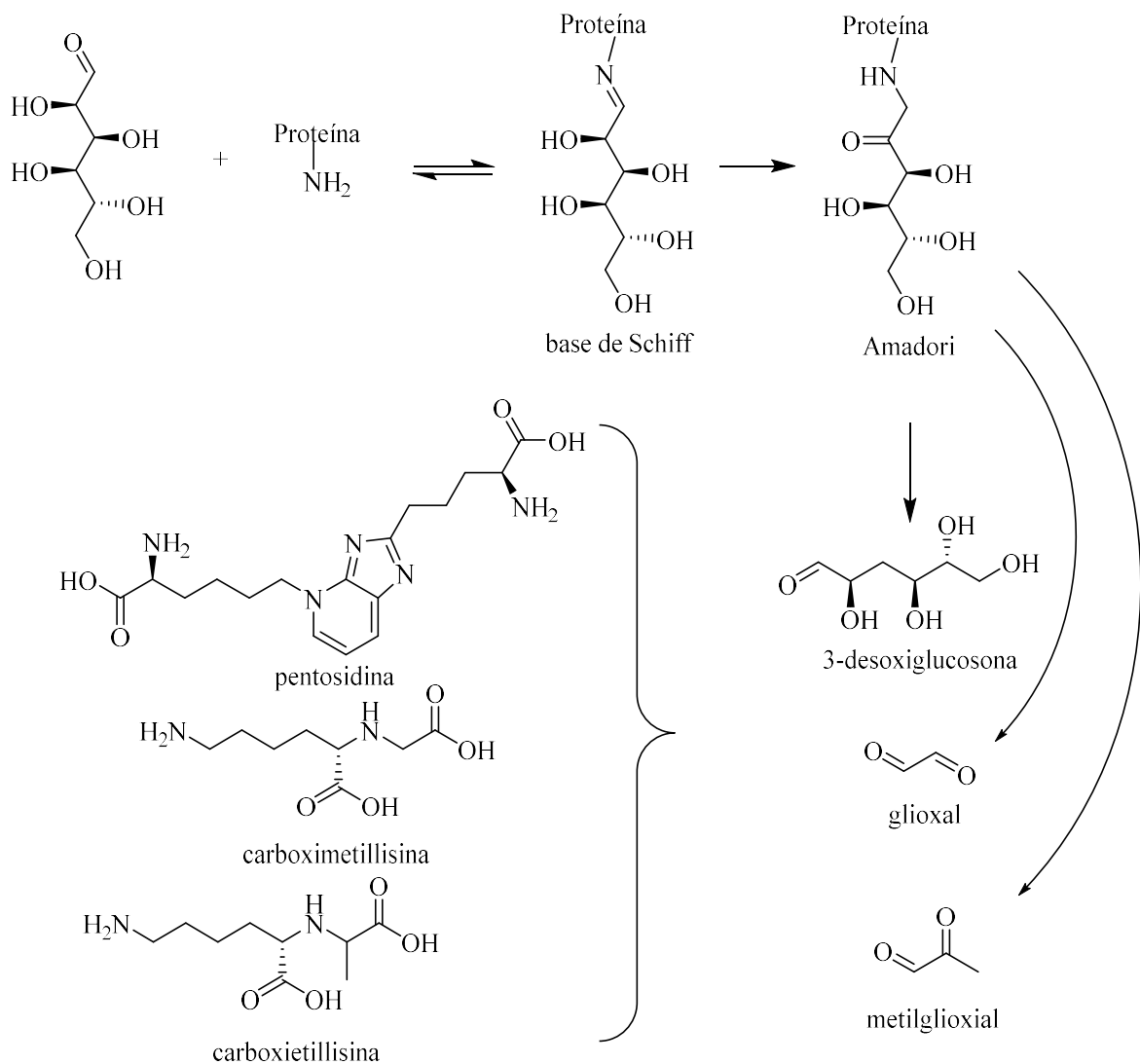
Fonte: O autor

### 2.2.3 Produtos de glicação avançadas

Como discutido nas seções anteriores, o diabetes leva seus portadores a algumas complicações de saúde e muitas dessas complicações são relacionadas ao aumento do EO em quadros de hiperglicemia. A formação dos produtos de glicação avançada (AGEs do inglês *Advance Glycation end Products*) é um dos processos que levam ao aumento desse EO (JOHANSEN et al., 2005; KANG, YANG, 2020). Além de levar ao aumento do EO, os AGEs também causam danos nas estruturas das proteínas prejudicando assim seu funcionamento, o que leva a problemas cardiovasculares, neuropatia, retinopatia, entre outros (KANG, YANG, 2020; KHAN et al., 2020).

Os AGEs são produtos formados por reações de Maillard não enzimáticas, que ocorrem entre carboidratos redutores com aminoácidos, lipídios ou ácidos nucleicos, e ocorre em três etapas (Figura 11) (RABBANI, THORNALLEY, 2018; KHAN et al., 2020). Na primeira etapa o açúcar reage com um grupo amino livre de uma molécula de proteína, formado um composto instável derivado de base de Schiff, que posteriormente sofre um rearranjo formando um intermediário chamado produto de Amadori. Esse intermediário sofre uma quebra podendo formar alguns tipos de produtos diferentes, como glioxal, metilglioxal ou 3-desoxiglucosona, que são os exemplos mais comuns (Figura 11). Posteriormente na fase final da reação de Maillard, que é uma etapa irreversível, há a formação de produtos coloridos de baixo peso molecular, chamado de produtos de glicação avançada. Na Figura 11 são mostrados alguns exemplos desses produtos formados a partir dos 3 intermediários. Após a formação desses AGEs, podem ser criadas ligações cruzadas com proteínas modificando assim sua estrutura (NIEDOWICZ, DALEKE, 2005; KHAN et al., 2020).

Figura 11 - Formação dos produtos de glicação avançada formados através da reação de Maillard.



## Exemplos de AGEs

Fonte: Adaptado de Niedowicz e Daleke (2005)

Assim, inibir a formação desses AGEs se mostra bastante importante. Há algumas substâncias usadas para esse fim, algumas delas sintéticas, como a aminoguanidina que foi a primeira utilizada. Esta substância atua capturando os precursores dos AGEs, o glicoxal, metilglicoxal ou 3-desoxiglucosona, impedindo assim a formação dos AGEs. Há outros produtos comerciais sintéticos utilizados para esse fim, porém esses compostos possuem alguns efeitos colaterais, como enfraquecimento do fígado, anemia, vômito, diarreia, entre outros. Dessa forma a busca por novas substâncias para esse fim se faz necessário (KHAN et al., 2020).

Na literatura encontra-se alguns trabalhos onde extratos de plantas mostraram boa atividade anti-glicação, assim como o trabalho de revisão feito por Khan e outros (2020), que trazem várias espécies que tiveram bons resultados de inibição anti-glicação. Além das propriedades de inibição apresentados por vários extratos, o trabalho também traz uma série de compostos encontrado em plantas que possuem boa atividade anti-glicante, mostrando assim que a utilização de produtos naturais pode sim ser um caminho viável.

### 2.3 Aspectos da família e do gênero da *Cassia bakeriana*

A *Cassia bakeriana* Craib pertence ao gênero *Cassia*, que por sua vez é pertencente à família Fabaceae (antiga *Leguminosae*), que é a terceira maior entre as angiospermas, com 751 gêneros e 19500 espécies. O gênero *Cassia* é um dos maiores da família, sendo constituído por mais de 600 espécies, incluindo arbustos, árvores e ervas, possuindo espécies distribuídas em regiões tropicais e subtropicais por todo o mundo (VIEGAS JUNIOR et al., 2006; GROUP et al., 2013a; GROUP et al., 2013b; BRANDÃO-COSTA, ARAÚJO, PORTO, 2018).

Trata-se de um gênero bastante importante dentro dessa família por possuir uma variedade de espécies com uso na medicina popular há anos, principalmente em países da África e Ásia (VIEGAS JUNIOR et al., 2006; ZHAO et al., 2016). No Brasil também há relatos de usos de algumas dessas espécies para fins medicinais, como a espécie *C. leiandra*, que é uma espécie nativa da Amazônia, e é utilizada pelos povos da região para tratamento de micoses (ARAÚJO et al., 2019). Na Tabela 5 é descrito alguns exemplos de espécies de *Cassia* usadas na medicina popular.

Tabela 5 – *Cassias* usadas na medicina popular com seus respectivos usos.

<b>Espécie</b>	<b>Usos na medicina popular</b>	<b>Referências</b>
<i>C. absus</i>	Infecções na pele, cicatrização de feridas, hipertensão, úlcera péptica.	(AHMAD et al., 2019)
<i>C. fistula</i>	Febre, problemas no coração, hemorragias, úlceras, laxante, problemas de pele, dores abdominais	(SHARMA, KUMAR, JAITAK, 2020)
<i>C. grandis</i>	Anemia, úlceras na pele, diabetes, expectorante.	(PRADA et al., 2020)

Tabela 5 – Exemplos de espécies de *Cassia* usadas na medicina popular com seus respectivos usos (*continua*).

<i>C. leiandra</i>	Tratamento de micose.	(ARAÚJO et al., 2019)
<i>C. italica</i>	Infecções de pele, constipação, edemas, expectorante, laxante.	(AL-HAIDARI, AL-OQAIL, 2020)
<i>C. obtusifolia</i>	Doenças oftálmicas, dor de cabeça, hipertensão, constipação.	(DEORE, MAHAJAN, 2018; FENG et al., 2018)
<i>C. occidentalis</i>	Disenteria, diarreia, constipação, febre, câncer, doenças venéreas, malária, asma, leprose, diabetes.	(SHARMA et al., 2014; SHUKLA et al., 2020)
<i>C. siamea</i>	Malária, diabetes, problemas de pele, problemas intestinais,	(TANTY, PERMAI, 2021)
<i>C. singueana</i>	Febre, malária, conjuntivite.	(OTTU, ATAWODI, ONYIKE, 2013)
<i>C. sieberiana</i>	Reumatismo, artrite, malária, diabetes, dor de dente, gengivite.	(MACEDO et al., 2021)
<i>C. sophera</i>	Analgésico, anti-inflamatória, asma.	(SUNDARAM OORTHY et al., 2016)
<i>C. tora</i>	Constipação, anti-inflamatória, asma, problemas intestinais, asma, expectorante.	(CHETHANA et al., 2017; LEE et al., 2019)

Devido ao expressivo uso dessas espécies na cultura popular, muitas delas foram estudadas ao longo dos anos e tiveram seus extratos e óleos essenciais de várias partes das plantas testadas para as mais diversas atividades biológicas. Um estudo de revisão feito por Sundaramoorthy e outros (2016), mostra espécies de *Cassia* que já foram avaliadas para algum tipo de atividade biológica (Tabela 6).

Tabela 6 – Espécies de Cassia com atividades biológicas atestadas.

Espécie	Atividades biológicas
<i>C. auriculata</i>	Antibactericida, antifúngica, antioxidante.
<i>C. australis</i>	Antiviral.
<i>C. fistula</i>	Antibactericida, antidiabética, anti-inflamatória, antioxidante, hepatoprotetora, antitumoral e antifúngica.
<i>C. javanica</i>	Antidiabética.
<i>C. nigricans</i>	Diversas atividades antimicrobianas frente patógenos comuns.
<i>C. nodosa</i>	Antioxidante.
<i>C. tora</i>	Antifúngica.
<i>C. sophera</i>	Larvicida, antioxidante.

O extrato das folhas da espécie *C. augustifolia* foram testados em ratos no tratamento de diabetes e apresentaram bons resultados quanto à diminuição de complicações metabólicas associadas a hipoglicemia (JANI, GOSWAMI, 2020). O extrato metanólico das folhas da espécie *C. auriculata* também apresentou boa atividade antidiabética ao ser testado em ratos (KHADER et al., 2017), patologia esta que será estudada nesse trabalho.

Como são plantas com bastante estudos publicados, tendo bons resultados para os mais diversos tipos de atividades, o isolamento de alguns de seus metabólitos bioativos também foi bem estudado, e muitos desses compostos também foram testados para diversas atividades biológicas. A tabela 7 mostra alguns compostos isolados de algumas espécies de *Cassia* e algumas atividades biológicas atribuídas a eles, quando for o caso, e as Figuras 12 e 13 trazem as estruturas desses compostos.



Tabela 7 – Compostos isolados de espécies de *Cassia* e atividade biológica.

<b>Espécies</b>	<b>Composto isolado</b>	<b>Atividade biológica</b>	<b>Referências</b>
<i>C. absus</i>	5,7,4'-tri-hidroxi-8,3'-dimetoxiflavona-5-O- $\alpha$ -L-raminopiranosil-7-O-	Antibactericida e	(YADAVA, VISHWAKARMA, 2013)
	$\beta$ - xilopiranosose-(1 $\rightarrow$ 4)-O- $\beta$ -galactopiranosideo ( <b>16</b> )	antifúngica	
	3,5,7,4'-tetra-hidroxi-2',5'-dimetoxiflavona ( <b>17</b> )	--	
	Luteolina ( <b>18</b> )	--	
<i>C. auriculata</i>	4-(2,5-diclorobenzil)-2,3,4,5,6,7-hexa-hidro-7-(4-etoxifenil) benzo[h][1,4,7] triazecin-8(1 <i>H</i> )-one ( <b>19</b> )	Anticâncer contra câncer do colo do útero	(ESAKKIRAJAN et al., 2014)
<i>C. fistula</i>	Reína ( <b>20</b> )	Larvicida e inseticida	(DURAI PANDIYAN, IGNACIMUTHU, PAULRAJ, 2011) (ANTONISAMY et al., 2019)
		Anti-inflamatória	
<i>C. garrettiana</i>	Crisofanol ( <b>21</b> )	--	(BUNLUEPUECH, WATTANAPIROMSAKUL, TEWTRAKUL, 2013)
	Piceatannol ( <b>22</b> )	Anti-HIV	
	Aloe-emodina ( <b>23</b> )	--	
	Emodina ( <b>24</b> )	--	
	Cassigarol E ( <b>25</b> )	Anti-HIV	
<i>C. nigricans</i>	Emodina ( <b>24</b> )	Antimicrobiana	(AYO, AMUPITAN, ZHAO, 2007)
<i>C. occidentalis</i>	Ácido cicloocidentalico C ( <b>26</b> )	Anti HIV	(SHI-FEI, SHUN-LIN, 2017)

<i>C. occidentalis</i>	cycloccidentaliside VI (27)	--	(SHI-FEI, SHUN-LIN, 2017)
	Emodina (24)	Antibactericida	(CHUKWUJEKWU et al., 2006)
<i>C. obtusifolia</i>	Toralactona-9- <i>O</i> - $\beta$ -D-gentiobioside (28)	Hepatoprotetora	(SEO et al., 2017)
	Aurantioobtusina (29)	--	(TANG et al., 2015)
	Crisoobtusina (30)		
	Rubrofusarina (31)	Antioxidante	(LUO et al., 2019)
	Toralactona (32)	Antioxidante e inibição de $\alpha$ -glicosidase	(LUO et al., 2019)
	Crisofanol (21)	inibição de $\alpha$ -glicosidase	(LUO et al., 2019)
	Physicon (33)	inibição de $\alpha$ -glicosidase	(LUO et al., 2019)
	Crisofanol-10,10'-biantrona (34)	inibição de $\alpha$ -glicosidase	(LUO et al., 2019)
	Obtusifolina (35)	--	
<i>C. roxburghii</i>	Emodina-1- <i>O</i> - $\beta$ -D-glucosídeo-(2 $\rightarrow$ 1)glucopiranosídeo (36)	--	(EL-TOUMY et al., 2012)
	Aloe-emodina-8- <i>O</i> - $\beta$ -D-glucosídeo-(6 $\rightarrow$ 1)glucopiranosídeo (37)	--	
	Quercetina-3- <i>O</i> - $\alpha$ -L-raminosídeo (38)	Antioxidante	

<i>C. siamea</i>	Siamalkaloid A (39)	Antiviral TMV ( <i>Tobacco mosaic virus</i> )	
	Siamalkaloid B (40)	Antiviral TMV	
	Siamalkaloid C (41)	Antiviral TMV	(WU et al., 2016)
	Cassiarina A (42)	Antiviral TMV	
	Siaminina A (43)	Antiviral TMV	
	Cassiarina H (44)	Antiviral TMV	
<i>C. sophera</i>	Rametina (45)	Anti-inflamatória	(MONDAL, RAJALINGAM, MAITY, 2013)
	Stigmasterol (poriferasterol) (46)	--	(BRAHMACHARI et al., 2017)
	2,7-di-hidroxi-4-metil-6 <i>H</i> -benzo[ <i>c</i> ]cromo-6-one (47)	--	(BRAHMACHARI et al., 2019)
	2,7-dihidroxi-9-metil-6-oxo-6 <i>H</i> -benzo[ <i>c</i> ]cromona-1-carboxilato (48)	--	(BRAHMACHARI et al., 2019)
<i>C. spectabilis</i>	(-)-espectralina (49)	Antifúngica, analgésica periférica	(VIEGAS JUNIOR et al., 2006)
	3-acetilleptofilina-A (50)	Antifúngica	
	3-O-acetilespectralina (51)	Analgésica periférica	
<i>C. tora</i>	6-metoxiciclo-hexano-1,2,3,4,5-pentaol mono-hidratado (52)	Anti-inflamatório	(ANTONISAMY et al., 2017)

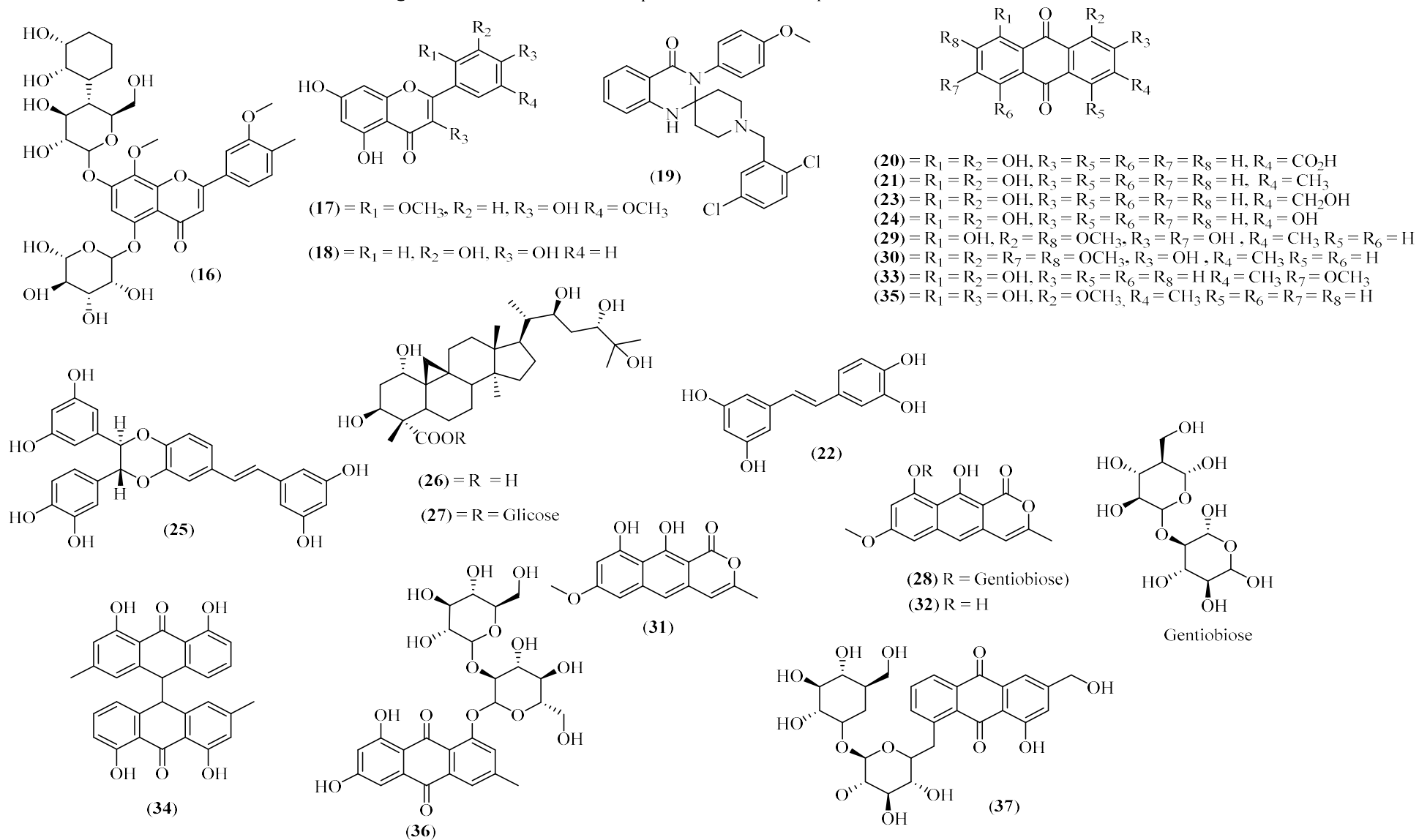
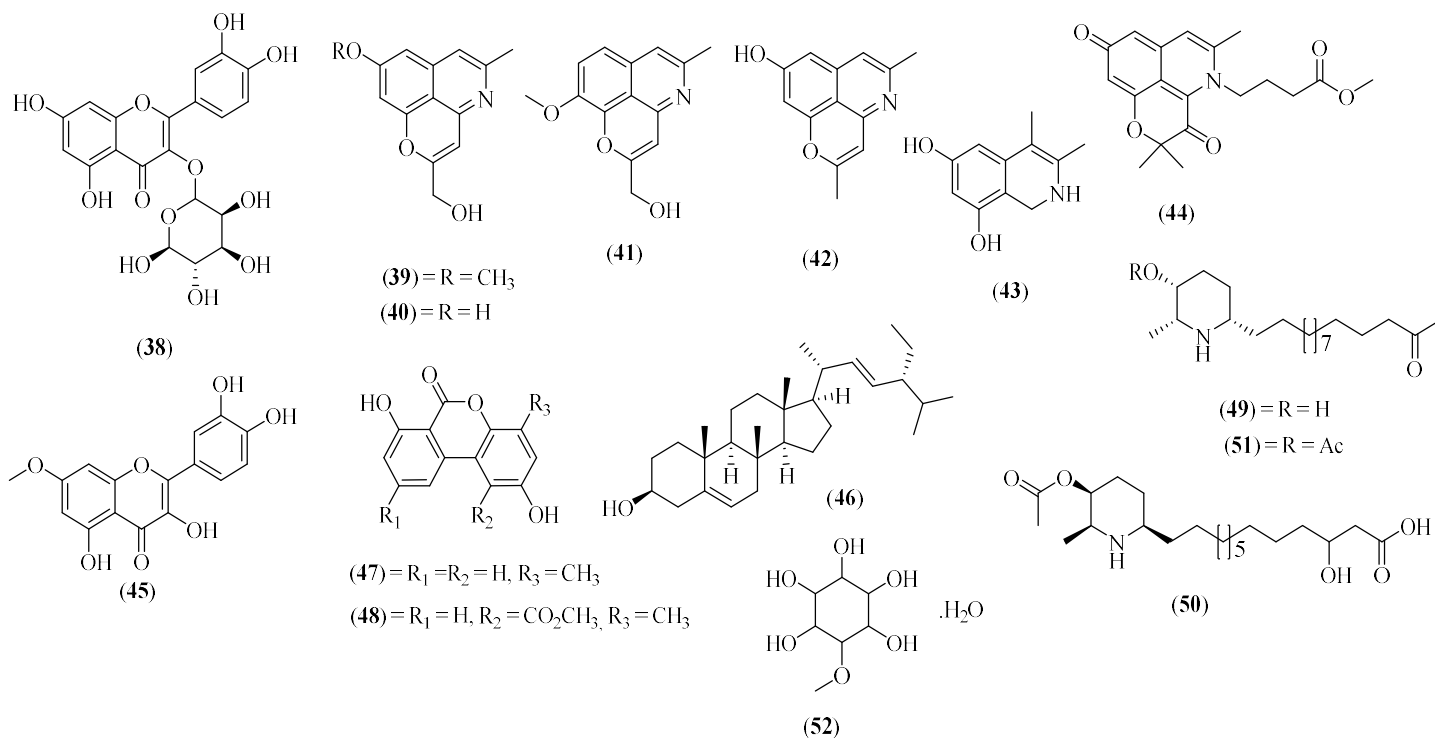
Figura 12 - Estruturas de composto isolados de espécies de *Cassia*

Figura 13 - Estruturas de composto isolados de espécies de *Cassia*

A partir desse levantamento realizado, fica mais evidente a importância do gênero. São inúmeros compostos já isolados das mais variadas classes, como flavonoides, terpenos, antraquinonas, alcaloides, cromonas, entre outros. Além da variedade de classes de compostos, tem-se uma boa variedade de atividades biológicas atribuídas a alguns deles, como atividade anti-HIV, antidiabética, anticâncer, antifúngica, antibactericida, anti-inflamatória, entre outras.

A *C. bakeriana* é uma espécie originária da Tailândia, conhecida popularmente como cássia-rósea ou cássia-bakeriana, e trata-se de uma árvore frondosa, bastante florífera e que pode alcançar de 12 a 15 metros de altura. Por ser bastante florífera, essa espécie é bastante utilizada na arborização de avenidas, parques e etc (LORENZI, 2003).

Não há na literatura relatos de uso popular dessa espécie para fins medicinais, porém trata-se de uma espécie pertencente a um grupo que possui inúmeras espécies com uso na medicina popular para as mais variadas enfermidades, muitas delas com atividades biológicas já testadas, além de compostos bioativos isolados como mostrado no item anterior. Além disso, é uma espécie pouco estudada, principalmente quando relacionado a todos os órgãos da planta, tendo poucos trabalhos sobre a sua composição química e poucos trabalhos de avaliação biológica.

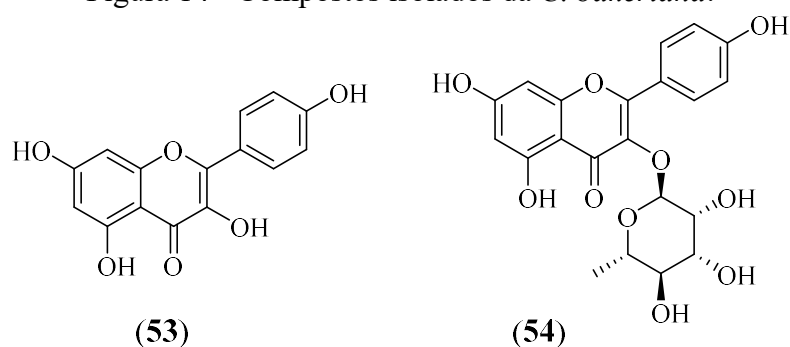
No trabalho por Cunha e outros (2013) foi avaliado a composição química do óleo essencial das folhas, cascas e madeira. Também foi avaliado a atividade antibactericida desses óleos contra bactérias aeróbicas e anaeróbicas da cavidade bucal. Em outro trabalho por Cunha

e outros (2017), foi feito um estudo bioguiado dos extratos das cascas, onde a fração diclorometano apresentou melhor atividade frente as bactérias aeróbicas e anaeróbicas da cavidade bucal. O estudo químico da fração levou ao isolamento da antraquinona reína (**20**) (Figura 12), que apresentou bons resultados para alguns microrganismos anaeróbicos, como a espécie *P. nigrescens* que apresentou um MIC de  $3,12 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

Em outro trabalho descrito por Nascimento e outros (2020), os extratos etanólicos das folhas e flores da *C. bakeriana* tiveram sua atividade antifúngica testada contra três espécies de *Candida* e também contra bactérias aeróbicas e anaeróbicas da cavidade bucal, tendo melhores resultados contra a espécie *Candida glabrata*, com CIM de  $23,4 \mu\text{g mL}^{-1}$  para os extratos das flores e  $46,9 \mu\text{g mL}^{-1}$  para as folhas.

No estudo realizado por Costa Silva e outros (2019) foi feito a avaliação química e biológica dos extratos das folhas da *C. bakeriana*. Foram testadas atividades inibitórias enzimáticas contra as enzimas  $\alpha$ -amilase,  $\alpha$ -glicosidase e  $\alpha$ -lipase, além de atividade anti-glicação e antioxidante. Para as atividades enzimáticas, os melhores resultados foram frente a enzima  $\alpha$ -amilase, onde o extrato etanólico exibiu uma inibição de 92,82%, com  $\text{CI}_{50}$  de  $5,00 \mu\text{g mL}^{-1}$  e frente a enzima  $\alpha$ -lipase, onde o extrato hexânico inibiu a atividade em 79,25%, com  $\text{CI}_{50}$  de  $25,27 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Os extratos e frações também apresentaram valores de atividade antioxidante promissores e boa inibição anti-glicação. Neste trabalho também foi realizada a identificação por espectrometria de massas do extrato etanólico e frações diclorometano e acetato de etila, além do isolamento dos flavonoides canferol (**53**) e canferol-3-*O*-ramnosídeo (**54**) (Figura 14).

Figura 14 - Compostos isolados da *C. bakeriana*.



Fonte: O autor

Dessa forma, observa-se que a espécie apesar de possuir poucos estudos, tem alguns trabalhos com resultados promissores, mostrando que a planta possui potencial a ser explorado

e que há a necessidade de estudos químicos mais completos de outras partes da planta, como as cascas, flores, galhos e raízes, que ainda não foram amplamente relatados na literatura.

Neste contexto, o objetivo geral deste trabalho foi realizar um estudo dos extratos das cascas da espécie *Cassia bakeriana* Craib. Como demonstrado a espécie faz parte de um importante gênero e os poucos estudos publicados já demonstraram um potencial biológico para a espécie, porém em relação às cascas da espécie, há poucos estudos, tanto químicos quanto biológicos. Além disso, como mostrado no item 1.1, há o risco de uma perda significativa de possíveis agentes bioativos devido a destruição causada pelo homem, reforçando assim a necessidade do estudo das mais diversas espécies evitando assim a possível perda desse conhecimento ainda disponível na natureza.

Assim o presente trabalho propõe o estudo químico dos extratos das cascas da *C. bakeriana*, e avaliação do seu potencial biológico quanto a inibição das enzimas  $\alpha$ -amilase,  $\alpha$ -glicosidase, a capacidade de inibição da glicação e a capacidade antioxidante.

### 3.0 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivos gerais

Este trabalho tem por objetivo geral estudar a composição química das cascas da *Cassia bakeriana* Craib, e avaliar as atividades antioxidante e biológicas relacionadas com o diabetes ou de possíveis complicações dessa patologia.

#### 3.2 Objetivos específicos

- Realizar o fracionamento do extrato etanólico das cascas de *C. bakeriana* por extração líquido-líquido com diferentes solventes.
- Realizar a prospecção fitoquímica dos extratos e frações;
- Avaliar a atividade antioxidante dos extratos e frações;
- Avaliar a atividade inibitória de  $\alpha$ -amilase e  $\alpha$ -glicosidase dos extratos e frações das cascas de *C. bakeriana*;
- Avaliar a capacidade de inibição da glicação dos extratos e frações;
- Identificar os compostos presentes nas frações ativas por espectrometria de massas.

## 4.0 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

### 4.1 Instrumentos e reagentes

#### 4.1.1 Instrumentação

- Banho de aquecimento FISATOM modelo 550;
- Balança analítica SHIMADZU modelo AUW220D;
- Balança de luz infravermelha para determinação de umidade Quimis modelo Kelt FD-600;
- Evaporador rotativo IKA modelo RV 10;
- Liofilizador TERRONI modelo LS3000;
- Incubadora B.O.D. Nova Ética modelo 411/FDP 155L;
- Lavadora ultra-sônica modelo USC-750 Unique;
- Cromatógrafo líquido de alta eficiência Agilent, modelo Infinity 1260, acoplado a um espectrômetro de massas de alta resolução do tipo Q-TOF (Quadropole Time of Flight) da marca Agilent, modelo 6520 B, com fonte de ionização por eletrospray (IES).

#### 4.1.2 Reagentes

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

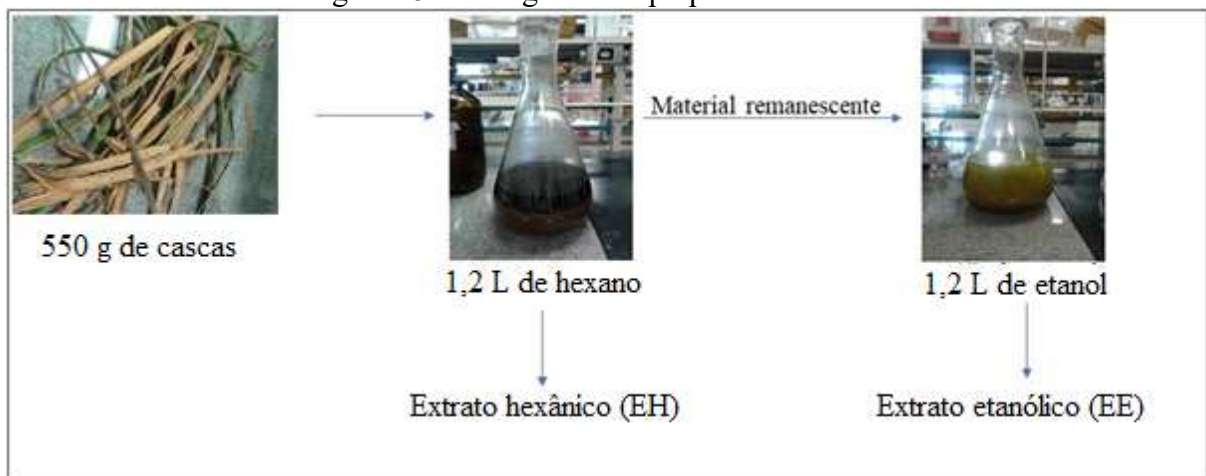


## 4.2 Preparo dos extratos e frações

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

Posteriormente as cascas foram encaminhadas para o Núcleo de Pesquisa em Produtos Naturais (NuPpEN) no Instituto de Química UFU e colocadas em estufa a 35 °C até que a umidade ficasse abaixo de 10%. A umidade foi determinada em uma câmara de infravermelho pelo método gravimétrico, onde 1 g das cascas foram monitoradas a uma temperatura de 105 °C por 15 min. Quando a umidade estava em 9,5%, as cascas foram retiradas da estufa e trituradas utilizando um multiprocessador. O extrato hexânico foi preparado pelo processo de maceração, onde 550 g das cascas secas foram colocadas em um erlenmeyer e acrescentado 1,2 L de hexano. A cada dois dias o hexano foi filtrado e destilado em um evaporador rotatório, obtendo assim o extrato hexânico (EH). Esse processo foi realizado 6 vezes. O extrato etanólico (EE) foi obtido da mesma forma que o EH, onde ao material vegetal remanescente da extração com hexano foram adicionados 1,2 L de etanol e o processo de extração foi repetido 6 vezes. Os extratos foram liofilizados para remoção resíduos de água. A Figura 15 mostra o esquema de preparo o material.

Figura 15- Fluxograma de preparo dos extratos.

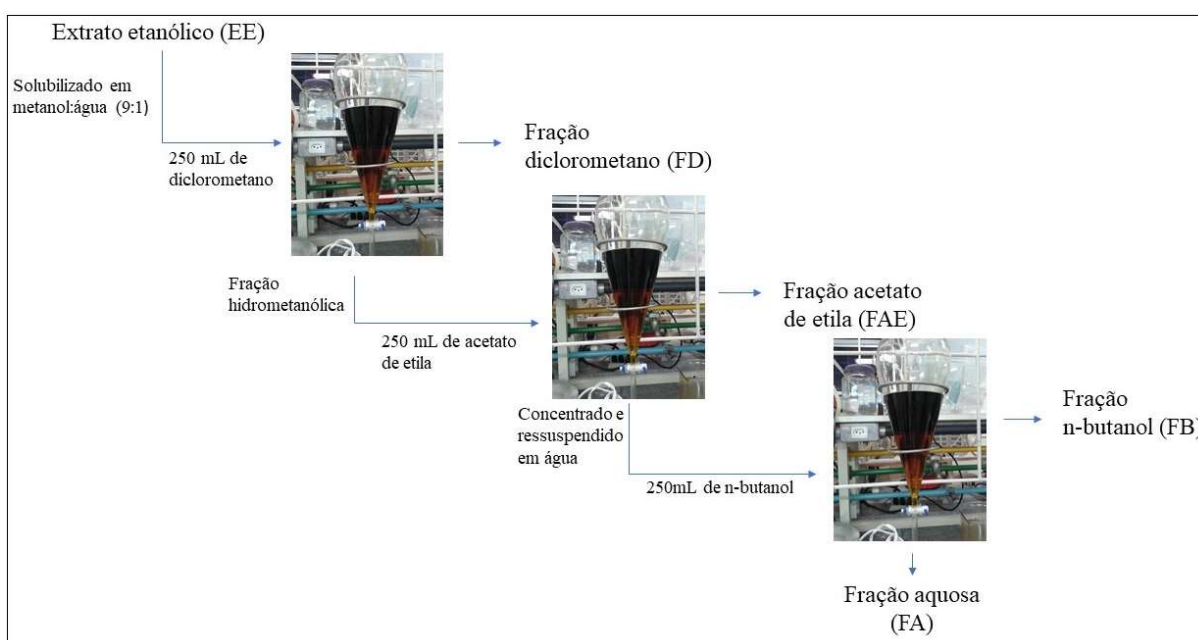


Fonte: O autor

Através da extração líquido-líquido foram obtidas as frações com solventes de polaridade crescente. Para isto, foram utilizados 100,15 g do EE das cascas da *C. bakeriana* onde foi adicionado 500 mL de uma solução metanol:água (9:1). A solução foi filtrada e transferida para um funil de separação, onde foi feita a extração com diclorometano (250 mL), O solvente foi evaporado no evaporador rotatório a pressão reduzida com banho a 40 °C. O processo foi repetido 5 vezes, obtendo assim, a fração diclorometano (FD).

Posteriormente foi feita a extração com acetato de etila, obtendo a fração acetato de etila (FAE), o processo foi o mesmo realizado para a FD. A fração metanol:água remanescente foi concentrada e solubilizada em água e na sequência adicionado o *n*-butanol. O processo de extração foi repetido obtendo a fração *n*-butanol (FB) e a fração aquosa (FA). As frações foram submetidas ao liofilizador para a remoção de água. A figura 16 traz um esquema do preparo das frações.

Figura 16 - Preparo das frações via extração líquido-líquido.



Fonte: O autor

### 4.3 Prospecção fitoquímica

A prospecção fitoquímica foi realizada a fim de estabelecer as possíveis classes de compostos presentes nos extratos e frações. Foi utilizada cromatografia em camada delgada (CCD) onde as amostras desenvolvem pela cromatoplaça e posteriormente, são usados reveladores químicos característicos para as principais classes de compostos presentes no

metabolismo das plantas. As placas de CCD utilizadas foram de sílica gel 60 com indicador de fluorescência (UV<sub>254</sub>) e 0,20 mm de espessura (Macherey-Nagel). Para realização da prospecção, os extratos e as frações foram solubilizados em metanol com concentração de 1 mg mL<sup>-1</sup> e utilizadas duas fases móveis como eluente, uma composta de hexano:acetato (5:1) (fase utilizada apenas para o EH) e a outra fase, composta por acetato:metanol (5:1) e 0,5 mL de ácido fórmico, que foi usada para o EE e para as demais frações. Os reveladores utilizados são listados a seguir, todos foram preparados segundo as metodologias propostas por Wagner e Bladt (1996).

#### **4.3.1 Reveladores para flavonoides**

NP/PEG: foram preparadas duas soluções, uma solução 1% (m v<sup>-1</sup>) de difenilboriloxietilamina (NP) e uma solução de 5% polietilenoglicol-4000 (PEG4000) em etanol. Posteriormente foram misturados 10 mL de solução de NP e 8 mL da solução de PEG4000, o revelador foi borrifado sobre a placa e o aparecimento de manchas coloridas sob a luz ultravioleta indica a presença de flavonoides.

#### **4.3.2 Reveladores para alcaloides**

Iodocloroplatinado: foram preparadas duas soluções, uma solução 5% (m v<sup>-1</sup>) de ácido hexacloroplatínico em água e uma solução de 10% (m v<sup>-1</sup>) de iodeto de potássio em água. A seguir foi misturado 1,0 mL da solução de ácido hexacloroplatínico e 9,0 mL da solução de iodeto de potássio, juntamente com 10 mL de água destilada. O revelador é borrifado sobre a placa e o aparecimento de manchas marrons indica a presença de alcaloides.

Dragendorff: foram preparadas duas soluções, denominadas A e B. A solução A foi preparada dissolvendo 0,85 g de nitrato de bismuto em 10 mL de ácido acético e em seguida foi adicionado 40 mL de água destilada sob aquecimento. A solução B foi preparada dissolvendo 8,0 g de iodeto de potássio em 30 mL de água destilada. As duas soluções foram misturadas em proporções iguais para o preparo de uma solução estoque; dessa solução estoque foi retirado 1,0 mL e adicionado 2,0 mL de ácido acético glacial e 10 mL de água destilada. O revelador é borrifado sobre a placa de CCD e o aparecimento de manchas de cor laranja indica a presença de alcaloides.

### **4.3.3 Reveladores para antraquinonas, antronas e cumarinas**

KOH: foi preparada uma solução de hidróxido de potássio 5% ( $m\ v^{-1}$ ) em etanol. O revelador é aplicado sobre a placa de CCD, o aparecimento de manchas vermelhas indica a presença de antraquinonas. Já a presença de antronas ou cumarinas é evidenciada com o auxílio de luz UV, onde o aparecimento de manchas amarelas indica a presença de antronas e azuis a de cumarinas.

### **4.3.4 Reveladores universais (Terpenos, esteroides, saponinas, açúcares, fenóis, taninos, flavonoides)**

Liberman-Burchard: foram adicionados 5,0 mL de ácido sulfúrico e 5,0 mL de anidrido acético em 50 mL de etanol absoluto, a solução foi preparada sob banho de gelo. O revelador é borrifado sobre a placa de CCD e a placa é aquecida por 5 a 10 minutos, com temperatura de 100 °C. O aparecimento de manchas coloridas indica a presença de compostos das classes citadas.

Sulfato cérico: foi dissolvido 2,1 g de  $Ce(SO_4)_2 \cdot 5H_2O$  em 15 mL de ácido sulfúrico concentrado e depois foram adicionados 800 mL de água destilada (CHAVES, 1997). A solução é aplicada sobre a placa de CCD e o aparecimento de manchas marrons indica a presença de compostos das classes citadas.

Vanilina sulfúrica: foram preparadas duas soluções, uma solução 1% ( $m\ v^{-1}$ ) de vanilina em etanol (solução A) e uma solução 5% ( $v\ v^{-1}$ ) ácido sulfúrico em etanol (solução B). A solução A é borrifada na placa seguida da solução B, a placa é aquecida por 5 a 10 minutos, com temperatura de 100 °C; o aparecimento de manchas coloridas indica a presença de compostos das classes citadas.

## **4.4 Análises biológicas**

### **4.4.1 Análise inibitória das enzimas $\alpha$ -amilase e $\alpha$ -glicosidase e inibição da glicação**

Todas as análises de inibição enzimática, assim como as análises de inibição de glicação e as atividades antioxidantes pelos métodos DPPH• e Orac, foram realizadas no Laboratório de

Bioquímica e Biologia Molecular do Instituto de Biotecnologia da UFU, com a colaboração do professor Dr. Foued Salmen Espindola.

#### 4.4.1.1 Inibição de $\alpha$ -amilase

A análise de inibição de  $\alpha$ -amilase foi feita através do método cinético (Gal-G2- $\alpha$ -CNP) modificado. Neste método é utilizado o substrato  $\alpha$ -(2-cloro-4-nitrofenil)- $\beta$ -1,4-galactopiranosilmaltosídeo (Gal-G2- $\alpha$ -CNP) e uma fração enriquecida da enzima  $\alpha$ -amilase (f-AS) (DA SILVA SANTOS et al., 2012; GOUVEIA et al., 2013).

O preparo da f-AS foi realizado a partir da coleta de saliva humana pelo método do cuspe, a saliva coletada foi armazenada por 48 horas a 20 °C (parecer do comitê de ética n.º 407.597). Após esse prazo, a saliva foi descongelada e centrifugada a 1200 xg pelo tempo de 1 minuto a 20 °C. O sobrenadante foi então fracionado em uma coluna de troca iônica Q-Sepharose; a fase móvel utilizada foi um tampão contendo 50 mmol L<sup>-1</sup> de Tris-HCl (pH 8,0), 10 mmol L<sup>-1</sup> de EDTA e 10 mmol L<sup>-1</sup> de EGTA. O volume de exclusão da coluna de Q-Sepharose foi dialisado em tampão de bicarbonato de amônio (50 mmol L<sup>-1</sup>, pH 7,0), liofilizado e solubilizado em 50 mmol L<sup>-1</sup> de tampão ácido 2-(N-morfolino)-etanossulfônico (MES), contendo 5 mmol L<sup>-1</sup> de cloreto de cálcio 140 mmol L<sup>-1</sup> detiocianato de potássio e 300 mmol L<sup>-1</sup> de cloreto de sódio (pH 6,0).

As amostras de extratos e frações foram solubilizadas em DMSO:água (1:1) e incubadas com a f-AS numa proporção de 1:10, o período de incubação foi de 30 minutos à temperatura de 37 °C. A reação foi iniciada pela adição de 320  $\mu$ L do substrato GAL-G2- $\alpha$ CNP (12 mmol L<sup>-1</sup>) e os valores de absorbâncias foram medidos a 405 nm, durante 3 min, com intervalo de 1 min a 37 °C. O controle foi realizado substituindo os extratos e frações por tampão MES. Como controle positivo foi utilizada a acarbose. Os ensaios foram feitos em duplicata e o resultado foi apresentado como porcentagem de inibição da  $\alpha$ -amilase; o resultado foi calculado através da equação 1. As equações 2 e 3, determinam a atividade enzimática em Uml<sup>-1</sup> e em % respectivamente, ambas foram usadas para calcular a inibição na equação 1.

$$\text{Inibição } \alpha - \text{amilase (\%)} = 100 - (\text{atividade de } \alpha - \text{amilase em \%}) \text{ equação 1}$$

$$\text{Atividade de } \alpha - \text{amilase Uml}^{-1} = \left[ \frac{\left( \frac{\Delta \text{Abs}}{\text{min}} \right) V_f \cdot Fd}{\zeta \cdot V \cdot S \cdot I} \right] \text{ equação 2}$$

$$\text{Atividade de } \alpha - \text{amilase (\%)} = \frac{(A \text{ amostra})}{(A \text{ contole})} \cdot 100 \text{ equação 3}$$

Onde:  $\Delta Abs/min = [(Abs_3 - Abs_1)/2]$  é a diferença de absorvância por minuto ( $Abs =$  absorvância; 1 e 3 = minutos);  $V_f$  é o volume total da reação (328  $\mu L$ );  $V_s$  é o volume de amostra (extratos, frações e enzima  $\alpha$ -amilase, 8  $\mu L$ );  $Fd$  é o fator de diluição da saliva (50);  $\xi$  é o coeficiente de absorvância do 2-cloro-p-nitrofenol;  $l$  é o comprimento do percurso da luz (0,97);  $A_{controle}$  é a atividade da  $\alpha$ -amilase e  $A_{amostra}$  é a atividade da  $\alpha$ -amilase na presença dos extratos e frações.

Também foi determinado o valor de  $CI_{50}$ , que é a concentração mínima de amostra necessária para inibir 50% da atividade enzimática. Para isso foram usadas concentrações de 30,0; 10,0; 5,5; 3,0; 1,0; 0,55; 0,33 e 0,1  $mg\ mL^{-1}$  de amostra. Com os valores obtidos foi traçado um gráfico de porcentagem de inibição versus concentração e, através da equação da reta, foi possível obter o valor de  $CI_{50}$ .

#### 4.4.1.2 Inibição de $\alpha$ -glicosidase

Para analisar a inibição de  $\alpha$ -glicosidase foi utilizado o método modificado com o substrato 4-nitrofenil- $\alpha$ -D-glicopiranosídeo ( $p$ -NPG) e uma fração enriquecida de  $\alpha$ -glicosidase f-AG (Sigma Aldrich I-1630) (TOMA et al., 2014). Para a preparação da f-AG, foram dissolvidos 200 mg de pó cetônico de intestino de rato em 3 mL de solução aquosa de cloreto de sódio (0,9  $m\ v^{-1}$ ). A solução foi centrifugada a 1200  $xg$  por 30 minutos e o sobrenadante foi utilizado no ensaio. As amostras a serem testadas foram dissolvidas em DMSO:água (1:1) e foram incubadas com a f-AG e 1,5  $mmol\ L^{-1}$  de glutatona reduzida, diluída em tampão fosfato, (50  $mmol\ L^{-1}$ , pH 6,8) durante 20 min a 37 °C. A reação se iniciou com a adição do substrato  $p$ -NPG (4  $mmol\ L^{-1}$ ) em tampão fosfato de sódio (50  $mmol\ L^{-1}$ , pH 6,8), foram então medidos valores de absorvância em 405 nm, durante 30 minutos em intervalos de 5 minutos, a 37 °C. O controle dos testes foi realizado utilizando somente o tampão fosfato e, para controle positivo foi utilizado, a acarbose. Para a determinação do  $CI_{50}$  foram utilizadas as mesmas concentrações que nos testes da  $\alpha$ -amilase. Todos os ensaios foram realizados em duplicata. Para esse teste a porcentagem de inibição é calculada através da equação 4.

$$inibição\ de\ \alpha - glicosidase = \left( \frac{ASC\ controle - ASC\ amostra}{ASC\ controle} \right) \cdot 100 \quad \text{equação 4}$$

Onde:  $ASC\ controle$  é a área sob a curva na ausência dos extratos e frações, e  $ASC\ amostra$  é a área sob a curva na presença dos extratos e frações.

#### 4.4.1.3 Inibição de glicação

Para este ensaio, as amostras foram primeiramente diluídas em DMSO:água (1:1) e adicionadas à albumina sérica bovina (BSA) com concentração de 50 mg mL<sup>-1</sup> e solução de frutose 1,25 mol L<sup>-1</sup>; todas soluções foram diluídas em um tampão fosfato (200 mmol L<sup>-1</sup>, pH 7,4). Posteriormente a mistura foi incubada por 72 horas a 37 °C, na ausência de luz. Após o período de incubação, foi adicionado 1,6 mL de ácido tricloroacético 20% m V<sup>-1</sup> em cada amostra. As amostras então foram centrifugadas a 1000 xg por 10 minutos e o *pellet* foi ressuspenso em 1,6 mL de tampão fosfato (200 mmol L<sup>-1</sup>, pH 7,4). A BSA possui uma fluorescência específica conforme ela se liga à frutose, essa redução na fluorescência foi medida em espectrofluorímetro (350 nm<sub>(ex)</sub>/420 nm<sub>(em)</sub>) (Perkin-Elmer LS 55, Massachusetts, USA) (HARSHA, LAVELLI, SCARAFONI, 2014). Como controle, os testes foram realizados substituindo a frutose pelo tampão fosfato e as amostras por DMSO, e para controle positivo foi utilizado a quercetina. Para a determinação do CI<sub>50</sub> foram utilizadas as mesmas concentrações que nos testes da α-amilase. Todos os ensaios foram realizados em duplicata. A porcentagem de inibição foi calculada através da equação 5:

$$IG (\%) = 100 - \left[ \frac{(IF \text{ amostra} - I \text{ branco})}{(IF \text{ controle} - IF \text{ branco})} \cdot 100 \right] \quad \text{equação 5}$$

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

## 4.5 Atividade antioxidante

### 4.5.1 Método do sequestro do DPPH•

Para a determinar a atividade antioxidante dos extratos e frações, foi utilizada a metodologia proposta por Yildirim, Mavi e Kara (2001), modificada utilizando o radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH). As amostras foram solubilizadas em DMSO e a reação foi iniciada adicionando 250 µL das amostras em 750 µL de uma solução metanólica do radical DPPH (0,06 mmol L<sup>-1</sup>). A mistura foi incubada por 20 minutos, na ausência de luz, a 30 °C. Após o período de incubação, a queda na absorbância em 517 nm foi então medida com o

auxílio de espectrofotômetro (Molecular Devices, Menlo Park, CA, EUA). Para a realização do branco, substitui-se a solução do radical DPPH por metanol e o ácido ascórbico foi usado como controle positivo. Todos os ensaios, assim como os de  $CI_{50}$  foram realizados em duplicata. Para calcular a atividade antioxidante (AA), que nesse caso corresponde a quantidade de radicais DPPH eliminados foi utilizado a equação 6:

$$AA (\%) = \left[ \frac{Abs\ controle - (Abs\ amostra - Abs\ branco)}{Abs\ controle} \right] \cdot 100 \quad \text{equação 6}$$

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

Para a obtenção do  $CI_{50}$ , foram utilizadas diferentes concentrações das amostras a fim de se obter a concentração que sequestra 50% do radical DPPH\*.

#### 4.5.2 Método do sequestro do radical de oxigênio ORAC

O método ORAC (do inglês *oxygen radical absorbance capacity*), consiste na inibição da oxidação induzida pelo radical peroxil, iniciada pela decomposição térmica do composto 2,2'-azobis-(2-amidinopropano)-di-hidrocloro (AAPH) (PRIOR et al., 2003), utilizando a fluoresceína como sonda fluorescente. A perda de fluorescência com o passar do tempo é avaliada na presença e ausência de compostos antioxidantes. Para isso, foram preparadas soluções das amostras a serem avaliadas em DMSO:água (1:1), em concentração de  $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Todos os reagentes foram preparados em tampão fosfato ( $75 \text{ mmol L}^{-1}$ , pH 7,4). Uma alíquota de  $25 \mu\text{L}$  de cada amostra foi adicionada a  $250 \mu\text{L}$  de fluoresceína ( $0,085 \text{ mmol L}^{-1}$ ) e então foram incubados por 15 minutos à temperatura ambiente. Posteriormente adicionou-se  $30 \mu\text{L}$  de AAPH às amostras para que se desse início à reação. A intensidade de fluorescência foi medida a  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  em um espectrofluorímetro, com excitação (ex) à  $485 \text{ nm}$  e emissão (em) à  $528 \text{ nm}$ , sendo verificada a cada 1 min e 30s durante 90 min. A perda da fluorescência foi medida calculando a área sobre a curva de decaimento da fluorescência da amostra pelo tempo, comparada com uma amostra sem antioxidante. A capacidade antioxidante foi determinada a partir da curva analítica construída com concentrações conhecidas do ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico (Trolox). O branco foi realizado substituindo as amostras por tampão fosfato e o ácido ascórbico foi utilizado como controle



positivo. Todas as análises foram realizadas em triplicatas e os resultados foram expressos como  $\mu\text{mol}$  equivalente de Trolox por grama de amostra.

#### 4.6 Análise por espectrometria de massas

Como o EE e as frações FD, FAE e FB obtiveram resultados biológicos promissores para algumas das análises feitas neste trabalho, e como também não há na literatura um trabalho com uma identificação dos compostos químicos presentes nos extratos das cascas desta espécie, o extrato e as frações foram submetidos a uma análise de espectrometria de massas (EM), para analisar a composição química das cascas.

As análises de cromatografia líquida de alta eficiência hifenado ao espectrômetro de massas (CLAE/EM), foram realizadas no Laboratório de Nanobiotecnologia do Instituto de Biotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia (IBTEC-UFU), em um CLAE (marca Agilent modelo Infinity 1260) hifenado ao espectrômetro de massas de alta resolução do tipo Q-TOF, da marca Agilent® modelo 6520 B com fonte de ionização por electrospray (BEN SAID et al.). Os parâmetros cromatográficos foram: coluna Agilent modelo Poroshell; 2.1 mm de diâmetro interno; 10 cm de comprimento; partículas de 2,7  $\mu\text{m}$ . A fase móvel: água acidificada com ácido fórmico (0,1% v v<sup>-1</sup>) (A) e metanol (B), com o gradiente: 2% de B (0 min); 98% de B (0-10 min); 100% de B (10-11 min). Os parâmetros de ionização foram: pressão do nebulizador de 20 psi; gás secante a 8L/min a uma temperatura de 220 °C, e no capilar foi aplicado uma energia de 4,5KV.

Foram então obtidos espectros em alta resolução no modo negativo e os espectros de massas sequencial (EM/EM) em diferentes energias de colisão. Com os valores de  $m/z$  (razão massa carga) obtidas nos espectros e seus respectivos espectros de fragmentação, foi possível propor a estrutura para alguns compostos presentes no extrato e nas frações. As possíveis estruturas foram propostas comparando os valores de  $m/z$  obtidos em alta resolução e os espectros de fragmentação com trabalhos encontrados na literatura, em bibliotecas online como o Metlin e bancos de dados (Chemspider, Pubchem e Massbank). Além disso, também foi levado em consideração a equivalência de duplas, regra do nitrogênio e o erro em ppm do  $m/z$  em alta resolução (equação 7), com valores de erro aceitos entre 0 a  $\pm 5$  ppm. Para o cálculo do erro, a massa teórica considerada foi baseada nos valores obtidos pelo software ChemDraw®.

$$E_{ppm} = \left( \frac{\text{massa experimental} - \text{massa exata}}{\text{massa exata}} \right) \times 10^6 \quad \text{equação 7}$$

## 5.0 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 5.1 Rendimentos dos extratos

O preparo dos extratos é uma etapa importante no estudo da química de produtos naturais, pois um bom rendimento possibilitará um melhor estudo dos metabólitos da planta e também das atividades que serão testadas posteriormente. A extração foi realizada por maceração e a escolha de preparar primeiramente o extrato hexânico é para a retirada de substâncias com caráter apolar como clorofilas. Posteriormente, a escolha pelo etanol se dá pela sua capacidade de extração de diferentes classes de metabólitos (MEDEIROS, KANIS, 2010). A Tabela 8 mostra o rendimento dos extratos preparados. Como esperado, a extração com etanol foi mais efetiva, tendo um maior rendimento que a extração com hexano.

Tabela 8 – Rendimento dos extratos das cascas da *Cassia bakeriana*.

<b>Massa das cascas (g)</b>	<b>Extrato</b>	<b>Massa de extrato obtido (g)</b>	<b>Rendimento</b>
550	Hexânico	4,6	0,8%
	Etanólico	137,3	25,0%

Outra etapa importante é o fracionamento através da extração líquido-líquido, essa etapa proporciona uma primeira separação dos compostos por afinidade aos solventes utilizados na extração, facilitando assim a separação dos compostos. A Tabela 9 apresenta os rendimentos obtidos para as frações a partir de 100,15 g do EE.

Tabela 9 – Rendimentos das frações obtidas por extração líquido-líquido.

<b>Fração</b>	<b>Massa obtida na Fração (g)</b>	<b>Rendimento (%)</b>
FD	9,5	9,5
FAE	33,8	33,7
FB	31,9	31,9
FA	14,3	14,3
Total	89,9	89,8
Material particulado no papel de filtro	5,2	

As frações mais polares foram as que apresentaram maiores rendimento, *n*-butanol (FB) e acetato de etila (FAE), indicando que a planta possui mais compostos com características polares, porém o etanol ainda foi capaz de extrair compostos com menor polaridade já que a fração diclorometano apresentou um rendimento, em torno de 10%. Outro fator dessa maior quantidade de compostos polares, é a retirada de parte dos compostos apolares pela primeira extração com hexano.

## **5.2 Prospecção fitoquímica**

Como já mencionado a prospecção fitoquímica permite verificar as possíveis classes de metabólitos presentes nos extratos e frações, com o intuito de facilitar as análises que serão feitas na sequência, visando a separação dos metabólitos. A Tabela 10 traz os resultados obtidos para a prospecção realizada.

Tabela 10 - Prospecção fitoquímica dos extratos e frações das cascas de *Cassia bakeriana*.

Amostras	Flavonoides		Alcaloides		Antraquinonas, Antronas, cumarinas		Terpenos, esteroides, saponinas, açúcares, fenóis, taninos, flavonoides		
	NP/PEG	Iodocloroplatinado	Dragendorff	KOH	Liebermann- Burchard	Sulfato Cérico	Vanilina Sufúrica		
EH	-	-	-	-	+	+++	++		
EE	+	-	-	+	++	++	+++		
FD	+	-	-	++	+	++	+++		
FAE	+	-	-	-	++	++	+++		
FB	+	-	-	-	+	+	+++		
FA	-	-	-	-	-	-	-		

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

Conforme mostrado na tabela, nenhum extrato ou fração indicou a presença de alcaloides. Para flavonoides, somente O EH e a FA apresentaram resultados negativos, o que era esperado para o FH com característica de extrair substâncias apolares e no caso FA por extrair substâncias muito polares. Todas as frações foram reveladas ao serem expostas na câmara de UV em 365 nm. O EE e as frações apresentaram uma mancha laranja com mesmo RF; as FD e FAE apresentaram também uma mancha de cor azul; e a FD além dessas duas manchas, apresentou uma outra mancha laranja, indicando assim que há pelo menos 3 flavonoides diferentes presentes.

No teste com KOH a CCD apresentou uma mancha rosa no EE e na FD, sendo que na FD a mancha se mostrou mais intensa. Manchas rosa com KOH indicam a presença de antraquinonas o que era um resultado esperado, uma vez que no trabalho realizado por Cunha e outros (2017) foi isolada a antraquinona réina (20). As outras frações apresentaram somente um rastro com coloração levemente marrom.

A vanilina sulfúrica para o EH apresentou manchas roxas e azuladas e para todas as outras frações, com exceção da FA, apresentaram manchas rosas bastante intensas por toda a plaquinha, indicando a presença de proantocianidinas.

O sulfato cérico para o EH apresentou manchas com diferentes tons de marrom, e com boa intensidade. Já para as demais frações apresentaram manchas marrons, porém bem menos intensas e por se tratar de um revelador mais geral, esse resultado indica que algumas das classes mencionadas na tabela podem estar presentes nos extratos e frações. A FA não revelou com sulfato cérico.

Para o revelador Liebermann-Burchard a CCD apresentou manchas marrons e roxas para o EE e para a FAE, já para as FD e FB somente manchas marrons. O EH apresentou manchas marrons claras e uma mancha azul, também bastante clara. A FA não revelou com este revelador.

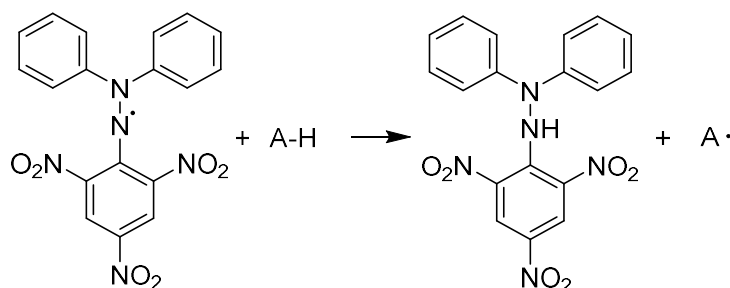
### **5.3 Atividades biológica**

#### **5.3.1 Atividade antioxidante**

A capacidade antioxidante dos extratos e frações foram avaliadas por dois métodos: o método do DPPH e pelo método ORAC.

O método DPPH se baseia na capacidade de um possível antioxidante neutralizar o radical livre estável 1,1-difenil-2-picril-hidrazil. Este radical possui coloração purpura ou violeta-escuro, variando de acordo com o solvente utilizado (normalmente se utiliza metanol ou etanol, nesse experimento foi utilizado metanol) e conforme o radical é neutralizado, ele perde sua coloração passando para violeta claro ou amarelo pálido. Desta forma é possível avaliar a neutralização desse composto, monitorando a perda de coloração com um espectrofotômetro UV/visível. A neutralização ocorre através da doação de um elétron ou um hidrogênio pela substância antioxidante (OLIVEIRA, 2015). A figura 17 mostra a reação do DPPH por transferência de hidrogênio.

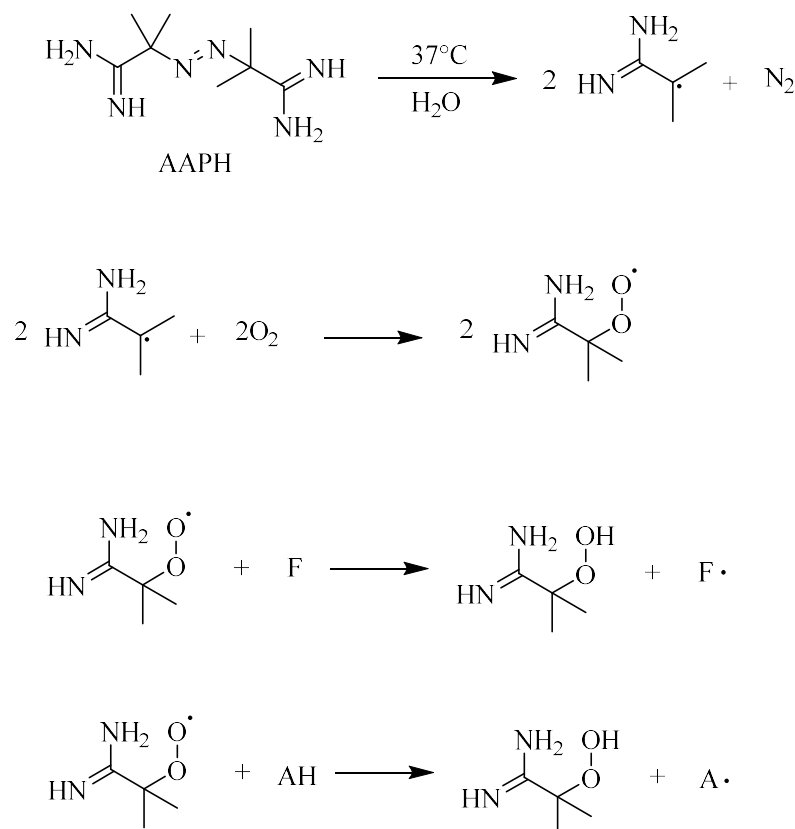
Figura 17 - Reação entre o DPPH<sup>•</sup> e uma substância antioxidante.



Fonte: adaptado de Oliveira (2015)

Já no método ORAC, o composto di-hidrocloreto de 2,2'-azobis-(2-amidinopropano) (AAPH) se decompõe termicamente em radicais livre peroxil que, na presença de oxigênio, gera os radicais livres que são capazes de interagir com substâncias fluorescentes; a queda na fluorescência indica a presença desse radical, (nesse experimento foi utilizado a fluoresceína). Sendo assim, na presença de substâncias antioxidantes, o radical reage com o antioxidante e não se observa a queda da fluorescência (LITESCU et al., 2014). A figura 18 traz todas as reações envolvidas no experimento, e na Tabela 11 são mostrados os resultados obtidos para ambos os métodos.

Figura 18 - Reações envolvidas no experimento ORAC



Fonte: adaptado de Litescu (2014)

Tabela 11 – Avaliação da atividade antioxidante pelo método ORAC e DPPH para os extratos e frações das cascas da *C. bakeriana*.

Amostra	ORAC ( $\mu\text{mol trolox}_{\text{eq}} \text{g}_{\text{amostra}}^{-1}$ )	DPPH (%)	DPPH $\text{CI}_{50}$ ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )
EH	1589,55 $\pm$ 52,26 <sup>a</sup>	26,05 $\pm$ 2,05 <sup>a</sup>	
EE	4363,50 $\pm$ 136,08 <sup>b</sup>	95,15 $\pm$ 0,49 <sup>b</sup>	30,30 $\pm$ 5,9 <sup>a</sup>
FD	4514,37 $\pm$ 176,03 <sup>b</sup>	93,30 $\pm$ 1,56 <sup>b</sup>	26,50 $\pm$ 1,1 <sup>a</sup>
FAE	4457,90 $\pm$ 216,79 <sup>b</sup>	93,30 $\pm$ 0,57 <sup>b</sup>	25,90 $\pm$ 3,2 <sup>a</sup>
FB	4388,13 $\pm$ 283,22 <sup>b</sup>	94,05 $\pm$ 0,49 <sup>b</sup>	54,70 $\pm$ 7,9 <sup>b</sup>
FA	2698,93 $\pm$ 293,49 <sup>c</sup>	24,65 $\pm$ 5,44 <sup>a</sup>	--
Ac. Ascórbico	2498,50 $\pm$ 109,60 <sup>c</sup>	97,87 $\pm$ 0,64 <sup>b</sup>	4,07 $\pm$ 1,21 <sup>c</sup>

Nota: --: não avaliado; Letras diferentes na mesma coluna apresentaram diferença estatística significativa ( $p < 0.05$ ).

Em relação à atividade antioxidante, com exceção do EH e da FA as demais amostras apresentaram elevada atividade antioxidante. O método ORAC apresentou valores bem superiores ao controle utilizado (ácido ascórbico), onde a FD obteve um valor de 4514,37  $\mu\text{mol trolox}_{\text{eq}} \text{g}_{\text{amostra}}^{-1}$ , enquanto o controle obteve 2498,50  $\mu\text{mol trolox}_{\text{eq}} \text{g}_{\text{amostra}}^{-1}$ . Já pelo método do DPPH, o EE, FD, FAE e FB apresentaram percentual de inibição bem próximos ao controle sem diferença estatística significativa com o controle. O EE, FD e FAE apresentaram valores de  $\text{CI}_{50}$  de 30,30; 26,50 e 25,90  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente e controle foi de 4,07  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Os valores foram maiores que o controle, mas ainda promissores. O EH e a FA apresentaram baixo percentual de inibição, por isso o valor de  $\text{CI}_{50}$  não foi determinado.

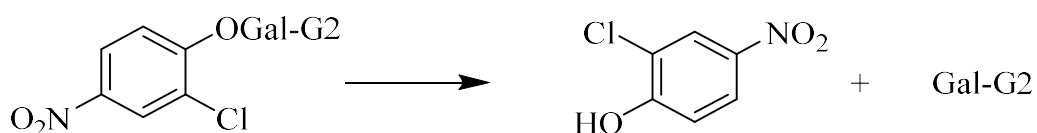
Os dois métodos utilizados para mensurar a capacidade antioxidante se baseiam em quanto a amostra analisada consegue reagir com o radical, diminuindo assim a capacidade oxidante dela. Os compostos fenólicos são conhecidos por normalmente possuírem elevada capacidade antioxidante, e essa capacidade está ligada justamente ao grupo fenol. A hidroxila ligada ao anel benzênico estabiliza a espécie formada após o composto reagir com um radical, pela prospecção fitoquímica é esperado a presença de compostos fenólicos nas amostras que tiveram os melhores resultados.

### 5.3.2 Inibição de $\alpha$ -amilase e $\alpha$ -glicosidase

Foram avaliadas a capacidade de inibição frente a enzima  $\alpha$ -amilase para os ambos os extratos (EH e EE) e para todas as frações (FD, FAE, FB e FA). O método utilizado para determinar a inibição  $\alpha$ -amilase foi pelo método cinético (Gal-G2- $\alpha$ -CNP) modificado, utilizando como substrato o  $\alpha$ -(2-cloro-4-nitrofenil)- $\beta$ -1,4-galactopiranosilmaltosídeo (Gal-G2- $\alpha$ -CNP) e uma fração enriquecida da enzima  $\alpha$ -amilase (f-AS).

Neste método o substrato Gal-G2- $\alpha$ -CNP é hidrolisado pela ação da enzima  $\alpha$ -amilase produzindo o composto colorido 2-cloro-4-nitrofenil e o fragmento  $\beta$ -1,4-galactopiranosilmaltosídeo (Gal-G2) (Figura 19). Assim, é possível verificar a inibição da enzima na ausência da liberação desse composto colorido através da medida da absorbância.

Figura 19 - Reação entre a enzima  $\alpha$ -amilase e o substrato Gal-G2- $\alpha$ -CNP.

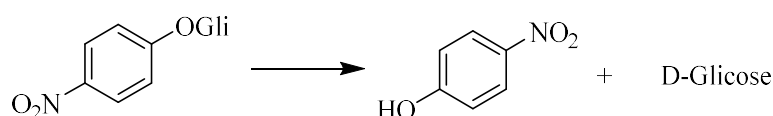


Fonte: adaptado de Liang e outros (2015)



Já para a enzima  $\alpha$ -glicosidase, foi utilizado o método modificado utilizando como substrato o 4-nitrofenil- $\alpha$ -D-glicopiranosídeo (*p*-NPG) e uma fração enriquecida de  $\alpha$ -glicosidase. A enzima  $\alpha$ -glicosidase ao entrar em contato com o substrato o hidrolisa em 4-nitrofenol e  $\alpha$ -D-glicose (Figura 20). O 4-nitrofenol é um composto amarelado, assim a inibição da enzima pode ser monitorada pela ausência deste composto através da absorbância. A Tabela 12 apresenta os resultados de inibição para as enzimas  $\alpha$ -amilase e  $\alpha$ -glicosidase.

Figura 20 - Reação entre a enzima  $\alpha$ -glicosidase e o substrato *p*-NPG



Fonte: adaptado de Eertmans e outros (2014)

Tabela 12 – Atividade inibitória para as enzimas  $\alpha$ -glicosidase e  $\alpha$ -amilase para os extratos e frações das cascas da *C. bakeriana*

	Inibição de $\alpha$ -amilase (%)	CI <sub>50</sub> ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Inibição de $\alpha$ -glicosidase (%)	CI <sub>50</sub> ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )
EH	13,6 $\pm$ 1,56 <sup>a</sup>	--	34,99 $\pm$ 2,99 <sup>ac</sup>	--
EE	93,65 $\pm$ 0,35 <sup>b</sup>	4,15 $\pm$ 0,21 <sup>a</sup>	60,70 $\pm$ 3,84 <sup>bde</sup>	556,05 $\pm$ 41,51 <sup>a</sup>
FD	71,15 $\pm$ 1,63 <sup>c</sup>	24,45 $\pm$ 2,90 <sup>b</sup>	43,18 $\pm$ 2,87 <sup>cde</sup>	--
FAE	94,00 $\pm$ 1,13 <sup>b</sup>	1,05 $\pm$ 0,21 <sup>a</sup>	61,56 $\pm$ 2,14 <sup>bde</sup>	537,85 $\pm$ 25,95 <sup>a</sup>
FB	91,15 $\pm$ 0,35 <sup>b</sup>	4,80 $\pm$ 1,56 <sup>a</sup>	53,58 $\pm$ 3,17 <sup>de</sup>	632,10 $\pm$ 22,20 <sup>a</sup>
FA	22,00 $\pm$ 6,22 <sup>a</sup>	--	51,86 $\pm$ 1,34 <sup>e</sup>	--
Acarbose	99,5 $\pm$ 0,70 <sup>b</sup>	0,05 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	74,40 $\pm$ 0,85 <sup>f</sup>	3,40 $\pm$ 0,6 <sup>b</sup>

Nota: --: não avaliado; Letras diferentes na mesma coluna apresentaram diferença estatística significativa ( $p < 0.05$ ).

Os melhores resultados obtidos foram para a inibição de  $\alpha$ -amilase. A FAE foi a que apresentou o melhor percentual de inibição, com valor próximo ao valor obtido pelo controle utilizado (arcabose), seguidos pelo EE e pela FB. Além de ter o melhor percentual de inibição, a FAE também foi a que mostrou o menor CI<sub>50</sub> entre todas seguida pelo EE e a FB, mas não havendo diferença estatística significativa com o controle nos percentuais de inibição e também nos valores de CI<sub>50</sub>.

Para a enzima  $\alpha$ -glicosidase os resultados não foram tão promissores quanto para a  $\alpha$ -amilase, apresentando os melhores valores de inibição para a FAE e o EE, com o melhor valor de  $CI_{50}$  obtido também para a FAE.

Algumas espécies de *Cassia* já tiveram seu potencial inibitório avaliado para as enzimas, a Tabela 13 mostra algumas dessas espécies com os valores de  $CI_{50}$  reportados para elas.

Tabela 13 –  $CI_{50}$  para inibição das enzimas  $\alpha$ -glicosidase e  $\alpha$ -amilase por espécies de *Cassia*.

	$\alpha$ -amilase ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	$\alpha$ -glicosidase ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Parte da planta	Referência
<i>C. abbreviata</i>	--	600,00	casca do caule	(SHAI et al., 2010)
<i>C. angustifolia</i>	228,00	170,53	semente	(NANUMALA, TULASI, SUJITHA, 2015)
<i>C. auriculata</i>	149,60	134,90	semente	(NANUMALA, TULASI, SUJITHA, 2015)
<i>C. auriculata</i>	182,75	200,06	botão da flor	(NAMBIRAJAN et al., 2018)
<i>C. auriculata</i>	249,30	232,05	flores	(NAMBIRAJAN et al., 2018)
<i>C. bakeriana</i>	1,05	537,85	cascas	Trabalho presente

Pelos os dados mostrados em relação à inibição da enzima  $\alpha$ -amilase, o EE e frações das cascas da *C. bakeriana* apresentaram valores superiores a outras espécies de *Cassia* já reportadas. Já para a enzima  $\alpha$ -glicosidase a espécie apresentou valores próximos aos obtidos por outras espécies do mesmo gênero.

Em relação aos resultados apresentados para as folhas no trabalho de Da Costa Silva e outros (2019), os resultados obtidos para as cascas foram melhores para a enzima  $\alpha$ -amilase. O melhor resultado para as folhas foi para o EE com 92,85% de inibição com  $CI_{50}$  de 5,00  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , já para as cascas a FAE apresentou um percentual de inibição bem próximo de 94%, com um  $CI_{50}$  menor (1,05  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). Em relação a  $\alpha$ -glicosidase, os resultados foram inferiores aos das folhas com melhor resultado para a FD das folhas com percentual de inibição de 57,20% e  $CI_{50}$  de 359,55  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , enquanto para as cascas o melhor resultado foi novamente para a

FAE com percentual de inibição próximo ao obtido para as folhas com 61,56%, porém um  $CI_{50}$  maior de 537,85  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

Com esses valores obtidos, comparando com o controle utilizado e com outros reportados para o gênero, ou até mesmo os já reportados pra espécie, é possível afirmar que os extratos das cascas da *C. bakeriana* possuem bom potencial como inibidor enzimático para as enzimas relacionadas ao diabetes, principalmente em relação a  $\alpha$ -amilase.

### 5.3.3 Atividade de inibição de glicação

A capacidade de inibição das amostras foi feita avaliando a capacidade dos extratos e frações em inibir a glicação da frutose com a albumina sérica bovina (BSA). Esse estudo é feito com a BSA por possuir bastante similaridade com a albumina do soro humano. A frutose é usada como glicante, pois ela é sintetizada no corpo humano em órgãos onde a via do sorbitol é ativa, como nas lentes oculares e em nervos periféricos. Além disso, em quadros de hiperglicemia (diabetes), há um acúmulo de frutose nesses órgãos, assim como em vasos sanguíneos e em glóbulos vermelhos; além da glicação via frutose ser até 10 vezes mais rápida do que pela glicose (WANG et al., 2011). A Tabela 14 mostra os resultados obtidos para os extratos e fração.

Tabela 14 – Atividade inibição de glicação para os extratos e frações das cascas da *C. bakeriana*.

Amostra	Inibição (%)	$CI_{50}$ ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )
EH	27,15 $\pm$ 2,62 <sup>a</sup>	--
EE	79,45 $\pm$ 0,64 <sup>b</sup>	91,40 $\pm$ 1,98 <sup>a</sup>
FD	61,45 $\pm$ 4,88 <sup>c</sup>	--
FAE	82,60 $\pm$ 3,11 <sup>b</sup>	109,25 $\pm$ 0,07 <sup>b</sup>
FB	85,15 $\pm$ 2,47 <sup>b</sup>	76,95 $\pm$ 5,87 <sup>c</sup>
FA	--	--
Quercetina	97,50 $\pm$ 0,70 <sup>e</sup>	12,30 $\pm$ 2,40 <sup>d</sup>

Nota: --: não avaliado; Letras diferentes na mesma coluna apresentaram diferença estatística significativa ( $p < 0.05$ ).

As amostras que apresentaram maiores percentuais de inibição foram selecionadas para determinação da  $CI_{50}$ . As amostras que obtiveram os melhores resultados foram o EE e as FAE

e FB, sendo que a FB teve a maior percentual de inibição com 85,15 %, com um valor de  $CI_{50}$  de  $76,95 \mu\text{g mL}^{-1}$ , valores um pouco abaixo do apresentado para o controle, porém ainda promissores.

Muitos estudos têm relacionado a capacidade antioxidante de compostos fenólicos com a capacidade de inibir a formação de AGEs, e alguns estudos mostraram que estes compostos diminuem a concentração de glioxal ao impedirem a oxidação de lipídios, o que faz os resultados obtidos *in vitro* serem promissores, uma vez que, tanto o EE como as frações tiveram ótima atividade antioxidante. Além dessa associação com a capacidade antioxidante, esses compostos também têm a capacidade de “capturar” os intermediários de AGEs, principalmente os mais comuns em humanos (glioxal e metilglioxal). Eles conseguem se ligar nesses intermediários com mais facilidade que a lisina e arginina, que são os aminoácidos que mais comumente reagem no processo de glicação (KHAN et al., 2020).

#### 5.4 Identificação dos metabólitos especializados

Foi realizada uma proposta para a identificação dos compostos presentes no EE e nas frações FAE, FD e FB, através da cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas com fonte de ionização por electrospray (CLAE- IES-EM). O EE e as frações foram escolhidos porque apresentaram as melhores atividades biológicas. Além disso, não há descrito na literatura um trabalho mais completo de identificação da composição química das cascas da *C. bakeriana*. Foram obtidos espectros no modo negativo com os respectivos valores de razão massa carga  $m/z$  e o erro em ppm atribuído para esses compostos. A Tabela 15 mostra as propostas de identificação e a Figura 21 traz o cromatograma obtido em alta resolução do EE (1), da fração diclorometano (2) e acetato de etila (3). Nos espectros estão identificados os picos referentes às substâncias identificadas e o espectro da fração *n*-butanol estará somente no material suplementar (juntamente com os espectros de EM/EM dos compostos identificados), pois não apresenta nenhuma substância nova em relação aos demais espectros, e na Figura 22 está representada as estruturas desses compostos identificados.

Figura 21 - Cromatogramas em alta resolução no modo negativo do extrato etanólico (EE) (1), da fração diclorometano (FD) (2) e da fração acetato de etila (FAE) (3).

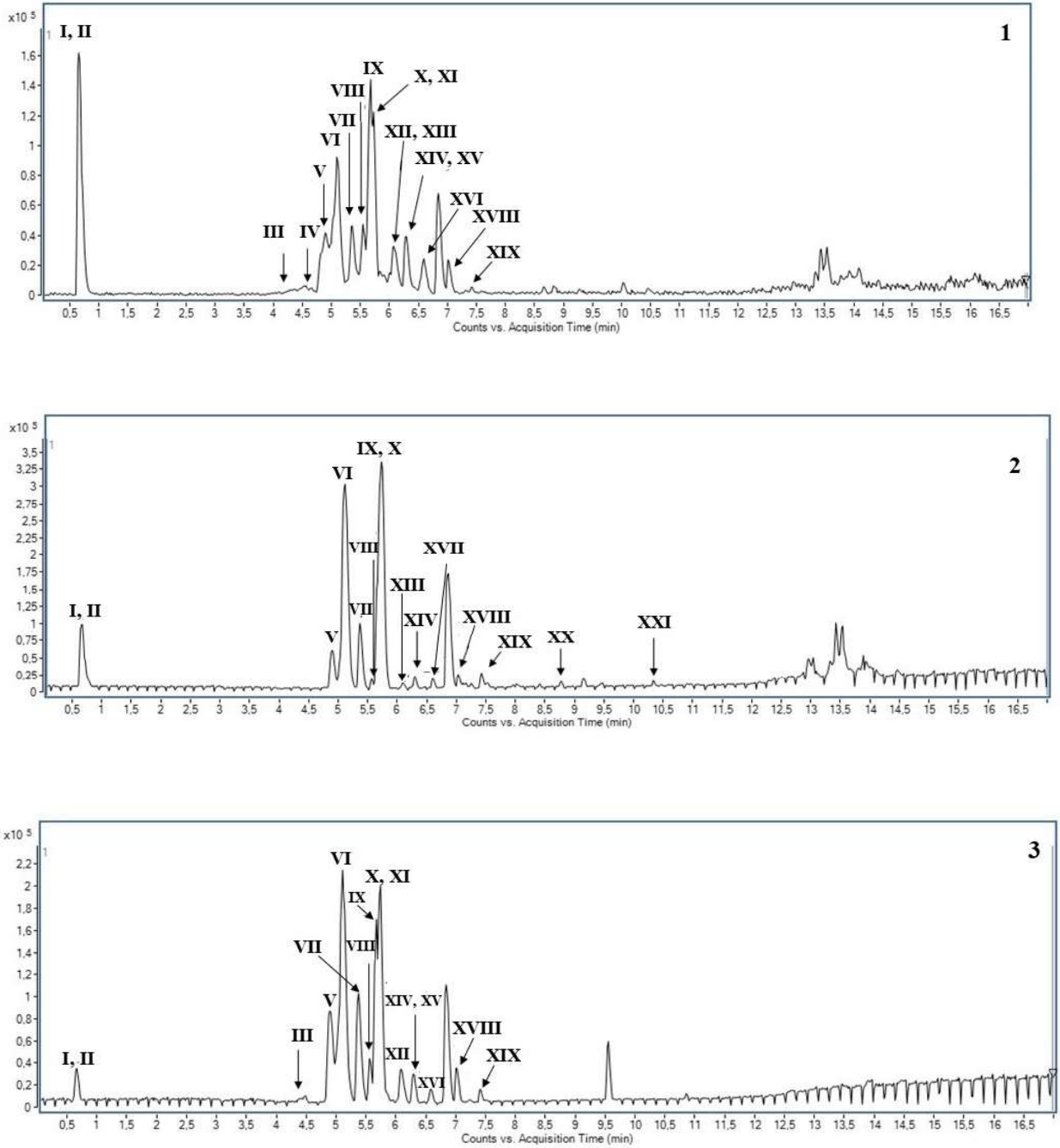


Tabela 15 – Propostas de identificação do extrato etanólico e das frações das cascas da *Cassia bakeriana*.

$t_R(\text{min})$	$[M - H]^-$	Massa exata	Erro (ppm)	Fragmentos MS <sup>2</sup>	Fórmula molecular	Composto	Fração	Referências
<b>0,706</b>	377, 0857	377,0856	0,26	5eV: <b>341</b> ,179, 161, 119,113, 101	C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub>	Sacarose + Cloro ( <b>I</b> )	EE, FD, FAE	(DARTORA et al., 2011)
<b>0,706</b>	341, 1092	341,1084	2,34	5 eV: 179, 161,143, 131, <b>119</b> , 113, 101	C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub>	Sacarose ( <b>II</b> )	EE, FD, FAE, FB	(SMITH et al., 2005; JIN et al., 2018)
<b>4,104</b>	577, 1352	577,1351	0,17	10eV: 451, 425, 407, <b>289</b> , 245, 125	C <sub>30</sub> H <sub>26</sub> O <sub>12</sub>	(epi)catequina-(epi)catequina ( <b>III</b> )	EE, FAE, FB	(DE SOUZA et al., 2008; TALA et al., 2013; GE et al., 2016a)
<b>4,604</b>	1105, 2756	1105, 2772	-1,45	20eV: 849, 815, 561, 543, 425,407 289, 271, 164, 125	C <sub>60</sub> H <sub>50</sub> O <sub>21</sub>	(epi)afzelequina-(epi)afzelequina-(epi)afzelequina-(epi)catequina ( <b>IV</b> )	EE	(GE et al., 2016a)
<b>5,034</b>	561, 1403	561.1402		10 eV: 435, 407, 289, 271, 245, 164, 125	C <sub>30</sub> H <sub>26</sub> O <sub>11</sub>	(epi)afzelechin-(epi)catechin I ( <b>V</b> )	EE, FD, FAE, FB	(GU et al., 2003a; COSTA SILVA et al., 2019)
<b>5,170</b>	289, 0719	289,0718	1,38	10 eV: 271, 245, 221, 205, 203, 179, 165, 151, 137, 125, <b>109</b>	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	(epi)catequina ( <b>VI</b> )	EE, FD, FAE, FB	(ABU-REIDAH et al., 2015b; BEN SAID et al., 2017; DA COSTA SILVA et al., 2019)
<b>5,336</b>	545, 1450	545,1453	0,55	5 eV: 419, 409, 391, 312, <b>273</b> , 271, 164, 125	C <sub>30</sub> H <sub>26</sub> O <sub>10</sub>	(epi)afzelequina-(epi)afzelequina I ( <b>VII</b> )	EE, FD, FAE, FB	(GE et al., 2016a; DA COSTA SILVA et al., 2019)
<b>5,517</b>	817, 2145	817,2138	0,85	15 eV: 681, 561, 543, 419, 289, 273, <b>271</b> , 164, 125	C <sub>45</sub> H <sub>38</sub> O <sub>16</sub>	(epi)afzelequina-(epi)afzelequina-(epi)afzelequina I ( <b>VIII</b> )	EE, FD, FAE, FB	(GE et al., 2016a)

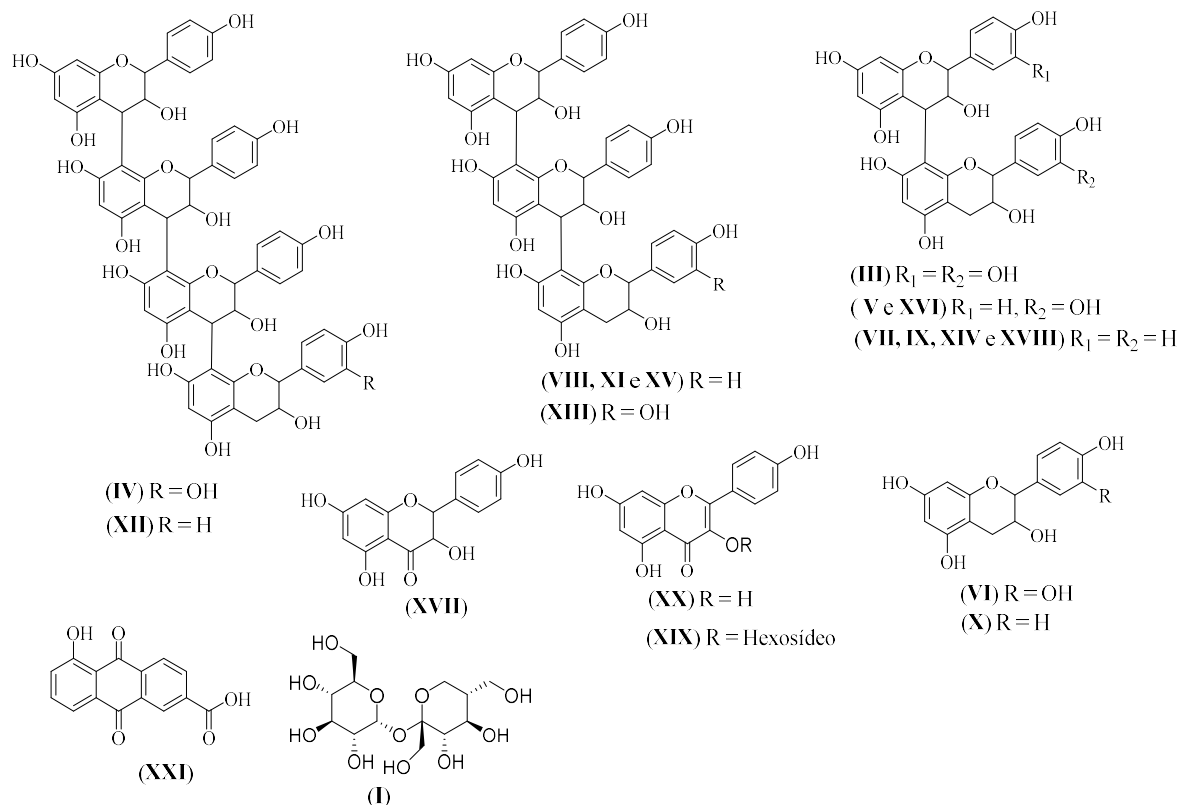
<b>5,669</b>	545, 1450	545,1453	1,10	5eV: 419, 409, 289, 287, <b>273</b> , 271, 164, 125	C <sub>30</sub> H <sub>26</sub> O <sub>10</sub>	(epi)aflzelequina-(epi)aflzelequina II ( <b>IX</b> )	EE, FD, FAE, FB	(GE et al., 2016a; DA COSTA SILVA et al., 2019)
<b>5,669</b>	273, 0777	273,0768	3,29	5eV: 255, 229, 205, 189, 187, <b>137</b>	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>5</sub>	(epi)aflzelequina ( <b>X</b> )	EE, FD, FAE, FB	(SMITH et al., 2005; SOBEH et al., 2018; DA COSTA SILVA et al., 2019)
<b>5,816</b>	817, 2144	817,2138	0,73	15:eV: 543, 289, 273, <b>271</b> , 164, 125	C <sub>45</sub> H <sub>38</sub> O <sub>15</sub>	(epi)aflzelequina-(epi)aflzelequina- (epi)afzelequina III ( <b>XI</b> )	EE, FD, FAE, FB	(GE et al., 2016a)
<b>6,002</b>	1089,2818	1089,2823	0,46	15 eV: 951, 833, 815, <b>543</b> , 407, 289, 271, 164, 125	C <sub>60</sub> H <sub>50</sub> O <sub>20</sub>	(epi)aflzelequina-(epi)afzelequina- (epi)aflzelequina-(epi)afzelequina ( <b>XII</b> )	EE, FAE	(GE et al., 2016a)
<b>6,157</b>	833, 2083	833,2087	-0,48	15 eV: <b>543</b> , 289, 273, 271, 164, 125	C <sub>45</sub> H <sub>38</sub> O <sub>16</sub>	(epi)aflzelequina-(epi)aflzelequina- (epi)catequina ( <b>XIII</b> )	EE, FD	(GU et al., 2003b; DE SOUZA et al., 2008; GE et al., 2016a; DA COSTA SILVA et al., 2019)
<b>6,164</b>	543,1297			5eV: <b>273</b> , 271		N.I.	FB	
<b>6,197</b>	609,1480			25eV: 446, <b>283</b> , 255		N.I.	FB	
<b>6,240</b>	243,0677		-	15eV: 201, 173, <b>159</b>		N.I.	FD	
<b>6,316</b>	545,1456	545,1453	0,55	5 eV: 419, 409, 312, <b>273</b> , 271,164, 137, 125	C <sub>30</sub> H <sub>26</sub> O <sub>10</sub>	(epi)aflzelequina-(epi)aflzelequina III ( <b>XIV</b> )	EE, FAE	(GE et al., 2016a; DA COSTA SILVA et al., 2019)
<b>6,382</b>	817,2139	817,2138	0,12	15 eV: 543, 419, 409, 289, 273, <b>271</b> , 164, 125	C <sub>45</sub> H <sub>38</sub> O <sub>16</sub>	(epi)aflzelequina-(epi)aflzelequina- (epi)afzelequina III ( <b>XV</b> )	EE, FAE, FB	(GE et al., 2016a)
<b>6,490</b>	505,2107			15eV: <b>463</b> , 331, 273, 257, 161		N.I.	FD	
<b>6,523</b>	555,1721			15eV <b>289</b>		N.I.	FD	

<b>6,552</b>	671,2072			15eV: 443, 315, 289, 273, 271, 255, <b>231</b>		N.I.	EE, FD, FB	
<b>6,582</b>	561,1400	561,1402	-0,36	10eV: 435, 407, <b>289</b> , 271, 245, 164, 125	C <sub>30</sub> H <sub>26</sub> O <sub>11</sub>	(epi)aflzelequina-(epi)catequina II <b>(XVI)</b>	EE, FAE	(GU et al., 2003b; DA COSTA SILVA et al., 2019)
<b>6,706</b>	287,0567	287,0561	2,1	5eV: 259, 243, 201, 151, <b>125</b>		Di-hidrocanferol <b>(XVII)</b>	FD	(MBAKIDI-NGOUABY et al., 2018)
<b>6,801</b>	525,1368			5eV: <b>231</b>		N.I.	EE, FD, FAE, FB	
<b>6,985</b>	545,1464	545,1453	2,01	5 eV: 419, 409, 312, <b>273</b> , 271, 164, 149, 137, 125	C <sub>30</sub> H <sub>26</sub> O <sub>10</sub>	(epi)aflzelequina-(epi)aflzelequina IV <b>(XVIII)</b>	EE, FD, FAE	(GE et al., 2016a; DA COSTA SILVA et al., 2019)
<b>7,417</b>	447, 0923	447,0933	-2,24	25eV: <b>284</b> , 255, 227, 151	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>11</sub>	Canferol-hexoside <b>(XIX)</b>	EE, FD, FAE, FB	(ABU-REIDAH et al., 2015b; COSTA SILVA et al., 2019)
<b>8,804</b>	285, 0411	285,0405	-2,10	25eV: 255, 239, 227, 211, 187, 145, 135, 117, 108	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>6</sub>	Canferol <b>(XX)</b>	FD	(SMITH et al., 2005; ABU- REIDAH et al., 2015a; COSTA SILVA et al., 2019)
	407, 0751			20eV: <b>271</b> , 258, 244, 227,		N.I.	FD	
<b>10,402</b>	283, 0249	283,0248	0,35	10eV: <b>239</b> , 211, 183	C <sub>15</sub> H <sub>8</sub> O <sub>6</sub>	Reína <b>(XXI)</b>	FD	(SMITH et al., 2005; CUNHA et al., 2017; DA COSTA SILVA et al., 2019)
<b>13,415</b>	591, 4102			5eV: 546, <b>471</b> , 453, 397, 379		NI	EE, FAE	

**Nota: EE extrato etanolico; FD fração diclorometano; FAE fração acetato de etila; FB fração n-butanol; NI: não identificado**



Figura 22 - Compostos identificados no EE, e nas frações FD, FAE e FB das cascas da *Cassia bakeriana*



Fonte: O autor

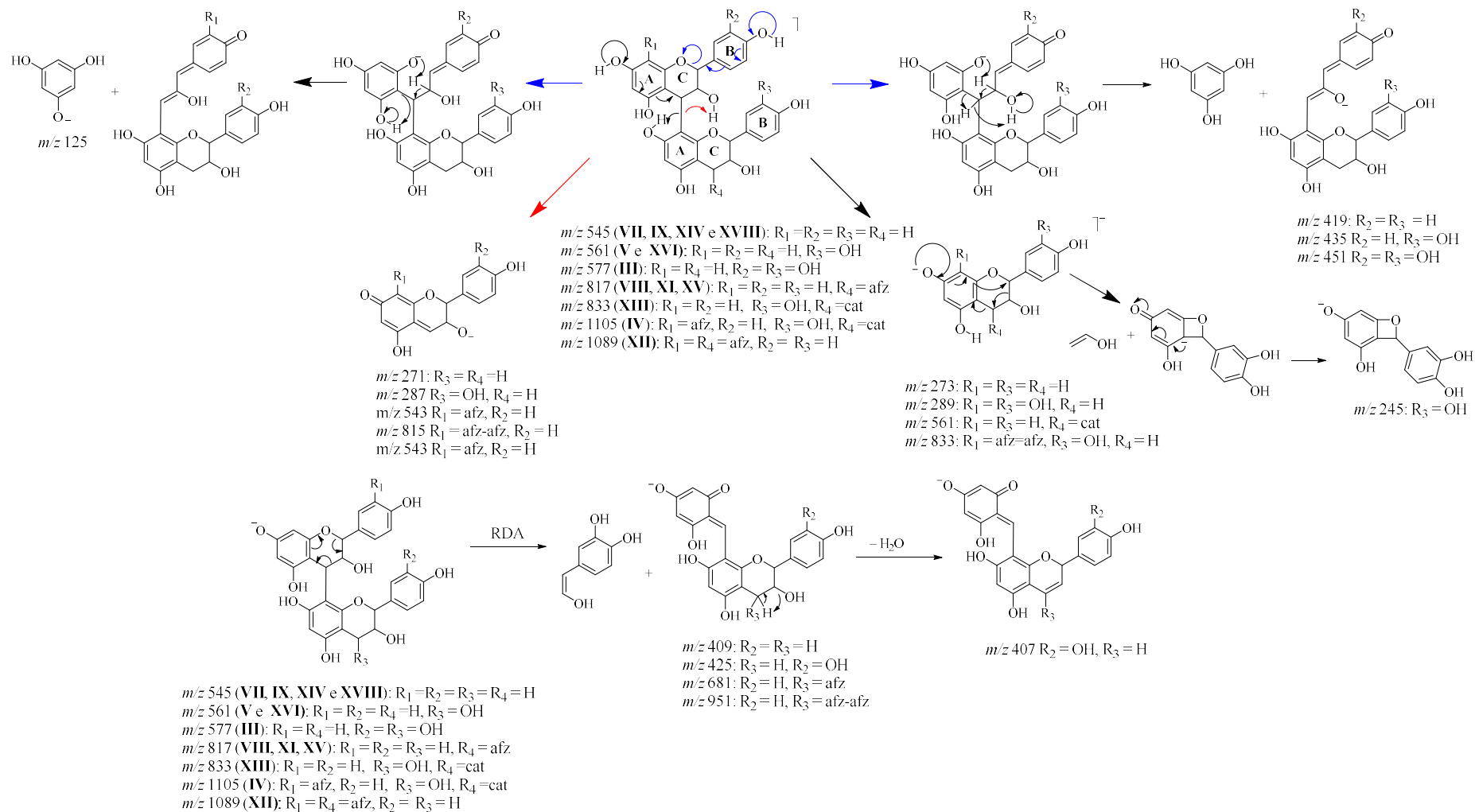
Tanto o EE quanto as frações mostraram uma predominância de taninos condensados, mais especificamente proantocianidinas. Foi identificado uma série desses compostos na forma de dímeros, trímeros e tetrâmeros. Era esperado o aparecimento de compostos dessa classe, pois na prospecção fotoquímica ao revelar com a vanilina sulfúrica houve o aparecimento de manchas rosas, que são características desse tipo de classe.

Os compostos dessa classe apresentaram fragmentação semelhante, assim será melhor explicado a fragmentação para o dímero formado por duas unidades de (epi)catequina (III) ( $m/z$  577, 1352), e as fragmentações para todas as proantocianidinas identificadas estão representados na Figura 23.

A quebra da ligação entre as duas unidades de proantocianidinas formam os fragmentos  $m/z$  289 e 287, nesse experimento o fragmento  $m/z$  287 não foi observado, mas para outras proantocianidinas a formação desse fragmento foi observada, por exemplo o fragmento  $m/z$  271 obtido a partir do dímero de (epi)afzelequina  $m/z$  545.1450 (VII). O fragmento  $m/z$  425 é formado por um mecanismo de *retro Diels-Alder* (RDA) no anel C, a partir do fragmento 425, com a perda de uma molécula neutra de água ( $H_2O$ ), há a formação do fragmento  $m/z$  407. Os fragmentos  $m/z$  451 e 125 são formados a partir de um mecanismo de *heterocyclic ring fission*

(HRF), primeiro ocorre a quebra da ligação C-O no anel C e posteriormente ocorre uma migração de H e a quebra da ligação entre os carbonos C4 e C5. O fragmento  $m/z$  245 é formado a partir do fragmento  $m/z$  289, com a liberação de um enol neutro ( $C_2H_4O$ ) (DEMARQUE et al., 2016; GE et al., 2016b; DE MOURA MARTINS et al., 2020).

Figura 23 - Proposta de fragmentação para as proantocianidinas identificadas nas cascas da *C. bakeriana*.



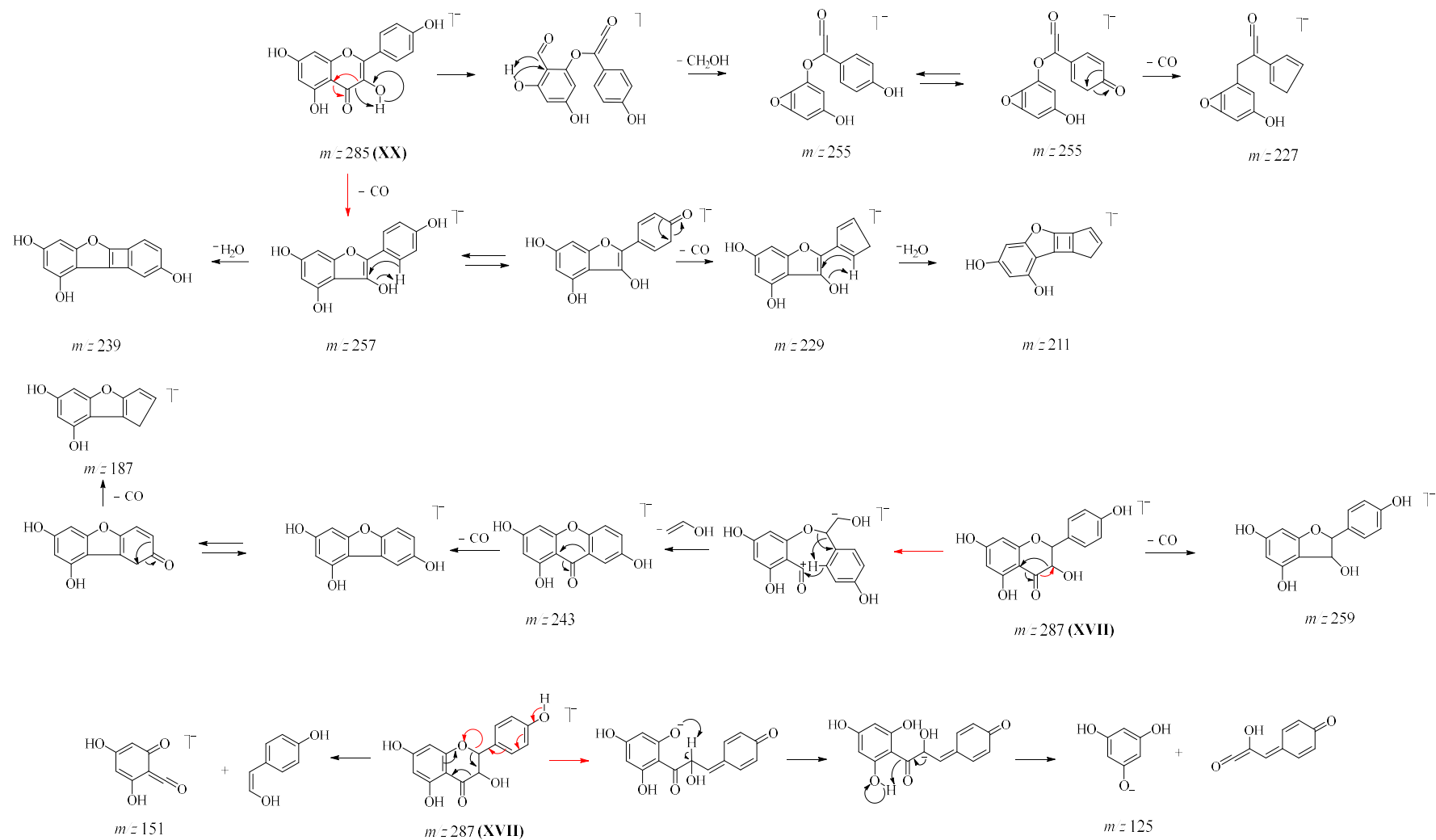
Outra classe de compostos que era esperada pela prospecção fotoquímica e que também foi identificada, foi a dos flavonoides. A fração diclorometano foi a que teve maior presença desses compostos, o que também era esperado pois na prospecção foi a fração que mais revelou para essa classe. Os flavonoides identificados foram o canferol (**XX**) ( $m/z$  285,0411), o di-hidrocanferol (**XVII**) ( $m/z$  287,0567) e o canferol-hexosídeo (**XIX**) ( $m/z$  447,0923). O canferol foi isolado nas folhas no trabalho por Da Costa Silva e outros (2019).

Vale ressaltar que por (-)-IES-EM/EM não foi possível distinguir se o composto com  $m/z$  447,0923 se tratava do canferol-hexosídeo ou da luteolina-hexosídeo que são isômeros de posição, porém, como no extrato e frações foi identificado a aglicona canferol além de ter sido isolado nas folhas, foi adotado o  $m/z$  447, 0923 como canferol-hexosídeo.

Em relação à fragmentação do di-hidrocanferol (**XVII**), o fragmento  $m/z$  259 é formado a partir de um mecanismo de descarboxilação com a liberação de uma molécula neutra de monóxido de carbono (CO). O fragmento 243 é formado a partir da liberação de um enol neutro (C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O), onde primeiramente ocorre a quebra da ligação C3-C4 do anel C promovendo a abertura do mesmo, após essa abertura a condensação dos três anéis é favorecida com a liberação do enol. O fragmento  $m/z$  151 é formado via mecanismo de RDA, e o fragmento  $m/z$  125 é formado de maneira similar ao mecanismo já explicado para as proantocianidinas, através de um mecanismo de HRF.

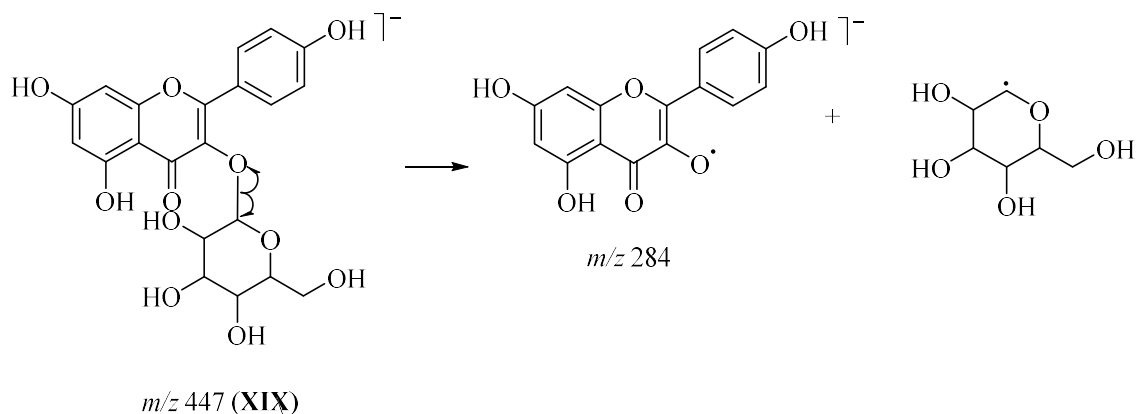
Para o canferol (**XX**), o fragmento  $m/z$  255 é formado através da liberação de uma molécula neutra de formaldeído (CH<sub>2</sub>O) em duas etapas, primeiro ocorre a quebra da ligação C3-C4 levando a abertura do anel com a formação de um aldeído na estrutura, posteriormente há a formação de um epóxido com a liberação de CH<sub>2</sub>O, a partir do fragmento  $m/z$  255 com a perda de uma molécula neutra de CO forma-se o fragmento  $m/z$  227. O fragmento  $m/z$  239 é formado a partir do fragmento  $m/z$  257, esse fragmento é esperado para essa molécula, porém não foi observado nesse experimento, o fragmento  $m/z$  257 é formado a partir da perda de uma molécula neutra de CO do fragmento  $m/z$  287, posteriormente com a perda de uma molécula neutra de H<sub>2</sub>O, há a formação do fragmento  $m/z$  239. O fragmento  $m/z$  211 também é formado a partir do fragmento  $m/z$  257 em duas etapas, na primeira etapa ocorre a perda de uma molécula neutra de CO, seguido de uma eliminação de uma molécula neutra de H<sub>2</sub>O. O fragmento  $m/z$  187 é formado a partir do fragmento  $m/z$  243, o fragmento  $m/z$  243 é formado de maneira similar ao di-hidrocanferol e posteriormente com a liberação de duas moléculas neutras de CO, há a formação do fragmento  $m/z$  187. A figura 24 traz uma representação das propostas de fragmentação para os dois flavanóis.

Figura 24 - Proposta de fragmentação para os flavanóis identificados nas cascas da *C. bakeriana*.



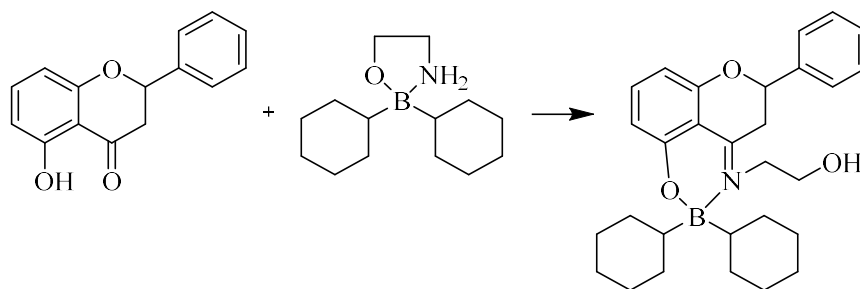
Quanto ao canferol hexosídeo (**XXI**) o fragmento  $m/z$  284 é formado a partir de uma quebra homolítica da ligação entre a unidade hexose e a aglicona canferol (Figura 25), os demais fragmentos são correspondentes aos fragmentos do canferol.

Figura 25 - Proposta de fragmentação para o canferolhexosídeo.



Ainda sobre os flavonoides, há mais dois dessa classe, mais especificamente dois flavan-3-ol, a catequina ( $m/z$  289, 0719) e afzelequina ( $m/z$  273, 0752), que não revelam com o revelador NP/PEG, pela ausência de uma carbonila na sua estrutura. Assim como os taninos formados por monômeros desses dois flavan-3-ol, a complexação ocorre quando há a presença da carbonila e um grupo hidroxila nas posições 3 ou 5. A Figura 26 mostra o complexo formado entre o revelador e um flavonoide.

Figura 26 - Reação entre o revelador NP/PEG e um flavonoide.

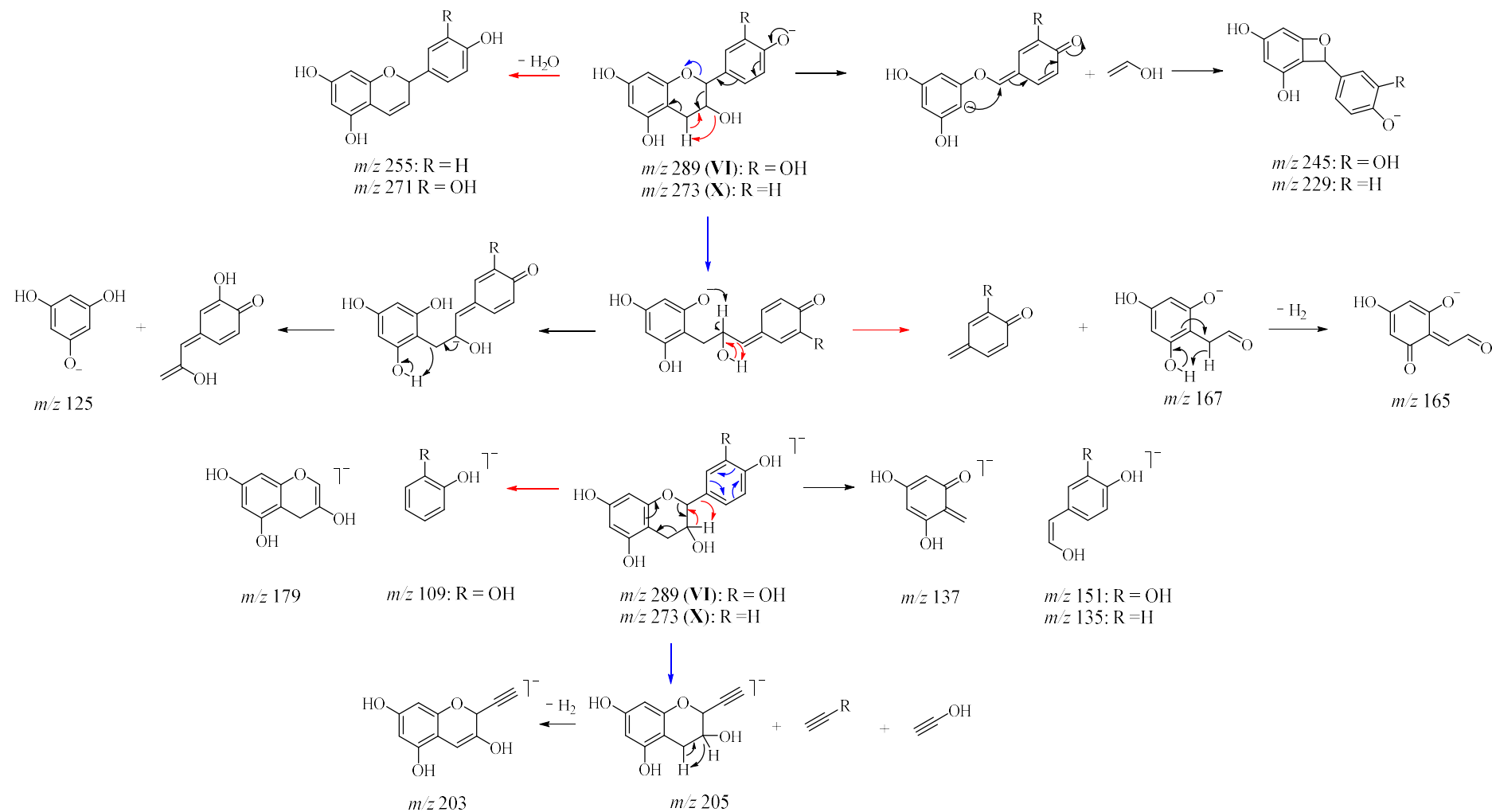


Adaptado de Kartnig e Gobel (1996)

Em relação a fragmentação da catequina (**VI**), o fragmento  $m/z$  271 é formado a partir da perda de uma molécula de  $H_2O$  do  $m/z$  289. O fragmento  $m/z$  165 é formado a partir do  $m/z$  167 (não observado), em três etapas, na primeira etapa ocorre um mecanismo de HRF, promovendo a quebra da ligação C-O no anel C, posteriormente ocorre a quebra da ligação

entre os carbonos C2 e 3, seguido de um rearranjo de hidrogênio formando o fragmento  $m/z$  167, que sofre a perda de uma molécula neutra de hidrogênio ( $H_2$ ), formando assim o fragmento  $m/z$  165. O fragmento  $m/z$  205 é formado a partir de um mecanismo similar a uma RDA, no anel B, com a liberação de dois alcinos neutros, a partir do fragmento  $m/z$  205 com a liberação de uma molécula neutra de  $H_2$  tem-se o fragmento  $m/z$  203. Os fragmentos  $m/z$  179 e 109 são formados a partir da quebra da ligação entre os anéis B e C. Os fragmentos  $m/z$  151 e 137 são formados via mecanismo de RDA no anel C. Os fragmentos  $m/z$  245 e 125 já foram explicados para as proantocianidinas. Os fragmentos observados para a afzelequina (XI) são formados de maneira similar à catequina. A figura 27 traz as propostas de fragmentação para os dois flavan-3-ol identificados.

Figura 27 - Proposta de fragmentação para os flavan-3-óis identificados nas cascas da *C. bakeriana*.

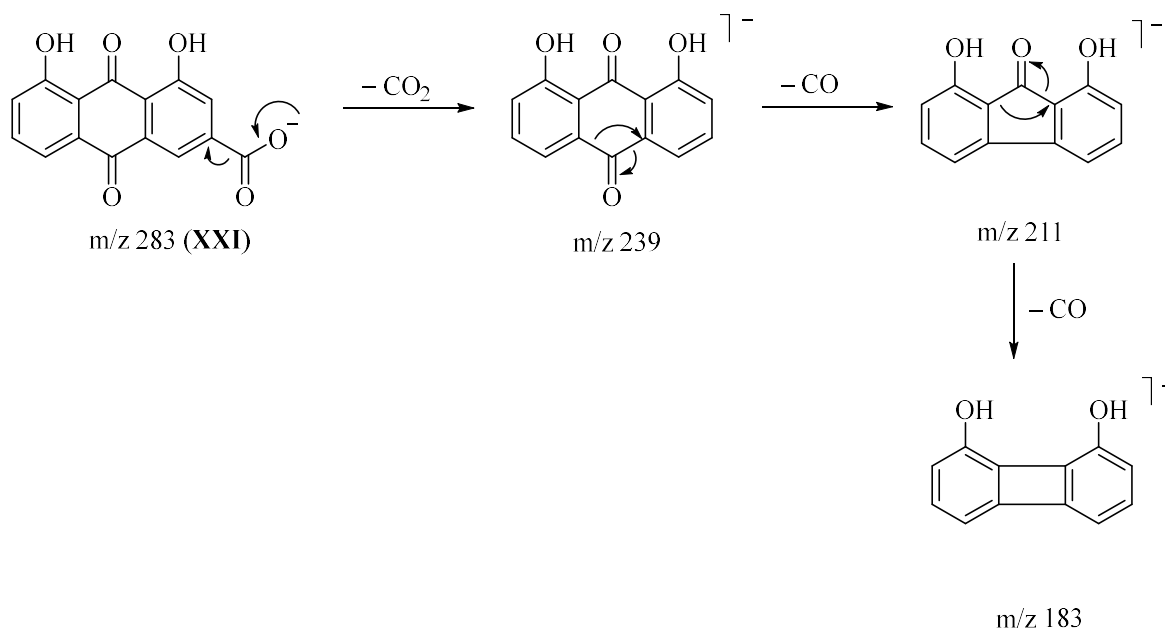




Outra classe esperada e que também teve um composto identificado é a classe das antraquinonas. Na prospecção, a fração diclorometano revelou positivo para essa classe com o revelador KOH e foi identificado a antraquinona réina (**XXI**) ( $m/z$  283,0249), composto já isolado no trabalho de Cunha e outros (2017).

A réina apresentou 3 fragmentos, o fragmento  $m/z$  239 é formado com a perda de uma molécula neutra de dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ), através de um mecanismo de descarboxilação. Do fragmento  $m/z$  239 com a perda de uma molécula neutra de CO, tem-se o fragmento  $m/z$  211 e com uma perda consecutiva de CO, forma-se o fragmento  $m/z$  183 (DEMARQUE et al., 2016). As propostas de fragmentação se encontram na Figura 28.

Figura 28 - Proposta de fragmentação para a réina.

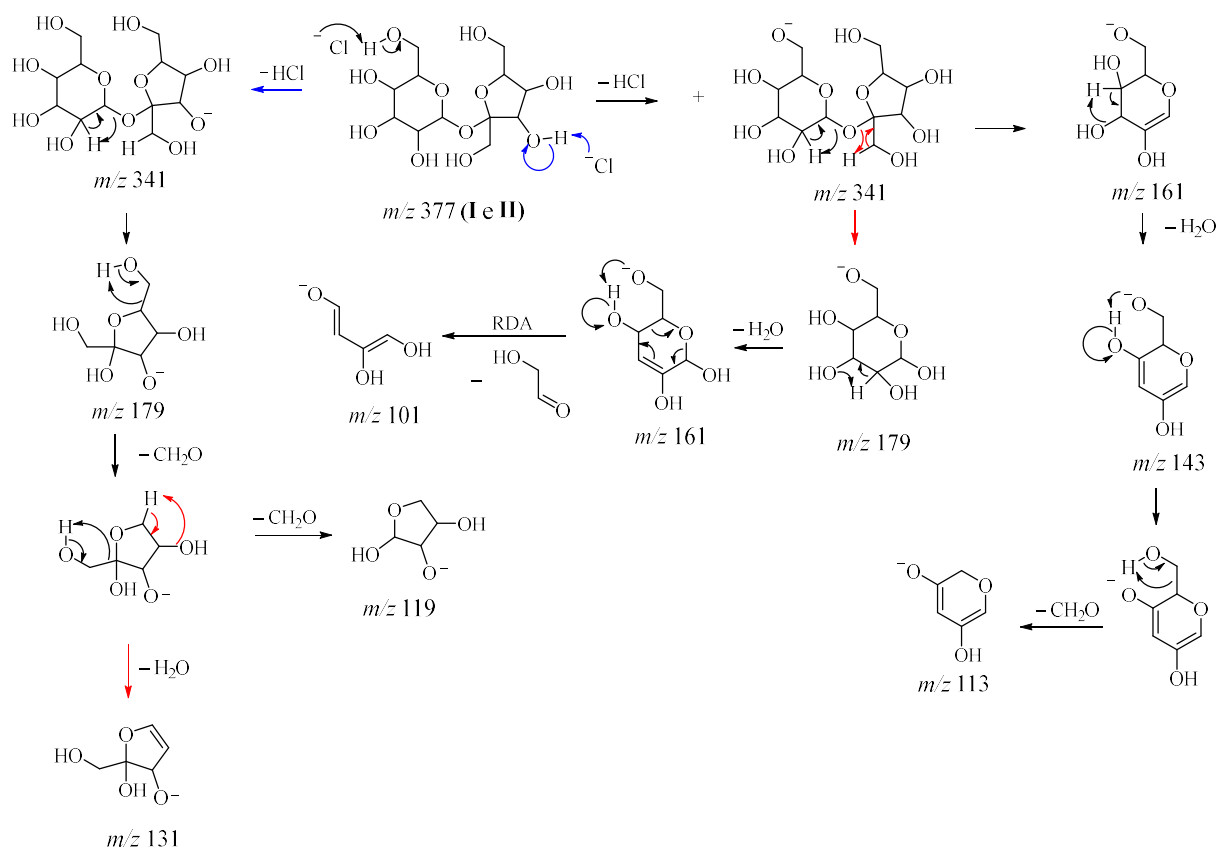


Além desses compostos, também foi identificado um dissacarídeo, a sacarose, que foi identificado tanto na sua forma iônica, com a perda de um átomo de hidrogênio (**I**) ( $m/z$  341,1099), quanto na forma de um aduto de cloro (**II**) ( $m/z$  377,0866), o que é comum para sacarídeos segundo Dartora e outros (2011). Outra evidência da formação do aduto de cloro é o pico  $m/z$  379 presente no espectro de EM (figura A3), esse pico é correspondente ao isótopo  $^{37}\text{Cl}$ , com aproximadamente 25% de intensidade, o que corresponde a proporção desse isótopo do cloro na natureza (FIETZKE et al., 2008).

Em relação a fragmentação, os fragmentos para a sacarose desprotonada (**I**) ( $m/z$  341,1099) e para o aduto de cloro (**II**) ( $m/z$  377,0866) foram os mesmos, com exceção da perda do íon cloro na forma de uma molécula neutra de HCl, formando o fragmento  $m/z$  341, que é

correspondente a sacarose desprotonada. O fragmento  $m/z$  179 corresponde a unidade de glicose ou de frutose, e é formado através da quebra da ligação glicosídica. O Fragmento  $m/z$  161 pode ser formado através da quebra da ligação glicosídica ou pela perda de uma molécula neutra de  $H_2O$  do fragmento  $m/z$  179. Do fragmento  $m/z$  161, com a perda de uma molécula de  $H_2O$ , tem-se o fragmento  $m/z$  143, que com uma perda sucessiva de uma molécula neutra de formaldeído ( $CH_2O$ ) resulta no fragmento  $m/z$  113. O fragmento  $m/z$  101 é formado a partir do fragmento  $m/z$  161 através de um mecanismo de RDA. Os fragmentos  $m/z$  119 e 131 são explicados através do fragmento  $m/z$  179, correspondente a unidade de frutose, com duas perdas sucessivas de  $CH_2O$  forma-se o fragmento  $m/z$  119, e com uma perda de  $CH_2O$  seguida de uma perda de  $H_2O$  tem-se o fragmento  $m/z$  131 (TAYLOR et al., 2005). As propostas de fragmentação se encontram na Figura 29.

Figura 29 - Proposta de fragmentação para a sacarose.



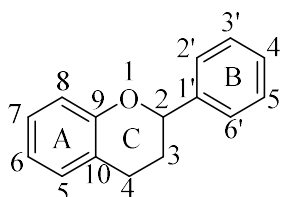
Assim, as principais classes de compostos identificados no EE e nas frações foram: flavonoides, antraquinonas, proantocianidinas e sacarídeos; sendo a classe de proantocianidinas com maior quantidade de moléculas identificadas e presentes em todas as amostras analisadas.

### 5.5. Biossíntese das principais classes de compostos fenólicos identificados nas cascas da *Cassia bakeriana*

Em relação a biossíntese dos compostos identificados, a composição do EE e frações é majoritariamente de compostos fenólicos, com predominância de flavonoides e principalmente de proantocianidinas, que são taninos condensados formados pela junção de monômeros de uma subclasse de flavonoides, os flavan-3-ol (epi)catequina e (epi)afzelequina.

Os flavonoides são compostos constituídos de um esqueleto de 15 carbonos, distribuídos em 3 anéis, sendo dois anéis benzênicos (A e B), conectados por um terceiro anel (C), comumente representados como compostos C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> (Figura 30) (BALASUNDRAM, SUNDRAM, SAMMAN, 2006; NABAVI et al., 2020).

Figura 30 - Estrutura geral de um flavonoide e sua respectiva numeração.

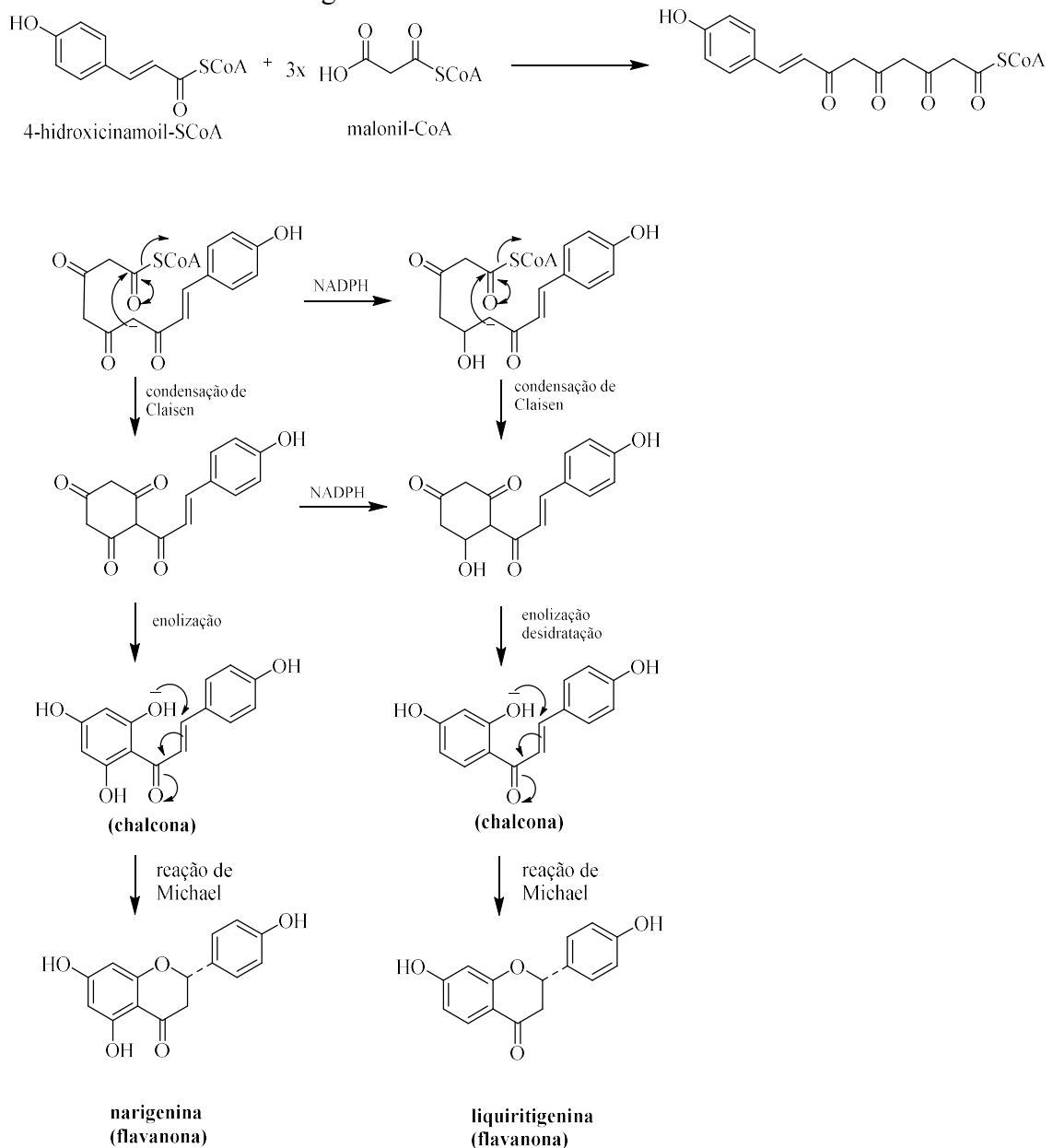


Fonte: O autor

O anel B é formado pela via do chiquimato e o anel A é formado por reações de condensação de moléculas de malonil-CoA vindas da via do acetato, formando assim uma estrutura chamada de chalcona. A partir dessa estrutura, com o fechamento do terceiro anel (anel C) forma-se uma flavanona, uma subclasse de flavonoides, que será precursora das demais subclasses dos flavonoides.

A reação se inicia com a condensação de 3 moléculas de malonil-CoA, com uma molécula de 4-hidroxicinamoil-SCoA. Em seguida ocorre a formação do anel A através de uma reação de Claisen levando a formação de um anel com 3 grupos cetonas, que ao sofrerem enolização, formam o anel benzênico, tendo assim a chalcona formada. Por fim, através de uma reação de Michael, a flavanona é formada. Note que durante algumas etapas pode ocorrer redução das cetonas presentes no anel A, levando a uma flavanona com apenas uma hidroxila no anel A. A Figura 31 mostra de forma resumida a formação dessas flavanonas.

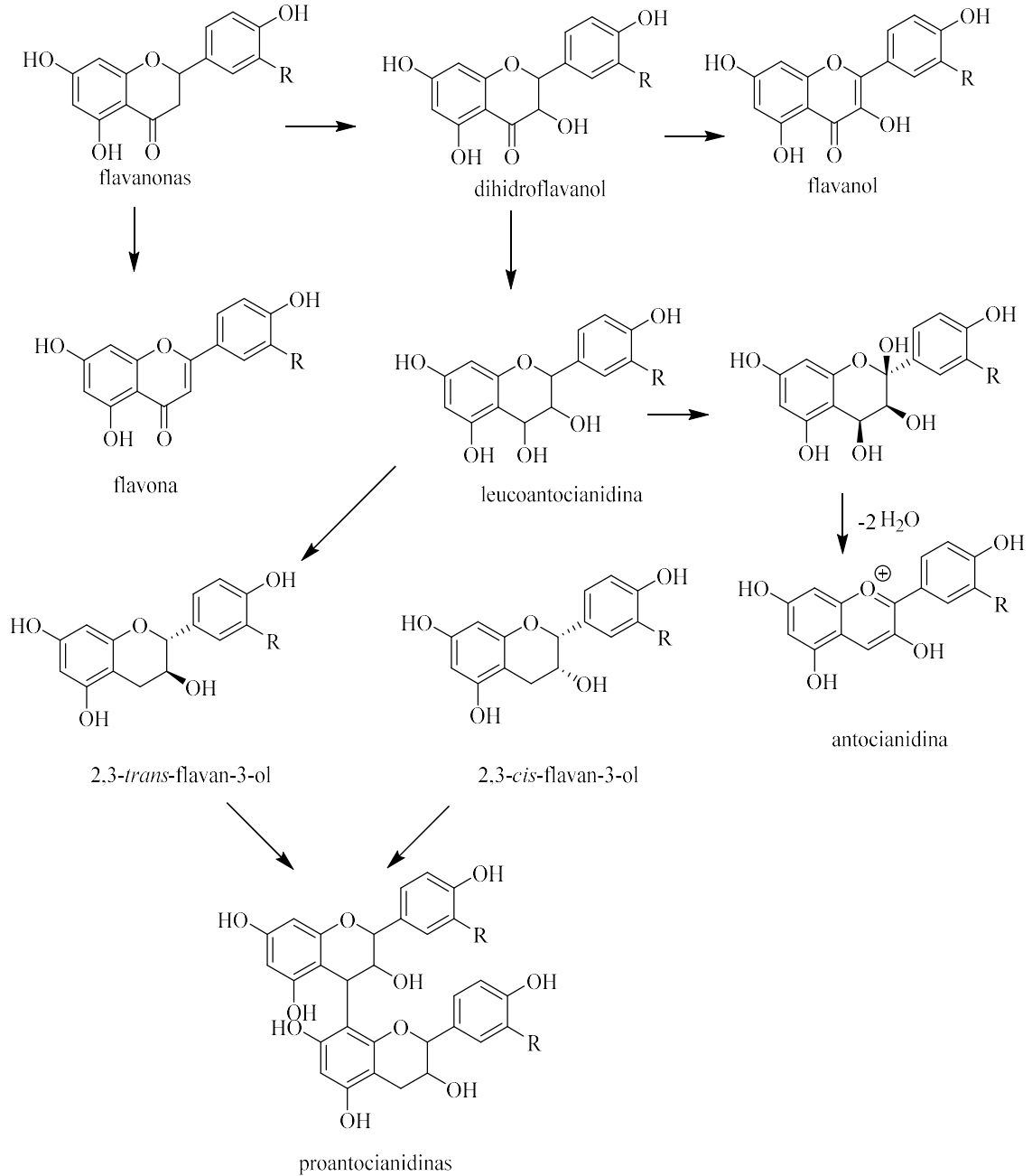
Figura 31 - Biossíntese das flavanonas.



Fonte: Adaptado de Dewick (2009)

A partir da flavanona, tem-se a formação das demais subclasses pertencentes a classe dos flavonoides, através de reações como reduções, oxidações, hidratações, hidrólises, entre outras. Lembrando que a maioria dessas reações são catalisadas por enzimas. A Figura 32 mostra de forma resumida a formação das principais subclasses de flavonoides (BALASUNDRAM, SUNDRAM, SAMMAN, 2006; DEWICK, 2009; BUCHANAN, GRUISSEM, JONES, 2015; NABAVI et al., 2020).

Figura 32 - Biossíntese das principais classes de flavonoides.



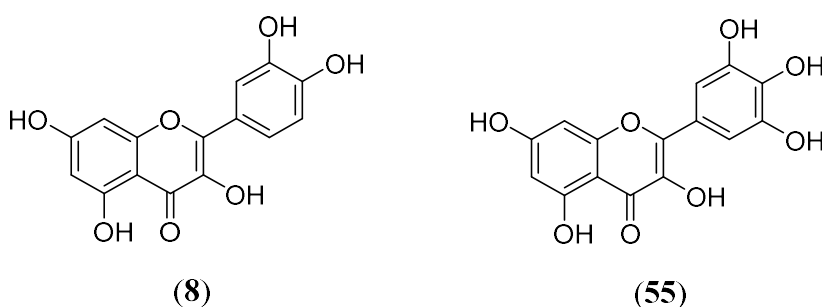
Fonte: Adaptado de Dewick (2009) e Buchanan, Grissem e Jones (2015)

## 5.6. Relação entre os compostos identificados e as atividades biológicas avaliadas

As atividades biológicas apresentadas para os extratos e frações das cascas de *C. bakeriana* podem estar relacionadas a alguns dos metabólitos especializados identificados. Em relação a atividade antioxidante, o extrato e as frações que tiveram as maiores capacidades antioxidante são constituídas praticamente de compostos fenólicos, alguns flavonoides e uma série de proantocianidinas. Esses metabólitos normalmente possuem mais de um grupo fenólico e também outras características em sua estrutura que facilitam a estabilização do radical

formado, como grupos hidroxilas vizinhas no anel B. O flavonoide miricetina (**55**) (Figura 33) possui três hidroxilas no anel B e possui melhor atividade antioxidante que a quercetina (**8**), que possui duas hidroxilas; outra característica presente em algumas classes de flavonoides que também favorecem a atividade, é a presença da carbonila na posição 4, conjugada com dupla entre as posições 2 e 3. A conjugação de uma hidroxila na posição 3' com a uma hidroxila na posição 3, também favorece o aumento da capacidade antioxidante, além de outras características. (OLSZOWY, 2019).

Figura 33 - Estrutura dos flavonoides miricetina e quercetina



Fonte: O autor

Alguns compostos identificados nas cascas possuem algumas dessas características, como a catequina, que possui duas hidroxilas no anel B, além das proantocianidinas que possuem um monômero de catequina em sua estrutura. O canferol só possui uma hidroxila no anel B, porém possui a conjugação da carbonila com a dupla no anel C, que também intensifica a atividade, tal composto foi inclusive testado no trabalho de Costa Silva e outros (2019) e apresentou atividade antioxidante tanto no método ORAC, quanto no DPPH. Assim, essa atividade antioxidante apresentada pelas amostras pode ser atribuída à presença de todos esses compostos com característica que favorecem a estabilização dos compostos radicalares.

Em relação a atividade antiglicante, alguns estudos também tem relacionado compostos fenólicos a essa capacidade, e para o caso de flavonoides, alguns estudos têm mostrado que algumas características na estrutura dos flavonoides podem aumentar a atividade antiglicante, assim como ocorre na AA. A presença de hidroxilas vizinhas no anel B aumentam essa capacidade e nas cascas de *C. bakeriana* foi identificado a (epi)catequina com essa característica. Outra característica que aumenta a atividade antiglicante é a conjugação da carbonila na posição 4 com a dupla nas posições 2 e 3, característica presente no canferol que também foi identificado nas cascas (KHANGHOLI et al., 2016).

Em um trabalho por Wang e outros (2011), a catequina apresentou boa atividade inibitória frente a glicação da frutose com a BSA com 81% de inibição. Frações ricas em proantocianidinas também apresentaram boa atividade antiglicação, e nas cascas foram identificados vários compostos dessa classe. Este trabalho também avaliou a capacidade de inibir a glicação do intermediário de formação dos AGEs metilglioxial com a arginina e com a BSA. A catequina apresentou boa inibição do metilglioxial com a BSA, mas não tão boa com a arginina. As frações ricas em proantocianidinas mostraram valores intermediários para ambos, isso mostra que essa classe de compostos tem capacidade de inibir tanto a glicação, como a parte final da formação de AGEs, “capturando” os intermediários que levam a formação desses produtos.

Para as atividades inibitórias das enzimas digestivas alguns compostos isolados também já demonstraram potencial para inibir essas enzimas, em um trabalho por Zhang e outros (2020), frações ricas em proantocianidinas extraídas dos frutos da *Lepisanthes alata* mostraram baixos valores de  $CI_{50}$  para ambas as enzimas, para a  $\alpha$ -amilase, a fração rica em proantocianidina extraída dos frutos maduros apresentaram  $CI_{50}$  de  $1,19 \pm 0,02 \mu\text{g mL}^{-1}$  e para a  $\alpha$ -glicosidase o melhor resultado também foram para as frações vindas dos frutos maduros com  $CI_{50}$  de  $4,1 \pm 0,2 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Os flavanoides catequina e canferol, que foram identificados nas cascas da *C. bakeriana*, também já mostraram boa atividade para inibição da enzima  $\alpha$ -amilase, o canferol foi isolado nas folhas da espécie e mostrou bom  $CI_{50}$  para a inibição da enzima com valor de  $1,5 \pm 0,14 \mu\text{g mL}^{-1}$ , e a catequina em um trabalho por Yilmazer-Musa e outros (2012) apresentou inibição com um  $CI_{50}$  de  $160 \pm 67,75 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

## 6.0 CONCLUSÕES

Utilizando o método de extração por maceração foi possível preparar os extratos hexânico (HE) e etanólico (EE) das cascas da *Cassia bakeriana*. Através do fracionamento do EE por extração líquido-líquido foi possível obter as frações FD, FAE, FB e FA.

A prospecção fitoquímica que foi realizada via CCD com a utilização de reveladores específicos para as principais classes de metabólitos especializados, possibilitou a identificação de algumas classes de metabólitos especializados presentes nas amostras como flavonoides, antraquinonas e proantocianidinas. Posteriormente através de CLAE-(-)-IES-EM foi possível confirmar e identificar os principais metabólitos presentes nelas. Da classe das antraquinonas foi identificada a reína (**XXI**); da classe dos flavonoides foram identificados o canferol (**XX**), di-hidrocanferol (**XVII**), entre outros, e para as proantocianidinas foram identificados dímeros, trímeros e tetrâmeros formados pelas unidades dos flavan-3-ol (epi)catequina (**VI**) e (epi)afzelequina (**X**). A reína já havia sido isolada das cascas e o canferol das folhas, porém alguns compostos identificados são inéditos na espécie, como o dímero formado por (epi)catequina (**III**), e os dois tetrâmeros identificados (**IV e XII**), essas duas proantocianidinas são inéditas também no gênero *Cassia*.

Através da avaliação de atividades biológicas relacionadas ao controle do diabetes, o EE e suas frações apresentaram resultados promissores. A FAE foi a mais promissora, ela apresentou ótima atividade inibitória para a enzima  $\alpha$ -amilase com inibição de  $94,00 \pm 1,13\%$  e  $CI_{50}$  de  $1,05 \pm 0,21 \mu\text{g mL}^{-1}$ , sem diferença significativa com o controle. Para a atividade inibitória de  $\alpha$ -glicosidase a fração FAE também apresentou os melhores resultados com percentual de inibição de  $61,56 \pm 2,14\%$  e  $CI_{50}$  de  $537,85 \pm 25,9521 \mu\text{g mL}^{-1}$ . A FAE também apresentou ótimos resultados para a atividade antioxidante em ambos os métodos testados, no método ORAC a fração obteve valores de sequestro de radical bem superiores ao controle ( $4457,90 \pm 216,79 \mu\text{mol trolox}_{\text{eq}} \text{g}_{\text{amostra}}^{-1}$ ), e para o método DPPH os valores de inibição do radical foram próximos ao controle ( $93,30 \pm 0,57\%$ ), apresentando valores de  $CI_{50}$  promissores ( $25,90 \pm 3,2 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). O EE e a FD também apresentaram boa atividade antioxidante, sendo os valores obtidos bastante promissores ao comparar com o controle utilizado. A FB apresentou valores promissores para a inibição de glicação com percentual de inibição de  $85,15 \pm 2,47\%$  e  $CI_{50}$  de  $76,95 \pm 5,87 \mu\text{g mL}^{-1}$ , seguido pela fração FAE e pelo EE.



Como perspectivas futuras para o grupo, será realizado o fracionamento da FAE e as frações serão analisadas na tentativa de isolamento das moléculas responsáveis pelas atividades avaliadas.

## REFERÊNCIAS

- ABU-REIDAH, I. M.;ALI-SHTAYEH, M. S.;JAMOUS, R. M.;ARRÁEZ-ROMÁN, D.;SEGURA-CARRETERO, A. HPLC–DAD–ESI-MS/MS screening of bioactive components from *Rhus coriaria* L. (Sumac) fruits. **Food Chemistry**, v. 166, p. 179-191, 2015a DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.06.011>.
- ABU-REIDAH, I. M.;ALI-SHTAYEH, M. S.;JAMOUS, R. M.;ARRÁEZ-ROMÁN, D.;SEGURA-CARRETERO, A. Comprehensive metabolite profiling of *Arum palaestinum* (Araceae) leaves by using liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Food research international**, v. 70, p. 74-86, 2015b DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.01.023>.
- AHMAD, S.;HASSAN, A.;REHMAN, T.;BASIT, A.;TAHIR, A.;ARSHAD, M. A. In vitro bioactivity of extracts from seeds of *Cassia absus* L. growing in Pakistan. **Journal of Herbal Medicine**, v. 16, p. 100258, 2019 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.hermed.2019.100258>.
- AL-HAIDARI, R. A.;AL-OQAIL, M. M. New benzoic acid derivatives from *Cassia italica* growing in Saudi Arabia and their antioxidant activity. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 28, n. 9, p. 1112-1117, 2020 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2020.07.012>.
- ANTONISAMY, P.;AGASTIAN, P.;KANG, C.-W.;KIM, N. S.;KIM, J.-H. Anti-inflammatory activity of rhein isolated from the flowers of *Cassia fistula* L. and possible underlying mechanisms. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 26, n. 1, p. 96-104, 2019 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2017.04.011>.
- ANTONISAMY, P.;DHANASEKARAN, M.;KIM, H.-R.;JO, S.-G.;AGASTIAN, P.;KWON, K.-B. Anti-inflammatory and analgesic activity of ononitol monohydrate isolated from *Cassia tora* L. in animal models. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 24, n. 8, p. 1933-1938, 2017 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2017.11.042>.
- ARAÚJO, N. M.;DIAS, L. P.;COSTA, H. P.;SOUSA, D. O.;VASCONCELOS, I. M.;DE MORAIS, G. A.;OLIVEIRA, J. T. CITI, a Kunitz trypsin inhibitor purified from *Cassia leiandra* Benth. seeds, exerts a candidicidal effect on *Candida albicans* by inducing oxidative stress and necrosis. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1861, n. 11, p. 183032, 2019 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbmem.2019.183032>.
- ASCHNER, P.;KARURANGA, S.;JAMES, S.;SIMMONS, D.;BASIT, A.;SHAW, J. E.;WILD, S. H.;OGURTSOVA, K.;SAEEDI, P. The International Diabetes Federation's guide for diabetes epidemiological studies. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 172, n., p., 2021 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2020.108630>.
- ASMAT, U.;ABAD, K.;ISMAIL, K. Diabetes mellitus and oxidative stress—A concise review. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 24, n. 5, p. 547-553, 2016 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2015.03.013>.
- AYO, R.;AMUPITAN, J.;ZHAO, Y. Cytotoxicity and antimicrobial studies of 1, 6, 8-trihydroxy-3-methyl-anthraquinone (emodin) isolated from the leaves of *Cassia nigricans* Vahl. **African Journal of Biotechnology**, v. 6, n. 11, p., 2007.
- BALASUNDRAM, N.;SUNDRAM, K.;SAMMAN, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. **Food Chemistry**, v. 99, n. 1, p. 191-203, 2006 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.07.042>.
- BEN SAID, R.;HAMED, A. I.;MAHALEL, U. A.;AL-AYED, A. S.;KOWALCZYK, M.;MOLDOCH, J.;OLESZEK, W.;STOCHMAL, A. Tentative characterization of polyphenolic compounds in the male flowers of *Phoenix dactylifera* by liquid chromatography coupled with mass spectrometry and DFT. **International journal of molecular sciences**, v. 18, n. 3, p. 512, 2017 DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms18030512>.

BERGMAN, M. E.; DAVIS, B.; PHILLIPS, M. A. Medically useful plant terpenoids: biosynthesis, occurrence, and mechanism of action. **Molecules**, v. 24, n. 21, p. 3961, 2019 DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules24213961>.

BERNARDINI, S.; TIEZZI, A.; LAGHEZZA MASCI, V.; OVIDI, E. Natural products for human health: an historical overview of the drug discovery approaches. **Natural product research**, v. 32, n. 16, p. 1926-1950, 2018 DOI: <https://doi.org/10.1080/14786419.2017.1356838>.

BRAHMACHARI, G.; MANDAL, B.; MANDAL, M.; MONDAL, A. Sopherone A and B: Two new biologically relevant dibenzo- $\alpha$ -pyrones from *Cassia sophera*. **Fitoterapia**, v. 136, p. 104169, 2019 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2019.05.008>.

BRAHMACHARI, G.; MONDAL, A.; NAYEK, N.; KUMAR, A.; SRIVASTAVA, A. K.; MISRA, N. Experimental and quantum chemical studies on poriferasterol—A natural phytosterol isolated from *Cassia sophera* Linn.(Caesalpinaceae). **Journal of Molecular Structure**, v. 1143, p. 184-191, 2017.

BRANDÃO-COSTA, R. M.; ARAÚJO, V. F.; PORTO, A. L. F. CgTI, a novel thermostable Kunitz trypsin-inhibitor purified from *Cassia grandis* seeds: Purification, characterization and termiticidal activity. **International journal of biological macromolecules**, v. 118, p. 2296-2306, 2018 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.07.110>.

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

BROOK, K.; BENNETT, J.; DESAI, S. P. The chemical history of morphine: an 8000-year journey, from resin to de-novo synthesis. **Journal of anesthesia history**, v. 3, n. 2, p. 50-55, 2017 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.janh.2017.02.001>.

BUCHANAN, B. B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. L. **Biochemistry and molecular biology of plants**. ed. John wiley & sons, 2015. p.

BUNLUEPUECH, K.; WATTANAPIROMSAKUL, C.; TEWTRAKUL, S. Anti-HIV-1 integrase activity of compounds from *Cassia garrettiana* heartwood. **Songklanakarin J. Sci. Tech**, v. 35, p. 665-9, 2013.

CHAVES, M. H. QUIMICA ORGANICA. **Química Nova**, v. 20, n., p. 5, 1997.

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

CHUKWUJEKWU, J.; COOMBES, P.; MULHOLLAND, D.; VAN STADEN, J. Emodin, an antibacterial anthraquinone from the roots of *Cassia occidentalis*. **South African Journal of Botany**, v. 72, n. 2, p. 295-297, 2006 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2005.08.003>.

COSTA SILVA, T. D.; JUSTINO, A. B.; PRADO, D. G.; KOCH, G. A.; MARTINS, M. M.; SANTOS, P. D. S.; MORAIS, S. A. L. D.; GOULART, L. R.; CUNHA, L. C. S.; SOUSA, R. M. F. D.; ESPINDOLA, F. S.; DE OLIVEIRA, A. Chemical composition, antioxidant activity and inhibitory capacity of  $\alpha$ -amylase,  $\alpha$ -glucosidase, lipase and non-enzymatic glycation, in vitro, of the leaves of *Cassia bakeriana* Craib. **Industrial Crops and Products**, v. 140, p. 111641, 2019 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.111641>.

CUNHA, L.; DE MORAIS, S. A.; MARTINS, C. H.; MARTINS, M. M.; CHANG, R.; DE AQUINO, F. J.; DE OLIVEIRA, A.; MORAES, T. D. S.; MACHADO, F. C.; DA SILVA, C. V. Chemical composition, cytotoxic and antimicrobial activity of essential oils from *Cassia bakeriana* Craib. against aerobic and anaerobic oral pathogens. **Molecules**, v. 18, n. 4, p. 4588-4598, 2013 DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules18044588>.

CUNHA, L. C.;DE MORAIS, S. A.;DE AQUINO, F. J.;CHANG, R.;DE OLIVEIRA, A.;MARTINS, M. M.;MARTINS, C. H.;SOUSA, L. C.;BARROS, T. T.;DA SILVA, C. V. Bioassay-guided fractionation and antimicrobial and cytotoxic activities of *Cassia bakeriana* extracts. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 27, n. 1, p. 91-98, 2017 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2016.08.002>.

DA COSTA SILVA, T.;JUSTINO, A. B.;PRADO, D. G.;KOCH, G. A.;MARTINS, M. M.;DE SOUZA SANTOS, P.;DE MORAIS, S. A. L.;GOULART, L. R.;CUNHA, L. C. S.;DE SOUSA, R. M. F. Chemical composition, antioxidant activity and inhibitory capacity of  $\alpha$ -amylase,  $\alpha$ -glucosidase, lipase and non-enzymatic glycation, in vitro, of the leaves of *Cassia bakeriana* Craib. **Industrial Crops and Products**, v. 140, p. 111641, 2019 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.111641>.

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

DARTORA, N.;DE SOUZA, L. M.;SANTANA-FILHO, A. P.;IACOMINI, M.;VALDUGA, A. T.;GORIN, P. A.;SASSAKI, G. L. UPLC-PDA-MS evaluation of bioactive compounds from leaves of *Ilex paraguariensis* with different growth conditions, treatments and ageing. **Food chemistry**, v. 129, n. 4, p. 1453-1461, 2011 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.05.112>.

DAWIDOWICZ, A. L.;OLSZOWY, M.;JÓŹWIK-DOŁĘBA, M. Antagonistic antioxidant effect in butylated hydroxytoluene/butylated hydroxyanisole mixture. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 39, n. 6, p. 2240-2248, 2015 DOI: <https://doi.org/10.1111/jfpp.12469>.

DE MOURA MARTINS, C.;MORAIS, S. A. L. D.;MARTINS, M. M.;CUNHA, L. C. S.;V. DA SILVA, C.;TEIXEIRA, T. L.;B. SANTIAGO, M.;DE AQUINO, F. J. T.;NASCIMENTO, E. A.;CHANG, R.;MARTINS, C. H. G.;DE OLIVEIRA, A. Antifungal and cytotoxicity activities and new proanthocyanidins isolated from the barks of *Inga laurina* (Sw.) Willd. **Phytochemistry Letters**, v. 40, p. 109-120, 2020 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2020.10.001>.

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

DE SOUZA, P. M.;DE SALES, P. M.;SIMEONI, L. A.;SILVA, E. C.;SILVEIRA, D.;DE OLIVEIRA MAGALHÃES, P. Inhibitory activity of  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase by plant extracts from the Brazilian cerrado. **Planta medica**, v. 78, n. 04, p. 393-399, 2012 DOI: <https://doi.org/10.1055/s-0031-1280404>.

DEBNATH, B.;SINGH, W. S.;DAS, M.;GOSWAMI, S.;SINGH, M. K.;MAITI, D.;MANNA, K. Role of plant alkaloids on human health: A review of biological activities. **Materials today chemistry**, v. 9, p. 56-72, 2018 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mtchem.2018.05.001>.

DEMARQUE, D. P.;CROTTI, A. E.;VESSECCI, R.;LOPES, J. L.;LOPES, N. P. Fragmentation reactions using electrospray ionization mass spectrometry: an important tool for the structural elucidation and characterization of synthetic and natural products. **Natural Product Reports**, v. 33, n. 3, p. 432-455, 2016 DOI: 10.1039/C7RA09475B.

DEORE, U. V.;MAHAJAN, H. S. Isolation and characterization of natural polysaccharide from *Cassia Obtusifolia* seed mucilage as film forming material for drug delivery. **International journal of biological macromolecules**, v. 115, p. 1071-1078, 2018 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.04.174>.

DEVECI, E.;ÇAYAN, F.;TEL-ÇAYAN, G.;DURU, M. E. Inhibitory activities of medicinal mushrooms on  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase-enzymes related to type 2 diabetes. **South African Journal of Botany**, v. 137, p. 19-23, 2021.

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

DEWICK, P. M. **Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach**. ed. John Wiley., 2009. p.

DIAS, D. A.;URBAN, S.;ROESSNER, U. A historical overview of natural products in drug discovery. **Metabolites**, v. 2, n. 2, p. 303-336, 2012 DOI: <https://doi.org/10.3390/metabo2020303>.

DO NASCIMENTO, M. N. G.;MARTINS, M. M.;CUNHA, L. C. S.;DE SOUZA SANTOS, P.;GOULART, L. R.;DE SOUZA SILVA, T.;MARTINS, C. H. G.;DE MORAIS, S. A. L.;PIVATTO, M. Antimicrobial and cytotoxic activities of *Senna* and *Cassia* species (Fabaceae) extracts. **Industrial Crops and Products**, v. 148, p. 112081, 2020 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.112081>.

DURAI PANDIYAN, V.;IGNACIMUTHU, S.;PAULRAJ, M. G. Antifeedant and larvicidal activities of Rhein isolated from the flowers of *Cassia fistula* L. **Saudi journal of biological sciences**, v. 18, n. 2, p. 129-133, 2011 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2010.12.009>.

EERTMANS, F.;BOGAERT, V.;VAN POECKE, T.;PUYPE, B. An Improved neutral  $\alpha$ -glucosidase assay for assessment of epididymal function—validation and comparison to the WHO method. **Diagnostics**, v. 4, n. 1, p. 1-11, 2014 DOI: <https://doi.org/10.3390/diagnostics4010001>.

EL-TOUMY, S. A.;EL SOUDA, S. S.;MOHAMED, T. K.;BROUARD, I.;BERMEJO, J. Anthraquinone glycosides from *Cassia roxburghii* and evaluation of its free radical scavenging activity. **Carbohydrate research**, v. 360, p. 47-51, 2012 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.carres.2012.07.020>.

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

FAGHERAZZI, G.;RAVAUD, P. Digital diabetes: Perspectives for diabetes prevention, management and research. **Diabetes & metabolism**, v. 45, n. 4, p. 322-329, 2019.

FENG, L.;YIN, J.;NIE, S.;WAN, Y.;XIE, M. Structure and conformation characterization of galactomannan from seeds of *Cassia obtusifolia*. **Food Hydrocolloids**, v. 76, p. 67-77, 2018 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.06.008>.

FIETZKE, J.;FRISCHE, M.;HANSTEEN, T.;EISENHAEUER, A. A simplified procedure for the determination of stable chlorine isotope ratios ( $\delta^{37}\text{Cl}$ ) using LA-MC-ICP-MS. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 23, p. 769, 2008 DOI: 10.1039/B718597A.

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

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

GE, Y. W.;ZHU, S.;KAZUMA, K.;WEI, S. L.;YOSHIMATSU, K.;KOMATSU, K. Molecular ion index assisted comprehensive profiling of B-type oligomeric proanthocyanidins in rhubarb by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Anal Bioanal Chem**, v. 408, n. 13, p. 3555-70, 2016b DOI: 10.1007/s00216-016-9433-z.

GIORGINO, F.;BHANA, S.;CZUPRYNIAK, L.;DAGDELEN, S.;GALSTYAN, G. R.;JANEŽ, A.;LALIĆ, N.;NOURI, N.;RAHELIĆ, D.;STOIAN, A. P. Management of patients with diabetes and obesity in the COVID-19 era: Experiences and learnings from South and East Europe, the Middle East, and Africa. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 172, p., 2021 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2020.108617>.

GOUVEIA, N. M.;ALBUQUERQUE, C. L.;ESPINDOLA, L. S.;ESPINDOLA, F. S. *Pouteria ramiflora* extract inhibits salivary amylolytic activity and decreases glycemic level in mice. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 85, n. 3, p. 1141-1148, 2013 DOI: <https://doi.org/10.1590/S0001-37652013000300016>

GROUP, L. P. W.;BRUNEAU, A.;DOYLE, J. J.;HERENDEEN, P.;HUGHES, C.;KENICER, G.;LEWIS, G.;MACKINDER, B.;PENNINGTON, R. T.;SANDERSON, M. J. Legume phylogeny and classification in the 21st century: progress, prospects and lessons for other species-rich clades. **Taxon**, v. 62, n. 2, p. 217-248, 2013a.

GROUP, T. L. P. W.;BRUNEAU, A.;DOYLE, J. J.;HERENDEEN, P.;HUGHES, C.;KENICER, G.;LEWIS, G.;MACKINDER, B.;PENNINGTON, R. T.;SANDERSON, M. J.;WOJCIECHOWSKI, M. F.;BOATWRIGHT, S. et al. Legume phylogeny and classification in the 21st century: Progress, prospects and lessons for other species-rich clades. **Taxon**, v. 62, n. 2, p. 217-248, 2013b DOI: <https://doi.org/10.12705/622.8>.

GU, L.;KELM, M. A.;HAMMERSTONE, J. F.;ZHANG, Z.;BEECHER, G.;HOLDEN, J.;HAYTOWITZ, D.;PRIOR, R. L. Liquid chromatographic/electrospray ionization mass spectrometric studies of proanthocyanidins in foods. **J Mass Spectrom**, v. 38, n. 12, p. 1272-80, 2003a DOI: 10.1002/jms.541.

GU, L.;KELM, M. A.;HAMMERSTONE, J. F.;ZHANG, Z.;BEECHER, G.;HOLDEN, J.;HAYTOWITZ, D.;PRIOR, R. L. Liquid chromatographic/electrospray ionization mass spectrometric studies of proanthocyanidins in foods. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 38, n. 12, p. 1272-1280, 2003b.

HARSHA, P. S.;LAVELLI, V.;SCARAFONI, A. Protective ability of phenolics from white grape vinification by-products against structural damage of bovine serum albumin induced by glycation. **Food chemistry**, v. 156, p. 220-226, 2014.

HUI, X.;WU, G.;HAN, D.;STIPKOVITS, L.;WU, X.;TANG, S.;BRENNAN, M. A.;BRENNAN, C. S. The effects of bioactive compounds from blueberry and blackcurrant powders on the inhibitory activities of oat bran pastes against  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase linked to type 2 diabetes. **Food research international**, v. 138, p. 109756, 2020 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109756>.

HUSSEIN, R. A.;EL-ANSSARY, A. A. Plants secondary metabolites: the key drivers of the pharmacological actions of medicinal plants. **Herbal Medicine**, v. 1, n., p. 13, 2019 DOI: <https://doi.org/10.5772/intechopen.76139>.

JANI, D. K.;GOSWAMI, S. Antidiabetic activity of *Cassia angustifolia* Vahl. and *Raphanus sativus* Linn. leaf extracts. **Journal of Traditional and Complementary Medicine**, v. 10, n. 2, p. 124-131, 2020 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jtcme.2019.03.002>.

JIN, J.;LAO, J.;ZHOU, R.;HE, W.;QIN, Y.;ZHONG, C.;XIE, J.;LIU, H.;WAN, D.;ZHANG, S.;QIN, Y. Simultaneous Identification and Dynamic Analysis of Saccharides during Steam Processing of Rhizomes of *Polygonatum cyrtonema* by HPLC-QTOF-MS/MS. **Molecules**, v. 23, n. 11, p. 2855, 2018.

JOHANSEN, J. S.;HARRIS, A. K.;RYCHLY, D. J.;ERGUL, A. Oxidative stress and the use of antioxidants in diabetes: linking basic science to clinical practice. **Cardiovascular diabetology**, v. 4, n. 1, p. 1-11, 2005.

KABERA, J. N.;SEMANA, E.;MUSSA, A. R.;HE, X. Plant secondary metabolites: biosynthesis, classification, function and pharmacological properties. **J Pharm Pharmacol**, v. 2, n. 7, p. 377-392, 2014.

KANG, Q.;YANG, C. Oxidative stress and diabetic retinopathy: Molecular mechanisms, pathogenetic role and therapeutic implications. **Redox Biology**, p. 101799, 2020.

KARTNIG, T.;GÖBEL, I. Effect of fluorescence intensifiers on the fluorodensitometric determination of flavones and flavonols after detection with diphenylboric acid 2-aminoethyl ester. **Journal of Chromatography A**, v. 740, n. 1, p. 99-107, 1996 DOI: [https://doi.org/10.1016/0021-9673\(96\)00102-1](https://doi.org/10.1016/0021-9673(96)00102-1).

KHADER, S. Z. A.;AHMED, S. S. Z.;BALASUBRAMANIAN, S. K.;KUMAR ARUNACHALAM, T.;KANNAPPAN, G.;MAHBOOB, M. R.;PONNUSAMY, P.;RAMESH, K. Modulatory effect of dianthrone rich alcoholic flower extract of *Cassia auriculata* L. on experimental diabetes. **Integrative medicine research**, v. 6, n. 2, p. 131-140, 2017.

KHAN, M.;LIU, H.;WANG, J.;SUN, B. Inhibitory effect of phenolic compounds and plant extracts on the formation of advance glycation end products: A comprehensive review. **Food research international**, v. 130, p. 108933, 2020 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108933>.

KHANGHOLI, S.;MAJID, F. A. A.;BERWARY, N. J. A.;AHMAD, F.;ABD AZIZ, R. B. The mechanisms of inhibition of advanced glycation end products formation through polyphenols in hyperglycemic condition. **Planta medica**, v. 82, n. 01/02, p. 32-45, 2016.

KIM, J. Y.;KU, Y. S.;KIM, H. J.;TRINH, N. T.;KIM, W.;JEONG, B.;HEO, T. Y.;LEE, M. K.;LEE, K. E. Oral diabetes medication and risk of dementia in elderly patients with type 2 diabetes. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 154, p. 116-123, 2019 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2019.07.004>.

KRAUSE, J.;TOBIN, G. Discovery, development, and regulation of natural products. **Using old solutions to new problems-natural drug discovery in the 21st century**, p. 3-35, 2013.

LEE, M.-J.;NHO, J.-H.;YANG, B.-D.;PARK, H.;LEE, H.-J.;LEE, K.-H.;JANG, J.-H.;JUNG, H.-K.;KIM, S.-R.;CHO, H.-W.;PARK, H.-S.;LIM, J.-O. et al. Subchronic toxicity evaluation of ethanol extract of *Cassia tora* L. seeds in rats. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 109, p. 104487, 2019 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2019.104487>.

LI, D.;FU, D.;ZHANG, Y.;MA, X.;GAO, L.;WANG, X.;ZHOU, D.;ZHAO, K. Isolation, purification, and identification of taxol and related taxanes from taxol-producing fungus *Aspergillus niger* subsp. *taxi*. **J Microbiol Biotechnol**, v. 27, n. 8, p. 1379-1385, 2017.

LIANG, Y.;PEI, F.;WANG, H.;CHEN, S. Two alkaloids as  $\alpha$ -amylase inhibitors: Enzyme kinetics and molecular modelling investigations. **J. Chin. Pharm. Sci**, v. 24, n. 2, p. 80-87, 2015.

LITESCU, S. C.;EREMIA, S. A.;TACHE, A.;VASILESCU, I.;RADU, G.-L. The use of oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assays in the assessment of beverages' antioxidant properties. **Processing and impact on antioxidants in beverages**, Elsevier, 2014. cap. p. 245-251.

LOBO, V.;PATIL, A.;PHATAK, A.;CHANDRA, N. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. **Pharmacognosy reviews**, v. 4, n. 8, p. 118, 2010.

LORENZI, H. **Árvores exóticas no Brasil: madeireiras, ornamentais e aromáticas**. ed. Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2003. p.

LUO, H.-Y.;GUO, R.-X.;YU, X.-K.;ZHANG, X.;LU, Y.-Q.;WU, H.-W.;TANG, L.-Y.;WANG, Z.-J. Chemical constituents from the seeds of *Cassia obtusifolia* and their in vitro  $\alpha$ -glucosidase inhibitory and antioxidant activities. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 29, n. 13, p. 1576-1579, 2019 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2019.05.002>.

MACEDO, T.;FERRERES, F.;PEREIRA, D. M.;OLIVEIRA, A. P.;GOMES, N. G.;GIL-IZQUIERDO, Á.;VALENTÃO, P.;ARAÚJO, L.;ANDRADE, P. B. *Cassia sieberiana* DC. leaves modulate LPS-induced inflammatory response in THP-1 cells and inhibit eicosanoid-metabolizing enzymes. **Journal of ethnopharmacology**, v. 269, p. 113746, 2021.

MBAKIDI-NGOUABY, H.;PINAULT, E.;GLOAGUEN, V.;COSTA, G.;SOL, V.;MILLOT, M.;MAMBU, L. Profiling and seasonal variation of chemical constituents from *Pseudotsuga menziesii* wood. **Industrial Crops and Products**, v. 117, p. 34-49, 2018 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.02.069>.

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

MONDAL, A.;RAJALINGAM, D.;MAITY, T. K. Anti-inflammatory effect of O-methylated flavonol 2-(3, 4-dihydroxy-phenyl)-3, 5-dihydroxy-7-methoxy-chromen-4-one obtained from *Cassia sophera* Linn in rats. **Journal of ethnopharmacology**, v. 147, n. 2, p. 525-529, 2013.

NABAVI, S. M.;ŠAMEC, D.;TOMCZYK, M.;MILELLA, L.;RUSSO, D.;HABTEMARIAM, S.;SUNTAR, I.;RASTRELLI, L.;DAGLIA, M.;XIAO, J.;GIAMPIERI, F.;BATTINO, M. et al. Flavonoid biosynthetic pathways in plants: Versatile targets for metabolic engineering. **Biotechnology Advances**, v. 38, p. 107316, 2020 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.11.005>.

NAMBIRAJAN, G.;KARUNANIDHI, K.;GANESAN, A.;RAJENDRAN, R.;KANDASAMY, R.;ELANGOVA, A.;THILAGAR, S. Evaluation of antidiabetic activity of bud and flower of Avaram Senna (*Cassia auriculata* L.) In high fat diet and streptozotocin induced diabetic rats. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 108, p. 1495-1506, 2018 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.10.007>.

NANDA, S.;MADAN, K. The role of Safranal and saffron stigma extracts in oxidative stress, diseases and photoaging: A systematic review. **Heliyon**, v. 7, n. 2, p. e06117, 2021.

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

NELSON, D.;COX, M. Principios de bioquímica: Lehninger.[SI]: Omega. p., 2014.

NELSON, D. L.;COX, M. M. **Lehninger: princípios de bioquímica**. ed. 2015. p.

NEWMAN, D. J.;CRAGG, G. M. Natural products as drugs and leads to drugs: the historical perspective. **Natural Product Chemistry for Drug Discovery**, p. 3-27, 2010.

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, n. 3, p. 770-803, 2020.

NIEDOWICZ, D. M.;DALEKE, D. L. The role of oxidative stress in diabetic complications. **Cell biochemistry and biophysics**, v. 43, n. 2, p. 289-330, 2005.



OLIVEIRA, G. S. Determinação da capacidade antioxidante de produtos naturais in vitro pelo método do DPPH: estudo de revisão. **Rev. bras. plantas med**, p. 36-44, 2015.

OLSZOWY, M. What is responsible for antioxidant properties of polyphenolic compounds from plants? **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 144, p. 135-143, 2019 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2019.09.039>.

OTTU, O.;ATAWODI, S.;ONYIKE, E. Antioxidant, hepatoprotective and hypolipidemic effects of methanolic root extract of *Cassia singueana* in rats following acute and chronic carbon tetrachloride intoxication. **Asian Pacific journal of tropical medicine**, v. 6, n. 8, p. 609-615, 2013.

OZOUGWU, J.;OBIMBA, K.;BELONWU, C.;UNAKALAMBA, C. The pathogenesis and pathophysiology of type 1 and type 2 diabetes mellitus. **Journal of physiology and pathophysiology**, v. 4, n. 4, p. 46-57, 2013.

PISOSCHI, A. M.;POP, A.;IORDACHE, F.;STANCA, L.;PREDOI, G.;SERBAN, A. I. Oxidative stress mitigation by antioxidants-an overview on their chemistry and influences on health status. **European Journal of Medicinal Chemistry**, p. 112891, 2020.

POTT, D. M.;OSORIO, S.;VALLARINO, J. G. From Central to Specialized Metabolism: An Overview of Some Secondary Compounds Derived From the Primary Metabolism for Their Role in Conferring Nutritional and Organoleptic Characteristics to Fruit. **Frontiers in Plant Science**, v. 10, n. 835, p., 2019 DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00835>.

PRADA, A. L.;ACHOD, L. D. R.;KEITA, H.;CARVALHO, J. C. T.;DE SOUZA, T. P.;AMADO, J. R. R. Development, pharmacological and toxicological evaluation of a new tablet formulation based on *Cassia grandis* fruit extract. **Sustainable Chemistry and Pharmacy**, v. 16, n., p. 100244, 2020.

PRASANSUKLAB, A.;THEERASRI, A.;RANGSINTH, P.;SILLAPACHAIYAPORN, C.;CHUCHAWANKUL, S.;TENCOMNAO, T. Anti-COVID-19 drug candidates: a review on potential biological activities of natural products in the management of new coronavirus infection. **Journal of Traditional and Complementary Medicine**, p., 2020.

PRIOR, R. L.;HOANG, H.;GU, L.;WU, X.;BACCHIOCCA, M.;HOWARD, L.;HAMPSCH-WOODILL, M.;HUANG, D.;OU, B.;JACOB, R. Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORACFL)) of plasma and other biological and food samples. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 51, n. 11, p. 3273-3279, 2003.

RABBANI, N.;THORNALLEY, P. J. Advanced glycation end products in the pathogenesis of chronic kidney disease. **Kidney International**, v. 93, n. 4, p. 803-813, 2018 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.kint.2017.11.034>.

RAMALHO, V. C.;JORGE, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. **Química nova**, p. 755-760, 2006.

RÍOS, J. L.;FRANCINI, F.;SCHINELLA, G. R. Natural products for the treatment of type 2 diabetes mellitus. **Planta medica**, v. 81, p., 2015 DOI: <http://dx.doi.org/10.1055/s-0035-1546131>.

SCHÄFER, H.;WINK, M. Medicinally important secondary metabolites in recombinant microorganisms or plants: progress in alkaloid biosynthesis. **Biotechnology Journal: Healthcare Nutrition Technology**, v. 4, n. 12, p. 1684-1703, 2009 DOI: <https://doi.org/10.1002/biot.200900229>.

SEO, Y.;SONG, J.-S.;KIM, Y.-M.;JANG, Y. P. Toralactone glycoside in *Cassia obtusifolia* mediates hepatoprotection via an Nrf2-dependent anti-oxidative mechanism. **Food research international**, v. 97, p. 340-346, 2017 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.04.032>.

SHAI, L. J.;MASOKO, P.;MOKGOTHO, M. P.;MAGANO, S. R.;MOGALE, A.;BOADUO, N.;ELOFF, J. N. Yeast alpha glucosidase inhibitory and antioxidant activities of six medicinal plants collected in Phalaborwa, South Africa. **South African Journal of Botany**, v. 76, n. 3, p. 465-470, 2010.

SHARMA, A.;KUMAR, A.;JAITAK, V. Pharmacological and chemical potential of *Cassia fistula* L-a critical review. **Journal of Herbal Medicine**, p. 100407, 2020.

SHARMA, S.;CHOUDHARY, M.;BHARDWAJ, S.;CHOUDHARY, N.;RANA, A. C. Hypoglycemic potential of alcoholic root extract of *Cassia occidentalis* Linn. in streptozotocin induced diabetes in albino mice. **Bulletin of Faculty of Pharmacy, Cairo University**, v. 52, n. 2, p. 211-217, 2014 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bfopcu.2014.09.003>.

SHI-FEI, L.;SHUN-LIN, L. Cycloartane triterpenoid and its glucoside isolated from *Cassia occidentalis*. **Chinese journal of natural medicines**, v. 15, n. 12, p. 950-954, 2017.

SHUKLA, V.;ASTHANA, S.;SINGH, S.;TRIPATHI, A. Role of Anthraquinones in *Cassia occidentalis* induced Hepatomyoencephalopathy. **Journal of ethnopharmacology**, p. 113431, 2020.

SIDDEEG, A.;ALKEHAYEZ, N. M.;ABU-HIAMED, H. A.;AL-SANEA, E. A.;AL-FARGA, A. M. Mode of action and determination of antioxidant activity in the dietary sources: An overview. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 28, n. 3, p. 1633, 2021.

SMITH, C. A.;O'MAILLE, G.;WANT, E. J.;QIN, C.;TRAUGER, S. A.;BRANDON, T. R.;CUSTODIO, D. E.;ABAGYAN, R.;SIUZDAK, G. METLIN: a metabolite mass spectral database. **Ther Drug Monit**, v. 27, n. 6, p. 747-51, 2005 DOI: 10.1097/01.ftd.0000179845.53213.39.

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

SOUZA, P. M. D. Application of microbial  $\alpha$ -amylase in industry-A review. **Brazilian journal of microbiology**, v. 41, n. 4, p. 850-861, 2010.

SUNDARAMOORTHY, S.;GUNASEKARAN, S.;ARUNACHALAM, S.;SATHIAVELU, M. A phytopharmacological review on *Cassia* species. **Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 8, n. 5, p. 260, 2016.

TALA, V. R. S.;CANDIDA DA SILVA, V.;RODRIGUES, C. M.;NKENGFACK, A. E.;CAMPANER DOS SANTOS, L.;VILEGAS, W. Characterization of proanthocyanidins from *Parkia biglobosa* (Jacq.) G. Don.(Fabaceae) by flow injection analysis—Electrospray ionization ion trap tandem mass spectrometry and liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry. **Molecules**, v. 18, n. 3, p. 2803-2820, 2013.

TANG, L.;WU, H.;SU, H.;ZHOU, X.;ZHOU, G.;WANG, T.;KOU, Z.;WANG, Z. Four new glycosides from the seeds of *Cassia obtusifolia*. **Phytochemistry Letters**, v. 13, p. 81-84, 2015 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2015.05.005>.

TANTY, H.;PERMAI, S. The Effect of Differences in Extraction of *Cassia Siamea*. Lamk Leaves in Etoh 70% and Etoh 90% Against The Inhibition of The A-Glucosidase Enzyme. In: **Journal of Physics: Conference Series**, 2021.

TAYLOR, V. F.;MARCH, R. E.;LONGERICH, H. P.;STADEY, C. J. A mass spectrometric study of glucose, sucrose, and fructose using an inductively coupled plasma and electrospray ionization. **International Journal of Mass Spectrometry**, v. 243, n. 1, p. 71-84, 2005 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijms.2005.01.001>.

THILAGAM, E.;PARIMALADEVI, B.;KUMARAPPAN, C.;MANDAL, S. C.  $\alpha$ -Glucosidase and  $\alpha$ -amylase inhibitory activity of *Senna surattensis*. **Journal of acupuncture and meridian studies**, v. 6, n. 1, p. 24-30, 2013.

THOLL, D. Biosynthesis and Biological Functions of Terpenoids in Plants. In: SCHRADER, J.; BOHLMANN, J. **Biotechnology of Isoprenoids**, Cham: Springer International Publishing, 2015. cap. p. 63-106.

TOMA, A.;MAKONNEN, E.;MEKONNEN, Y.;DEBELLA, A.;ADDISAKWATTANA, S. Intestinal  $\alpha$ -glucosidase and some pancreatic enzymes inhibitory effect of hydroalcoholic extract of *Moringa stenopetala* leaves. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 14, n. 1, p. 1-5, 2014.

VATNER, S. F.;ZHANG, J.;OYDANICH, M.;BERKMAN, T.;NAFTALOVICH, R.;VATNER, D. E. Healthful aging mediated by inhibition of oxidative stress. **Ageing Research Reviews**, v., n., p. 101194, 2020.

VEELEN, A.;TAPIA, E. E.;OSCARSSON, J.;SCHRAUWEN, P. Type 2 diabetes subgroups and potential medication strategies in relation to effects on insulin resistance and beta-cell function: a step towards personalized diabetes treatment? **Molecular Metabolism**, p. 101158, 2020.

VIEGAS JR, C.;BOLZANI, V. D. S.;BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química nova**, v. 29, p. 326-337, 2006 DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422006000200025>.

VIEGAS JUNIOR, C.;REZENDE, A. D.;SILVA, D. H. S.;CASTRO-GAMBÔA, I.;BOLZANI, V. D. S.;BARREIRO, E. J.;MIRANDA, A. L. P. D.;ALEXANDRE-MOREIRA, M. S.;YOUNG, M. C. M. Aspectos químicos, biológicos e etnofarmacológicos do gênero *Cassia*. **Química Nova**, v. 29, n. 6, p. 1279-1286, 2006.

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

WANG, W.;YAGIZ, Y.;BURAN, T. J.;DO NASCIMENTO NUNES, C.;GU, L. Phytochemicals from berries and grapes inhibited the formation of advanced glycation end-products by scavenging reactive carbonyls. **Food Research International**, v. 44, n. 9, p. 2666-2673, 2011.

WU, H.-Y.;HU, W.-Y.;LIU, Q.;YU, Z.-H.;ZHAN, J.-B.;YAN, K.-L.;WANG, Y.-D.;ZHOU, K.;DONG, W.;LI, Y.-K.;ZHOU, M.;HU, Q.-F. Three new alkaloids from the twigs of *Cassia siamea* and their bioactivities. **Phytochemistry Letters**, v. 15, p. 121-124, 2016 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2015.12.009>.

YADAV, A.;KUMARI, R.;YADAV, A.;MISHRA, J.;SRIVATVA, S.;PRABHA, S. Antioxidants and its functions in human body-A Review. **Research in Environment and Life Sciences**, v. 9, n. 11, p. 1328-1331, 2016.

YADAVA, R.;VISHWAKARMA, U. K. New biologically active allelochemical from seeds of *Cassia absus* Linn. p., 2013.

YİLDİRİM, A.;MAVI, A.;KARA, A. A. Determination of Antioxidant and Antimicrobial Activities of *Rumex crispus* L. Extracts. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 49, n. 8, p. 4083-4089, 2001 DOI: <https://doi.org/10.1021/jf0103572>.

YILMAZER-MUSA, M.;GRIFFITH, A. M.;MICHELS, A. J.;SCHNEIDER, E.;FREI, B. Grape Seed and Tea Extracts and Catechin 3-Gallates Are Potent Inhibitors of  $\alpha$ -Amylase and  $\alpha$ -Glucosidase Activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 36, p. 8924-8929, 2012 DOI: 10.1021/jf301147n.

YOSHIMIZU, M.;TAJIMA, Y.;MATSUZAWA, F.;AIKAWA, S.-I.;IWAMOTO, K.;KOBAYASHI, T.;EDMUNDS, T.;FUJISHIMA, K.;TSUJI, D.;ITOH, K.;IKEKITA, M.;KAWASHIMA, I. et al. Binding parameters and thermodynamics of the interaction of imino sugars with a recombinant human acid  $\alpha$ -glucosidase

( $\alpha$ -glucosidase): Insight into the complex formation mechanism. **Clinica Chimica Acta**, v. 391, n. 1, p. 68-73, 2008 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cca.2008.02.014>.

ZHANG, L.;XU, L.;YE, Y.-H.;ZHU, M.-F.;LI, J.;TU, Z.-C.;YANG, S.-H.;LIAO, H. Phytochemical profiles and screening of  $\alpha$ -glucosidase inhibitors of four *Acer* species leaves with ultra-filtration combined with UPLC-QTOF-MS/MS. **Industrial Crops and Products**, v. 129, p. 156-168, 2019 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.11.051>.

ZHANG, Y.;SANTOSA, R. W.;ZHANG, M.;HUO, J.;HUANG, D. Characterization and bioactivity of proanthocyanidins during Malay cherry (*Lepisanthes alata*) fruit ripening. **Food Bioscience**, v. 36, p. 100617, 2020 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2020.100617>.

ZHAO, Y.;ZHAO, K.;JIANG, K.;TAO, S.;LI, Y.;CHEN, W.;KOU, S.;GU, C.;LI, Z.;GUO, L. A review of flavonoids from *Cassia* species and their biological activity. **Current pharmaceutical biotechnology**, v. 17, n. 13, p. 1134-1146, 2016.

## APENDICE

Figura A1 - Cromatograma em alta resolução no modo negativo da fração *n*-butanol

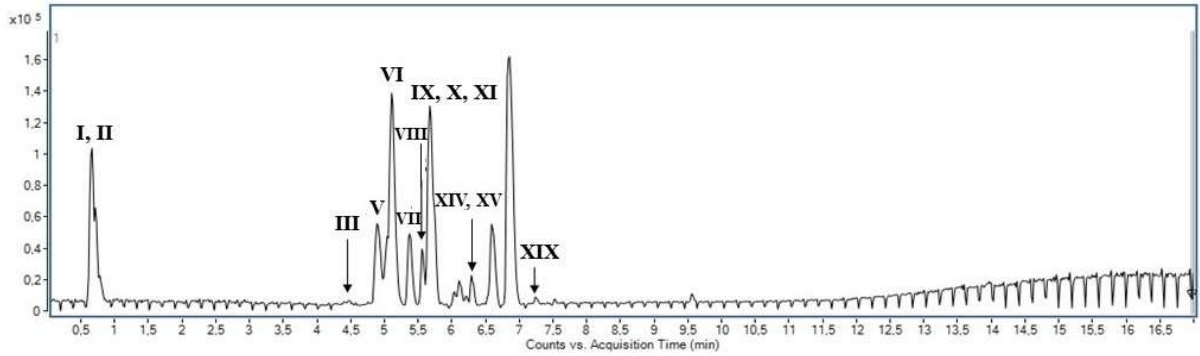


Figura A2 - (-)-EM do composto 1 ( $m/z$  377, 0856  $[M + Cl]^-$ ).

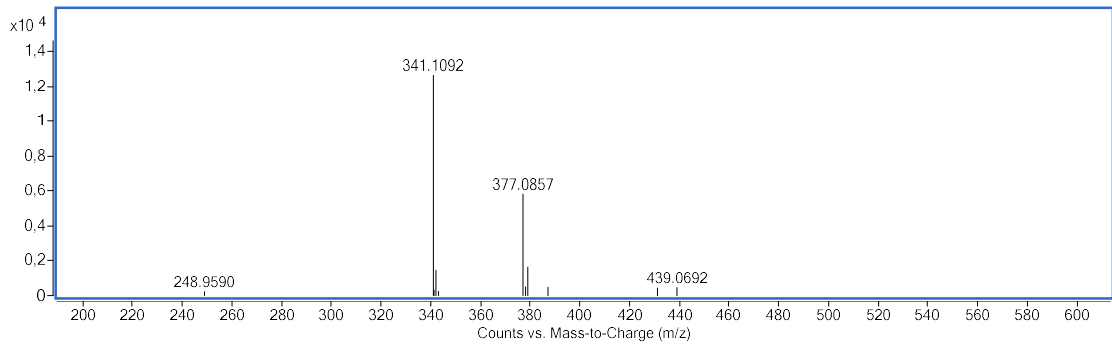


Figura A3 - (-)-EM do composto 1 isótopo  $^{37}Cl$  ( $m/z$  379.0816  $[M + Cl]^-$ ).

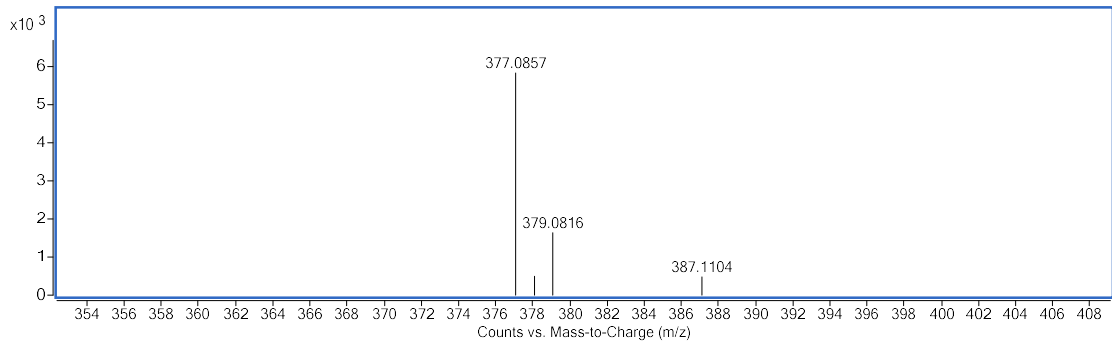


Figura A4 - (-)-IES-EM/EM do composto 1 ( $m/z$  377, 0856 [ $M + Cl$ ]<sup>-</sup>).

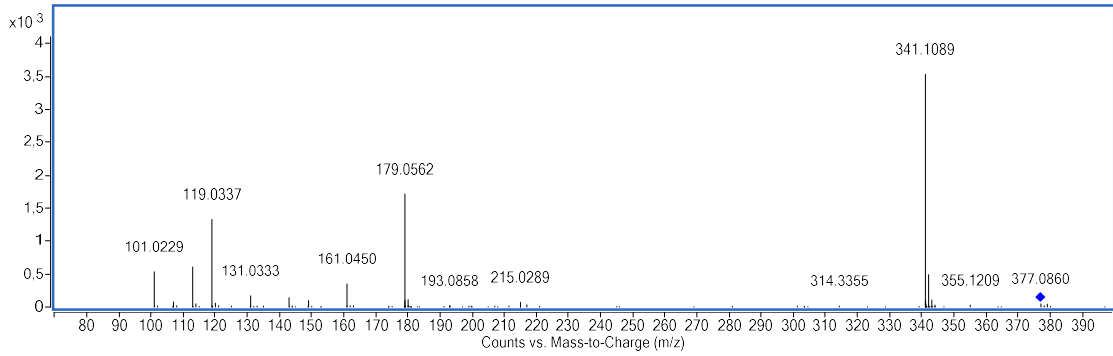


Figura A5 - (-)-EM do composto 2 ( $m/z$  341,1092 [ $M - H$ ]<sup>-</sup>)

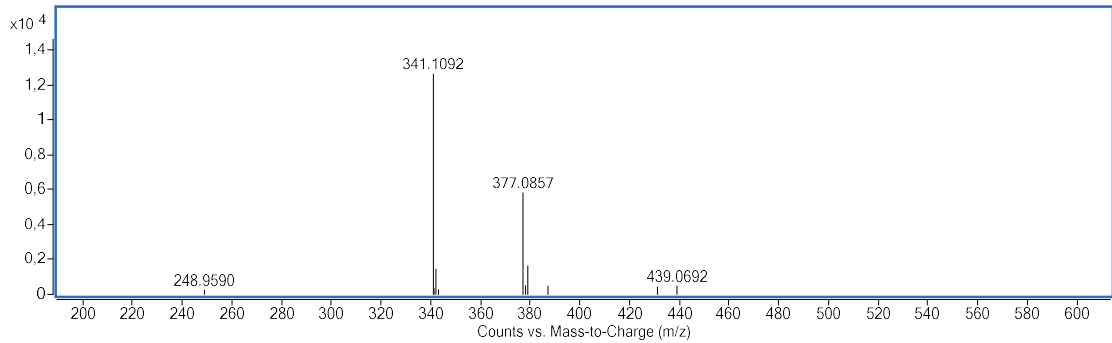


Figura A6 - (-)-IES-EM/EM do composto 2 ( $m/z$  341,1092 [ $M - H$ ]<sup>-</sup>)

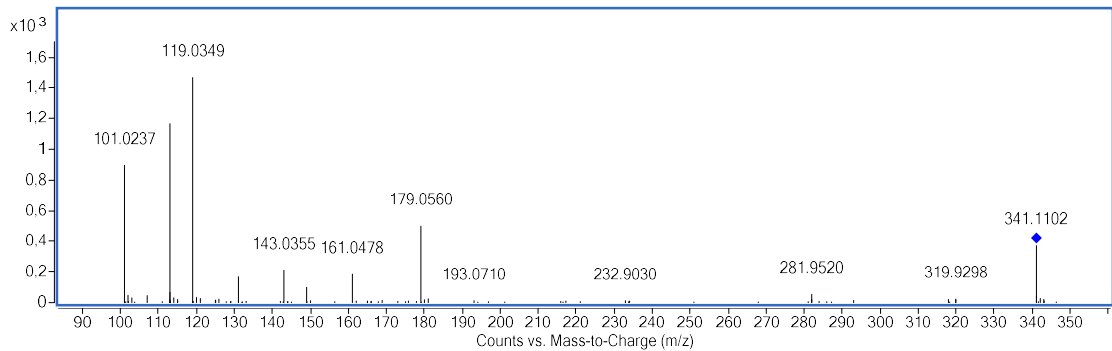


Figura A7 - (-)-EM do composto 3 ( $m/z$  577, 1352 [ $M - H$ ]<sup>-</sup>)

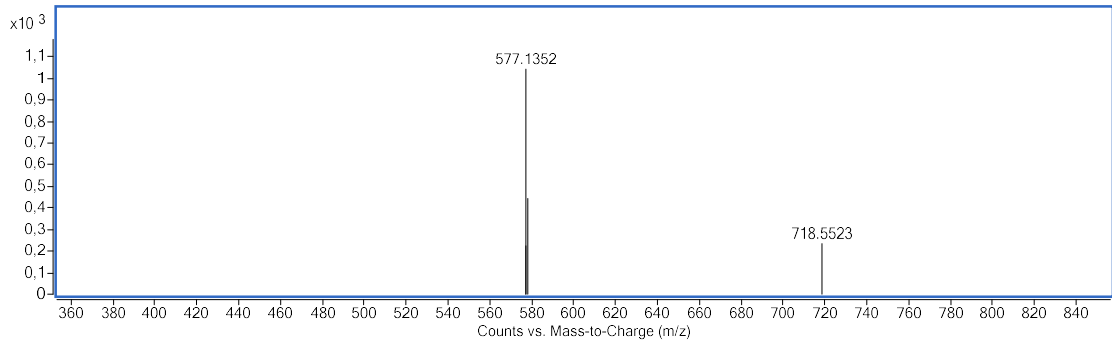


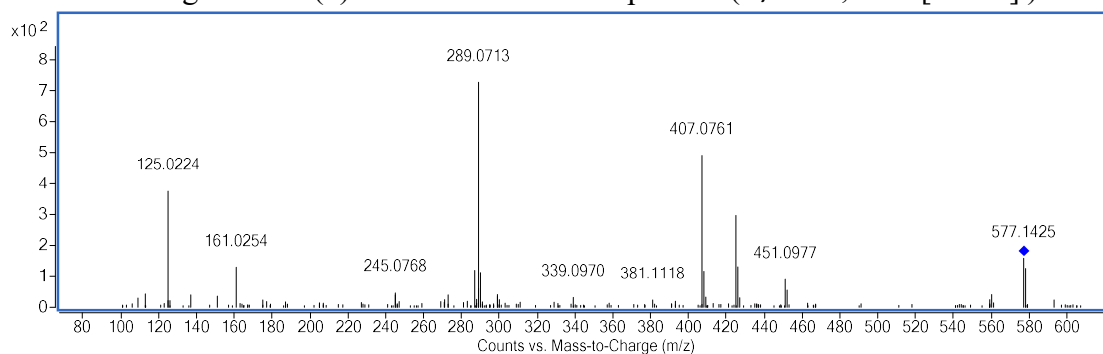
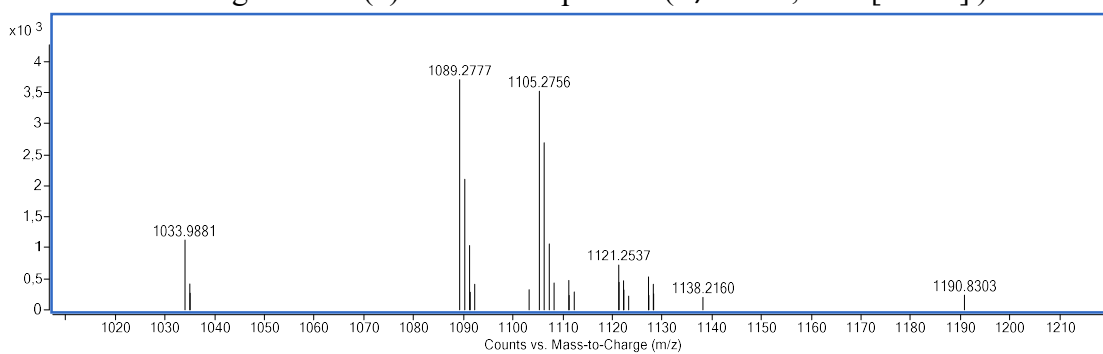
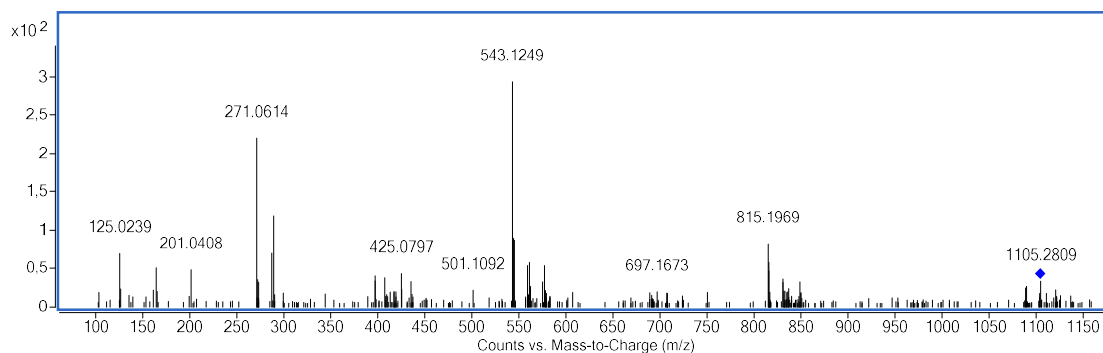
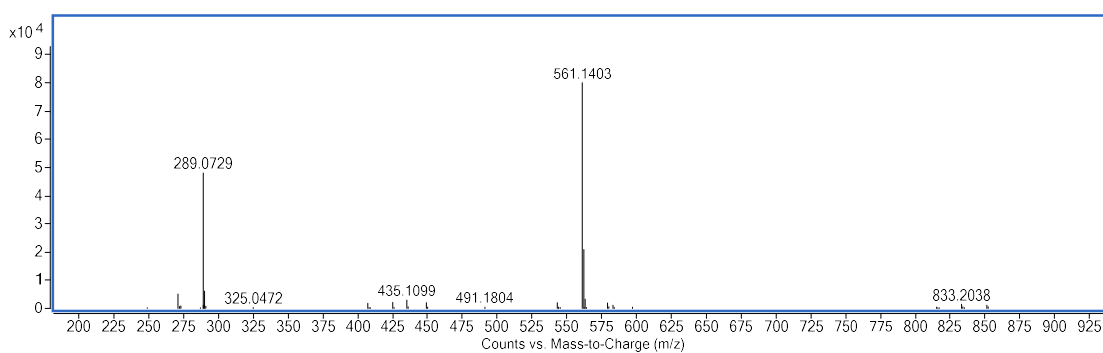
Figura A8 - (-)-IES-EM/EM do composto 3 ( $m/z$  577,1352  $[M - H]^-$ )Figura A9 - (-)-EM do composto 4 ( $m/z$  1105,2756  $[M - H]^-$ )Figura A10 - (-)-IES-EM/EM do composto 4  $[M - H]^-$  ( $m/z$  1105,2756  $[M - H]^-$ )Figura A11 - (-)-EM do composto 6 ( $m/z$  561,1403  $[M - H]^-$ )

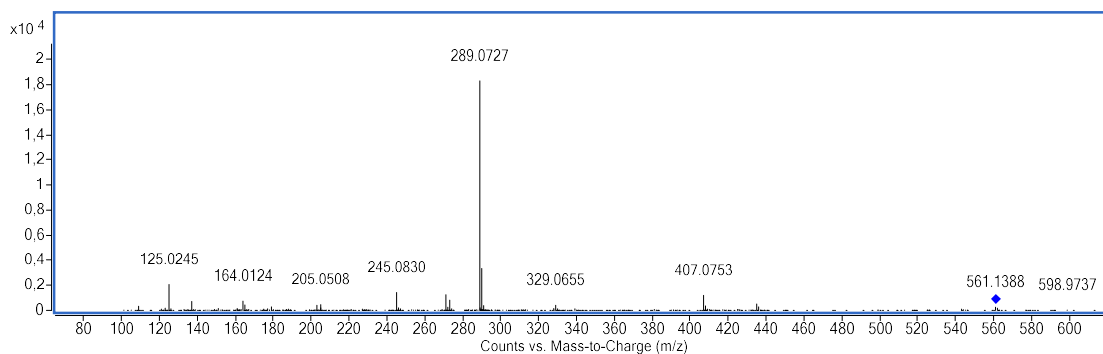
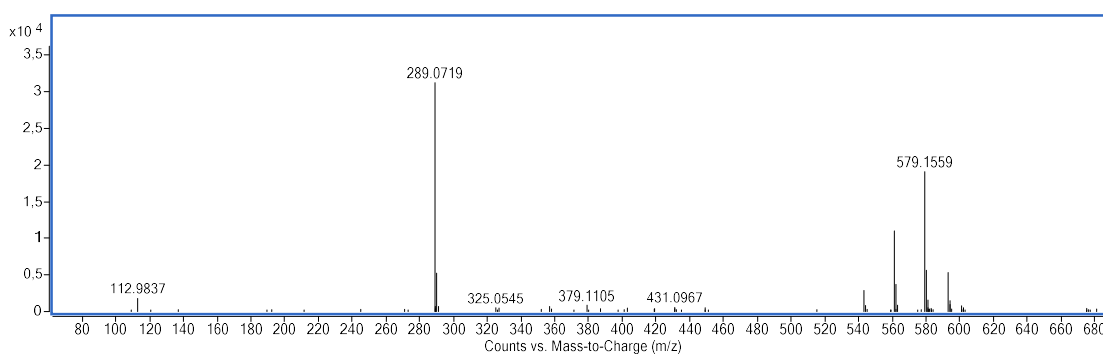
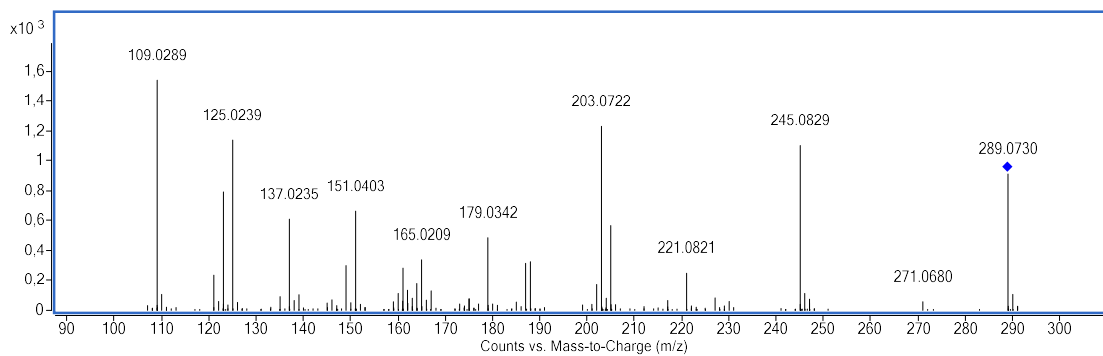
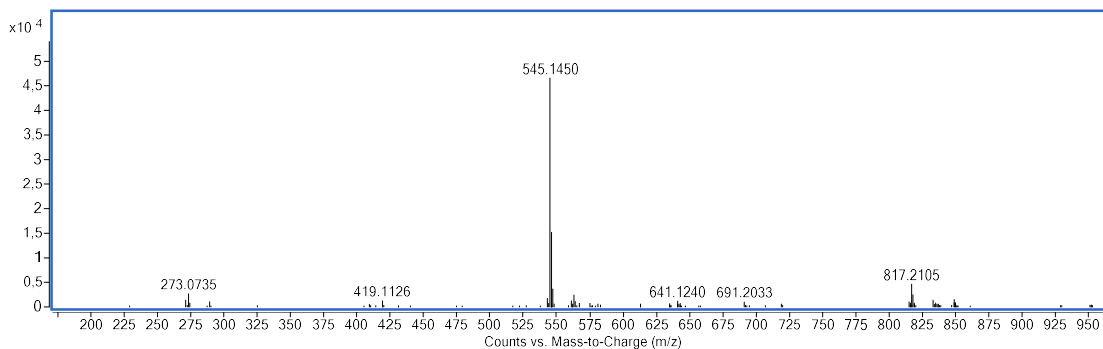
Figura A12 - (-)-IES-EM/EM do composto 6 ( $m/z$  561,1403 [M - H]<sup>-</sup>)Figura A13 - (-)-EM do composto 5 ( $m/z$  289,0719 [M - H]<sup>-</sup>)Figura A14 - (-)-IES-EM/EM do composto 5 ( $m/z$  289,0719 [M - H]<sup>-</sup>)Figura A15 - (-)-EM do composto 7 ( $m/z$  545,1450 [M - H]<sup>-</sup>)



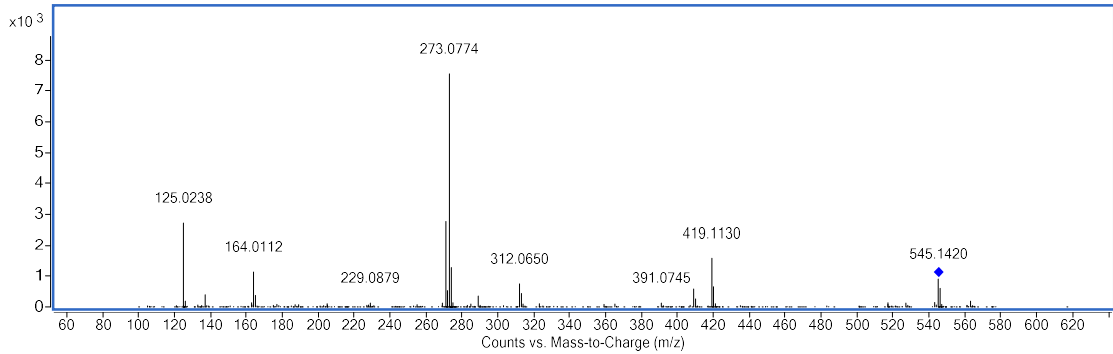
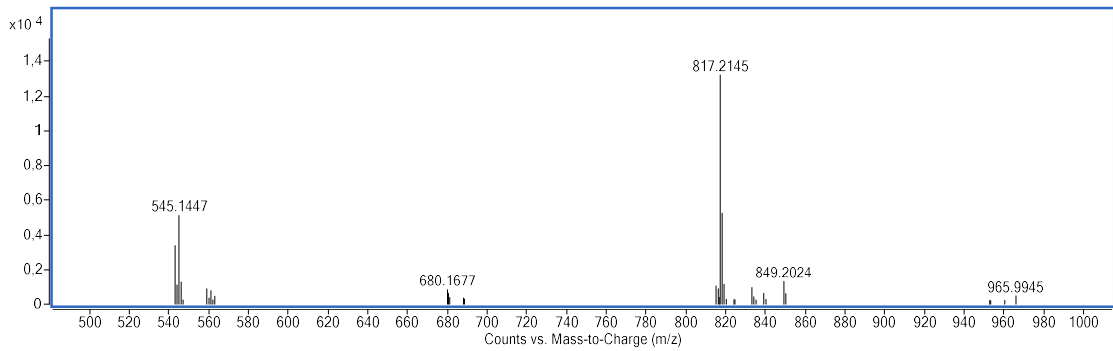
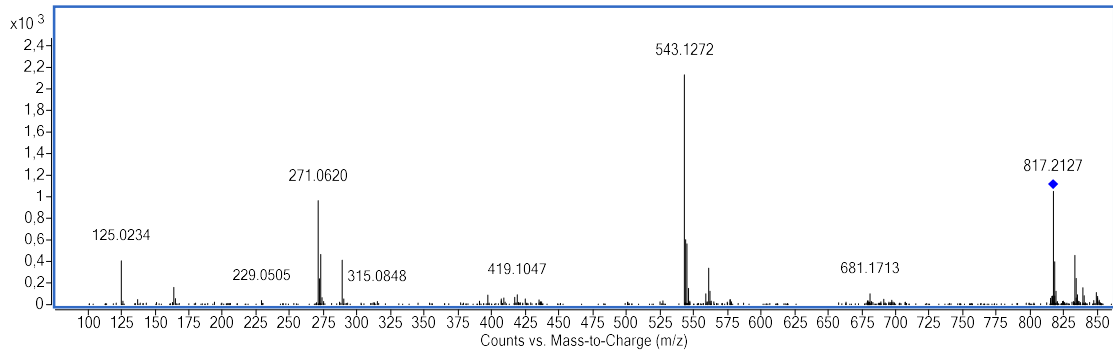
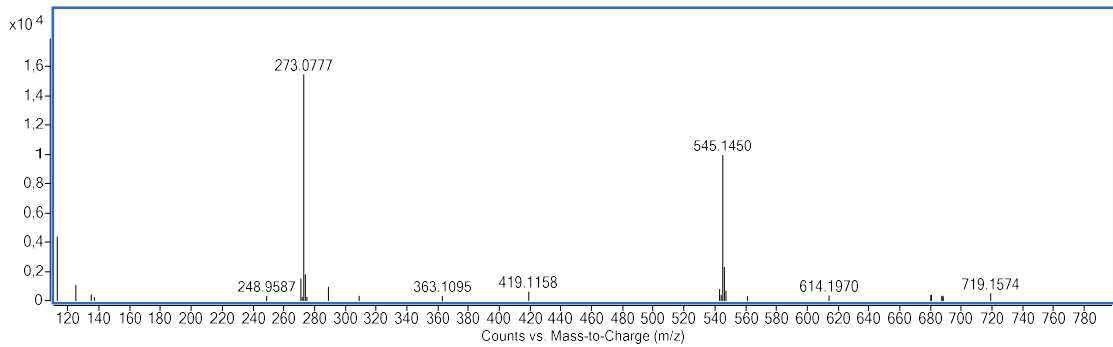
Figura A16 - (-)-IES-EM/EM do composto 7 ( $m/z$  545,1450 [M - H]<sup>-</sup>)Figura A17 - (-)-EM do composto 9 ( $m/z$  817,2145 [M - H]<sup>-</sup>)Figura A18 - (-)-IES-EM/EM do composto 9 ( $m/z$  817,2145 [M - H]<sup>-</sup>)Figura A19 - (-)-EM do composto 10 ( $m/z$  545, 1450 [M - H]<sup>-</sup>)

Figura A20 - (-)-IES-EM/EM do composto 10 ( $m/z$  545, 1450 [ $M - H$ ]<sup>-</sup>)

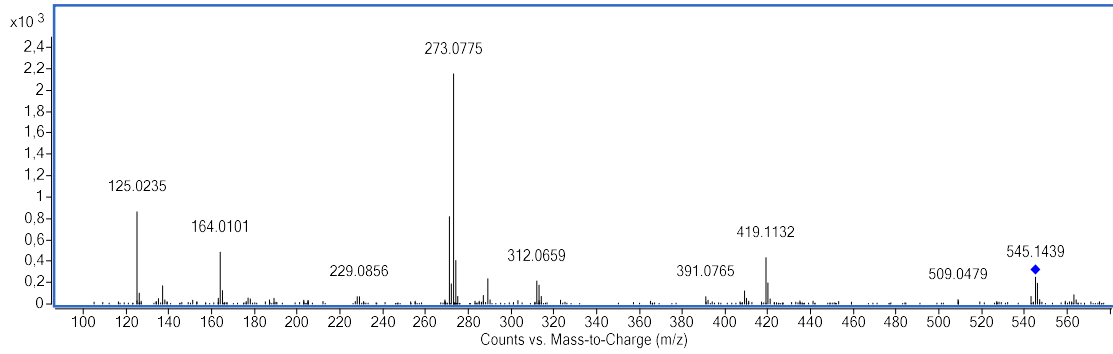


Figura A21 - (-)-EM do composto 11 ( $m/z$  273,0777 [ $M - H$ ]<sup>-</sup>)

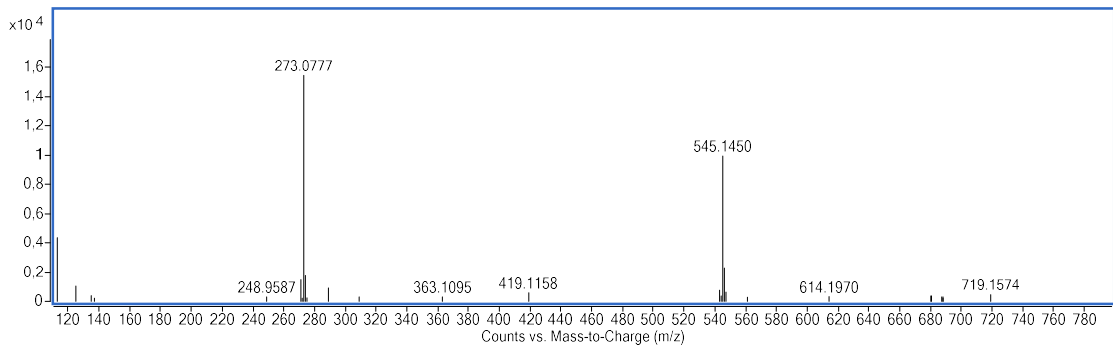


Figura A22 - (-)-IES-EM/EM do composto 11 ( $m/z$  273,0777 [ $M - H$ ]<sup>-</sup>)

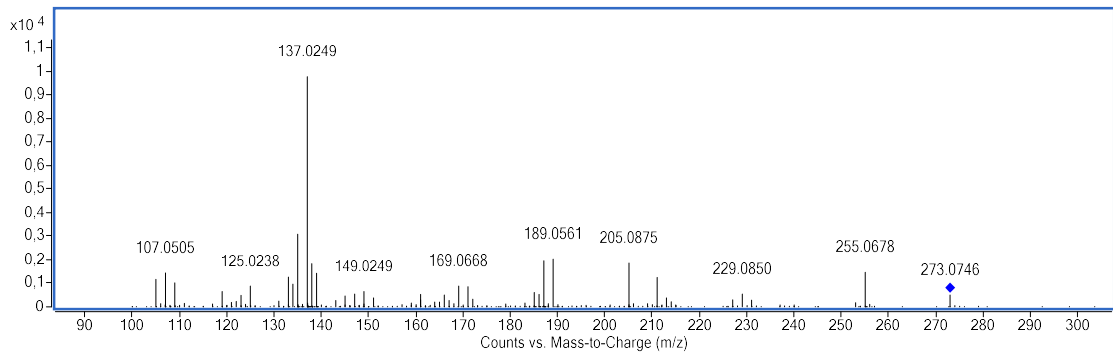


Figura A23 - (-)-EM do composto 12 ( $m/z$  817,2144 [ $M - H$ ]<sup>-</sup>)

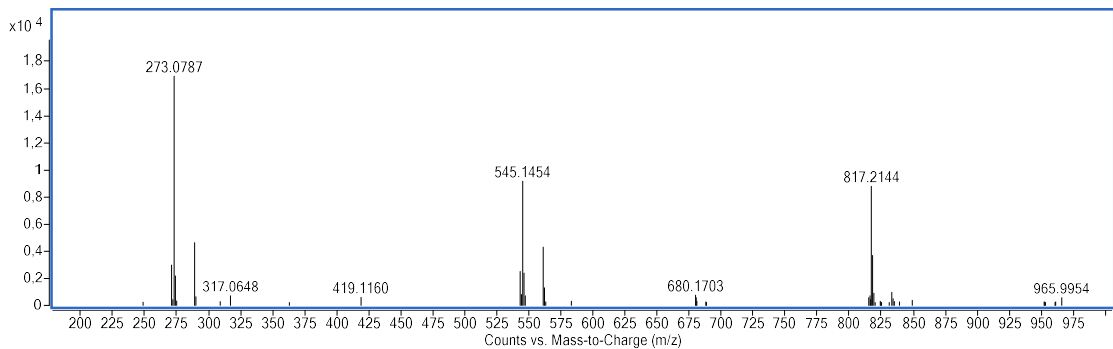


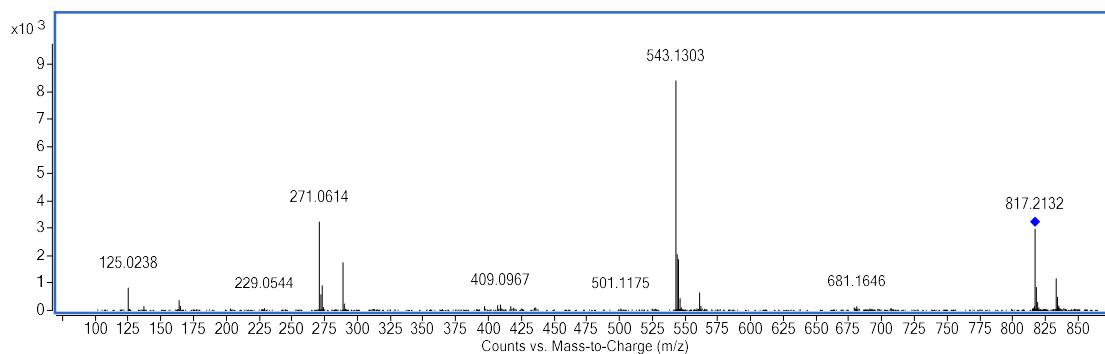
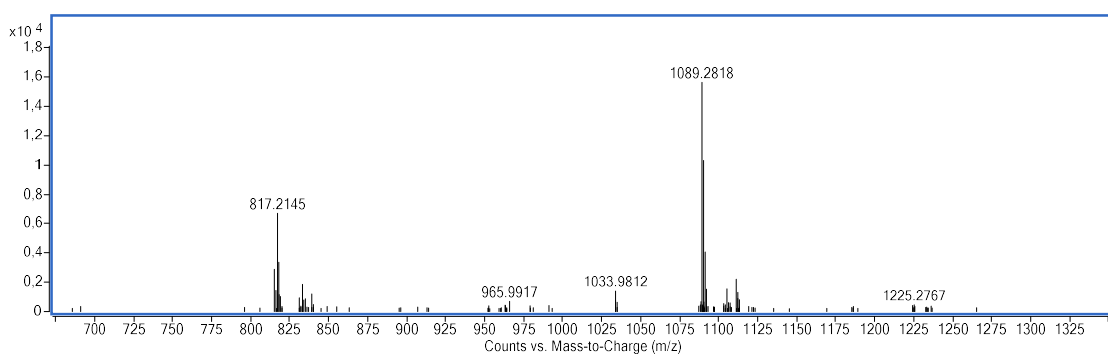
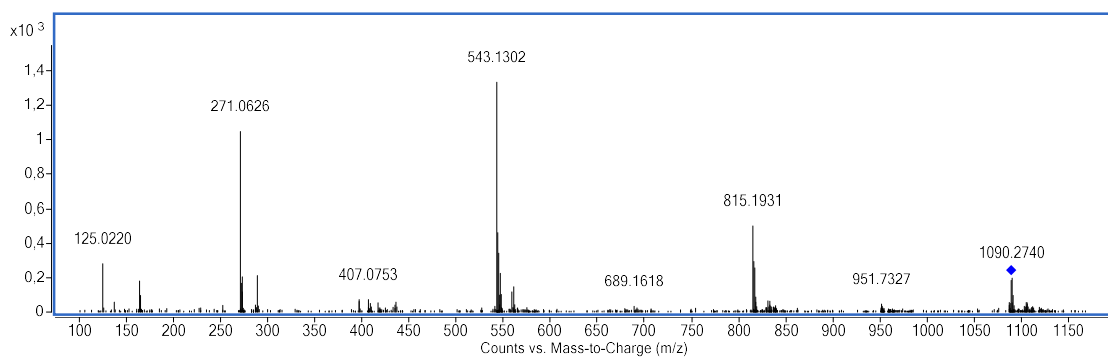
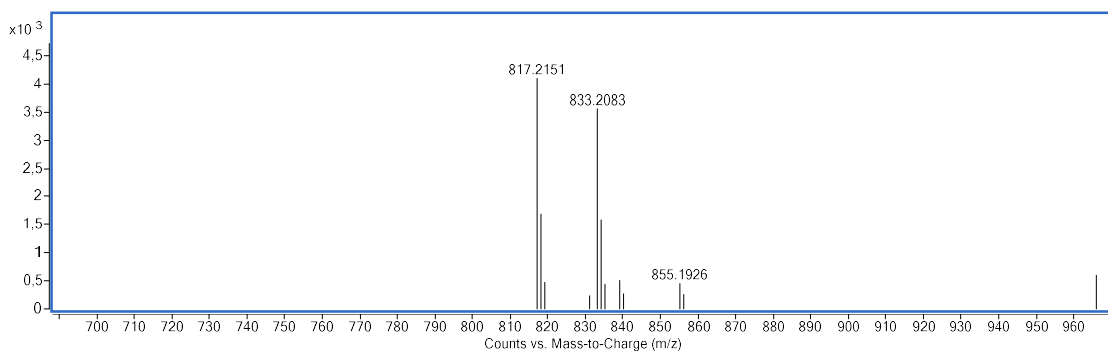
Figura A24 - (-)-IES-EM/EM do composto 12 ( $m/z$  817,2144 [M - H]<sup>-</sup>)Figura A25 - (-)-EM do composto 13 ( $m/z$  1089,2818 [M - H]<sup>-</sup>)Figura A26 - (-)-IES-EM/EM do composto 13 ( $m/z$  1089,2818 [M - H]<sup>-</sup>)Figura A27 - (-)-EM do composto 14 ( $m/z$  833, 2083 [M - H]<sup>-</sup>)

Figura A28 - (-)-IES-EM/EM do composto 14 ( $m/z$  833, 2083 [M - H]<sup>-</sup>)

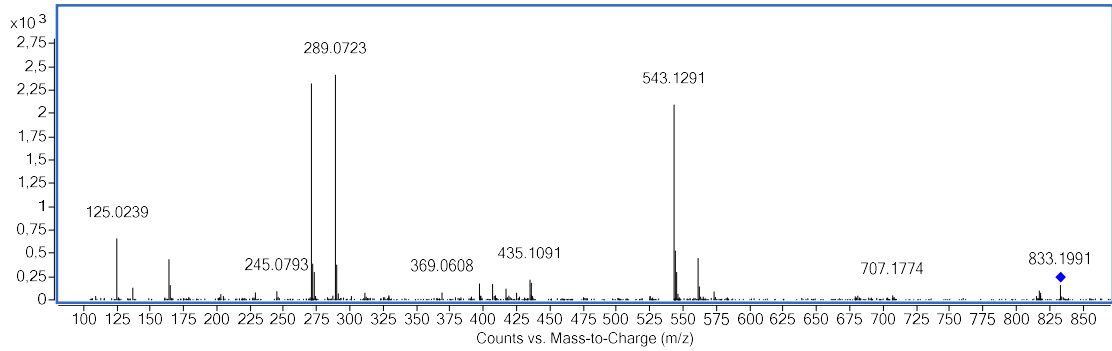


Figura A29 - (-)-EM do composto 15 ( $m/z$  545, 1456 [M - H]<sup>-</sup>)

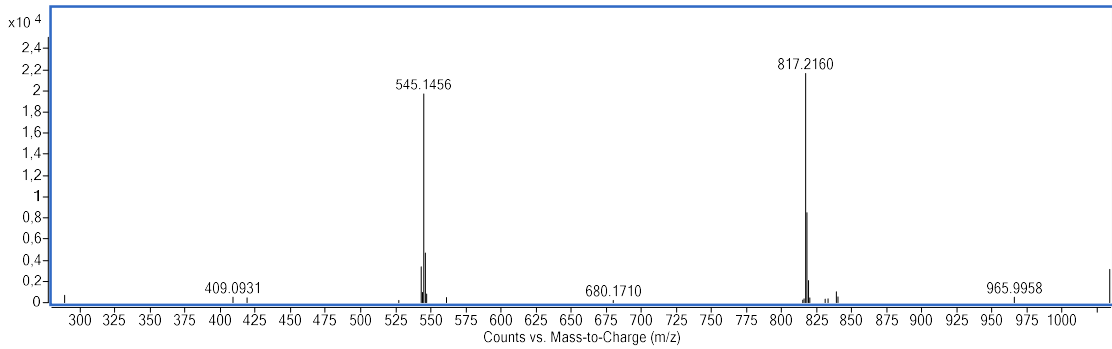


Figura A30 - (-)-IES-EM/EM do composto 15 ( $m/z$  545, 1456 [M - H]<sup>-</sup>)

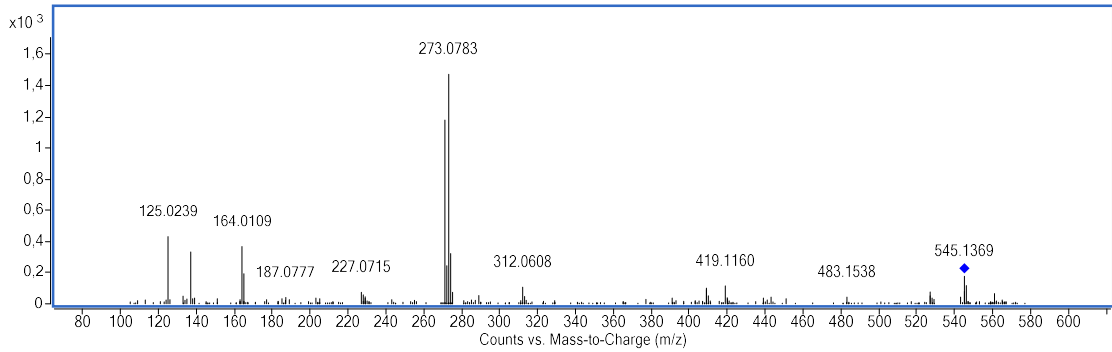


Figura A31 - (-)-EM do composto 16 ( $m/z$  817, 2139 [M - H]<sup>-</sup>)

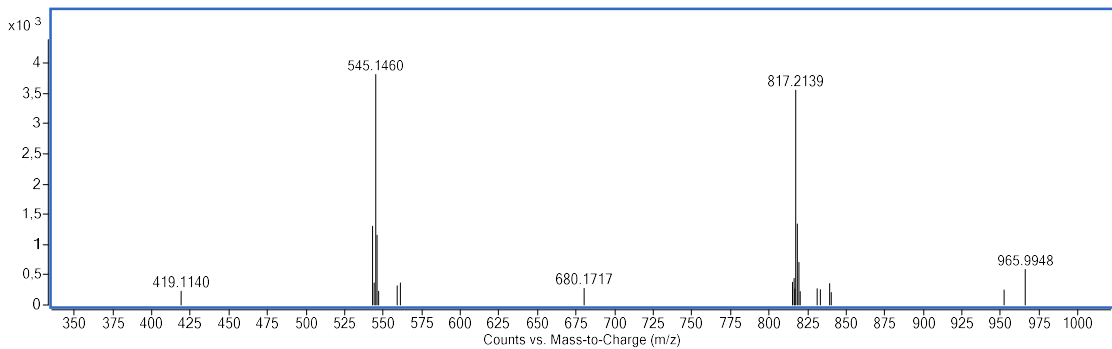


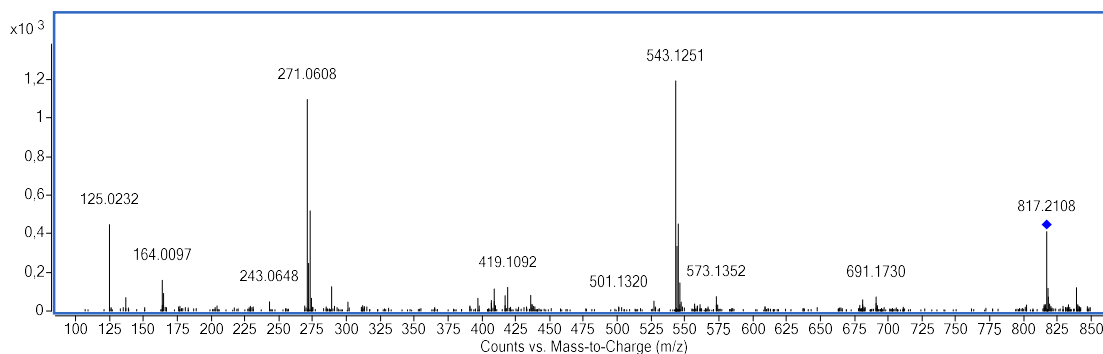
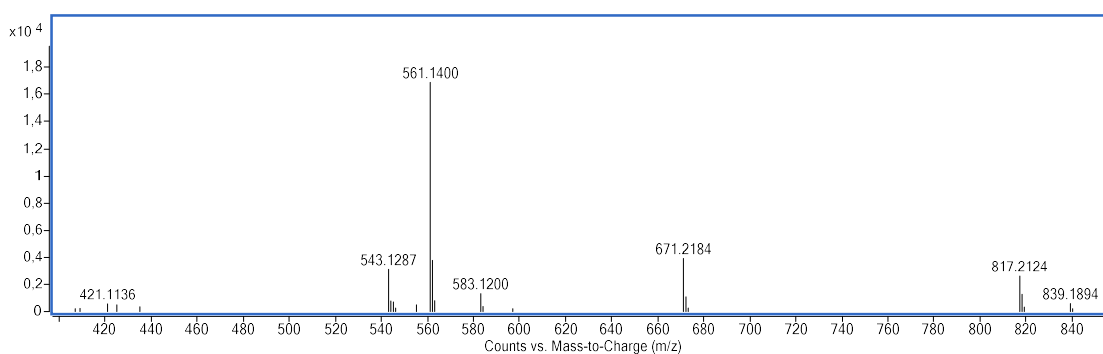
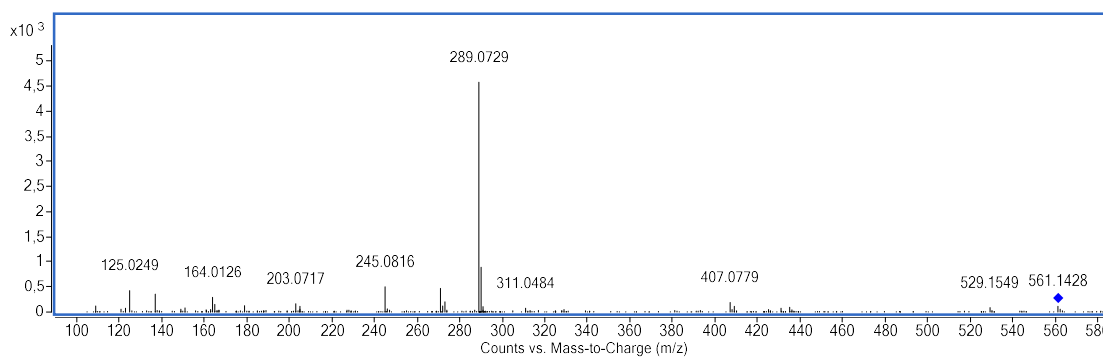
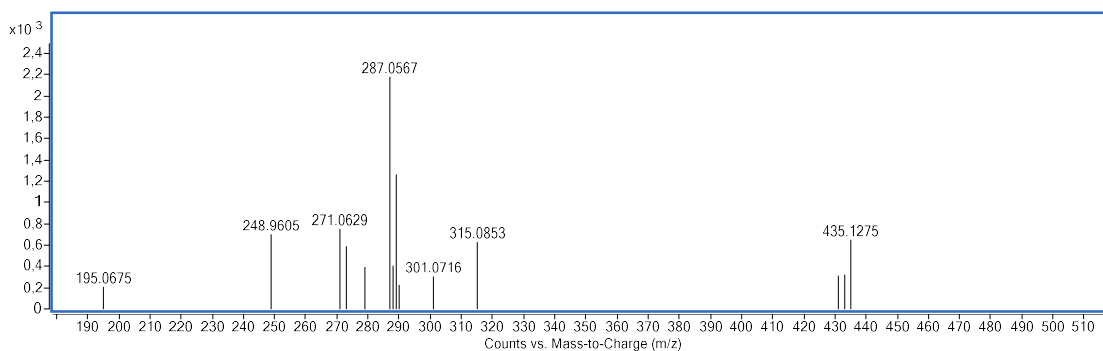
Figura A32 - (-)-IES-EM/EM do composto 16 ( $m/z$  817, 2139 [M - H]<sup>-</sup>)Figura A33 - (-)-EM do composto 17 ( $m/z$  561, 1400 [M - H]<sup>-</sup>)Figura A34 - (-)-IES-EM/EM do composto 17 ( $m/z$  561, 1400 [M - H]<sup>-</sup>)Figura A35 - (-)-EM do composto 18 ( $m/z$  287, 0567 [M - H]<sup>-</sup>)

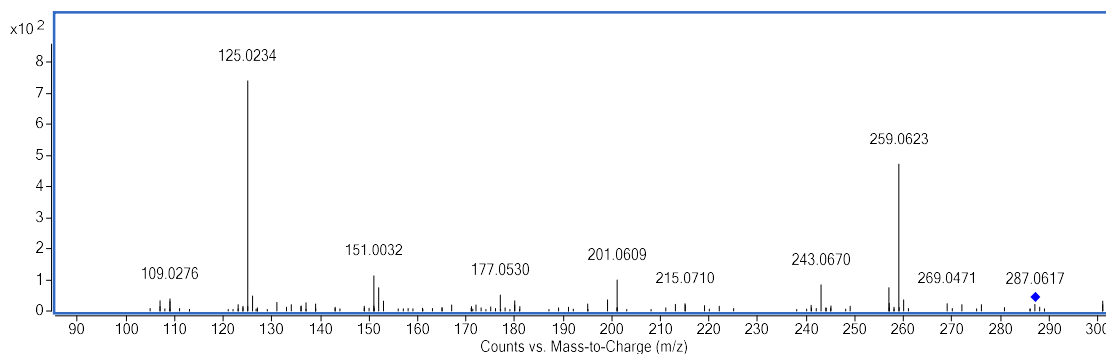
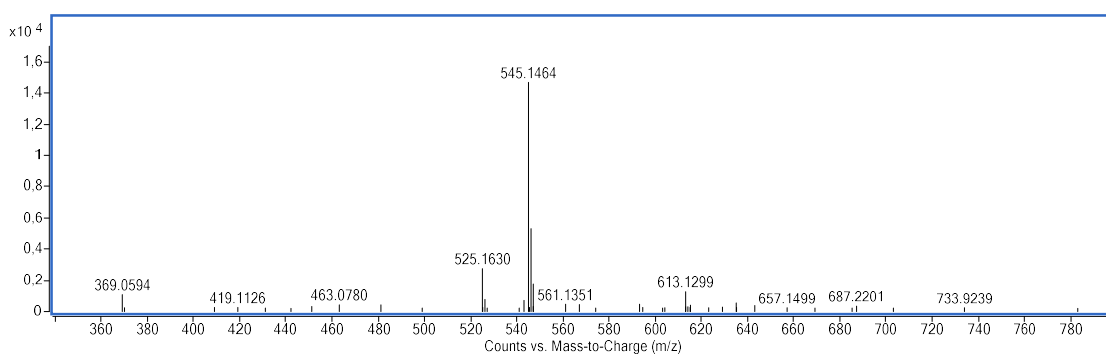
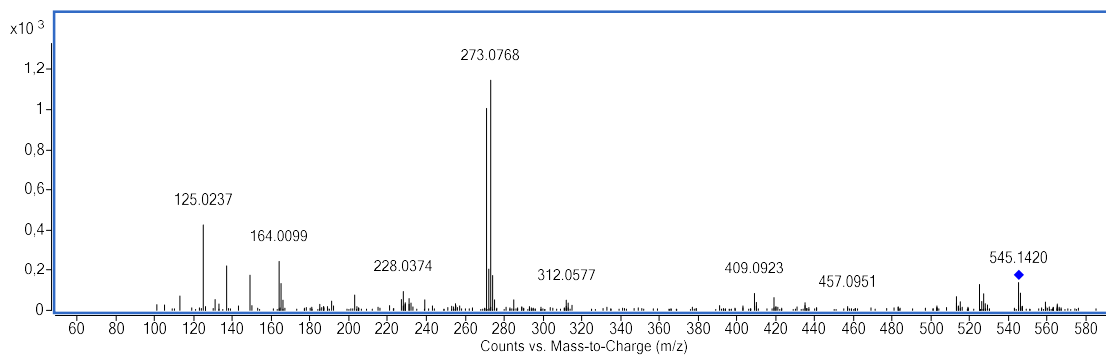
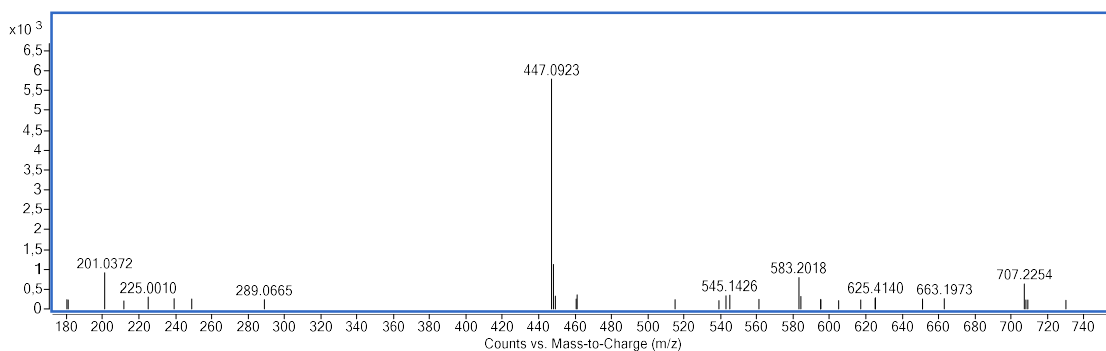
Figura A36 - (-)-IES-EM/EM do composto 18 ( $m/z$  287, 0567 [M - H]<sup>-</sup>)Figura A37 - (-)-EM do composto 19 ( $m/z$  545, 1464 [M - H]<sup>-</sup>)Figura A38 - (-)-IES-EM/EM do composto 19 ( $m/z$  545, 1464 [M - H]<sup>-</sup>)Figura A39 - (-)-EM do composto 20 ( $m/z$  447, 0923 [M - H]<sup>-</sup>)

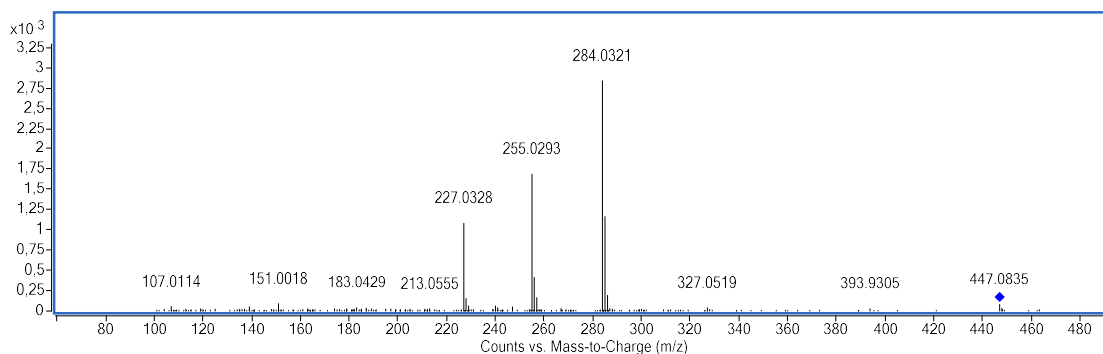
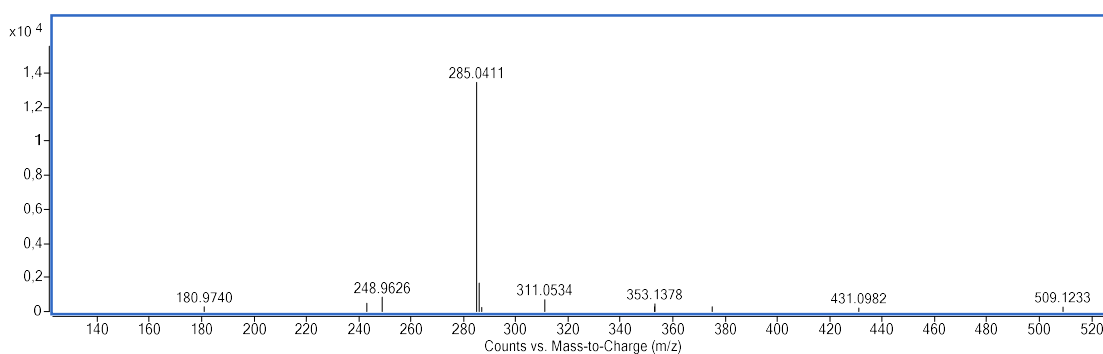
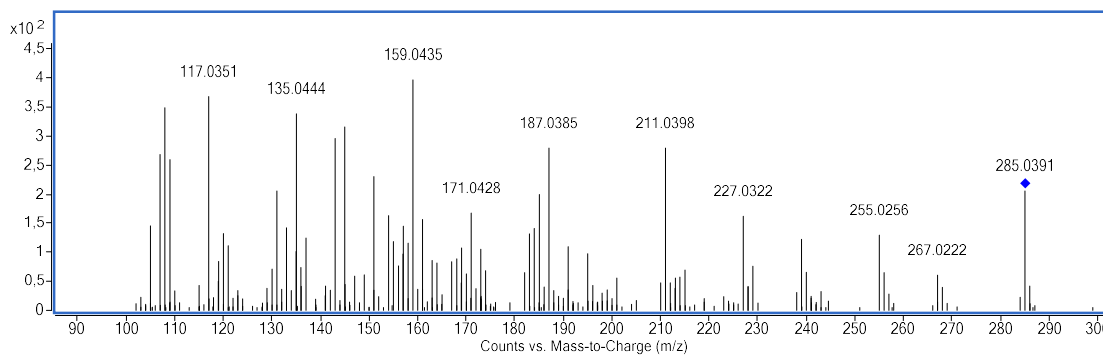
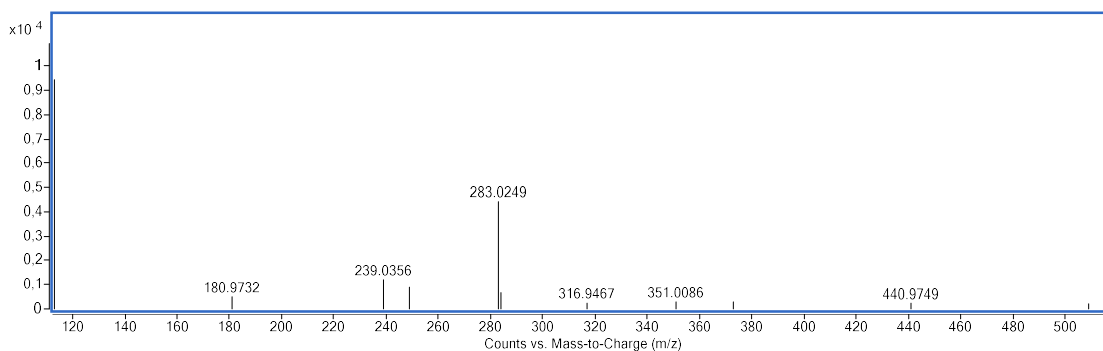
Figura A40 - (-)-IES-EM/EM do composto 20 ( $m/z$  447, 0923 [M - H]<sup>-</sup>)Figura A41 - (-)-EM do composto 21 ( $m/z$  285, 0411 [M - H]<sup>-</sup>)Figura A42 - (-)-IES-EM/EM do composto 21 ( $m/z$  285, 0411 [M - H]<sup>-</sup>)Figura A43 - (-)-EM do composto 22 ( $m/z$  283, 0249 [M - H]<sup>-</sup>)

Figura A44 - (-)-IES-EM/EM do composto 22 ( $m/z$  283, 0249 [M - H]<sup>-</sup>)