

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

FRANK DOS SANTOS DA SILVA

ESTUDO QUÍMICO E BIOLÓGICO DAS FLORES DE *Cassia bakeriana* Craib

UBERLÂNDIA-MG

AGOSTO – 2021

FRANK DOS SANTOS DA SILVA

ESTUDO QUÍMICO E BIOLÓGICO DAS FLORES DE *Cassia bakeriana* Craib

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre.

Área de Concentração: Química Orgânica

Orientador: Prof. Dr. Francisco J. T. de Aquino

Coorientador: Prof. Dr. Sérgio A. L. de Moraes

UBERLÂNDIA-MG

AGOSTO – 2021

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

S586 Silva, Frank dos Santos da, 1992-
2021 ESTUDO QUÍMICO E BIOLÓGICO DAS FLORES DE *Cassia
bakeriana* Craib [recurso eletrônico] / Frank dos Santos
da Silva. - 2021.

Orientador: Francisco José Tôres de Aquino.
Coorientador: Sérgio Antônio de Lemos Morais.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de
Uberlândia, Pós-graduação em Química.

Modo de acesso: Internet.

Disponível em: <http://doi.org/10.14393/ufu.di.2021.356>

Inclui bibliografia.

1. Química. I. Aquino, Francisco José Tôres de, 1961-,
(Orient.). II. Morais, Sérgio Antônio de Lemos, 1961-,
(Coorient.). III. Universidade Federal de Uberlândia.
Pós-graduação em Química. IV. Título.

CDU: 54

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:

Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091



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, 326, PPGQUI | | | | |
| Data: | Vinte e seis de agosto de dois mil e vinte e um | Hora de início: | 9:00 | Hora de encerramento: | 12:30 |
| Matrícula do Discente: | 11912QMI006 | | | | |
| Nome do Discente: | Frank dos Santos da Silva | | | | |
| Título do Trabalho: | Estudo químico e biológico das flores de <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: | Prospecção fitoquímica, ensaios biológicos e espectrofométricos de plantas do cerrado | | | | |

Reuniu-se por meio de webconferência, Plataforma Google Meet, link <https://meet.google.com/mzv-vkuc-bpp>, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Química, assim composta: Professores Doutores: Antonio Eduardo Miller Crotti, da Universidade de São Paulo; Celso de Oliveira Rezende Júnior, da Universidade Federal de Uberlândia e Sérgio Antônio Lemos de Moraes, orientador do candidato.

Iniciando os trabalhos o presidente da mesa, Dr. Sérgio Antônio Lemos de Moraes, 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 **Antônio Eduardo Miller Crotti, Usuário Externo**, em 27/08/2021, às 08:16, 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 **Sergio Antonio Lemos de Moraes, Professor(a) do Magistério Superior**, em 27/08/2021, às 17:29, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Celso de Oliveira Rezende Júnior, Professor(a) do Magistério Superior**, em 30/08/2021, às 12:44, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **3005120** e o código CRC **029EFD85**.

AGRADECIMENTOS

A Deus por conceder a oportunidade de realizar esse trabalho. A Minha família. Ao meu orientador professor Dr. Francisco José Torres de Aquino, pelos ensinamentos transferidos.

Ao meu co-orientador professor Dr. Sergio António de Moraes Lemos, pela compreensão e disponibilidade.

Ao Doutorando Rafael Aparecido de Souza e a aluna de Iniciação Científica Bianka Gomes Costa que contribuíram muito para a realização desse trabalho.

Ao Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart e Dr. Mário Machado Martins do Laboratório de Nanobiotecnologia do Instituto de Biotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia (IBTEC-UFU), pela realização dos experimentos de espectrometria de massas, e ao Prof. Dr. António Carlos Ferreira Batista e Andressa Tironi Viera do Laboratório Multiusuários do *campus* Pontal, pela colaboração nos experimentos de Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas.

Ao Prof. Dr. Carlos Henrique Gomes Martins e Mariana Brentini Santiago do Laboratório de Ensaios Antimicrobianos (LEA) da Universidade Federal de Uberlândia *campus* Umuarama, pelas análises Antimicrobianas.

Ao professor Dr. Cláudio Vieira da Silva e aos alunos Anna Clara Azevedo Silveira, Rafael M. Oliveira, e Cassiano Costa Rodrigues do Laboratório Tripanosomatídeos (LATRI) pela colaboração nos ensaios de citotoxicidade.

Ao Prof. Foued Salmen e seus alunos Allisson B. Justino, e Rodrigo R Franco, pelas análises de atividade antioxidante e antiglicante.

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

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

A todos os colegas e amigos que fizeram ou ainda fazem parte do NuPPeN, aos alunos de iniciação científica, e aos colegas de mestrado e doutorado. Obrigado pelo apoio e companheirismo nestes anos de trabalho.

A Sra, Maria Batista Carneiro pela amizade, acolhida, incentivo e companheirismo que teve e tem comigo até hoje.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES).

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pelo apoio financeiro ao projeto de pesquisa (código de identificação 11436) que propiciou a realização deste trabalho.

RESUMO

Cassia bakeriana Craib é uma planta pertencente à família Leguminosae-Caesalpioideae, nativa da Tailândia e bem adaptada ao bioma Cerrado. O Trabalho objetivou estudar a composição química das flores de *C. bakeriana* Craib, bem como explorar o potencial antifúngico, antibacteriano, antioxidante, antiglicação, citotóxico e identificar os constituintes químicos das amostras mais ativas. A prospecção química dos extratos e partições das flores indicou presença de terpenos, esteroides, açúcares, fenóis, flavonoides e antraquinonas. A composição química da partição *n*-hexânica flores (P-HF) foi determinada por CG-EM, possibilitando identificar 11 compostos: cinco ésteres de cadeia longa (5; 45%), dois ácidos graxos de cadeia longa (2; 18%), dois alcanos de cadeia longa (2; 18%) e dois terpenos (2; 18%). Por meio análise da CLAE-EM-IES, foi possível identificar no extrato etanólico das flores (EEF) e nas partições hexânica das flores (P-HF), partição diclorometano das flores (P-DF), partição acetato de etila das flores (P-AEF), partição *n*-butanol das flores (P-BF), partição água das flores (P-AF) os compostos fenólicos e derivados, flavonoides, antraquinonas e ácidos graxos. Na quantificação dos teores de compostos polifenólicos, foram encontrados os melhores teores para fenóis para o extrato etanólico (123,4±1,2 mg EAG/ g_{extrato}) seguida da partição acetato de etila 95,4±0,6 mg EAG/ g_{extrato}, para proantocianidinas com *n*-butanol (92,9±0,0 mg EC/ g_{extrato}) e para teor de flavonoides, o extrato etanólico (109,6±0,4 mg EQ/ g_{extrato}), seguidamente da partição acetato de etila com (128,6±0,6 mg EQ/ g_{extrato}). A avaliação antifúngica e antibacteriana foi realizada pelo Método da Microdiluição em Caldo, contra as espécies de *Candida* e contra bactérias da cavidade bucal, respectivamente. As partições mais ativas contra *C. tropicalis* e *C. glabrata* foram P-HF, P-DF, P-BF e P-AF, com valores de CIM variando entre 2,9 a 11,72 µg ml⁻¹. Quanto à atividade antibacteriana, esta foi considerada moderada para as partições P-DF e P-BF, com CIM de 50 µg ml⁻¹ para ambas as partições, contra a bactéria *A. naeslundii*. A avaliação da atividade antioxidante foi realizada pelos métodos ORAC, DPPH• e FRAP. Dentre as partições, a P-AEF apresentou o melhor resultado (IC₅₀ de 9,8 ± 0,4 µg L⁻¹), demonstrando altíssima atividade antioxidante em todos os métodos empregados, com resultados superiores ao controle positivo ácido ascórbico (1317,2 ± 11,3 µmol Trolox eq/g_{amostra}). No que se refere a capacidade de inibição da glicação, novamente a P-AE apresentou maior percentual de inibição da glicação (IC₅₀ 38,6 ± 0,4 µg mL⁻¹) igual ao controle positivo (quercetina). O índice de seletividade (IS) indicou que os extratos e partições das flores de *C. bakeriana* não apresentaram nenhuma citotoxicidade para células Vero nas concentrações testadas. Esses achados são auspiciosos, uma vez que o uso dessas partições ricas em polifenóis em outros ensaios “*in vivo*” pode ser viável. Além disso, os dados deste estudo ampliam o mapeamento do conhecimento desta espécie vegetal estudada por nosso grupo de pesquisa, contribuindo para a sua conservação e proteção no bioma Cerrado.

PALAVRAS-CHAVE: *C. bakeriana*, extratos de flores, caracterização química, atividade biológica.

ABSTRACT

Cassia bakeriana Craib is a plant belonging to the Leguminosae-Caesalpioideae family, native to Thailand and adapted to the Cerrado biome. The work aimed to study the chemical composition of *C. bakeriana* Craib flowers, as well as explore the antifungal, antibacterial, antioxidant, antiglycation, cytotoxic potential and identify the chemical constituents of the most active samples. Chemical prospection of extracts and flower partitions indicated the presence of terpenes, steroids, sugars, phenols, flavonoids and anthraquinones. The chemical composition of the flowers n-hexanic partition (P-HF) was determined by GC-MS, enabling the identification of 11 compounds: five long-chain esters (5; 45%), two long-chain fatty acids (2; 18%), two long-chain alkanes (2; 18%) and two terpenes (2; 18%). Through HPLC-EM-IES analysis, it was possible to identify in the ethanol extract of the flowers (EEF) and in the hexane partition of the flowers (P-HF), dichloromethane partition of the flowers (P-DF), ethyl acetate partition of the flowers (P-AEF), *n*-butanol partition of flowers (P-BF), water partition of flowers (P-AF) phenolic compounds and derivatives, flavonoids, anthraquinones and fatty acids. In the quantification of the contents of polyphenolic compounds, the best contents for phenols were found for the ethanol extract (123,4±1.2 mg EAG/gextrat) followed by the partition of ethyl acetate 95,4±0.6 mg EAG/gextract, for proanthocyanidins with *n*-butanol (92,9±0.0 mg EC/gextract) and for flavonoid content, the ethanol extract (109,6±0.4 mg EQ/gextract), followed by ethyl acetate partition with (128,6 ± 0.6 mg EQ / gextract). The antifungal and antibacterial evaluation was carried out using the Broth Microdilution Method, against *Candida* species and against bacteria from the oral cavity, respectively. The most active partitions against *Candida tropicalis* and *Candida glabrata* were P-HF, P-DF, P-BF, and P-AF with MIC values ranging from 2,9 to 11,72 µg ml⁻¹. For the antibacterial activity, it was considered moderate for the P-DF and P-BF partitions, with a MIC of 50 µg ml⁻¹ for both partitions, against the bacteria *A. naeslundii*. The evaluation of the antioxidant activity was carried out by the ORAC, DPPH* and FRAP methods. Among the partitions, P-AEF had the best result (IC₅₀ of 9,8 ± 0,4µg L⁻¹), demonstrating remarkably high antioxidant activity in all tested methods, with results superior to the positive control ascorbic acid (1317,2 ± 11,3 µmol Trolox eq/g_{sample}). Regarding the glycation inhibition capacity, again the P-AE presented a higher percentage of glycation inhibition (IC₅₀ 38,6 ± 0.4 µg mL⁻¹) equal to the positive control (quercetin). The selectivity index (SI) indicated that the extracts and partitions of *C. bakeriana* Craib flowers did not show any cytotoxicity to Vero cells at the tested concentrations. These findings are auspicious since the use of this polyphenols-rich fractions in further “in vivo” assays could be feasible. In addition, the data from this study extends the mapping of knowledge of this plant species studied by our research group, contributing to its conservation and protection in the Cerrado biome.

KEYWORDS: *C. bakeriana*, flower extracts, chemical characterization, biological activities.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1 – Estrutura química de alguns metabólitos isolado de plantas importantes no desenvolvimento de fármacos..... | 15 |
| Figura 2 - Classificação dos fármacos aprovados no período de 1981 a 2019 (Total=1881)..... | 17 |
| Figura 3 - Estruturas químicas de alguns princípios ativos de fármacos aprovados entre 2018 e 2019 e seus agentes infecciosos. | 18 |
| Figura 4 - Estrutura química da clorexidina..... | 26 |
| Figura 5 - Estrutura química da aminoguanidina..... | 28 |
| Figura 6 - Estrutura química dos compostos isolados das flores de espécies de <i>Cassia</i> . (<i>Contiua</i>)..... | 36 |
| Figura 7 – Fotografias de árvore e flores de <i>Cassia bakeriana</i> na Universidade Federal de Uberlândia - MG, Campus Santa Mônica. | 39 |
| Figura 8 - Estrutura química do composto Reno isolado da fração diclorometano das cascas <i>C. bakeriana</i> | 40 |
| Figura 9 - Compostos canferol-3-O-ramnosídeo (35) e canferol (36) isolados das folhas <i>C. bakeriana</i> | 41 |
| Figura 10 – Fotografias do preparo do material vegetal..... | 44 |
| Figura 11 – Fotografias da extração hexânica (EHF) das flores (a); obtenção da partição hexânica (P-HF) das flores de <i>Cassia bakeriana</i> (b). | 45 |
| Figura 12 – Esquema da obtenção dos extratos brutos, partições e rendimentos. ... | 46 |
| Figura 13 - Reação redox da resazurina | 57 |
| Figura 14 - Cromatograma de CG-EM da partição <i>n</i> -hexânica (P-HF) das flores de <i>C. bakeriana</i> | 63 |
| Figura 15 – Estruturas de compostos identificados por CG-EM na P-HF das flores <i>C. bakeriana</i> | 65 |
| Figura 16 - Cromatogramas de CLAE-IES-EM/EM das partições P-HF, P-DF, P-AEF, P-BF, P-AF e do extrato EEF obtidos por CLAE-EM-IES, no modo negativo. | 69 |
| Figura 17 - Estrutura dos compostos identificados no extrato etanólico (EEF) e nas partições P-HF, P-DF, P-AEF, P-BF, P-AF das flores de <i>C. bakeriana</i> | 75 |
| Figura 18 - Espectros de EM-IES (-) em alta resolução do ácido protocatecuico (a,b) e seus respectivos EM/EM-IES | 77 |

| | |
|---|-----|
| Figura 19- Proposta de fragmentação para o ácido protocatecuico identificado por EM/EM-IES (-) nas partições P-DF e P-AEF das flores de <i>C. bakeriana</i> | 77 |
| Figura 20 – Espectros de EM-IES (-) em alta resolução da taxifolina (c,d) e seus respectivos EM/EM-IES..... | 78 |
| Figura 21- Proposta de fragmentação da taxifolina identificado por EM/EM-IES (-) nas partições P-DF e P-AEF das flores de <i>C. bakeriana</i> | 79 |
| Figura 22 - Reação entre o ácido gálico e o íon molibdênio, componente do reagente de Folin-Ciocalteu. | 80 |
| Figura 23 - Reação da vanilina sulfúrica com tanino catéquico, em que R é o monômero de tanino condensado..... | 83 |
| Figura 24 - Reação de complexação de uma estrutura de flavonoide $AlCl_3$ | 84 |
| Figura 25 - Estruturas de ressonância do radical fenoxila..... | 96 |
| Figura 26 - Formação do radical peroxil e sua e reação com a fluoresceína e a substância antioxidante..... | 97 |
| Figura 27 - Reação do radical DPPH• com BHT. | 98 |
| Figura 28 - Características estruturais que favorecem a atividade antioxidante dos flavonoides. | 100 |

QUADRO

| | |
|--|----|
| Quadro 1 - Espécies de <i>Cassia</i> e suas respectivas utilizações na medicina tradicional (contua) | 31 |
|--|----|

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1- Classes de agentes infecciosos no período de 1981 a 2019 | 19 |
| Tabela 2 - Compostos isolados das flores de espécies de <i>Cassia</i> e suas respectivas atividades biológicas. (<i>Continua</i>)..... | 34 |
| Tabela 3 - Rendimento (%) obtido dos extratos EHF e EEF das flores de <i>C. bakeriana</i> | 60 |
| Tabela 4 - Rendimento das partições líquido-líquido realizada a partir do extrato etanólico..... | 61 |
| Tabela 5 - Prospecção fitoquímica do extrato e partições de <i>C. bakeriana</i> | 62 |
| Tabela 6 - Compostos identificados por CG-EM na P-HF das flores de <i>C. Bakeriana</i> Craib..... | 64 |
| Tabela 7 - Proposta de identificação dos compostos das partições P-HF, P-DF, P-AEF, P-BF, P-AF, e do extrato EEF das flores de <i>C. bakeriana</i> . (<i>continua</i>)..... | 70 |
| Tabela 8 - Teores de fenóis totais dos extratos brutos e partições das flores de <i>C. bakeriana</i> | 81 |
| Tabela 9 - Teor de fenóis totais nas flores de <i>C. auriculata</i> e <i>C. siamea</i> | 82 |
| Tabela 10 - Teores de proantocianidinas dos extratos brutos e partições das flores de <i>C. bakeriana</i> | 83 |
| Tabela 11 - Teores de flavonoides dos extratos brutos e partições das flores de <i>C. bakeriana</i> | 84 |
| Tabela 12 - Teor de flavonoides nas partições das flores de <i>C. auriculata</i> e <i>C. siamea</i> | 86 |
| Tabela 13 – Atividade antifúngica dos extratos e partições das flores de <i>C. bakeriana</i> Craib..... | 86 |
| Tabela 14- CIM's e DI's da atividade antifúngica dos extratos e partições de folhas e flores das espécies de <i>Cassia</i> | 90 |
| Tabela 15 - Atividade antibacterina dos extratos e partições das flores da <i>C. bakeriana</i> contra bactérias bucais aeróbicas e anaeróbicas..... | 92 |
| Tabela 16 - CIM's e DI's da atividade antibacteriana dos extratos e partições de flores, folhas das espécies de <i>Cassia</i> . (<i>continua</i>). | 94 |
| Tabela 17 - Atividade antioxidante apresentada pelos extratos, partições de <i>C. bakeriana</i> pelos métodos ORAC, DPPH• e FRAP. | 99 |

| | |
|---|-----|
| Tabela 18 - Percentual de inibição (%) e IC ₅₀ da inibição da glicação dos extratos e partições das flores de <i>C. bakeriana</i> | 102 |
| Tabela 19 - Concentração Citotóxica (CC ₅₀) e Índices de Seletividades (IS) dos extratos e partições de flores de <i>C. bakeriana</i> | 105 |

EQUAÇÕES

| | |
|---------------|----|
| Equação | 49 |
| Equação | 50 |
| Equação | 51 |
| Equação | 52 |
| Equação | 52 |
| Equação | 53 |
| Equação | 56 |
| Equação | 60 |

LISTA DE ABREVIATURAS

- ANVISA** - Agência nacional de vigilância sanitária
- Acetil CoA** - Acetilcoenzima A
- ATCC** - Coleção de cultura americana
- AIDS** - Síndrome de imunodeficiência adquirida
- CIM** - Concentração inibitória mínima
- CCD** - Cromatografia em camada delgada
- CG** - Cromatografia gasosa
- CLAE** - Cromatografia líquida de alta eficiência
- DI** - Diâmetro inibitório
- EM** - Espectrometria de massa
- EEF** - Extrato etanólico das flores
- EHF** - Extrato hexano das flores
- EMA** - Agência médica europeia
- FDA** - Administração de alimentos e medicamentos
- HIV** - Vírus da imunodeficiência humana
- IUPAC** - União internacional de química pura e aplicada
- IQ** - Instituto de química
- MC** - Metabolismo central
- ME** - Metabólitos especializados
- MEs** - Metabólitos especiais
- MS** - Ministério da Saúde
- MOPS** - Ácido 3-N-morfolinopropanosulfônico
- NIST** - Instituto nacional de padrões e tecnologias
- OMS** - Organização mundial da saúde
- P-HF** – Partição hexânica das flores

P-DF - Partição em diclorometano das flores

P-AEF - Partição de acetato de etila das flores

P-BF - Partição *n*-butanol das flores

P-AF - Partição água de flores

PN - Produto natural

PNs - Produtos naturais

PMT - Programa de Medicina Tradicional

RPMI - Roswell Park Memorial Institute

SUS - Sistema Único de Saúde

UFU - Universidade Federal de Uberlândia

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA..... | 13 |
| 1.1 ATIVIDADES BIOLÓGICAS DOS EXTRATOS E PARTIÇÕES DAS FLORES DE ESPÉCIES DE <i>Cassia</i> | 21 |
| 1.1.1 Atividade antifúngica | 21 |
| 1.1.2 Atividade antibacteriana | 24 |
| 1.1.3. Antiglicação e atividade antioxidante | 27 |
| 1.2 FAMÍLIA LEGUMINOSAE | 30 |
| 1.3 ASPECTOS QUÍMICOS E BIOLÓGICOS DO GÊNERO <i>Cassia</i> | 30 |
| 1.4 <i>Cassia bakeriana</i> Craib: ASPECTOS MORFOLÓGICOS, QUÍMICOS E BIOLÓGICOS..... | 39 |
| 2 OBJETIVO..... | 41 |
| 2.1 OBJETIVO GERAL | 41 |
| 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 41 |
| 3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL..... | 42 |
| 3.1 INSTRUMENTAÇÃO..... | 42 |
| 3.2 SOLVENTES E REAGENTES | 42 |
| 3.3 COLETA E PREPARO DO MATERIAL VEGETAL | 43 |
| 3.4 PREPARO DOS EXTRATO BRUTO E EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO | 44 |
| 3.5 PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA DOS EXTRATOS E PARTIÇÕES..... | 46 |
| 3.6 ANÁLISE DA PARTIÇÃO HEXÂNICA DAS FLORES DE <i>Cassia bakeriana</i> POR CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS (CG-EM)..... | 48 |
| 3.7 ANÁLISE POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS (CLAE-EM-IES) | 49 |
| 3.8 QUANTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS POLIFENÓLICOS | 50 |
| 3.8.1 Determinação do teor de fenóis totais..... | 50 |
| 3.8.2 Determinação do teor de proantocianidinas | 51 |
| 3.8.3 Determinação de teor de flavonoides | 52 |
| 3.9 DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE | 53 |
| 3.9.1 Método do sequestro do DPPH• | 53 |
| 3.9.2 Método da capacidade de absorbância de radical de oxigênio ORAC..... | 54 |
| 3.9.3 Método do poder antioxidante redutor férrico (FRAP)..... | 55 |
| 4.10 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIGLICAÇÃO..... | 55 |
| 4.11 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA..... | 56 |
| 4.11.1 Atividade antifúngica dos extratos e partições frente a leveduras da <i>Candida</i> | 56 |

| | |
|---|------------|
| 4.11.2 Atividade antibacteriana dos extratos e partições frente as bactérias bucais anaeróbicas e aeróbicas | 58 |
| 5 RESULTADOS E DISCUSSÕES..... | 60 |
| 5.1 EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO E RENDIMENTO DOS EXTRATOS..... | 60 |
| 5.2 PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA..... | 61 |
| 5.3 IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO POR CG-EM DOS COMPOSTOS PRESENTES NA PARTIÇÃO <i>n</i> -HEXÂNICA DAS FLORES | 62 |
| 5.4 PROPOSTA DE IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS PRESENTES NO EXTRATO EEf e NAS PARTIÇÕES P-HF, P-DF, P-AEF, P-BF e P-AF POR CLAE-IES-EM/EM..... | 65 |
| 5.4.1 Proposta de fragmentação do ácido protocatecuico e da taxifolina | 76 |
| 5.4.2 Análise do teor de fenóis totais | 80 |
| 5.4.3 Análise do teor de proantocianidinas | 82 |
| 5.4.4 Análise do teor de flavonoides | 84 |
| 5.5 ATIVIDADE ANTIFÚNGICA | 86 |
| 5.6 ATIVIDADE ANTIBACTERIANA | 91 |
| 5.7 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE | 96 |
| 5.8 ATIVIDADE INIBITÓRIA DE GLICAÇÃO | 101 |
| 5.9 AVALIAÇÃO DA CITOTOXIDADE | 103 |
| 6 CONCLUSÕES..... | 107 |
| 7 REFERENCIAS | 109 |
| APÊNDICE..... | 137 |

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

O conhecimento sobre o uso de plantas com fins medicinais no tratamento de enfermidades patogênicas é uma das práticas mais antiga da humanidade. É comum em muitas comunidades, e até mesmo nas grandes cidades, a comercialização de plantas medicinais em feiras e mercados populares. Acredita-se que, através da instintividade e do conhecimento empírico sobre seu uso e eficácia, foi se propagando por todo mundo uma série de informações quanto a sua utilização (VEIGA; PINTO; MACIEL, 2005).

Grande parte da herança de remédios à base de ervas era empregada pelos índios, e utilizada por todas as tribos primitivas, para aliviar suas dores. O primeiro desses papéis foi o de curandeiro. Esse personagem desenvolveu um repertório de substâncias secretas que guardava com zelo, transmitindo-o, seletivamente, para futuros herdeiros pajés (SIMÕES; SCHENKEL; SIMON, 2001). Costumavam, por exemplo, mastigar ervas ou enrolavam folhas sobre os ferimentos para cicatrização, pois acreditavam que era a única forma a ser utilizada para a cura. Mesmo atualmente, com o desenvolvimento do sistema médico e o surgimento de fármacos, as plantas ainda são uma alternativa no tratamento de doenças pelas comunidades indígenas (MOHAMMADI; MANSOORI; BARADARAN, 2017; WANGKHEIRAKPAM, 2018).

Ao final da década de 70, a Organização Mundial de Saúde (OMS) cria o Programa de Medicina Tradicional (PMT). A OMS reconhece que grande parte da população dos países em desenvolvimento depende da medicina tradicional para sua atenção primária, tendo em conta que 80% da população mundial utiliza essas plantas ou preparações destas no que se refere à atenção primária de saúde. A Índia, por exemplo, utiliza preferencialmente a medicina tradicional, incluindo recursos vegetais, excedendo o uso de medicamentos sintéticos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006; NANDI et al., 2016). A cerca dessas informações, outro fator importante no uso de planta é a intoxicação. A forma como esses insumos são ingeridos de planta provenientes chás, garrafadas dentre outras formas, é um fator preocupante a saúde. Dados do Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas (SINITOX) revelaram que, dos casos de intoxicação em humanos no Brasil, cerca de 1% foi devido ao uso inadequado de plantas pela automedicação (UGALDE; ETHUR, 2019)).

Historicamente, os produtos naturais (PNs) têm sido uma fonte riquíssima de estudos para diversas áreas, tais como a química, a biologia e a medicina. Um trabalho em equipe entre etnobotânicos, etnofarmacologistas, fitoquímicos e médicos é essencial para um resultado mais proveitoso da pesquisa de plantas medicinais. Assim cada um desempenharia um papel mais eficaz no estudo da lógica da presença de diferentes combinações de atividades biológicas em plantas medicinais individuais, bem como nas formulações, enquanto o papel do químico mudará levemente em direção à identificação, isolamento e padronização de plantas (GOTTLIEB; BORIN, 2012; KUMAR; WALDMANN, 2018)

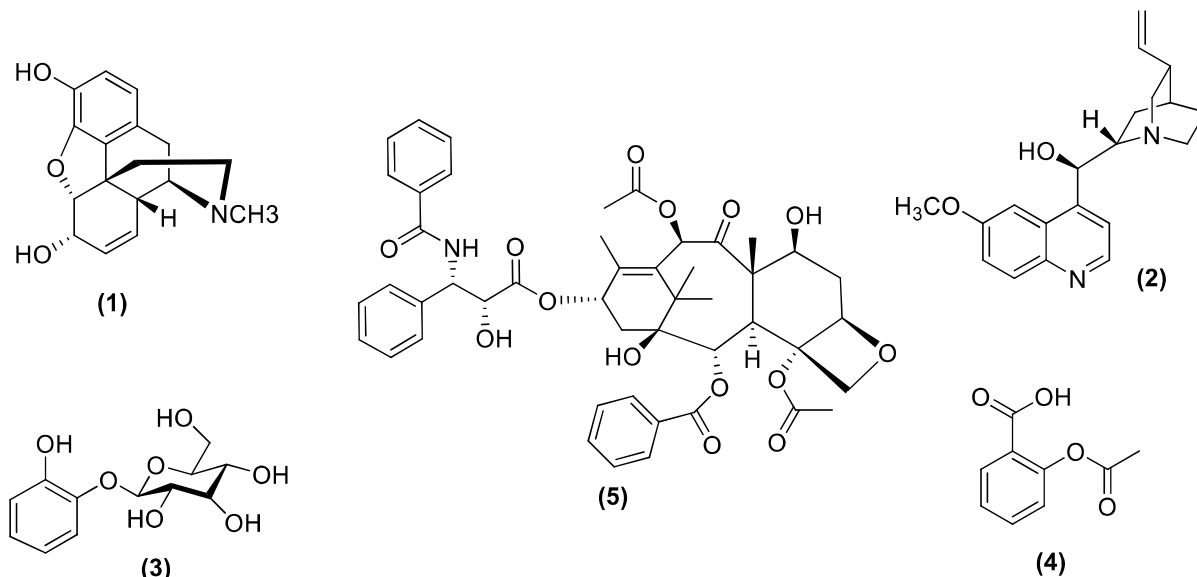
Esses compostos detêm uma grande variabilidade estrutural e complexa, graças a biodiversidade da flora. Estes compostos podem ainda ser usados como base para obter moléculas farmacologicamente ativas, com recurso a processos de síntese parcial, com o objetivo de melhorar as propriedades farmacológicas, ou podem ser usados como modelos moleculares para a síntese total de novos compostos bioativos (SIMÕES et al., 2017).

É sabido que o desenvolvimento de novos fármacos a partir de PNs, oriundos da flora, tem origem na informação etnofarmacológica sobre a espécie, passando por etapas de avaliação da atividade biológica do material biofracionado e purificado, e finalizando com a caracterização estrutural da substância bioativa e da avaliação da toxicidade (MARQUES et al., 2010). Após a identificação do potencial biológico das plantas medicinais, parte-se para o isolamento de princípios ativos que poderão ser empregados como fármacos para a prevenção de doenças e infecções (MAJUMDAR; SOMANI, 2018; DUTTA et al., 2019), na cavidade bucal e a candidíase.

A evolução e desenvolvimento da química de PNs se deram mais especialmente com a descoberta de novas moléculas, como por exemplo a Morfina (**1**), isolada do ópio de *Papaver somniferum*, entre os anos de 1804 e 1817 (Figura 1), esta substância é utilizada como analgésico para o alívio de dores crônicas agudas severas (KRISHNAMURTI; RAO, 2016). A quinina (**2**), isolada das cascas de espécies de *Cinchona*, em 1820, é um importante fármaco antimalárico (BALIRAINÉ et al., 2011). A salicina (**3**), isolada em 1828 da casca do salgueiro (*Salix alba*) serviu como modelo para a síntese do ácido acetilsalicílico (**4**) (aspirina), amplamente utilizado como analgésico mais brando (RAMADHANI; SANTONI; EFDI, 2019). O taxol (**5**) é um potente agente antitumoral que foi isolado no início da década de 1960 das cascas

de *Taxus brevifolia* (LI et al., 2017). A estruturas químicas destes fármacos estão representadas na Figura 1.

Figura 1 – Estrutura química de alguns metabólitos isolado de plantas importantes no desenvolvimento de fármacos.



Fonte: o autor

O aparecimento de técnicas de síntese mais avançadas, fez a matrizes oriundas de PNs uma abertura para descobertas de novos fármacos. Esse episódio ficou marcado pela concorrência entre indústrias na descoberta de novas classes de fármacos, que passaram a priorizar ensaios rápidos e de alta produtividade. A triagem de PNs teve grande importância para seu período, porém descartada, devido às dificuldades em trabalhar com esses produtos, como acesso, alta complexidade química e indisponibilidade de ferramentas analíticas (HARVEY, 2008; KATZ; BALTZ, 2016; KHAN, 2018). O avanço tecnológico em ferramentas e instrumentação analíticas permitiu melhorias nos métodos para purificação de compostos de alta complexidade, resultando no desenvolvimento de técnicas analíticas sofisticadas como as Cromatografias Líquidas de Alta Eficiência acopladas à Espectrometria de Massas (CLAE-EM), que proporcionaram maior facilidade na definição e caracterização de estruturas químicas (QUEIROZ et al., 2006)

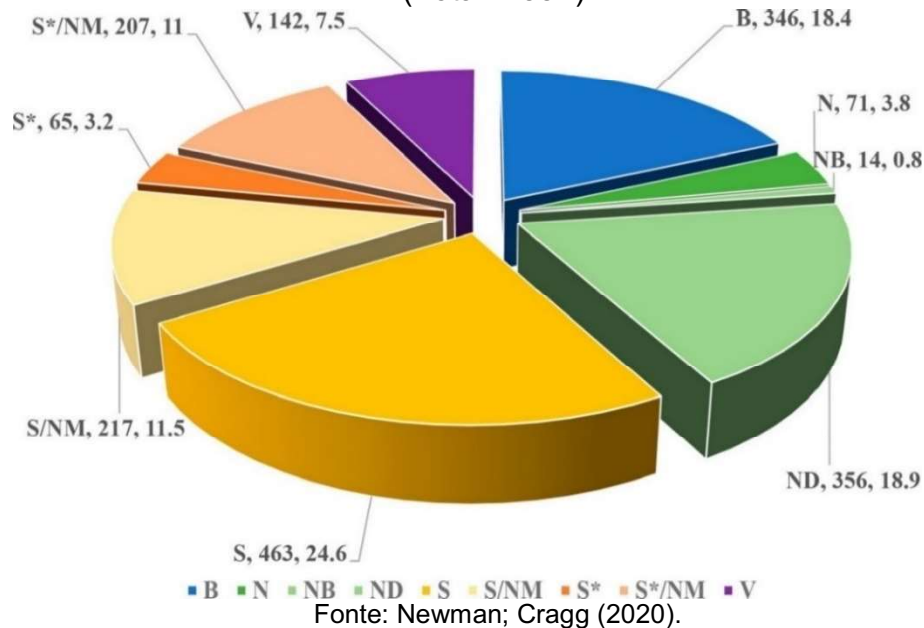
Estima-se que um quarto de todos os medicamentos aprovados pela *Food and Drug Administration* (FDA) e/ou pela Agência Médica Europeia (EMA) foi baseado em compostos isolados de plantas (THOMFORD et al., 2018). Mesmo hoje na medicina

ocidental, e apesar do progresso na química sintética, aproximadamente 25% dos medicamentos prescritos ainda são derivados direta ou indiretamente de PNs (ROMERO-BENAVIDES et al., 2017). Portanto, é notável a importância dos PNs para toda humanidade, acredita-se que ainda têm a contribuir para o combate a patógenos resistentes sejam virais, fúngicos, parasitários ou bacterianos.

Outro parâmetro que enfatiza essas investigações, está no estudo de Chen e colaboradores (2020), em que realizaram análises de visualização cienciométrica para toxicologia global e pesquisa farmacológica de PNs. Já outro estudo atual que faz ênfase aos PNs para descobertas de novos fármacos, é relatada no estudo de revisão de Newman e Cragg (2020), ao qual aborda os PNs como fontes de novos medicamentos e desenvolvimento de novos fármacos ao longo de 39 anos. Esse estudo ressalta ainda mais a importância dos PNs que vêm ganhando força até os dias atuais para descoberta de novos fármacos. A revisão também menciona que de 1981 a 2019, cerca de 49,2% dos 1.881 fármacos existentes são guiados por PNs e aprovados pela *Food and Drug Administration* (FDA) e pela Agência Médica Europeia (EMA). Em relação a revisão de Newman e Cragg de 2016, observa-se que cerca de 1.562 fármacos foram aprovados, com 51% oriundo de PNs. Quanto as moléculas pequenas aprovada também neste período representam cerca de 67% dos fármacos aprovados de PNs.

Ainda a respeito ao estudo da revisão Newman e Cragg (2020), os fármacos podem ser classificados de acordo com sua origem, categorias e suas subdivisões, bem como, macromolécula biológica (B); produto natural inalterado (N); medicamento botânico (mistura definida) (NB); derivado de um produto natural (ND); fármacos totalmente sintéticos (S); feito por síntese total, mas o farmacóforo era de um produto natural (S*); vacina (V); e produto natural mimetizado (NM). Na Figura 2 é apresentada a classificação dos fármacos produzidos inspirados em PNs.

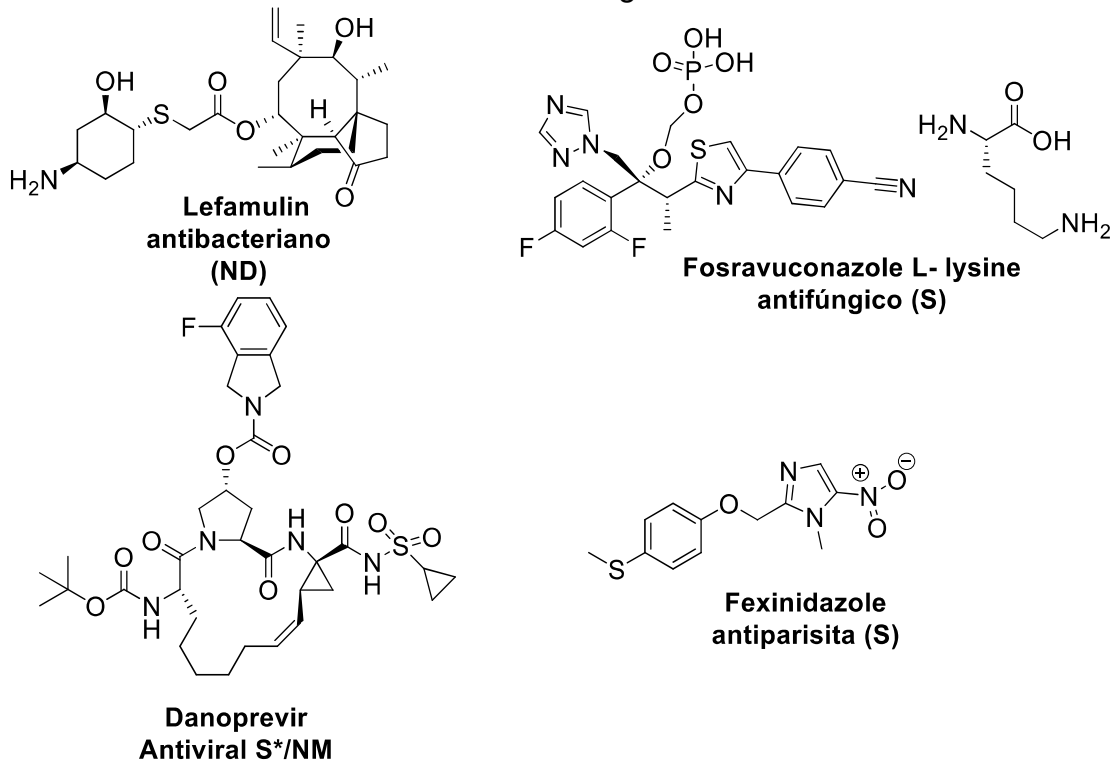
Figura 2 - Classificação dos fármacos aprovados no período de 1981 a 2019 (Total=1881).



Esses dados deixam evidente a predominância dos compostos de PNs, sejam naturais ou derivados, isto é, de uma forma geral, a maioria dos fármacos são aperfeiçoados de PNs. Outra ferramenta tem ganhado espaço no cenário de plantas medicinais, a fitoterapia. A grande parte desse sucesso de PNs se deve ao arsenal de fitoterápicos, que de fato, assumiu um papel alternativo interessante. É notável, que houve um crescimento significativo no número de programas municipais de fitoterapia no Sistema Único de Saúde (SUS), desde o lançamento da Política Nacional de Plantas Medicinais, em 2006 (HASENCLEVER et al., 2017; RIBEIRO, 2019). A obtenção dos medicamentos fitoterápicos, passam por algumas análises, tais como toxicidade, análise farmacológica, além da validação da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).

As fontes de PNs possuem um arsenal riquíssimo de substâncias ainda a ser explorado, assim como seu potencial biológico. Parte das descobertas de substâncias ativas, passam por atividades antimicrobianas, como por exemplo, a antibacteriana, antifúngica, antiparasitária e antiviral, (ABDELMOHSEN et al., 2017). A seguir são apresentadas algumas estruturas químicas de acordo com sua origem, categorias e seus respectivos agentes infecciosos (Figura 3).

Figura 3 - Estruturas químicas de alguns princípios ativos de fármacos aprovados entre 2018 e 2019 e seus agentes infecciosos.



Fonte: Watanabe; Tsubouchi; Okubo, (2018); Newman; Cragg (2020); Falcó et al., (2020)

As plantas do bioma brasileiro têm sido usadas na medicina tradicional pela população local no tratamento de diversas doenças, incluindo aquelas causadas por agentes infecciosos. A literatura apresenta uma série de estudo de moléculas biologicamente ativas (Figura 3). Dentre essas atividades destacam-se a antibacteriana, antifúngica, antiparasitária, antiviral, dentre outras (Tabela 1). Há de ressaltar que grande sucesso moléculas ativas, se deve em razão do potencial biológico desses agentes e ao grande avanço na área da química.

Tabela 1- Classes de agentes infecciosos no período de 1981 a 2019

| Classes de fármacos | B | N | ND | S | S/NM | S* | S*/NM | V | Total |
|---------------------|----|----|----|----|------|----|-------|-----|-------|
| Antibacteriana | 4 | 11 | 78 | 36 | | | 1 | 32 | 162 |
| Antifúngica | 1 | | 3 | 27 | 3 | | | | 34 |
| Antiviral | 17 | | 6 | 19 | 9 | 26 | 21 | 87 | 185 |
| Antiparasitária | | 2 | 7 | 6 | | 3 | | 2 | 20 |
| Total | 22 | 13 | 94 | 88 | 12 | 29 | 22 | 121 | 401 |

Fonte: adaptado de Newman; Cragg (2020).

O número de agentes infecciosos da Tabela 1 deixa evidente as descobertas e os desenvolvimentos de novas moléculas, sejam elas sintetizadas ou não, nos últimos 38 anos. A Tabela 1 ainda destaca os dados estatísticas gerais para esses agentes, como as contribuições dos fármacos “N/ND” e “S*/NM”, podendo ser observadas nas quatro classes, demonstrando que essas categorias são responsáveis por 136 agentes do total de 401 de pequenas moléculas (NEWMAN; CRAGG, 2020).

Patógenos bacterianos e fúngicos desenvolveram numerosos mecanismo de defesa contra agentes antimicrobianos, e as resistências a medicamentos antigos e recém-produzidos está aumentando. O crescimento de resistência de microrganismos alertou e intensificou o empenho sobre estratégias para a produção de novos fármacos que possam inibir ou até curar doenças patológicas, a partir de PNs. Por isso, a ratificação da alta porcentagem de fármacos com origem de PNs é um caminho propício na busca de novos medicamentos (YAP et al, 2014; KATZ; BALTZ, 2016; ANWAR et al., 2018; PHAM et al., 2019). De fato, as doenças infecciosas ainda continuam a comprometer as conquistas da medicina moderna nas últimas décadas, em particular, a resistências antimicrobianas aos fármacos, o que impôs um grande fardo a saúde.

Com relação à disponibilidade de material vegetal para estudos de PNs, o Brasil se destaca por apresentar um papel relevante, pois estima-se que cerca de 20% da biodiversidade de plantas do planeta esteja em solo brasileiro (GARCEZ et al., 2016; MACÊDO et al., 2018). Como possui uma vasta extensão territorial e uma vegetação bem heterogênea, o Brasil é subdividido em 6 grandes biomas, designados por “hot-spot” de biodiversidade (MARCHESE, 2015), sendo eles: Amazônia, Cerrado, Caatinga, Mata atlântica, Pantanal e Pampa (GARCEZ et al., 2016). A diversidade de

solos e o clima tropical favorece a grande variedade de vegetação. Todavia, esses biomas são fontes promissoras para o interesse de estudos químicos e biológicos.

Recentes levantamentos realizados por 575 botânicos brasileiros enumeraram 46.097 espécies, em que 43% são endêmicas do território nacional. A cada ano são identificadas e descritas cerca de 250 novas espécies (FIORAVANTI, 2016). Na Amazônia foram listadas 14.035 espécies; no Pantanal 1.518 espécies; na Mata Atlântica 20.241 novas espécies; no Cerrado 13.488 espécies, e na Caatinga 5.780 espécies (ZAPPI; BFG - THE BRAZIL FLORA GROUP, 2015).

O Cerrado é o segundo bioma do Brasil ocupando cerca de 25% do território brasileiro, além de representar 5% de toda diversidade do planeta. Seu território também é composto pelos geraizeiros (norte de Minas Gerais), geraizenses (Gerais de Balsas/MA), as quebradeiras de coco babaçu (Zonas dos Cocais/MA, Piauí e Tocantins), os veredeiros (veredas do norte de Minas), varjeiros e ribeirinhos (ao longo dos rios São Francisco, Grande e Paraná), dentre outros (EMBRAPA, 2020). Segundo o estudo realizado por Strassburg e colaboradores (2017), o Cerrado já perdeu 46% da sua cobertura nativa e, se o cenário tendencial evoluir, nos próximos 30 anos, 1/3 do restante será perdido.

Das diversas plantas que podem ser encontradas no Cerrado, a *Cassia bakeriana* Craib, em especial as flores, objeto de estudo deste trabalho, não apresentam relatos na literatura sobre a sua aplicabilidade na medicina tradicional e a sua composição química, o que valoriza mais ainda este trabalho.

No geral, tem-se um conhecimento prévio da composição química do extrato de flores, podendo ser constituído por classe de flavonoides responsáveis por expressar o pigmento das cores das flores (BROUILLARD et al., 1990), além de apresentar, em sua grande maioria, propriedades antioxidantes (RANAWEERA et al., 2021).

Na literatura, há estudos descritos sobre *C. bakeriana*, envolvendo o fracionamento bioguiado de extratos de madeira, casca e folhas da *C. bakeriana* do cerrado brasileiro (CUNHA et al., 2017); a composição química, atividade antioxidante e glicação não enzimática, *in vitro*, das folhas de *C. bakeriana*. Craib (SILVA et al., 2019).

Outros estudos com diferentes espécies de *Cassia* como *C. absus*, *C. alata*, *C. angulata*, *C. fastuosa*, *C. ferruginea*, *C. grandis*, *C. obtusifolia*, *C. occidentalis*, e *C.*

Senna, nativas no Brasil e encontradas no Cerrado, já foram também estudadas e apresentaram potencial biológico do gênero, as quais apresentaram atividades: antioxidante, hepatoprotetor, anti-hiperuricêmico, anti-inflamatória, anaeróbicas, antimalárica, antidiabética, anticâncer, hipotensora, diurética, laxante, analgésica, antipirética, ansiolítica, antidepressiva e sedativa (SUDI et al., 2011; CUNHA et al., 2013a; KAMAGATÉ et al., 2014; ZHAO et al., 2016; SCHEIDEGGER, 2018; NASCIMENTO et al., 2020).

O estudo químico da composição dos extratos, partições e frações das flores de *Cassia bakeriana* tem propósito de contribuir com o conhecimento sobre esta espécie de *Cassia* presente no Cerrado como fonte de compostos biologicamente ativos.

1.1 ATIVIDADES BIOLÓGICAS DOS EXTRATOS E PARTIÇÕES DAS FLORES DE ESPÉCIES DE *Cassia*

1.1.1 Atividade antifúngica

Os fungos são agentes infecciosos, causadores de infecções, atingindo de formas distintas as áreas corporais, como a pele, as unhas e os cabelos. Existem outras patogenias por fungos, como as incômodas micoses, onicomicose e vaginal. Partes dessas infecções são causadas por fungos dermatófitos, incluindo as do gênero *Trichophyton*, *Microsporum* e *Epidermophyton*. Outra principal espécie do gênero é a *Candida*, objeto de estudo neste trabalho. Essas espécies podem causar irritantes infecções nos tecidos mucosos, e também doenças chamadas coletivamente de candidíase em bebês e indivíduos imunocomprometidos (CARRIS; LITTLE; STILES, 2012; MARTINS et al., 2015; OLIVEIRA et al., 2015; ZIDA et al., 2017; ABOODY; MICKYMARAY, 2020). A *Candida albicans* é o patógeno fúngico mais prevalente nos humanos e responsável por mais de 90% dos casos de infecções fúngicas (ZIDA et al., 2017; CAIRNS; NAI; MEYER, 2018).

Embora infecções superficiais sejam comuns e geralmente fáceis de curar, as infecções invasivas podem causar doenças potencialmente fatais, em pacientes imunocomprometidos com HIV/AIDS (vírus da imunodeficiência humana/ síndrome de imunodeficiência adquirida) ou doenças autoimunes, e naquelas submetidas a quimioterapia anticâncer ou transplante de órgãos (BROWN et al 2012; KIM, 2016;

ABOODY; MICKYMARAY, 2020). Observa-se que, mesmo com estudos relacionados a essa patogenia, ainda há um lento progresso, o que dificulta o avanço e desenvolvimento de novos antifúngicos, principalmente aqueles de origens de PNs mais especificamente as plantas.

No Brasil, uma estimativa do Ministério da Saúde (MS), de 2016, sugeria que mais de 3,8 milhões de indivíduos sofriam de alguma infecção fúngica séria. Em 2017, houve 390 mil casos de aspergilose alérgica broncopulmonar, quase 600 mil de asma severa afetada por fungos, principalmente *Aspergillus* sp, 28 mil casos de candidemia, causada pela presença de fungos do gênero *Candida* no sangue, e 6,8 mil casos de meningite, (pneumonia por *Cryptococcus*), representando a segunda maior causa de infecções fúngicas em todo mundo (BROWN et al 2012; KIM, 2016; ZIDA et al., 2017; CAIRNS; NAI; MEYER, 2018; ABOODY; MICKYMARAY, 2020).

Entre as espécies encontradas em indivíduos saudáveis, estão presentes os patógenos fúngicos causadores de invasões infecciosas: *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, *Aspergillus fumigatus* e *Histoplasma capsulato*.

A *C. albicans* é considerada o patógeno mais comum, e geralmente coloniza as regiões da pele, mas se torna patogênica com crescimento excessivo nas superfícies da pele e mucosas, e invasão no tecido hospedeiro, sendo o agente predominante nos casos de infecções fúngicas invasivas (CARRIS; LITTLE; STILES, 2012; KIM, 2016; ABOODY; MICKYMARAY, 2020). Höfs e colaboradores (2016) discutem como a interação do “host” é mantida e perturbada, bem como os fatores que podem ser atribuídos à dinâmica da interação, e as maneiras pelas quais as bactérias na microbiota interagem com *C. albicans*, para exercer resultados positivos ou negativos no potencial de virulência.

A espécie *C. neoformans* é um patógeno humano fúngico basidiomiceto que causa pneumonia fúngica e meningite, com risco de vida em pacientes imunocomprometidos, constituindo-se em importante causa de morbidade e mortalidade em indivíduos por todo mundo. Esta espécie é encontrada em fontes ambientais, incluindo fezes de pombos. Outro patógeno relacionado é o *Cryptococcus gattii*, que infecta indivíduos imunocompetentes em áreas tropicais. No entanto, há evidências de que o *C. neoformans* também infecta hospedeiros imunocompetentes (PANACKAL et al., 2015).

A *C. tropicalis* é um patógeno humano com taxas de mortalidade significativas, particularmente prevalentes em regiões tropicais (O'BRIEN; OLIVEIRA-PACHECO; BUTLER, 2019). O fungo *Aspergillus fumigatus* é inalado por seres humanos, mas efetivamente eliminado pelo sistema imunológico em indivíduos saudáveis. No entanto, os esporos iludem o sistema de defesa em indivíduos imunocomprometidos e causam a aspergilose invasiva, com risco de vida (KIM, 2016). A espécie *Histoplasma capsulatum* é um fungo termicamente dimórfico que cresce em uma forma de hifa no ambiente, mas existe como um brotamento em hospedeiros mamíferos. O *Histoplasma capsulatum* causa histoplasmose pulmonar, que apresenta características clínicas e patogênicas semelhantes da tuberculose (KIM, 2016; WOODS, 2016; ABOODY; MICKYMARAY, 2020). Neste presente trabalho foram avaliados os microrganismos fúngicos *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, e *Candida glabrata*.

Apesar de atualmente haver uma variabilidade maior de opções de antifúngicos, seja de origem natural ou sintética, como por exemplo, o pró-fármaco Fosravuconazole l-lysine (Figura 3., p. 18), citado por Newman e Cragg (2020), o arsenal terapêutico ainda é bastante restrito, e é clara a necessidade de novos antifúngicos mais eficazes e menos tóxicos (CARRIS, LITTLE; STILES, 2012; KIM, 2016; WATANABE et al., 2018; ABOODY; MICKYMARAY, 2020).

Assim como todos os agentes patogênicos, o maior desafio dos estudos é a resistência antifúngica e seus mecanismos, diminuindo dessa forma opções de tratamento, uma vez que existe resistência em diferentes espécies de *Candida* e em todas as classes disponíveis de agentes antifúngicos (PIANALTO; ALSPAUGH, 2016; ZIDA et al., 2017; ABOODY; MICKYMARAY, 2020).

Os agentes antifúngicos aprovados são divididos em quatro classes principais: os polienos, como a anfotericina B e nistatina; os azóis como fluconazol, itraconazol, voriconazol, posaconazol, isavuconazol; as equinocandinas, como a caspofungina, micafungina, anidulafungina; e os antimetabólitos, como 5-fluorocitosina (PIANALTO; ALSPAUGH, 2016; LANGER et al., 2018). A anfotericina-B (um polieno) apresenta neurotoxicidade devido à ligação fora do alvo das membranas do hospedeiro. Muitos azóis podem promover alterações da condição cardíaca, e a 5-fluorocitosina apresenta toxicidade contra a medula óssea especialmente na presença de insuficiência renal. Esses fármacos antifúngicos estão associados a resistência

fúngica e seus efeitos adversos (PIANALTO; ALSPAUGH, 2016; LANGER et al., 2018; ABOODY; MICKYMARAY, 2020).

Na recente revisão de Newman e Cragg (2020), apenas dois agentes de origem sintética foram aprovados: o sulfato de isavuconazônio e o fosravuconazol. Existem também mais dois compostos naturais baseados nos PNs e em ensaios de fase III, que podem muito bem ajudar a melhorar a estatísticas de PN em um futuro relativamente próximo.

Há diversas espécies de plantas do Cerrado que foram avaliadas contra *Candida* spp. (SILVA et al., 2012; ZAMBUZZI-CARVALHO et al., 2013; E SILVA et al., 2014; CORREIA et al., 2016). Quanto aos compostos fenólicos com atividades antifúngicas, identificados nos extratos deste trabalho, também foram abordados por Ansari et al., (2013) e Oliveira et al., (2016). Em outro estudo, Alves et al., (2014) apresentam resultados satisfatório no estudo da atividade antifúngica de compostos fenólicos identificados em flores de espécies de planta do Nordeste. Já no Cerrado, há estudos com resultados promissores ante o potencial antifúngico, abordados por Rocha et al., (2018); Martins et al., (2019); Nascimento et al., (2020) e Oliveira et al., (2020).

1.1.2 Atividade antibacteriana

A descoberta dos agentes antimicrobianos foi de suma importância para a humanidade, erradicando diversas infecções que acometiam a população no passado. A penicilina, as quinolonas e as sulfonamidas revolucionaram a prática médica, reduzindo drasticamente a taxa de mortalidade pelas infecções bacterianas (CHIBLI, 2013).

As bactérias, assim como os fungos, são agentes patogênicos, causadoras de diversas infecções superficiais e internas. As infecções bacterianas da pele são as mais comuns. Ocorrem com maior frequência após lesões prévias, especialmente quando os ferimentos não são tratados assepticamente. As principais bactérias associadas a infecções da pele são a *Staphylococci* e a *Streptococci*, consideradas como as principais causas de morbidade e mortalidade, ocasionando infecções respiratórias e sepse (CHIBLI, 2013; HWANG et al., 2013; PHAM et al., 2019).

Neste presente trabalho as cepas avaliadas foram as bactérias anaeróbicas, que compreendem o grupo mais numeroso de microrganismo. Nos seres humanos, esses agentes costumam viver no trato gastrointestinal, podendo ser encontrados em diversos lugares no corpo, provenientes principalmente do solo e da água, alimentos e animais (CORRALES et al., 2015; ALVES et al., 2017). As bactérias avaliadas foram as *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Actinomyces naeslundii*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus sanguinis*, e a *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Estas bactérias apresentam importância e relevância global no tratamento de infecções bucais, (CORRALES et al., 2015; DIAS; SILVA; LIMA, 2015; ALVES et al., 2017).

A utilização crescente da fitoterapia entre os programas preventivos e curativos tem estimulado o estudo dos extratos de plantas para o uso na odontologia como controle do biofilme dental e outras afecções bucais, aumentando as pesquisas com PNs no meio odontológico nos últimos anos, com maior atividade terapêutica, com menor toxicidade e melhor biocompatibilidade, além de apresentarem custos mais acessíveis à população (FRANCISCO, 2010; MACHADO; OLIVEIRA, 2014; DIAS; SILVA; LIMA, 2015; BOHNEBERGER et al., 2019; GOMES et al., 2020a).

As infecções odontológicas mais comuns relatadas na literatura são a cárie, a gengivite, a periodontite, estomatite aftosa, herpes simples e problemas de cicatrização na mucosa bucal. Em recente trabalho, Bohneberger e colaboradores (2019) abordaram algumas plantas medicinais e fitoterápicos no tratamento de infecções bucais. Ainda neste estudo os autores sugerem que as bactérias orais podem estar associadas com outras doenças como pneumonia e doenças cardiovasculares, otite média, rinossinusite, mastoidite, abscessos cerebrais, paroníquias (infecção da pele que rodeia a unha) e abscessos cervicais profundos (KUMAR, 2013; ALVES et al., 2017). Desse modo, há a necessidade de mais estudos no desenvolvimento de novos antibióticos no combate de infecções bucais.

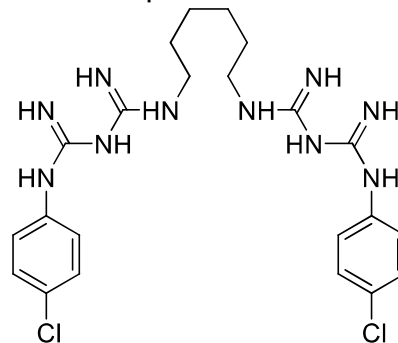
A cárie dentária ainda é uma das doenças infecciosas de maior prevalência da cavidade oral, atingindo a grande maioria dos adultos nos países industrializados e 60% a 90% das crianças em idade escolar (WORLD; HEALTH ORGANIZATION, 2012). Esta doença representa um alto custo em países desenvolvidos, onde a saúde bucal é responsável por 5% a 10% de toda a despesa com saúde pública e um custo

que excede a capacidade financeira da maioria dos países em desenvolvimento (MICHELON et al., 2016)

A cavidade bucal é colonizada por inúmeras espécies de bactérias sejam gram-positivas ou gram-negativas, formadoras de camada biofilmes, mais conhecida por placas dentárias (ALVES et al., 2017; BOHNEBERGER et al., 2019), responsáveis por inúmeras infecções dentárias em todo mundo. As placas dentárias podem ser removidas mecanicamente durante a escovação dos dentes. Entretanto, outras ferramentas e estratégias vêm surgindo com o uso de produtos antimicrobianos, como as soluções removedoras das placas dentárias, a clorexidina e os derivados fenólicos (DE MEDEIROS NÓBREGA et al., 2016).

Diante desses fatos, há uma grande preocupação de relevância mundial relacionada a resistência desses agentes bacterianos. Segundo a Organização Mundial da Saúde (2010), a resistência bacteriana a medicamentos deveria ser vista há muito tempo como um problema de saúde pública, principalmente no âmbito hospitalar. A clorexidina e hipoclorito de sódio não são capazes de inativar os lipopolissacarídeos bacterianos, nem de remover totalmente a “smear layer” (camada da parede dentinária do canal radicular) (BONAN; BATISTA; HUSSNE, 2011). Em relação a isto, estudo tem enfatizado que a clorexidina (Figura 4) sofre degradação, formando a *p*-cloroanilina, que é hematóxico e carcinogênico. Assim, o uso indiscriminado a torna um poluente emergente (ZONG; KIRSCH, 2012; LIMA et al., 2014). Diante desse contexto, uma alternativa mais plausível, é de fato, a busca por antimicrobianos de fontes naturais.

Figura 4 - Estrutura química da clorexidina.



Fonte: o autor.

Nesta perspectiva, os agentes antimicrobianos de fonte de PNs têm se mostrado uma fonte promissora contra bactérias orais, ante o aumento da resistência bacteriana devido ao uso excessivo de antibióticos. Na literatura há estudo relacionado a fontes naturais com potencial antimicrobiano frente a bactérias causadoras de infecções bucais (SÜNTAR et al., 2016). Estudo com extratos das flores da espécie *Cassia javanica* mostraram resultados promissores contra bactérias (MOHAMMED et al., 2019). Já no Cerrado, estudos de Rocha et al., (2018); Oliveira et al., (2018) e Martins et al., (2020), mostraram resultados promissores contra esses microrganismos.

1.1.3. Antiglicação e atividade antioxidante

No organismo humano, as reações de oxidação desempenham um papel fundamental no processo metabólico que leva a produção de energia necessária para as atividades essenciais das células (ALVES et al., 2010; HAMEISTER et al., 2019). Desse modo, as reações de oxidações biológicas produzem as espécies reativas de oxigênio (EROs) que contém elétrons desemparelhados, os radicais livres.

Dentre as principais espécies de radicais livres encontram-se os intermediários neutros como H_2O_2 e espécies carregadas como $(ONOO^-)$ e que são denominadas espécies reativas (ER). As ER são divididas em espécies reativas de oxigênio (EROs) e espécies reativas de nitrogênio (ERNs). São exemplos de ER: radical hidroxil (OH^\bullet), radicais superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), óxido nítrico (NO^\bullet), óxido nitroso (N_2O_3), peroxinitrito ($ONOO^-$) (HAMEISTER et al., 2019). As EROs em excesso nos processos bioquímicos podem causar sérios danos oxidativos às células e tecidos, o quais estão relacionadas a diversas patogenicidade, incluindo câncer, distúrbios inflamatórios, doenças cardiovasculares, aterosclerose e, principalmente, complicações diabéticas, uma vez que essas doenças estão atribuídas ao estresse oxidativo (LÓPEZ-ALARCÓNA; DENICOLA, 2012; HAMEISTER et al., 2019).

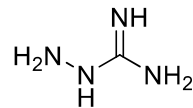
Como já mencionado, a diabetes pode causar doenças microvascular específica na retina, no glomérulo renal e nos nervos periféricos, bem como a doença macrovascular aterosclerótica acelerada (BROWNLEE, 2001; BARBOSA; OLIVEIRA; SEARA, 2009; TORRES et al., 2018). A hiperglicemia é o fator primário desencadeador dessas complicações micro e macrovasculares, sendo a formação

endógena dos produtos de glicação avançada, também chamados por AGEs (*advanced glycation end-products*), um dos principais mecanismos responsáveis pelos danos celulares e teciduais (MONNIER et al., 2005; BARBOSA; OLIVEIRA; SEARA, 2009; TORRES et al., 2018).

Os AGEs, além de modificar propriedades químicas e funcionais das estruturas biológicas, atuam também na geração de radicais livres, promovendo o estresse oxidativo, na formação de ligações cruzadas com proteínas ou interagindo com receptores celulares, o que contribui para progressão de complicações diabéticas (BARBOSA; OLIVEIRA; SEARA, 2009; TORRES et al., 2018).

Compreende-se que a atividade antiglicante é a capacidade de inibir a formação dos AGEs e, um dos inibidores pioneiros na formação das reações cruzadas foi a aminoguanidina (Figura 5). Entretanto, a busca por novos agentes antiglicantes que não apresentem efeitos colaterais ainda continua a ser explorada (TORRES et al., 2018). Estudos comprovaram que extratos de plantas tem apresentado resultados promissores na atividade antiglicante, como os extratos das flores de *Cassia auriculata* que apresentou potencial de inibição da glicação, sendo está atividade atribuída a compostos fenólicos presentes nestes extratos (KUMAR, et al., 2014; PERERA; EKANAYAKE; RANAWEERA, 2015). A literatura tem ressaltado que diferentes classes de metabólitos foram associadas à atividade antiglicante, como os compostos fenólicos, flavonoides, polissacarídeos, carotenoides e os ácidos graxos (MATSUDA et al., 2003; KUERBAN et al., 2017; TORRES et al., 2018).

Figura 5 - Estrutura química da aminoguanidina.



Fonte: o autor

Assim, observar-se que os compostos antiglicantes possam inibir a formação de AGEs (BARBOSA; OLIVEIRA; SEARA, 2009). Isso corrobora com os desequilíbrios associados aos processos fisiológicos, como o estresse oxidativo, ocasionando diversas patologias.

O desequilíbrio do estresse oxidativo faz as células saudáveis do corpo serem atacadas, levando a oxidação do DNA, proteínas, e enzimas, dentre outras

macromoléculas. Esse desequilíbrio pode causar uma variedade de doenças crônicas e degenerativa além do processo de envelhecimento (ALVES et al., 2010; HAMEISTER et al., 2019). O próprio organismo contém agentes antioxidantes endógenos, que proveem de enzimas superóxido dismutase, catalase, peroxidase, ascorbato peroxidase e glutathione redutase que são os principais antioxidantes endógenos, e os exógenos que provém da alimentação, que incluem vitamina C e E, terpenoides, caratenoides, e compostos fenólicos como ácidos fenólicos, flavonoides, cumarinas, lignanas e taninos (YANG et al., 2011; LÓPEZ-ALARCÓNA; DENICOLA, 2012; HAMEISTER et al., 2019).

Os agentes antioxidantes exógenos podem ser sintéticos e naturais. Aqueles oriundos de plantas, destacam-se pelos compostos especializados de natureza fenólica, em especial oriundos de flores. Diversos estudos realizados com compostos fenólicos, da classe de flavonoides, demonstram a capacidade de sequestrar radicais livres, sendo responsáveis pela potente ação antioxidante (ALVES et al., 2010; ZHANG et al., 2016), apesar da ampla empregabilidade dos agentes sintéticos, seja na indústria alimentícia, farmacêutica ou cosmética, como o hidroxianisol butilado (BHA), o hidroxitolueno butilado (BHT), o galato de propila (PG) e a *terc*butilidroquinona (TBHQ). Em contrapartida, estudos tem relatado a possibilidade desses antioxidantes apresentarem efeitos carcinogênicos e tóxicos para o fígado e pâncreas (YEHYE et al., 2015; TOZETTO et al., 2017).

Algumas espécies de *Cassia* foram previamente avaliadas quanto a atividade antioxidante das flores. Kaisoon e colaboradores (2011) relataram que flores de *C. siamea* são fontes de componentes bioativos com altas propriedades antioxidantes, e que podem ser de interesse dos consumidores e profissionais de saúde pública. Kaur e colaboradores (2006) ainda sugerem que o extrato alcoólico de flores de *C. siamea* possui potentes antioxidantes. Já para Kumaran e Karunakaran (2007), os extratos de etanol e metanol de flores de *C. auriculata* apresentaram alta atividade antioxidante com base no sequestro de radicais livre, devido à presença de flavonoides e taninos.

Quanto ao estudo com as flores de *Cassia bakeriana*, objeto de estudo deste trabalho, não foram ainda relatados estudos sobre a atividade antioxidante. Dessa forma, torna-se importante o estudo desta planta em busca de compostos auxiliares nesta atividade, como as classes fenólicas contra o excesso de EROs no processo fisiológico, bem como o estresse oxidativo.

1.2 FAMÍLIA LEGUMINOSAE

A Leguminosae (Fabaceae s. l.) constitui uma das famílias de angiospermas, juntamente com Orchidaceae e Asteraceae, com distribuição subcosmopolita, com ocorrência em todos os ecossistemas (LEWIS et al., 2005; ANDRADE et al., 2009; DRYFLOR, 2016; MENESES; ESSI, 2016; GOMES; SILVA; CONCEIÇÃO, 2017). Compreende 770 gêneros e cerca de 19.500 espécies (AZANI, 2017). A família pode ser reconhecida botanicamente pela morfologia de suas folhas compostas, filotaxia alterna, presença de estípulas e pulvinos, ovário súpero, unicarpelar, placentação marginal e fruto do tipo legume (AZANI, 2017; GOMES et al., 2020b).

Conforme a literatura, a família Leguminosae está distribuída em três subfamílias tradicionais: Caesalpinioideae, Mimosoideae e Papilionoideae. Uma nova proposta bem abrangente, baseada em estudos taxonômicos e moleculares, foi apresentada e estabelece seis subfamílias: Caesalpinioideae (onde foi circunscrita à antiga Mimosoideae); Cercidoideae; Detarioideae; Dialioideae; Duparquetioideae e Papilionoideae (SELEGATO et al., 2017; LPWG, 2017).

Segundo Yahara e colaboradores (2013), as leguminosas são culturas alimentares importantes por serem fontes altamente nutritivas de proteínas e micronutrientes, que podem beneficiar a saúde e os meios de subsistência, particularmente nos países em desenvolvimento.

No Brasil, é a maior família botânica, reconhecida por 222 gêneros e 2.849 espécies e presentes em todos os domínios fitogeográficos, com maior diversidade no Cerrado, com aproximadamente 1.524 espécies endêmicas (FINGER; FINGER, 2015; STRASSBURG et al., 2017; GOMES; SILVA; CONCEIÇÃO, 2017; FREITAS et al, 2019; FLORA DO BRASIL, 2020).

Estas espécies são encontradas na maioria das regiões e distribuídas por quase todas as formações vegetacionais (ZAPPI; BFG - THE BRAZIL FLORA GROUP, 2015). Também apresentam grandes índices de diversificação, bem como sua ecologia e morfologia, com hábito de grandes árvores às ervas (LEWIS et al., 2005).

1.3 ASPECTOS QUÍMICOS E BIOLÓGICOS DO GÊNERO *Cassia*

O gênero *Cassia* é composto por mais de 600 espécies, incluindo arbustos, árvores e ervas, distribuídas em regiões tropicais por todo mundo (DAVE; LEDWANI, 2012). Recentes revisões apresentaram mais informações sobre a importância e aplicabilidade das espécies em questão. No Brasil, observa-se a utilização dessa planta de forma ornamental, pela beleza das flores e, também, na medicina popular, para tratamentos de várias patologias como laxante, purgativo, antimalárico, cicatrizante de úlceras, antidiabético, hepatoprotetor, nefroprotetor, antitumoral. Esta espécie também é usada no tratamento de infecções de pele e febre periódica em toda a região tropical e subtropical (HAFEZ et al., 2019). No quadro 1 estão descritas algumas espécies de *Cassia* e suas respectivas utilizações medicinais.

Quadro 1 - Espécies de *Cassia* e suas respectivas utilizações na medicina tradicional (*continua*).

| Espécies de <i>Cassia</i> | Uso medicinal |
|----------------------------|--|
| <i>Cassia abbreviata</i> | Dor de cabeça, dor de dente, doenças gastrointestinais, vermífugo, doenças venéreas, pneumonia, complicações no útero, malária, laxante (SCHMELZER; GURIB-FAKIM, 2008). |
| <i>Cassia absus</i> | Tumores, asma, constipações (DAVE; LEDWANI, 2012) |
| <i>Cassia angustifolia</i> | Agentes laxantes, analgésicos e antifúngicos para tratar micose e outras infecções fúngicas da pele (NASCIMENTO et al., 2020). |
| <i>Cassia alata</i> | Laxante, febrífuga, micose, herpes, doenças do fígado, problemas gastrointestinais (PARVEEN; SHAHZAD, 2015) |
| <i>Cassia auriculata</i> | Atividade antioxidante (KUMAR et al., 2014; PRASATH et al., 2019). |
| <i>Cassia fistula</i> | Laxante, malária, intoxicação sanguínea, diarreia, lepra, tuberculose, reumatismo, doenças de pele, pedra no rim, vermífugo, úlcera (SCHMELZER; GURIB-FAKIM, 2008, NAGPAL et al., 2011). |

Quadro 1 – Espécies de *Cassia* e suas respectivas utilizações na medicina tradicional. (*Conclusão*).

| | |
|----------------------------|---|
| <i>Cassia occidentalis</i> | Anemia, doenças no fígado, coceiras, micose, malária, dores de barriga, gripes, febres, infecções gerais, distúrbios hepáticos e do estômago, diurético, tuberculose (DI STASI; HIRUMA-LIMA, 2002). |
| <i>Cassia reticulata</i> | Problemas de pele e menstruais, antitérmico, diurético, picada de cobra (DI STASI; HIRUMA-LIMA, 2002). |
| <i>Cassia sieberiana</i> | Úlcera, diarreia, gonorreia, hemorroidas, lepra, disenteria (SCHMELZER; GURIB-FAKIM, 2008). |
| <i>Cassia sophera</i> | Artrite, asma, câncer, diabetes, antidiurético (MONDAL; RAJALINGAM; MAITY, 2013.). |
| <i>Cassia tora</i> | Doenças de pele, caspa, constipação, tosse hepatite, febre, hemorroidas (BHALERAO et al., 2013). |

Fonte: adaptado de Viegas Junior et al., (2006); Sundaramoorthy et al., (2016); Hafez et al., (2019).

Recentemente, o uso etno-botânico e tradicional de compostos naturais, especialmente de origem vegetal, recebe muita atenção, pois são bem testados quanto à sua eficácia e geralmente considerados seguros para uso humano (SENTHAMILSELVI; MURUGANANTHAM; SOLOMON, 2016).

Estudos de *Cassia* tem apresentado pela literatura por suas indicações etnofarmacológicas (Quadro 1). Por exemplo, as flores da *Cassia Surattensis* Burm apresentaram atividade antidiabética significativa (RAMESH PETCHI; VIJAYA; DEVIKA, 2011). A *Cassia auriculata* apresentou atividade anti-úlceras, antidiabética (KUMAR et al 2014; ADIKAY; SANTHOSHINI 2017; NAMBIRAJAN et al., 2018). A *Cassia uniflora* apresentou atividades anti-inflamatória, analgésica e anti-úlceras (CHAUDHARI; CHAUDHARI; CHAVAN, 2012). A *Cassia spectabilis* mostrou-se efetiva contra filmes de *Candida albicans* (TOREY et al., 2016). *Cassia fistula* indicou atividade analgésica e anti-inflamatória significativa (SRIVIDHYA et al., 2017). A *Cassia glauca* mostrou atividade antifúngica excelente (SUMATHY et al., 2014).

Outro exemplo, a *Cassia tora* apresentou atividade antioxidante, hepatoprotetora, anticâncer e antimicrobiana, sendo o extrato rico em polifenóis e ácidos graxos, tais como, palmítico, linolênico, margárico e melíssico que foram identificados em maiores quantidades (DHANASEKARANA; IGNACIMUTHU;

AGASTIAN, 2009; SHUKLA et al., 2018). Uma avaliação e investigação de três espécies de *Cassia*, nomeadamente *Cassia alata* Linn., *Cassia occidentalis* Linn, e *Cassia sieberiana* apresentou as classes de metabólitos alcaloides, flavonoides e saponinas, através da prospecção fitoquímica (AWOMUKWU et al.,2015). Em outro estudo, foram identificados compostos como a flavan-3-ol, flavona, flavonóis glicosilados, dímeros de proantocianidinas e trímeros de proantocianidinas (NASCIMENTO, et al., 2020)

Em outro trabalho recente com as folhas de *Cassia bakeriana*, o fracionamento levou ao isolamento de dois flavonoides: canferol-3-O-ramnosíde e canferol (SILVA et al., 2019). A Tabela 2 apresenta alguns compostos isolados dos extratos de flores de espécies de *Cassia* e suas atividades biológicas. Na Figura 6 estão representadas as estruturas desses compostos. A partir destas informações, cresceu a importância de estudar as flores de *Cassia bakeriana*.

Tabela 2 - Compostos isolados das flores de espécies de *Cassia* e suas respectivas atividades biológicas. (Continua).

| Espécie de <i>Cassia</i> | Compostos isolados | Número do composto | Atividade biológica | Referência |
|---------------------------------|---|---------------------------|-----------------------------|---|
| <i>Cassia javanica</i> | Dihidromarmendina-3-O-β-D glucopiranosídeo | (6) | - | (SHARMA; AHMAD; HARIKUMAR, 2014) |
| | Éter leucocianidin-4'-O-metilico-3-O-β-D-galactopiranosídeo | (7) | - | |
| <i>C. siamea</i> | Cassiadinina | (8) | - | (THONGSAARD et al., 1996) |
| | 5-acetonil-7-hidroxi-2-metilcromona | (9) | - | |
| | (+) - 6-Hidroximelina | (10) | - | |
| <i>C. auriculata</i> | Diacetato de (+) - 6-hidroximelina | (11) | - | |
| | Chaksine | (12) | - | |
| | 5-O-metil-quercetin-3-O- (3 " - acetil -) - d-galactósídeo | (13) | - | (SENTHAMILSELVI; MURUGANANTHAM; SOLOMON, 2016) |
| <i>C. alata</i> | β-sitosterol β-D-glucósídeo | (14) | Antifúngica, antibacteriana | (SATYENDER; YADAV, 2013; FATMAWATI, et al., 2020) |
| | Alanonal | (15) | Antifúngica, antibacteriana | |
| <i>C. jahni</i> | (-)-6-iso-carnavalina | (16) | - | |
| | (-)-espectalina | (17) | - | (RICE; COKE, 1966) |
| | 6-iso-cassina | (19) | - | |
| | (+)-espectalina | (20) | - | |
| <i>C. spectabilis</i> | (-)-espetalina | (21) | antifúngica | (VIEGAS JUNIOR et al., 2006) |
| | (-) - 3-O-acetilspectralina | (22) | - | |
| | (-) - 7 hidroxispectralina | (23) | - | (VIEGAS JUNIOR et al., 2003) |
| | iso-6-espetalina | (24) | - | |

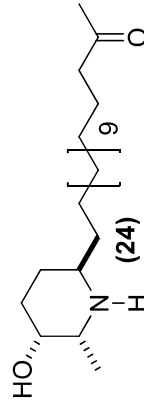
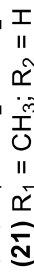
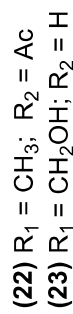
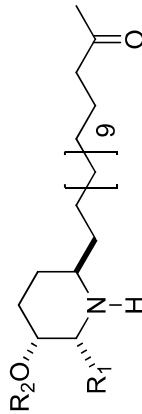
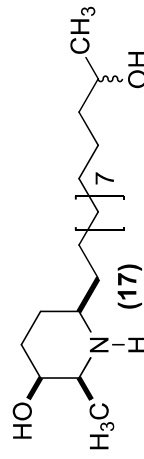
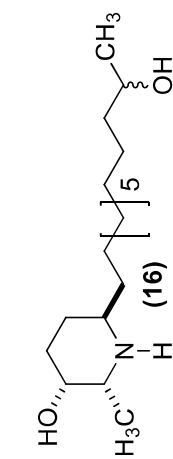
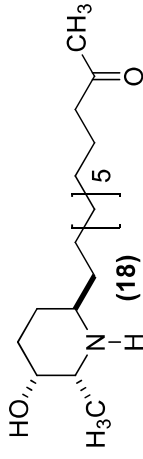
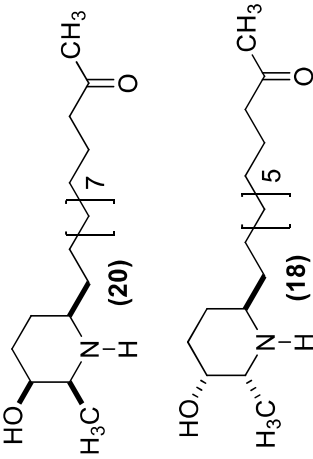
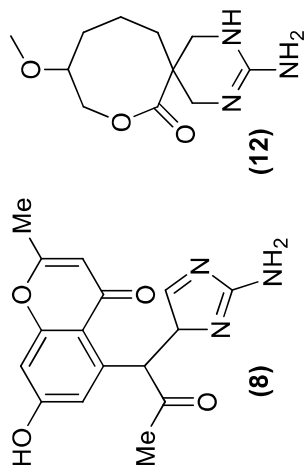
Tabela 2 - Compostos isolados das flores de espécies de *Cassia* e suas respectivas atividades biológicas. (continua).

| Espécie de Cassia | Compostos isolados | Número do composto | Atividade biológica | Referência |
|--------------------------|---------------------------|---------------------------|----------------------------|---------------------------|
| | Fissiona | (25) | - | |
| | (-)-floribundona-2 | (26) | - | |
| | (-)-floribundona-1 | (27) | - | |
| | torosanina-9,10-quinona | (28) | Citotóxica | (KITANAKA e TAKIDO, 1994) |
| <i>C. torosa</i> | 5,7-diidroxicromona | (29) | - | |
| | Crisoeriol | (30) | - | |
| | Bitorosacrisona | (31) | Citotóxica | |
| | torosaflavona C | (32) | Citotóxica | (KITANAKA e TAKIDO, 1991) |
| | torasaflavona D | (33) | - | |

Nota: (-). Não identificado: Fonte: adaptado de Viegas Junior et al., (2006); Sundaramoorthy et al., (2016); Hafez et al., (2019).

Figura 6 - Estrutura química dos compostos isolados das flores de espécies de *Cassia*. (*Contiua*).

Alcaloides



Fonte: o autor

Flavona

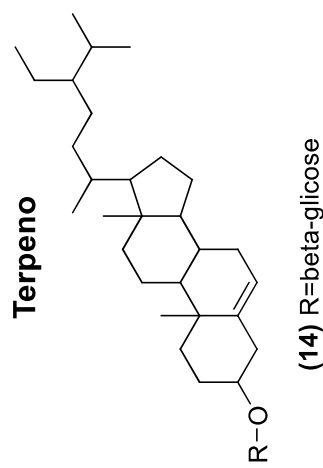
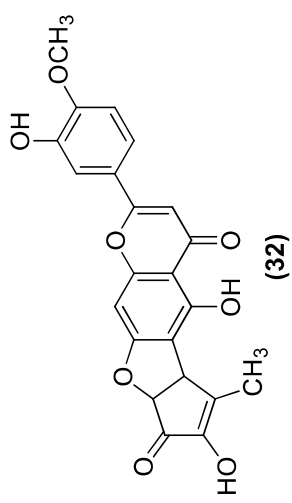
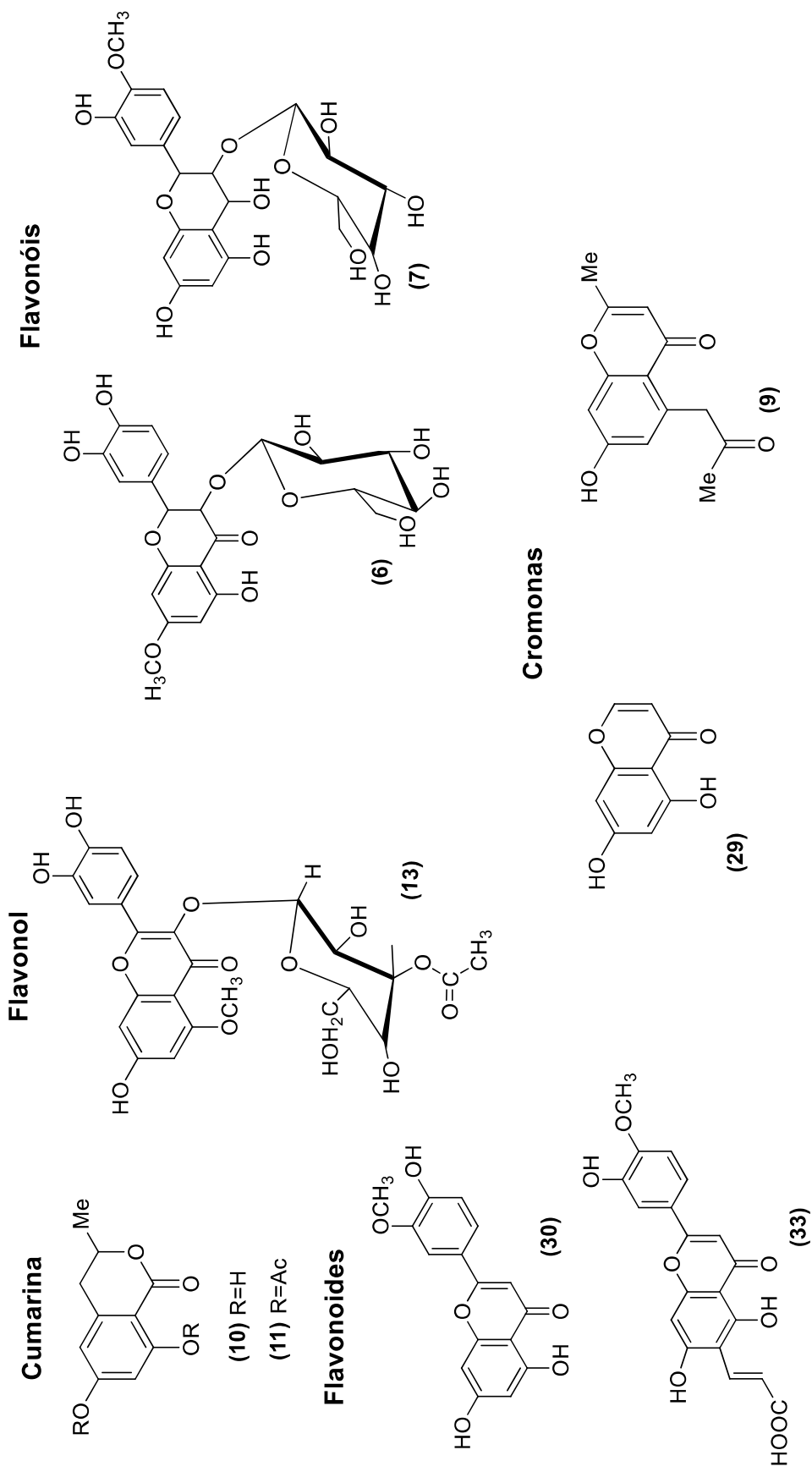


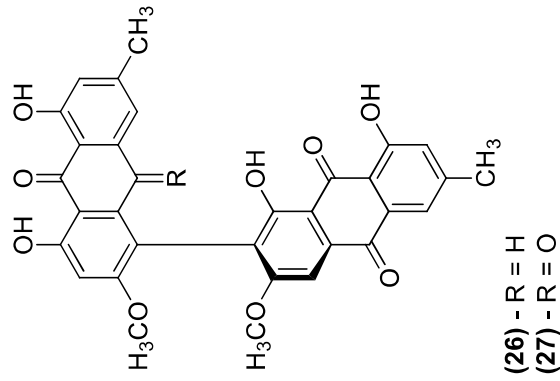
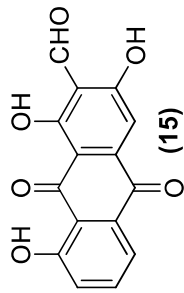
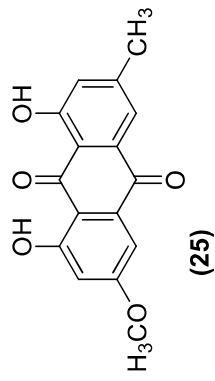
Figura 6- Estrutura química dos compostos isolados das flores de espécies de *Cassia*. (continua).



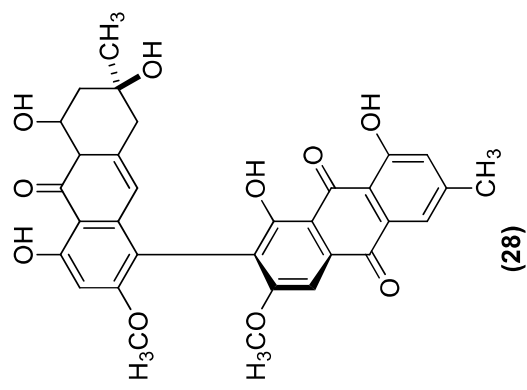
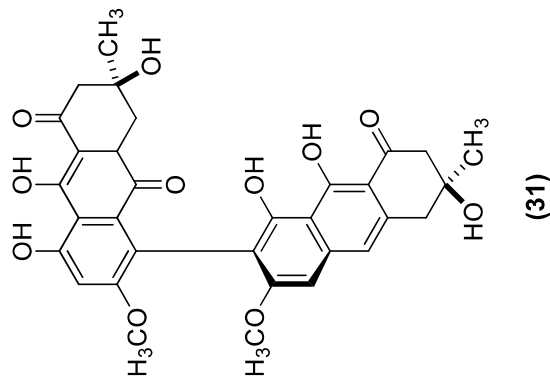
Fonte: o autor

Figura 6 - Estrutura química dos compostos isolados das flores de espécie de *Cassia*. (Conclusão).

Antranquinona



Quinonas



Fonte: o autor

1.4 *Cassia bakeriana* Craib: ASPECTOS MORFOLÓGICOS, QUÍMICOS E BIOLÓGICOS.

A planta estudada neste trabalho é a *Cassia bakeriana* Craib, pertencente à família Leguminosae-caesalpioideae, popularmente conhecida como cássia-rósea e cássia-bakeriana, originária da Tailândia, e representada na Figura 7.

Essa espécie de origem tropical e úmido, tolera as condições subtropicais de inverno ameno das regiões sul e sudeste do Brasil. Essa árvore frondosa tem como características gerais atingir 12-15 m de altura, com tronco robusto, cascas pardocinzenta e lisa (Figura 7). Possui ramagem longa recurvada e forte, dando origem a uma copa ampla e arredondada. As folhas possuem forma semi-decíduas, com 12-15 pares de folíolos opostos que se perdem na época seca, de 2-4 cm de comprimento. As flores são grandes com cinco pétalas ovaladas e róseas, formadas de novembro a janeiro. Os frutos de coloração marrom, são do tipo vagem (legume), não se abrem após a maturação, são lenhosos, cilíndricos, quebradiços, de 20-30 cm de comprimento, e com sementes castanhas de formato ovalado. A árvore é adequada para uso paisagístico, arborização de largas avenidas, e composição de vegetal de parques e grandes jardins, possuindo rápido crescimento (LORENZI et al., 2003).

Figura 7 – Fotografias de árvore e flores de *Cassia bakeriana* na Universidade Federal de Uberlândia - MG, Campus Santa Mônica.



Árvore



Árvore com flores



Flor

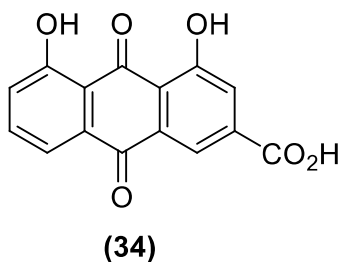
Fonte: o autor

A literatura aborda alguns estudos com a *Cassia bakeriana* em relação a seu potencial biológico. Por exemplo, Cunha e colaboradores (2013b) determinaram a composição química, a avaliação da atividade antimicrobiana e a citotoxicidade do óleo essencial da madeira, cascas e folhas. O óleo essencial das folhas e cascas apresentaram elevada atividade antimicrobiana com Concentração Inibitória Mínima (CIM) entre 62,5 e 125 $\mu\text{g mL}^{-1}$ frente a microrganismos aeróbios e anaeróbios, sendo rico em ácidos graxos. As cascas e as folhas identificaram álcoois, aldeídos e ácidos graxos como principais funções presentes. O efeito citotóxico foi maior para o óleo da madeira e menor para o óleo das folhas (93 e 153 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente).

Segundo Cunha e colaboradores (2017), a atividade antimicrobiana de extrato e frações das cascas e folhas de *C. bakeriana* foi avaliada contra bactérias aeróbias e anaeróbias da cavidade bucal. A fração diclorometano das cascas apresentou elevada atividade antibacteriana. O fracionamento bioguiado dessa fração levou ao isolamento da antraquinona Reno (do alemão "Rhein") (Figura 8).

Este composto se mostrou altamente ativo contra microrganismos anaeróbios, com valores de CIM variando entre 3,12 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Figura 8 - Estrutura química do composto Reno isolado da fração diclorometano das cascas *C. bakeriana*

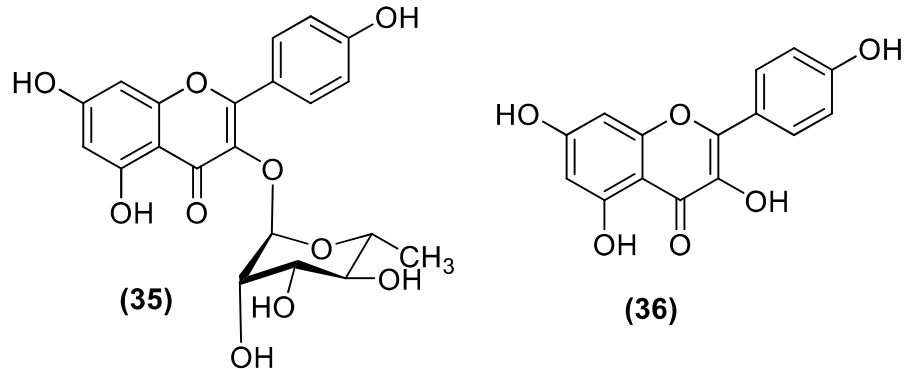


Fonte: Cunha e colaboradores (2017).

Silva e colaboradores (2019) determinaram a composição química, atividade antioxidante e capacidade inibitória α -amilase, α -glucosidase, lipase e glicação não enzimática *in vitro*, das folhas de *Cassia bakeriana*. Em sua composição química foi possível identificar diversos compostos presentes no extrato etanólico e nas partições, tais como ácidos fenólicos, flavonoides, ácidos graxos e derivados, antraquinonas, esfingolipídios, norisoprenóide megastigmano, cianina e proantocianidinas. O fracionamento da partição diclorometano (P-DF), permitiu o isolamento dos

flavonoides: canferol-3-O-ramnosídeo (**35**) e canferol (**36**) representados na (Figura 9). O canferol (**36**) apresentou alta atividade inibitória contra a α -amilase ($IC_{50} = 1,5 \pm 0,14 \mu\text{g mL}^{-1}$). Os compostos (**35**) e (**36**) mostraram inibição da glicação ($IC_{50} = 84,27 \pm 11,38$ e $64,16 \pm 1,53 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente).

Figura 9 - Compostos canferol-3-O-ramnosídeo (**35**) e canferol (**36**) isolados das folhas *C. bakeriana*



Fonte: Silva e colaboradores (2019).

2 OBJETIVO

2.1 OBJETIVO GERAL

- Estudar a composição química das flores de *Cassia bakeriana* Craib, bem como explorar o potencial antifúngico, antibacteriano, antioxidante, antiglicação, e a citotoxicidade dos extratos e partições.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Preparar o extrato hexânico e etanólico por maceração de flores coletadas e identificadas da *Cassia bakeriana*;
- Particionar o extrato etanólico por extração líquido-líquido com solventes de polaridades crescentes;
- Realizar a prospecção fitoquímica dos extratos e partições das flores;
- Determinar o teor de fenóis, proantocianidinas e flavonoides dos extratos e partições das flores;

- Identificar e quantificar por CG-EM os compostos apolares presentes na partição hexânica das flores por cromatografia gasosa;
- Identificar a composição química das partições mais ativas por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas com ionização por *electrospray* (CLAE-ESI-EM);
- Avaliar a atividade antifúngica dos extratos e partições frente espécie de *Candida* pelo método da microdiluição em caldo;
- Avaliar a atividade antibacteriana dos extratos e partições frente os microrganismos da cavidade bucal, pelo método da microdiluição em caldo;
- Avaliar a atividade antioxidante dos extratos e partições pelo método ORAC, DPPH• e FRAP;
- Avaliar o potencial inibitório de glicação dos extratos e partições;
- Avaliar a atividade citotóxica dos extratos e partições.

3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3.1 INSTRUMENTAÇÃO

- Banho de aquecimento FISATOM modelo 550;
- Balança analítica SHIMADZU modelo AUW220D;
- Balança de luz infravermelha para determinação da umidade Quimis modelo Kett FD-600;
- Evaporador rotatório IKA modelo RV 10;
- Espectrofotômetro Genesysis 10S UV-Vis;
- Liofilizador TERRONI modelo LS3000;
- Incubadora B.O.D Nova Ética modelo 411/FPD 155L;
- Lavadora ultra-sônica modelo USC-750 Unique;

3.2 SOLVENTES E REAGENTES

Solventes utilizados para a extração e cromatografia: hexano, etanol, acetato de etila, *n*-butanol, diclorometano e metanol foram de marcas diversas: Synth, Vetec,

Merck, Neon. O hexano, etanol e acetato de etila foram destilados para maior grau de pureza.

Anidrido acético e os ácidos acético, sulfúrico e fórmico também foram de marcas diversas: Synth, Merck e Vetec;

Reagentes químicos: nitrato de bismuto (Isofar), iodeto de potássio (Chemicals), difenilboriloxietilamina NP (Sigma-Aldrich). O polietilenoglicol 400 (PEG-400), o cloreto de alumínio, e o sulfato cérico pentahidratado foram da marca Vetec; Metanol HPLC usado foi da Sigma- Aldrich e J. T. Baker;

3.3 COLETA E PREPARO DO MATERIAL VEGETAL

As flores de *Cassia bakeriana* foram coletadas nos meses de outubro e novembro de 2019, dentro do *campus* Santa Mônica da 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 UFU pelos Professores Dr. Glein Monteiro de Araújo e Dr. Ivan Schiavini. A exsicata do espécime foi depositada no Herbário da UFU, *campus* Umuarama, com o número 63584.

Posteriormente a coleta, as flores foram levadas para Núcleo de Pesquisa em PNs (NUPPeN), no Instituto de Química da UFU, e colocadas em uma incubadora B.O.D. 441 D, com circulação de ar a 35-40 °C, para secagem. O teor de umidade das flores foi determinado pelo método gravimétrico, por meio de uma balança de luz infravermelha. Cerca de 1,0 g das flores foi monitorada a uma temperatura de 105 °C, por 15 min, até que o teor de umidade permanecesse constante. As flores foram retiradas da incubadora quando apresentaram 7,4 % de umidade, e em seguida foram trituradas. O preparo do material vegetal está apresentado na Figura 10.

Figura 10 – Fotografias do preparo do material vegetal.



Fonte: o autor

3.4 PREPARO DOS EXTRATO BRUTO E EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO

O extrato das flores foi obtido através do processo de maceração em que 604,6 g das flores trituradas foram colocadas em contato com o hexano (2,5 L), utilizando um garrafão de 10 L por 48 horas a temperatura ambiente e protegido da luz. (Figura 11a). Após esse tempo, o solvente foi filtrado e concentrado utilizando um evaporador rotatório a pressão reduzida e banho a 40 °C. O procedimento foi realizado cinco vezes com o solvente hexano e obtido o extrato hexânico das flores (EHF). Posteriormente, foi obtido o extrato etanólico (EEF), adicionando-se 2,5 L de etanol ao remanescente da extração em hexano, e repetido o mesmo procedimento por cinco vezes. Após a remoção dos solventes, foi obtido o residual etanólico das flores e o extrato etanólico das flores (EEF), que posteriormente foi congelado e liofilizado para remoção de água. A massa obtida do extrato etanólico das flores (EEF) é de (163,2 g).

Para a realização da extração líquido-líquido com solventes de polaridade crescente, foram pesadas 40 g do EEF seco, e solubilizadas em 100 mL (9OHCH₃ metanol: 1H₂O água), filtrado e adicionadas em um funil de separação. Em seguida, foi colocado hexano (5 x 200 mL), a mistura agitada e a fase hexânica foi extraída e rotoevaporada até obter a partição hexânica das flores (P-HF) (Figura 11b).

Posteriormente adicionou-se diclorometano (5 x 200 mL) ao remanescente da partição em hexano. Em seguida, o solvente foi rotoevaporado, obtendo-se a partição diclorometano das flores (P-DF).

Logo após, foi obtida a partição acetato de etila das flores (P-AEF) adicionando-se acetato de etila (5 x 200 mL) ao funil de separação onde estava contido o remanescente da partição diclorometano, seguindo o mesmo procedimento anterior. O remanescente da partição em acetato de etila foi submetida a uma nova extração com *n*-butanol (5 x 200 mL), em que o procedimento foi transcrito como o anterior, até obter a partição *n*-butanol das flores (P-BF) e o ressuspendido em água (partição água). A partição água das flores (P-AF) foi a última a ser obtida, onde ressuspendido em água foi rotaevaporado até obter o mesmo à pressão reduzida, banho a 40 °C. A Figura 11 apresenta a primeira extração (EHF) e líquido-líquido (P-HF).

Figura 11 – Fotografias da extração hexânica (EHF) das flores (a); obtenção da partição hexânica (P-HF) das flores de *Cassia bakeriana*(b).



Extração EHF (a)

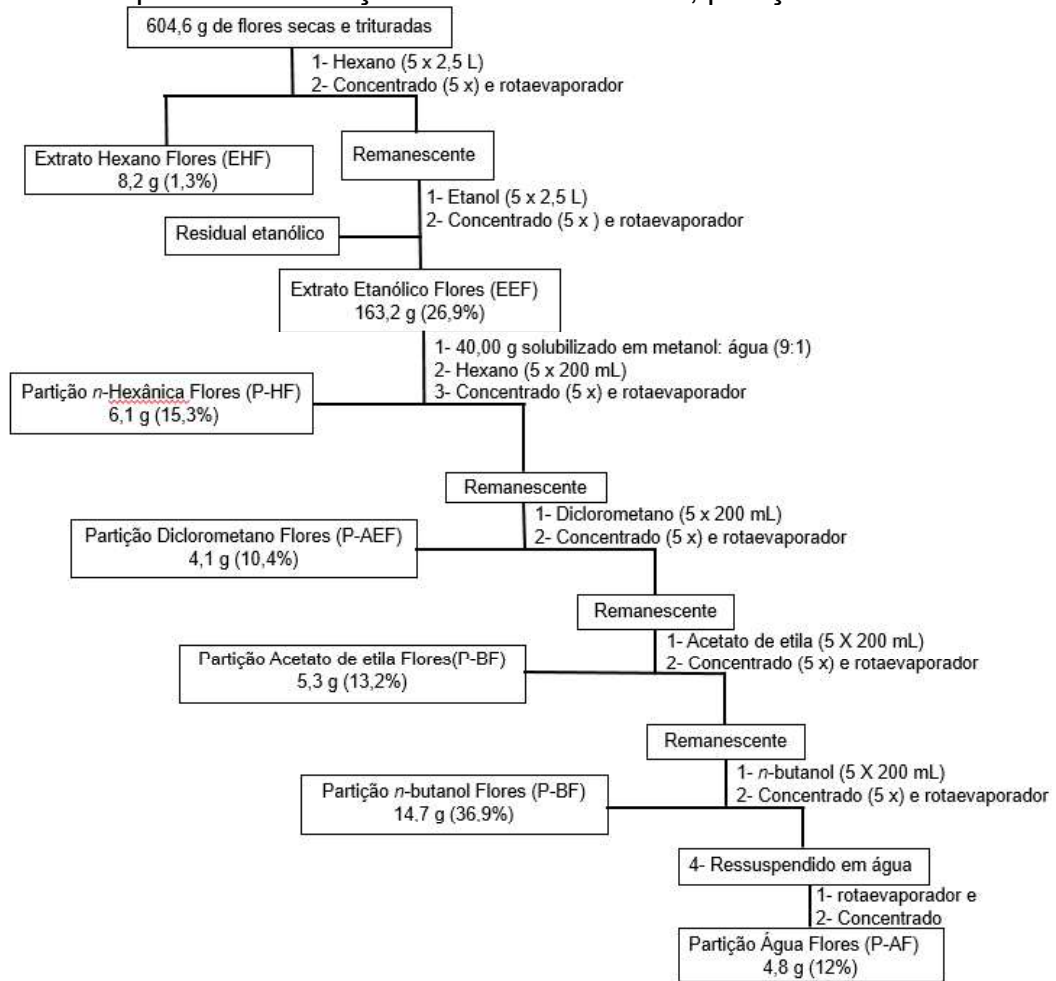


Partição Líquido-Líquido P-HF (b)

Fonte: o autor

O Esquema na Figura 12 apresenta o procedimento da preparação dos extratos e das partições.

Figura 12 – Esquema da obtenção dos extratos brutos, partições e rendimentos.



Fonte: o autor.

3.5 PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA DOS EXTRATOS E PARTIÇÕES

Para análise das classes de compostos presentes nos extratos e partições, estes foram solubilizados em metanol com concentração 1 mg/mL e aplicadas em placas comerciais de **CCD**. Foram utilizados 3 sistemas de fases móvel para desenvolvimento das placas cromatográficas. A fase móvel 1 - hexano: acetato de etila (4:1) - utilizada para o extrato hexânico e partição hexânica; a fase móvel 2 - ácido fórmico: acetato de etila: metanol, nas proporções (0,8:8:1) – utilizada para o, extrato etanólico, partições *n*-butanol, acetato de etila, diclorometano. A fase móvel 3 – acetato de etila: metanol: ácido fórmico (5:1:0,5) – utilizada para a partição água. Abaixo é descrita a metodologia proposta por Wagner; Bladt (1996) utilizando os seguintes reveladores:

a) Detecção de alcaloides:

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

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

b) Detecção de flavonoides:

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

Reagente Cloreto de alumínio: foi preparada uma solução contendo $AlCl_3$ 1% ($m v^{-1}$) em metanol. A placa CCD foi borrifada com o revelador e observada na câmara de luz UV.

c) Detecção de antraquinonas:

Solução alcoólica de KOH, (reagente Borträger): hidróxido de potássio 5% em etanol. As antraquinonas revelam-se com coloração vermelhas. Na câmara de luz UV é possível identificar antronas (amarela) e cumarinas (azul).

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

Solução de Sulfato Cérico: 2,1 g de $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ foram dissolvidos em 15 mL de H_2SO_4 concentrado e adicionado a 800 mL de água (CHAVES, 2001). A mistura foi aplicada na placa e os compostos revelados apresentaram coloração marrom.

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

Reagente de Vanilina Sulfúrica: foram preparadas uma solução A contendo vanilina 1% em etanol (m/v) e uma solução B contendo ácido sulfúrico 5% em etanol (v/v). A placa CCD foi borrifada com a solução A seguida da B e aquecida a 100 °C, por 5 a 10 min, podendo observar os compostos revelados de diversas cores. Trata-se de um revelador geral, mas muito utilizado para detecção de triterpenos.

3.6 ANÁLISE DA PARTIÇÃO HEXÂNICA DAS FLORES DE *Cassia bakeriana* POR CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS (CG-EM)

A P-HF foi dissolvida em diclorometano (5 mg m L^{-1}), filtrados em cartucho Sep-Pak de sílica C18. Desta solução foi retirado 1 μL , o qual foi injetado no CG-EM. As análises foram realizadas em equipamento CG-EM equipado com coluna capilar OV-5 serial 121345, d.i. 0,25 mm THICKNESS: 0,25 μm , 30 m. Foi usado gás Hélio como carreador, a fluxo constante de $1,02 \text{ mL min}^{-1}$; a temperatura do injetor foi de 246 °C (modo Split 1:20 para as frações e 1:5 para os extratos em *n*-hexano); a temperatura do detector de 220 °C; a temperatura do injetor foi programada para aquecer de 60 a 246 °C com velocidade de $3 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$ mantendo-se nessa temperatura por 38 minutos. O tempo total de análise foi de 100 minutos. A energia do feixe da fonte de ionização por elétrons foi de 70 eV. Assim, os espectros de massas foram analisados pelo índice de similaridade (acima de 88%) resultante da comparação entre os espectros de massas mostrados pelas bibliotecas do software (WILEY, NIST e SHIMATSU) e espectro de massa do composto analisado.

Posteriormente, foi realizado o cálculo de parâmetro chamando de índice aritmético (IA) que correlaciona o tempo de retenção do composto analisado de alcanos. Nesse mesmo propósito é considerado o número de carbonos dos alcanos que apresentam tempos de retenção próximo ao do composto analisado. O IA foi calculado através da (1), utilizando o tempo de retenção do composto analisado e dos padrões previamente de alcanos injetados utilizando a mesma metodologia. Onde: C é o tempo de retenção em min; C é o número de carbonos; x é composto analisado; (P_z) é o alcano apresentam o tempo de retenção anterior a x ; P_{z+1} é o alcano com tempo de retenção posterior a x . No apêndice A se encontram os tempos de retenção dos padrões de alcanos (C₈-C₃₀) empregados nos cálculos do IAs.

$$IA(x) = 100C(P_z) + 100 \left[\left(\frac{T_R(x) - T_R(P_z)}{T_R(P_{z+1}) - T_R(P_z)} \right) \right] \quad (1)$$

O IA calculado é comparado com o de compostos isolados, tabelados por Adams, (2017). Além disso, o IA calculado também foi comparado com a biblioteca NIST (2014), nas mesmas condições utilizadas para a análise em CG-EM, com diferença máxima de 15 unidades.

3.7 ANÁLISE POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS (CLAE-EM-IES)

O EEF, e as demais P-HF, P-DF, P-AEF, P-BF e P-AF das flores de *Cassia bakeriana* foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência a espectrometria de massa com fonte de ionização por electrospray (CLAE-EM-IES), destacando-se todas as partições P-HF, P-DF, P-AEF, P-BF e P-AF pois foram as partições mais ativas nas análises biológicas realizadas. As análises de CLAE-EM-IES EM foram realizadas no Laboratório de Nanobiotecnologia do Instituto de Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia (IGEB-UFU), utilizando em um cromatógrafo líquido (marca Agilent modelo Infinity 1260) acoplado a um espectrômetro de massas de alta resolução, tipo Q-TOF, da marca Agilent® e modelo 6520 B, com fonte de ionização por electrospray (IES). Os parâmetros cromatográficos para análise dos extratos e partições foram: coluna Agilent modelo Poroshell C18, com 2,1 mm de diâmetro interno; 10 cm de comprimento, partículas de

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

As análises de espectrometria de massas sequencial (EM/EM) foram realizadas em diferentes energias de colisões para os modos negativo e positivo para cada íon precursor. A partir das análises dos fragmentos e da massa de alta resolução foi possível propor a estrutura química dos compostos das amostras bioativas. A fórmula molecular proposta de cada composto foi selecionada de acordo com uma lista sugerida pelo Software MassHunter®, seguindo a mais baixa diferença entre a massa experimental e a massa exata erro em ppm, (2), a equivalência de insaturações e a regra do nitrogênio. A confirmação das possíveis estruturas químicas foi proposta de acordo com outros trabalhos na literatura, além da biblioteca Metlin e bancos de dados (Pubchem), analisando sistemas de solventes, tempos de retenção e espectro de massas.

$$E_{\text{ppm}} = \frac{\text{massa experimental} - \text{massa exata}}{\text{massa exata}} \times 10^6 \quad (2)$$

3.8 QUANTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS POLIFENÓLICOS

3.8.1 Determinação do teor de fenóis totais

Utilizando-se a metodologia proposta por Moraes e colaboradores (2008), o teor de fenóis totais foi determinado para os extratos brutos e partições das flores. Inicialmente, em um tubo de ensaio, foram adicionados 0,5 mL de solução metanólica dos extratos brutos e partições (CA = 150 $\mu\text{g mL}^{-1}$), com 2,5 mL de solução aquosa do reagente de Folin-Ciocalteu 10% (v v⁻¹) e 2,0 mL de uma solução recém preparada de carbonato de sódio 7,5% (m v⁻¹). A mistura foi mantida por 5 min, em banho a 50 °C. Todas as absorvâncias foram medidas em um espectrofotômetro, em 760 nm, e o experimento foi realizado em triplicata. Para obtenção do branco, foi utilizado 0,5 mL de metanol e 2,5 mL da solução aquosa do reagente Folin-Ciocalteu mais 2,0 mL da

solução de carbonato de sódio. O resultado foi expresso em mg de equivalente de ácido gálico (EAG) por grama de extrato, que foi obtido e calculado conforme a Equação (3).

$$EAG = \frac{CAG}{CA} * 10^3 \quad (3)$$

Em que;

CAG - a concentração em equivalentes de ácido gálico em $\mu\text{g mL}^{-1}$,

CA - a concentração da amostra em $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Para obtenção da concentração da amostra em função do ácido gálico, uma solução metanólica de ácido gálico foi reagido com o Folin-Ciocalteu em variadas concentrações (5 a 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$), com 0,5 mL da solução metanólica de ácido gálico, 2,5 mL da solução aquosa do reagente de Folin-Ciocalteu e 2,0 mL da solução de carbonato de sódio e assim, construída uma curva analítica da absorbância obtida versus concentração de ácido gálico ($y=0,0161x + 0,0799$) utilizada. O coeficiente da reta foi determinado por $R^2 = 0,995$. A partir dessa equação da reta obteve-se o valor da concentração (x) em equivalente de ácido gálico (CAG) expresso em mg mL^{-1} e obtida (y é absorbância medida).

3.8.2 Determinação do teor de proantocianidinas

Utilizando-se a metodologia proposta por Morais e colaboradores (2008), o teor de proantocianidinas foi determinado para os extratos brutos e partições das flores. Inicialmente, em um tubo de ensaio, foram adicionados 2,0 mL de solução metanólica dos extratos brutos e partições ($CA = 150 \mu\text{g mL}^{-1}$) e 3,0 mL de solução de vanilina (10 mg mL^{-1}) em ácido sulfúrico 70% (m mL^{-1}). A mistura foi mantida por 15 min em banho, a 40 °C. Todas as absorbâncias foram medidas em um espectrofotômetro em 500 nm e o experimento foi realizado em triplicata. Para obtenção do branco, foi utilizando 2,0 mL de metanol e 3,0 mL da solução de vanilina. O resultado foi expresso em mg de equivalente de catequina (EC) por grama de extrato e calculado conforme a Equação (4).

$$EC = \frac{CC}{CA} * 10^3 \quad (4)$$

Em que,

CC - a concentração em equivalentes de catequina em $\mu\text{g mL}^{-1}$,

CA - a concentração da amostra em $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Para obtenção da concentração da amostra em função da catequina, uma solução metanólica de catequina foi reagida com a solução de vanilina sulfúrica em variadas concentrações (1 a 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$), com 2,0 mL da solução metanólica de catequina e 3,0 mL da solução da solução de vanilina e assim, construída uma curva analítica da absorbância obtida versus concentração de catequina ($y=0,0342x + 0,1067$) utilizada. O coeficiente da reta foi determinado por $R^2 = 0,997$. A partir dessa equação da reta obteve-se o valor da concentração (x) em equivalente de catequina (CC) expresso em $\mu\text{g mL}^{-1}$ e (y é absorbância medida).

3.8.3 Determinação de teor de flavonoides

Utilizando-se a metodologia proposta por Woisky; Salatino (1998); Aryal e colaboradores (2019), o teor de flavonoides foi determinado para os extratos brutos e partições das flores. Inicialmente, em um tubo de ensaio foram adicionados 2,0 mL de solução em metanol dos extratos brutos e partições ($CA = 150 \mu\text{g mL}^{-1}$), 1,0 mL de solução em metanol de AlCl_3 5% (m v^{-1}) e 2,0 mL de metanol. A mistura foi deixada em repouso por 30 min, a temperatura ambiente. Todas as absorbâncias foram medidas em um espectrofotômetro em 425 nm e o experimento foi realizada em triplicata. Para obtenção do branco, o mesmo procedimento foi realizado substituído a amostra por metanol. O resultado foi expresso em mg de equivalente de quercetina (EQ) por grama de extrato, obtido e calculado conforme a Equação (5).

$$EQ = \frac{CQ}{CA} * 10^3 \quad (5)$$

Em que,

CQ - a concentração em equivalentes de quercetina em $\mu\text{g mL}^{-1}$,
 CA - a concentração da amostra em $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Para obtenção da concentração da amostra em função da quercetina, uma solução metanólica de quercetina foi reagida com uma solução em metanol de AlCl_3 5% (m v⁻¹), em variadas concentrações (1 a 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$), contendo 2,0 mL de quercetina e 4,0 mL de metanol e 1,0 mL de solução em metanol de AlCl_3 5% (m v⁻¹). Em seguida, foi construída uma curva analítica da absorbância obtida versus a concentração de quercetina ($y=0,0281x + 0,0373$, $R^2 = 0,988$). A partir dessa equação da reta obteve-se o valor da concentração (x), em equivalente de quercetina (CQ) expresso em $\mu\text{g mL}^{-1}$ (y é absorbância medida).

3.9 DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE

3.9.1 Método do sequestro do DPPH•

As análises da atividade antioxidante de *C. bakeriana* foram realizadas no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular do Instituto de Biotecnologia da UFU, com a colaboração do professor Dr. Foued Salmen Espindola. Este procedimento foi realizado segundo a metodologia proposta por Yildirim et al., (2001) modificado, utilizando o radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH•). Os extratos e partições foram diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO). A reação foi iniciada adicionando-se 250 μL dos extratos e partições, solubilizados em 750 μL de solução metanólica do radical DPPH (0,06 mmol L⁻¹). A mistura foi incubada a 30° C, na ausência de luz, durante 20 min. Através de um espectrofotômetro (Molecular Devices, Menlo Park, CA, EUA), foi possível medir a redução da absorbância da mistura em 517 nm. O controle foi realizado substituindo o extrato e partições por metanol. O branco foi realizado substituindo a solução do radical DPPH por metanol. O ácido ascórbico foi usado como controle positivo. Para calcular a porcentagem de atividade antioxidante (AA) que corresponde a porcentagem dos radicais DPPH eliminados, foi utilizado a Equação (6).

$$\text{Atividade antioxidante (\%)} = \frac{\text{Abs}_{\text{controle}} - (\text{Abs}_{\text{amostra}} - \text{Abs}_{\text{branco}})}{\text{Abs}_{\text{controle}}} \times 100 \quad (6)$$

Onde: $Abs_{controle}$ é a absorvância da solução metanólica do radical DPPH, $Abs_{amostra}$ é a absorvância da mistura (DPPH• + amostra), Abs_{branco} é a absorvância da amostra em metanol. O ensaio foi realizado em duplicata e a concentração inibitória (IC_{50}) (do inglês “*inhibitory concentration*”), que é a concentração de amostra necessária para sequestrar 50% do DPPH•, foi determinada com diferentes concentrações dos extratos e partições.

3.9.2 Método da capacidade de absorvância de radical de oxigênio ORAC

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

3.9.3 Método do poder antioxidante redutor férrico (FRAP)

Para realização do experimento, preparou-se uma solução tampão acetato de sódio (pH= 3,6) e uma solução de cloreto férrico 20 mmol L⁻¹. Também foi preparado uma solução de HCl 40 mmol L⁻¹, e uma solução de 2,4,6-tris(2-piridil)-s-traizina (TPTZ) 10 mmol L⁻¹ em HCl. O preparo do reagente de FRAP é realizado misturando-se na proporção 10: 1: 1 as soluções tampão acetato, TPTZ ácido e cloreto férrico. Para a quantificação se faz necessário uma curva analítica que foi realizada com Trolox. Ácido ascórbico foi usado como controle positivo. Um branco foi realizado com as amostras / controles para reduzir a contribuição da cor para a absorbância.

Na microplaca transparente reagiram-se 10 µL amostra, 1 mg mL⁻¹ (ou Trolox em diferentes concentrações conhecidas) + 25 µL água + 250 µL do reagente de FRAP e, essa mistura foi deixada incubada por 6 minutos, a 37 °C. A absorbância foi medida a 593 nm no espectrofotômetro e a atividade antioxidante foi determinada usando uma curva analítica, em µmol de equivalente de trolox por grama de extrato (µmol ET g⁻¹) (ZHONG; SHAHIDI, 2015).

4.10 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIGLICAÇÃO

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

$$I.G. (\%) = 100 - \left[\frac{(IF \text{ amostra} - IF \text{ branco})}{(IF \text{ controle} - IF \text{ branco})} * 100 \right] \quad (7)$$

Sendo: *IF* amostra a intensidade de fluorescência na presença dos extratos e partições, *IF* branco a intensidade de fluorescência na ausência de frutose, extratos e partições, e *IF* controle a intensidade de fluorescência na ausência de extratos e partições. Vale ressaltar que todas as análises foram realizadas em duplicata para determinação da IC₅₀.

4.11 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Para os ensaios da atividade antimicrobiana dos extratos brutos e partições foram determinadas de acordo com as Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM). As análises foram realizadas no Laboratório de Ensaios Antimicrobianos (LEA) da Universidade Federal de Uberlândia *campus* Umuarama, com a colaboração do Prof. Dr. Carlos Henrique Gomes Martins, seguindo o método da microdiluição em caldo contra leveduras de diferentes espécies de *Candida*, e contra bactérias bucais aeróbias e anaeróbias, utilizando cepas padrão provenientes da “*American Type Culture Collection*” (ATCC).

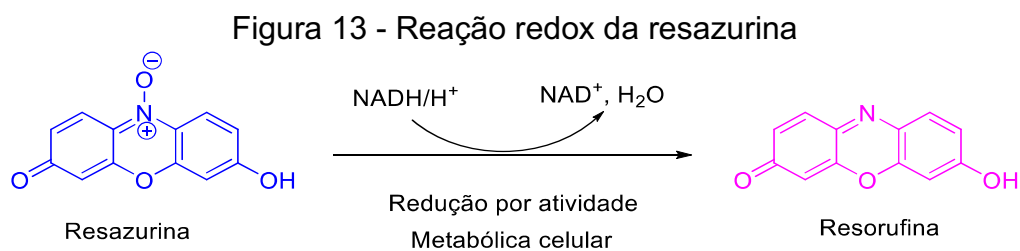
4.11.1 Atividade antifúngica dos extratos e partições frente a leveduras da *Candida*

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

Inicialmente soluções de estoque foram preparadas, dissolvendo os extratos e partições em dimetilsulfóxido (DMSO), na concentração de 192000 µg mL⁻¹. Em seguida, foram realizadas diluições com as soluções de estoque, usando o caldo “*Roswell Park Memorial Institute*” (RPMI) 1640 (meio de cultura), tamponado em pH 7,2 com ácido 3-N-morfolinopropanosulfônico (MOPS), até a concentração de 12000 µg mL⁻¹. A determinação da CIM foi realizada em placas de microdiluição com 96 poços, onde foram feitas as diluições seriadas com concentrações de 3000 a 1,46 µg mL⁻¹ dos extratos e partições. Cada poço recebeu 100,0 µL da suspensão do inóculo,

sendo o volume final de cada poço de 200 μL . Para o controle positivo (Anfotericina B) foi realizado o mesmo procedimento com concentrações entre 0,031 e 16,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$. O método espectrofotométrico foi utilizado para preparar o inóculo à 530 nm, e as medidas comparadas com a escala 0,5 Mc Farland para obter uma concentração de 6,0. 10^6 UFC (Unidades formadoras de colônias). Diluições em caldo RPMI foram realizadas até que a concentração final testada em cada poço foi de 1,2. 10^3 UFC mL^{-1} (Unidades formadoras de colônias por mL). Controles de esterilidade do meio de cultura (caldo RPMI 1640), do inóculo, dos extratos, partições e do solvente (DMSO) também foram realizados. O controle do solvente foi preparado nas concentrações de 1 % a 5 % em v^{-1} e não influenciou no crescimento das leveduras. Para validação dos ensaios, o controle positivo anfotericina B foi testado frente às cepas de referência *Candida krusei* (ATCC6258) e *Candida parapsilosis* (ATCC22019), com concentrações entre 0,25 a 2,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente. Valores de CIM dentro deste intervalo para estas leveduras validam a metodologia e os resultados para as demais leveduras, segundo o CLSI M27-A3 (CLSI, 2008). Todos os testes foram realizados em triplicatas. Após a montagem das microplacas, essas foram incubadas por 48 h, a 37 °C e, posteriormente, foi determinada a CIM utilizando o revelador resazurina (0,02 % $m v^{-1}$). A leitura foi realizada a partir da mudança de coloração da resazurina (de coloração azul para coloração vermelha), se houver crescimento das leveduras. A CIM correspondeu a menor concentração dos extratos e partições capaz de inibir o crescimento das leveduras.

A resazurina é um revelador redox que, irreversivelmente, muda coloração na presença de atividade metabólica celular (de azul para rosa). Essa mudança também é estrutural em nível molecular (ELSHIKH et al., 2016; MATSUURA et al., 2019), como ilustrado na Figura 13.



Fonte: adaptada de Matsuura e colaboradores (2019)

4.11.2 Atividade antibacteriana dos extratos e partições frente as bactérias bucais anaeróbicas e aeróbicas

As seguintes cepas padrões proveniente da coleção “*American Type Culture Collection*” (ATCC) foram testados nos ensaios antibacterianos: bactérias anaeróbicas *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 33277); *Fusobacterium nucleatum*. (ATCC 25586), *Actinomyces naeslundii* (ATCC 19039), e bactérias aeróbicas *Streptococcus mutans* (ATCC 25175), *Streptococcus mitis* (ATCC 49456), *Streptococcus sanguinis* (ATCC 10556) e *Agreggatibacter actinomycetemcomitans* (ATCC 43717).

A atividade antibacteriana foi determinada utilizando o Método da Microdiluição em Caldo, de acordo com o *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) para os microrganismos anaeróbios (CLSI, 2012a) e aeróbios (CLSI, 2012b). A análise da atividade antibacteriana foi realizada em microplacas contendo 96 poços. O inóculo, o caldo, e a amostra foram adicionados em cada poço, obtendo-se um volume final de 100,0 μL para as bactérias aeróbicas e 200,0 μL para as anaeróbicas. O volume de inóculo adicionado nos orifícios da microplaca foi de 20,0 μL para os testes com bactérias aeróbicas, e 40,0 μL para os testes com bactérias anaeróbicas. O método espectrofotométrico foi utilizado para preparar o inóculo à 625 nm, e as medidas comparadas com a escala 0,5 Mc Farland. A concentração final testada para cada microrganismo foi de 5,0. 10^5 UFC mL^{-1} (Unidades formadoras de colônias por mL). As concentrações das amostras testadas frente às bactérias aeróbias e anaeróbias foram de 0,195 $\mu\text{g mL}^{-1}$ a 400,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$. As concentrações do controle positivo testado para as aeróbias (dicloridrato de clorexidina) foram de 0,115 $\mu\text{g mL}^{-1}$ a 59,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Metronidazol foi utilizado como controle positivo no intervalo de concentrações 0,0115 $\mu\text{g mL}^{-1}$ a 5,9 $\mu\text{g mL}^{-1}$ frente as cepas *Bacteroides fragilis* (ATCC 25285) e cepas *Bacteroides thetaiotaomicron* (ATCC 2974), para validação do método. Como controle negativo foi utilizado o dimetilsulfóxido (DMSO) (concentração de 5,0% a 1,0% v/v). Foram ainda realizados os controles de esterilidade do controle positivo, do meio de cultura e das amostras.

Para os microrganismos aeróbios, as microplacas foram incubadas em microaerofilia pelo sistema chama/vela, a 37 °C, por 24 h. Após o período de incubação, foram adicionados 30,0 μL do indicador resazurina (0,01% m/v) em cada orifício. Os microrganismos anaeróbios foram incubados por 72 h, em câmara de

anaerobiose (atmosfera contendo: 5 - 10% de H₂, 10% CO₂, 80-85% N₂), a 36 °C, sendo revelado com o mesmo indicador. A coloração azul resultante após a adição do indicador representa a ausência de crescimento bacteriano, enquanto a coloração rosa indica a presença do crescimento bacteriano. Todos os testes foram realizados em triplicatas para segurança e precisão dos resultados.

4.12. DETERMINAÇÃO DA CITOTOXICIDADE E ÍNDICE DE SELETIVIDADE

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

A cultura celular Vero ATCC CCL 81 (fibroblastos de rim de macaco verde africano) foi mantida em meio DMEM suplementado, a 37 °C, em atmosfera úmida com 5% de CO₂. Preparou-se uma solução contendo 1 x 10⁶ células em 10,0 mL de meio DMEM suplementado. As amostras dos extratos e partições foram dissolvidas em metanol e diluídas com DMEM suplementado para formar uma solução estoque de 640 µg mL⁻¹. A concentração final de metanol da solução estoque não excedeu 3% (v v⁻¹). Para permitir que as células aderissem ao fundo do poço da microplaca, 100 µL de solução de células foram transferidos para cada poço e incubados por 6 h, a 37 °C, em uma atmosfera úmida com 5% de CO₂ em ar. Posteriormente, o meio de cultura de cada poço foi retirado e as soluções dos extratos e partições foram adicionadas nas concentrações testadas (1024 µg mL⁻¹ a 4 µg mL⁻¹). O volume final de cada poço foi de 100 µL e a quantidade de células presentes em cada poço foi de 1 x 10⁴. Após preparada, a placa foi incubada por 48 horas, a 37 °C, em atmosfera úmida com 5% de CO₂ em ar. Em seguida, 10 µL de uma solução de resazurina (3 mM) em tampão fosfato-salino (PBS) foram adicionados (ROLÓN et al., 2006). Mais uma vez, a placa foi incubada nas mesmas condições durante 24 horas, e os valores de absorbância foram medidos a 595 nm num espectrofotômetro de microplacas. O controle positivo utilizado foi a anfotericina B. O ensaio foi realizado em triplicata.

A viabilidade celular foi calculada com valores de absorvância em relação ao controle de crescimento. Um gráfico dose-resposta com regressão não-linear foi construído para o cálculo da concentração citotóxica (CC_{50}), que é a concentração que representa 50% de viabilidade celular (PILLAY et al., 2007).

A partir dos valores de CC_{50} e dos valores de IC_{50} (ou CIM) obtidos nas atividades biológicas, foi possível calcular o Índice de Seletividade (IS) de cada amostra, através da Equação (8) (CASE et al., 2006).

$$IS = \log \frac{CC_{50} \text{ (amostra)}}{IC_{50} \text{ ou CIM (amostra)}} \quad (8)$$

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO E RENDIMENTO DOS EXTRATOS

Os extratos das flores foram obtidos por meio da maceração de 604,6 g de flores, em temperatura ambiente e pressão atmosférica. Acredita-se que nessas condições as estruturas dos compostos sejam preservadas, sem alguma interferência externa. O extrato *n*-hexano (EHF) foi o primeiro a ser obtido, para remoção dos compostos apolares presentes nas flores, como por exemplo os ácidos graxos. Posteriormente foi obtido o extrato etanólico das flores (EEF). Pelo fato da constante dielétrica do *n*-hexano ser bem menor (1,9) do que a constante dielétrica do etanol (24,6) e, portanto, o *n*-hexano ser menos polar do que o etanol, substâncias de distintas polaridade foram extraídas nestes dois solventes (MEDEIROS; KANIS, 2010). A seguir são apresentados os rendimentos dos extratos EHF e EEF, conforme a Tabela 3.

Tabela 3 - Rendimento (%) obtido dos extratos EHF e EEF das flores de *C. bakeriana*.

| Amostra | Massa obtida de extrato (g) | Rendimento (%) |
|-----------|-----------------------------|----------------|
| Hexano | 8,2 | 1,3 |
| Etanólico | 163,2 | 26,9 |

Fonte: o autor.

De acordo com os dados da Tabela 3 o EEF apresentou maior rendimento com relação ao EHF, isso porque foi extraído em solvente com caráter polar (etanólico) extraíndo assim os compostos mais polares presentes nas flores.

Os resultados de rendimento obtidos da partição líquido-líquido, a partir do EEF (40 g), estão apresentadas na Tabela 4.

Tabela 4 - Rendimento das partições líquido-líquido realizada a partir do extrato etanólico.

| Partições | Massa obtida da partição (g) | Rendimento (%) |
|-----------|------------------------------|----------------|
| P-HF | 6,1 | 15,3 |
| P-DF | 4,1 | 10,4 |
| P-AEF | 5,3 | 13,2 |
| P-BF | 14,7 | 36,9 |
| P-AF | 4,8 | 12,0 |
| Total | 35,1 | 87,9 |

Nota: P-HF – partição *n*-hexânica das flores; P-DF – partição diclorometano das flores; P-AEF – partição acetato de etila das flores; P-BF – partição butanol das flores; P-AF – partição água das flores; Fonte: o autor

Observa-se que o P-BF apresentou maior rendimento em relação a todas as partições, indicando que a maior parte dos compostos polares do extrato estão presente nesta partição. Em contrapartida, a partição P-DF apresentou menor rendimento dentre as demais partições (10,4%). Esse baixo valor deve estar associado a polaridade intermediária que o solvente (diclorometano) exerce sobre os compostos presentes no extrato. Outro fator, pode estar relacionado a metodologia de extração utilizada, em que grande parte dos compostos apolares foram extraídas pelo EHF, influenciando a composição da P-DF.

5.2 PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA

A prospecção fitoquímica permitiu rastrear as principais classes de constituintes químicos que compõem os extratos e partições das flores de *C. bakeriana*. Os resultados estão na Tabela 5.

Tabela 5 - Prospecção fitoquímica do extrato e partições de *C. bakeriana*.

| Amostra | Flavonoides ^a | | Alcaloides ^b | | Antraquinonas, antronas, cumarinas ^c | Terpenos, esteroides, saponinas, açúcares, fenóis, taninos, flavonoides ^d | | |
|---------|--------------------------|-------------------|-------------------------|-------------|---|--|----------------|--------------------|
| | NP/PEG | AlCl ₃ | Iodo-cloro-platinado | Dragendorff | KOH | Liebermann Buchard | Sulfato Cérico | Vanilina Sulfúrica |
| EHF | - | - | - | - | - | + | + | + |
| EEF | ++ | ++ | - | - | +++ | +++ | +++ | +++ |
| P-HF | + | + | - | - | - | - | - | - |
| P-DF | +++ | - | - | - | ++ | ++ | + | ++ |
| P-AEF | +++ | - | - | - | +++ | +++ | +++ | ++ |
| P-BF | - | - | - | - | - | - | - | + |
| P-AF | - | - | - | - | - | - | - | + |

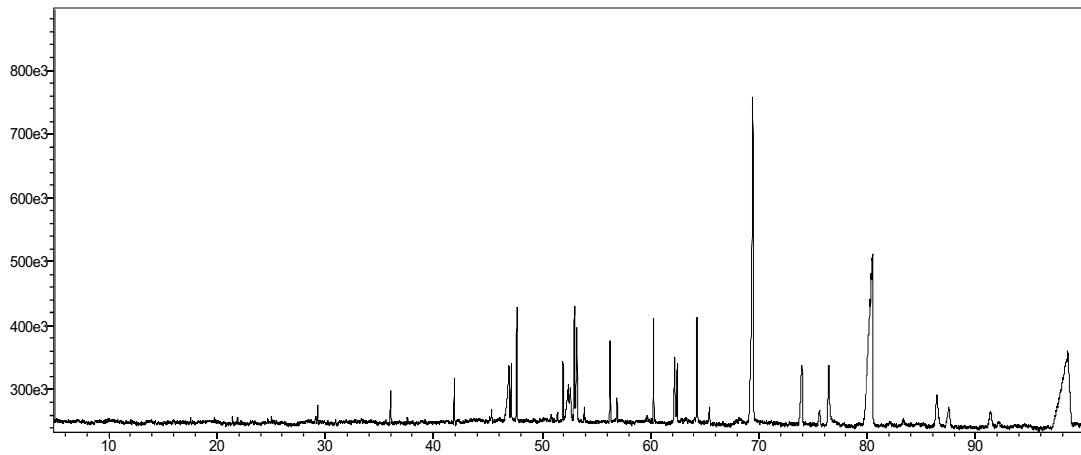
Revelador; ^aNP/PEG, AlCl₃; ^bIodo-cloro-platinado, Dragendorff; ^cKOH; ^dLiebermann-Buchard, Anisaldeído, Sulfato Cérico, Vanilina Sulfúrica; Nota: -: não identificado; ++: intenso; +++: muito intenso; Fonte: o autor.

Conforme os resultados da Tabela 5, o extrato etanólico e as partições P-DF e P-AEF indicaram, em geral, forte intensidade quando revelados com Liebermann-Buchard, NP/PEG, solução alcoólica KOH, sulfato cérico e vanilina sulfúrica, indicando a presença de terpenos, esteroides, saponinas, açúcares, fenóis, taninos, flavonoides, antraquinonas. A presença de flavonoides foi fortemente identificada no extrato EEF, e nas partições P-AEF e P-DF, no comprimento de onda 365 nm, bem como evidenciada por machas amarelas e verdes por CCD. A presença de alcaloides não foi identificada em nenhuma amostra.

5.3 IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO POR CG-EM DOS COMPOSTOS PRESENTES NA PARTIÇÃO *n*-HEXÂNICA DAS FLORES

A partição *n*-hexânica das flores foi analisada por Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM), a fim de identificar compostos mais apolares. O cromatograma da partição *n*-hexânica encontra-se na Figura 14.

Figura 14 - Cromatograma de CG-EM da partição *n*-hexânica (P-HF) das flores de *C. bakeriana*.



Fonte: o autor.

Os compostos presentes na partição P-HF das flores de *C. bakeriana* foram identificados pelo índice de similaridade (IS) resultante da comparação dos espectros de massa obtidos com a biblioteca NIST, Wiley e SHIM (Figura 14). Os índices aritméticos (IA) calculados para os compostos identificados foram comparados com a literatura (Adams, 2017). Foram identificados pela primeira vez, na partição *n*-hexânica das flores de *C. Bakeriana*, 11 compostos (Tabela 6): cinco ésteres de cadeia longa (5; 45%), dois ácidos graxos de cadeia longa (2; 18%), dois alcanos de cadeia longa (2; 18%) e dois terpenos (2; 18%). Observa-se que os ésteres, ácidos graxos, alcanos, e principalmente terpenos, foram identificados nesta amostra.

Os componentes identificados na partição *n*-hexânica das flores de *C. bakeriana* já se mostraram bastante eficazes para algumas atividades biológicas. Por exemplo, o neofitadieno, e o esqualeno e o ácido palmítico apresentaram atividades antioxidante, e antifúngica, (PSOMIADOU et al., 1999; ESTEVAM, et al., 2005; SANTOS, 2014a; PERES et al., 2012; KADOWAKI; IWAMOTO; YAMAUCHI, 2012; ELFIKY et al., 2020).

Tabela 6 - Compostos identificados por CG-EM na P-HF das flores de *C. Bakeriana* Craib.

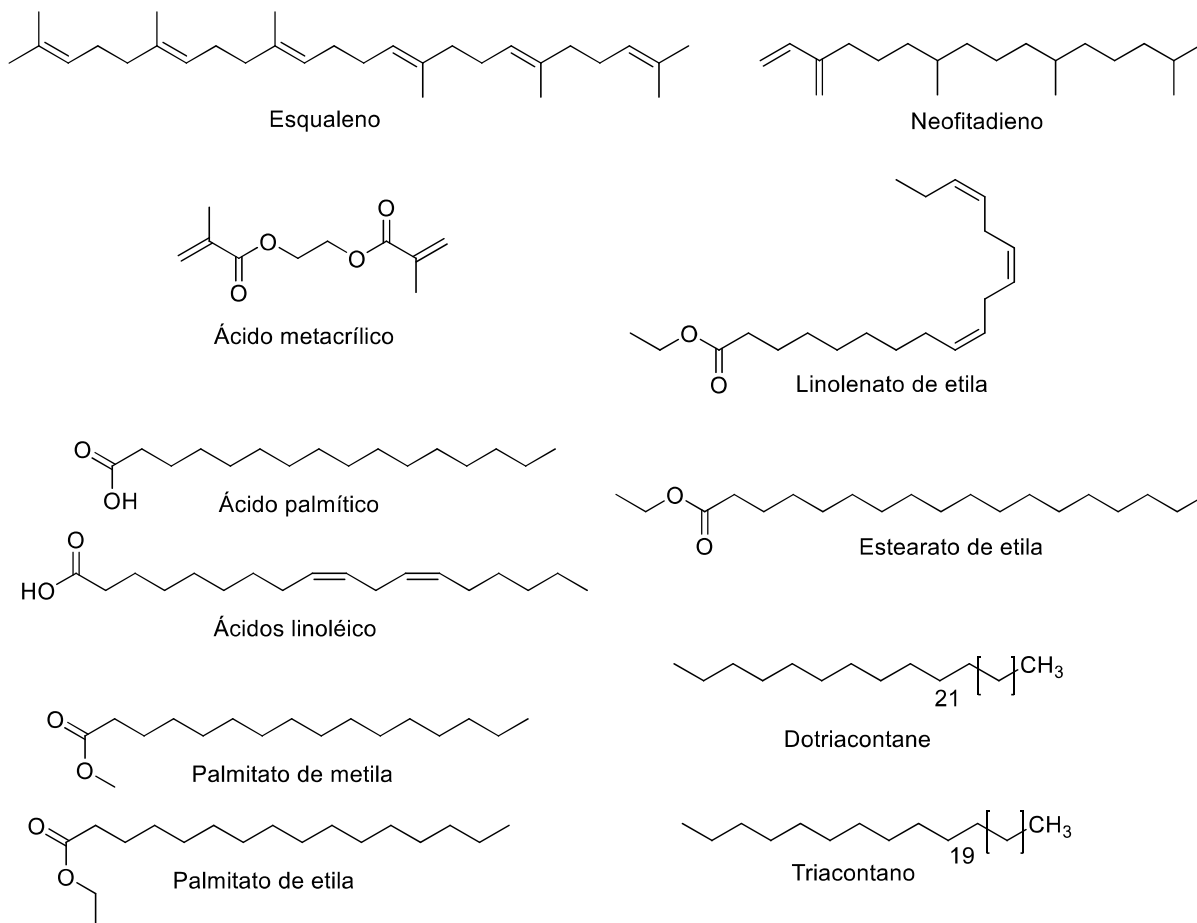
| Composto proposto | T _R (min) | IS | Al _{calculado} | AI* | Área do pico |
|-----------------------------------|----------------------|----|-------------------------|------|--------------|
| Ácido metacrílico ^d | 21.434 | 93 | 1279 | NI | 72172 |
| Palmitato de metila ^d | 45.321 | 90 | 1942 | 1927 | 100886 |
| Ácido palmítico ^e | 46.910 | 89 | 1955 | 1960 | 1069193 |
| Palmitato de etila ^d | 47.657 | 94 | 1953 | NI | 842896 |
| Neofitadieno ^g | 51.410 | 89 | 2152 | 2056 | 96082 |
| Ácido linolênico ^e | 52.398 | 92 | 2154 | 2143 | 834741 |
| Ácido linolênico ^e | 52.618 | 91 | 2168 | 2143 | 435797 |
| Linolenato de etila ^d | 52.990 | 91 | 2170 | 2150 | 981197 |
| Linoleolato de etila ^d | 53.214 | 94 | 2173 | 2150 | 877700 |
| Estearato de etila ^d | 53.877 | 92 | 2174 | NI | 131538 |
| Dotriacontano ^f | 56.896 | 87 | 2189 | 3200 | 173949 |
| Triacontano ^f | 62.448 | 93 | 2455 | NI | 550173 |
| Esqualeno ^g | 75.597 | 91 | 2869 | 2832 | 153858 |

Nota: AI*: valor teórico; IS: índice de similaridade; T_R (min): Tempo de retenção; NI: não identificado; ^désteres de cadeia longa (5; 35%), ^eácido graxo de cadeia longa (3; 21%), ^falcanos de cadeia longa (3; 21%), ^gterpenos (2; 14%); éter de cadeia longa (1; 7%) Fonte: o autor.

A composição química de alguns extratos de espécies de *Cassia* já foi determinada, como por exemplo, para a *C. alata* (OGUNWANDE et al., 2010), a *C. fistula* (TZAKOU; LOUKIS; SAID, 2007), a *C. nigricans*, (AYO et al., 2007; GEORGES et al., 2008). A maioria dos compostos encontrados nestas diferentes espécies de *Cassia* se assemelha com os encontrados na *C. bakeriana*, como o ácido palmítico, o esqueleno, o Linoleato de metila, o tetracosano, o hexacosano, o heptacosano e o linolenato de etila.

No estudo das folhas de *C. bakeriana* abordado por Cunha e colaboradores (2017), os compostos identificados se assemelham com os compostos encontrados nas flores do presente trabalho, como por exemplo o ácido palmítico, o tetracosano, dentre outros. A Figura 15, apresenta os compostos identificados na P-HF das flores de *C. bakeriana*.

Figura 15 – Estruturas de compostos identificados por CG-EM na P-HF das flores *C. bakeriana*.



Fonte: o autor.

5.4 PROPOSTA DE IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS PRESENTES NO EXTRATO EEF e NAS PARTIÇÕES P-HF, P-DF, P-AEF, P-BF e P-AF POR CLAE-IES-EM/EM

O extrato EEF e as partições P-HF, P-DF, P-AEF, P-BF, P-AF das flores de *C. bakeriana* apresentaram resultados satisfatório em todos os ensaios biológicos, que são discutidos nos tópicos (5.5 a 5.9) (pg. 86 a 102). As amostras foram analisadas por CLAE-IES-EM/EM. Os cromatogramas das partições bioativas encontram-se na Figura 16. A Tabela 9 mostra a proposta de identificação dos compostos. Os espectros de EM/EM dos compostos encontram-se no Apêndice, e as estruturas dos compostos identificados são mostradas na Figura 17.

A análise dos espectros de massas em alta resolução no modo negativo permitiu observar nas amostras diversos compostos, como por exemplo ácido carboxílico (como por exemplo o íon m/z 135.0300) detectados comumente em todas

as amostras. Outros compostos importantes, como os ácidos fenólicos, foram identificados nas partições P-DF, P-AEF, P-BF e no extrato EEF. Destaca-se também o ácido 4-hidroxi-O-glucosídeo benzóico (íon m/z 299.0772). Ao ácido serínico (íon m/z 197.0457) é atribuído diversas atividades biológicas, entre elas as atividades antioxidantes e antibacterianas (SRINIVASULU et al., 2018). Podemos levar em consideração também a presença de dois compostos pertencentes a classe de ácido jasmônico, o m/z 225.1135 e m/z 305.0700 identificados pela primeira vez nas flores de *C. bakerina*, mais que podem atuar em diversos processos biológicos importantes como na resistência a herbívoros, indutora, sinalizadores contra patógenos, senescência, processos de desenvolvimento e respostas de defesa da planta (GIDDA et al.2003; DELKER et al., 2006).

Destacam-se os íons precursores da classe de flavonoides que também foram encontrados comumente em quatro amostras, como a catequina (íon m/z 289.0719), a quercetina-3-O-beta-D-glucosídeo (íon m/z 463.0883), a quercetina-3-O-rhamnosídeo (íon m/z 447.0933), o kaempferol-3-O-rhamnosídeo (íon m/z 431.0984) e o kaempferol (íon m/z 285.0408) praticamente presentes em todas as partições, com exceção da P-AF. classe de compostos fenólicos também foi observada e revelada na prospecção fitoquímica (Tabela 5).

Outro fato a ser discutido e observado é que, a grande parte dos compostos identificados nas partições P-HF, P-DF, P-AEF e P-BF também foi comumente identificada no extrato EEF. Este fato pode estar associado aos compostos com menor massa molecular, distribuídos dentre as partições e o extrato etanólico. Contudo, este fato não foi observado no estudo de Silva e colaboradores (2019) com as folhas de *C. bakeriana*. Foi observado que a presença destes compostos no extrato tinha sido menos evidenciada por ser uma amostra mais complexa, com um número maior de compostos e que, portanto, não se ionizaram adequadamente para serem detectados (SILVA et al., 2019).

Os derivados de ácidos graxos também foram detectados o (íon m/z 327.2176), o ácido trihidroxi-octadecenóico (íon m/z 329.2335), o ácido dihidroxi-hexadecanoico (íon m/z 287.2228), o ácido linolênico (íon m/z 277.2172), o ácido hidroxihexadecanoico (íon m/z 271.2277), e o ácido octadecadienóico (íon m/z 279.2329) no extrato etanólico (EEF), na matriz mais complexa. Estes ácidos graxos de cadeia longa também foram identificados na partição P-DF, que é uma amostra com caráter

de polaridade intermediária. Essa classe de compostos foi relatada também no trabalho de Cunha e colaboradores (2013b), na composição do óleo essencial de diferentes partes da *C. bakeriana*. Os ácidos graxos também são conhecidos por possuírem atividade antibacteriana, antimalárica e antifúngica (POHL; KOCK; THIBANE, 2011; PINTO et al., 2017).

Alguns compostos presentes nas flores de *C. bakeriana* já foram identificados e caracterizados previamente nas espécies *C. javanica*, *C. siamea*, *C. auriculata*, *Cassia alata*, *C. nodosa*, *C. hirsute*, *C. laevigata*, *C. petersiana*, e *C. renigera* (ZHAO et al., 2016). A presença dos compostos catequina (íon m/z 289.0719), ácido ferúlico (íon m/z 193.0504), naringinina (íon m/z 271.0617), luteolina (íon m/z 285.0406), apiginina (íon m/z 269.0454), a reina (íon m/z 283.0250), a apigenina (íon m/z 269.0454) e o ácido linolênico (íon m/z 277.2172) foi identificada e quantificada nas flores de cinco espécies de *Cassia*: (*C. siamea*, *C. fistula*, *C. occidentalis*, *C. auriculata*, e *C. uniflora*) (CHANDRA et al., 2015).

O ácido protocatecuico (íon m/z 153.0194) encontrado nas partições P-DF, P-AEF e EEF está relacionado as atividades antibacteriana, antifúngica e, principalmente, pela forte relação com a atividade antioxidante (TANAKA; TANAKA; TANAKA, 2011; KAKKAR; BAIS 2014). Ainda Kakkar e Bais (2014) enfatizam que, dentre as diversas atividades do ácido protocatecuico, destacam-se fortemente as propriedades farmacológicas antibacteriana e antioxidante.

A taxifolina (íon m/z 303.0514) detectado nas partições P-DF, P-AEF e EEF detém potente atividade antioxidante, com capacidade de redução, eliminação de radicais, atividade citotóxica e antiglicante (TOPAL et al., 2015; MURAMATSU et al., 2019).

As flavonas luteolina e apigenina foram identificadas nas partições P-DF, P-AEF e EEF, e já foram descritas por apresentar atividade antiglicante (CHINCHANSURE et al., 2015; RONSISVALLE et al., 2020). A flavanona naringenina (íon m/z 271.0617) detectada na partição P-DF é reportada por apresentar forte atividade antifúngica (DANELUTTE et al., 2004). Outra flavona identificada abordada foi a diosmetina (íon m/z 299.0562), detectada nas P-DF e P-AEF. Este composto possui atividade antioxidante e antibacteriana contra as espécies de *Candida* (PATEL et al., 2013; WEIDENBÖRNER; JHA, 1997). Podemos destacar também o ácido linolênico (íon m/z 277.2172), presente na partição P-HF e no extrato EEF, detectado

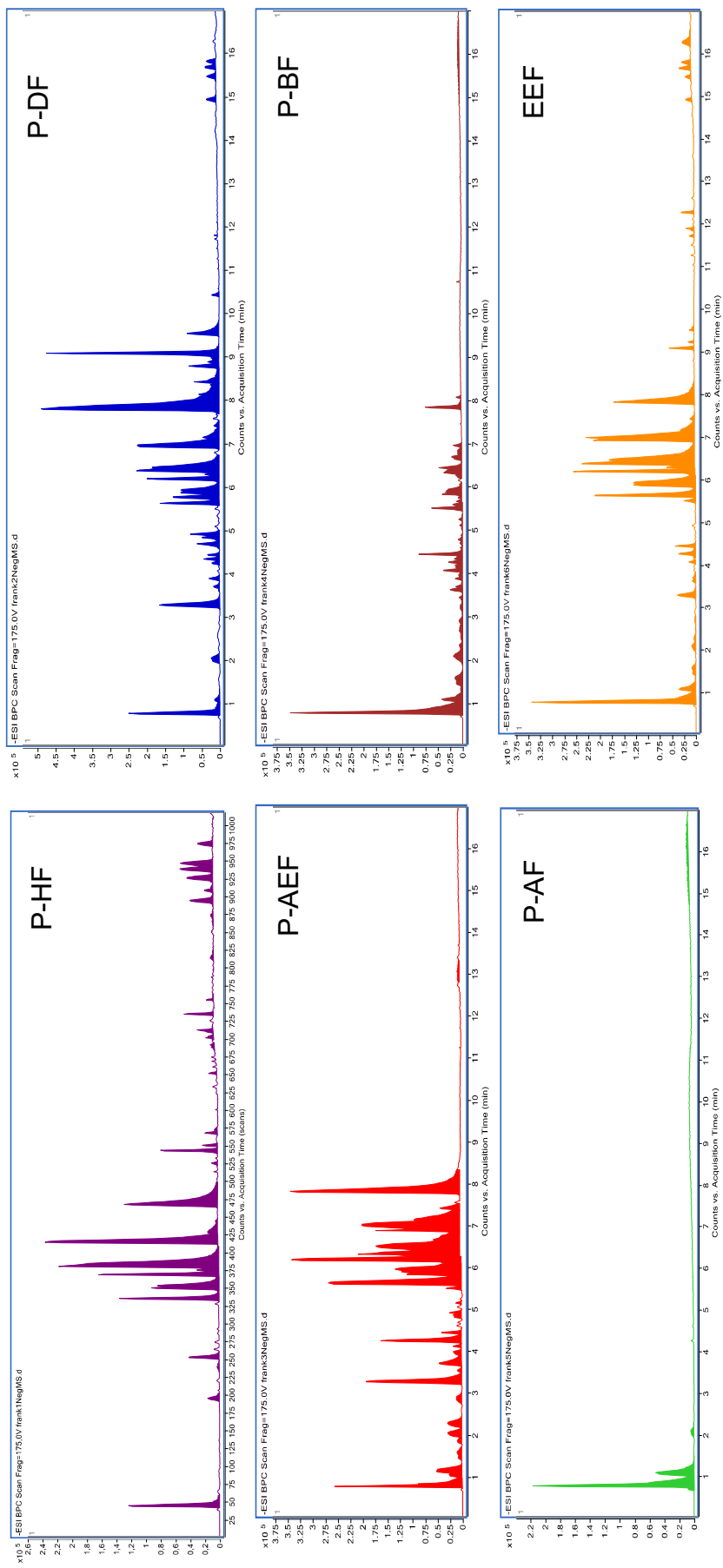
nas duas cromatografias estudadas (CG e CLAE). Este composto tem sido associado atividade de antiglicação (PRASANNA; SARASWATHI 2017).

Neste presente trabalho também foi detectada a classe de antraquinonas na partição P-DF: a emodina (íon m/z 269.0454), a quinalizarina (íon m/z 271.0248) e um isômero da reina (íon m/z 283.0250). A classe de antraquinonas está relacionada com atividades antibacteriana e antifúngica (COOPOOSAMY; MAGWA, 2006; FRIEDMAN et al., 2020).

O estudo com flores de diversas espécies de plantas é bem menos relatado quando comparado com estudos com outras partes de plantas, por exemplo as folhas. Este fato está relacionado com a época da floração, uma vez que as florações ocorrem uma vez por ano, na sua maioria, e isto acontece também com a *C. bakeriana*. Entretanto, alguns estudos com flores da espécie *Cassia* identificaram o alanol e o β -sitosterol- β -D-glucosídeo (SATYENDER; YADAV, 2013; FATMAWATI, et al., 2020). Além destes compostos, foi identificado o 5-O-metil-quercetin-3-O-(3-acetil)-d-galactosídeo também presente nas flores de *C. alata* (SENTHAMILSELVI; MURUGANANTHAM; SOLOMON, 2016). Na investigação de Kumar e colaboradores (2006) foram identificados os compostos kaempferol-3-O-rhamnoside (íon m/z 431.0984) e quercetina-3-O- β -D-glucosídeo (íon m/z 463.0883) nas flores de *C. nodosa*, presentes também neste trabalho.

No estudo de Silva e colaboradores (2019) com folhas de *C. bakeriana* foram identificados a epicatequina (íon m/z 289.0719), a astilbin (íon m/z 449.1092), o kaempferol (íon m/z 285.0408), o ácido málico (íon m/z 133.0143), também identificados neste trabalho, e o ácido 2,3-dihidroxibenzoico (ácido hipogálico). No estudo de Cunha e colaboradores (2017) com cascas da *C. bakeriana* foi identificada a antraquinona reina. Foi também identificada a classe de derivados de ácidos graxos de cadeia longa, comumente encontrada em espécies de *Cassia*, principalmente no óleo essencial de diferentes partes de *C. bakeriana* (CUNHA et al., 2013a). Vale ressaltar que todas as classes discutidas aqui, foram evidenciadas e reveladas pela prospecção fitoquímica (Tabela 5). Ainda não há estudos da composição química das flores da *C. bakeriana*. Desta forma, foram identificados 50 compostos nas partições avaliadas, pela primeira vez nas flores de *C. bakeriana*.

Figura 16 - Cromatogramas de CLAE-IES-EM/EM das partições P-HF, P-DF, P-AEF, P-BF, P-AF e do extrato EEF obtidos por CLAE-EM-IES, no modo negativo.



Fonte: o autor

Tabela 7 - Proposta de identificação dos compostos das partições P-HF, P-DF, P-AEF, P-BF, P-AF, e do extrato EEF das flores de *C. bakeriana*. (continua)

| T _R min | [M-H] ⁻ | Massa exata | Erro (ppm) | Fragmentos MS ² | Fórmula molecular | Tentativa de identificação* | Referências |
|--------------------|--------------------|-------------|------------|--|---|---|--|
| 0.80 | 135.0300 | 135.0299 | 0.7 | 10 eV: 117, 89, 75 , 59, 56 | C ₄ H ₈ O ₅ | Treonato ^{a, b, c, d, e, f} (I) | Metlin ⁽⁰⁾ ; LAVOIE et al., 2004; WANG et al., 2006 |
| 0.91 | 133.0143 | 133.0142 | 0.7 | 20 eV: 115, 89, 72, 71 , 65, 59 | C ₄ H ₆ O ₅ | Ácido málico ^{b, c, d, e, f} (II) | Metlin ⁽⁰⁾ ; ABU-REIDA et al., 2015a |
| 1.06 | 117.0193 | 117.0193 | 0.0 | 20 eV: 99, 85, 73 , 59 | C ₄ H ₆ O ₄ | Ácido succínico ^c (III) | Metlin ⁽⁰⁾ |
| 1.08 | 242.0671 | -- | -- | 10 eV: 182 , 154, 126, 110 | -- | N.I. ^{d, e, f} | -- |
| 1.18 | 161.0453 | 161.0455 | -1.2 | 10 eV: 143, 101, 99 , 59, 57 | C ₆ H ₁₀ O ₅ | Ácido 3-hidroxi-3-metil-glutárico ^{b, c, d, f} (IV) | Metlin ⁽⁰⁾ ; PubChem ⁽⁹⁾ |
| 1.45 | 299.0772 | 299.0772 | 0.0 | 10 eV: 175, 137 , 93 | C ₁₃ H ₁₆ O ₈ | Ácido 4-hidroxi-O-glucosídeo benzoico ^{b, c, d, f} (V) | ABU-REIDAH et al., 2015a |
| 1.60 | 137.0244 | 137.0244 | 0.0 | 10 eV: 109, 93 , 75, 65 | C ₇ H ₆ O ₃ | Ácido <i>p</i> -hidroxibenzoico ^{a, b, c, f} (VI) | Metlin ⁽⁰⁾ ; SUN et al., 2007; PANIAGUA-GARCIA et al., 2019 |
| 1.85 | 131.0350 | 131.0350 | 0.0 | 10 eV: 113, 99, 87 , 71, 69 | C ₅ H ₈ O ₄ | Ácido glutárico ^{c, f} (VII) | Metlin ⁽⁰⁾ |
| 2.10 | 218.1035 | 218.1034 | 0.4 | 10 eV: 146 , 88, 71 | C ₉ H ₁₇ NO ₅ | Ácido pantotênico ^{d, f} (IX) | Metlin ⁽⁰⁾ |
| 2.10 | 315.0721 | 315.0722 | -0.3 | 20 eV: 153 , 152, 109, 108 | C ₁₃ H ₁₆ O ₉ | Hexose de ácido protocatecuico ^{d, f} (X) | CHEN et al., 2011; ABU-REIDAH et al., 2015b |
| 2.25 | 153.0194 | 153.0193 | 0.6 | 10 eV: 110, 109 , 108, 91 | C ₇ H ₆ O ₄ | Ácido 3,4-dihidroxibenzoico ^{b, c, f} (Ácido protocatecuico) (XI) | Metlin ⁽⁰⁾ ; ABU-REIDAH et al., 2015b; MOHSEN et al., 2020 |
| 2.35 | 329.0878 | 329.0878 | 0.0 | 20 eV: 167, 152, 135, 123, 108 | C ₁₄ H ₁₈ O ₉ | (Iso) hexosídeo de ácido vanílico ^{d, f} (XII) | ABU-REIDAH et al., 2015a |
| 2.85 | 223.0247 | 223.0248 | -0.4 | 10 eV: 193, 149, 137, 128 | C ₁₀ H ₈ O ₆ | N.I. ^{c, f} | -- |
| 2.90 | 359.0981 | 359.0984 | -0.8 | 10 eV: 197 , 182, 153, 123 | C ₁₅ H ₂₀ O ₁₀ | Hexosídeo de ácido serfínico ^{d, f} (XIII) | Metlin ⁽⁰⁾ ; ABU-REIDAH et al., 2015b |
| 3.23 | 329.0879 | 329.0878 | 0.3 | 20 eV: 167 , 152, 135, 123, 108 | C ₁₄ H ₁₈ O ₉ | (Iso) hexosídeo de ácido vanílico ^{d, f} (XIV) | ABU-REIDAH et al., 2015a |
| 3.36 | 137.0244 | 137.0244 | 0.0 | 10 eV: 93 , 75, 65 | C ₇ H ₆ O ₃ | Ácido <i>p</i> -hidroxibenzoico ^{b, c, f} (XV) | Metlin ⁽⁰⁾ ; SUN et al., 2007 |

Tabela 7 - Proposta de identificação dos compostos das partições P-HF, P-DF, P-AEF, P-BF, P-AF, e do extrato EEF das flores de *C. bakeriana*. (continua).

| | | | | | | | |
|------|----------|----------|------|--|---|--|--|
| 3.54 | 289.0719 | 289.0718 | 0.3 | 10 eV: 289, 271, 245, 179, 125 | C ₁₅ H ₁₄ O ₆ | Catequina ^{b, c, d, f} (XVI) | Metilin ⁽ⁱ⁾ ; BYSTROM et al., 2008; ABU-REIDAH et al., 2015a; SILVA et al., 2019 |
| 3.61 | 443.1915 | 443.1923 | -1.8 | 15 eV: 443, 329, 190, 101 | C ₂₁ H ₃₂ O ₁₀ | N.I. ^{d, f} | -- |
| 3.71 | 325.0930 | 325.0929 | 0.3 | 10 eV: 163, 119 | C ₁₅ H ₁₈ O ₈ | O-hexosídeo de ácido <i>p</i> -cumárico ^{d, f} (XVII) | Metilin ⁽ⁱ⁾ ; ABU-REIDAH et al., 2015b; MOHSEN et al., 2020 |
| 3.71 | 121.0296 | 121.0295 | 0.8 | 10 eV: 121, 93, 92, 91, 77, 65 | C ₇ H ₆ O ₂ | <i>p</i> -hidroxibenzaldeído ^{b, c, f} (XVIII) | Metilin ⁽ⁱ⁾ ; PubChem ^(h) |
| 3.74 | 273.0405 | 273.0405 | 0.0 | 20 eV: 255, 229, 211, 185, 163, 135, 109, 75 | C ₁₄ H ₁₀ O ₆ | N.I. ^{b, c, f} | -- |
| 3.90 | 167.0352 | 167.0350 | 1.1 | 10 eV: 152, 123, 108, 91, 65 | C ₈ H ₈ O ₄ | Ácido vanílico ^{b, f} (XX) | PubChem ⁽ⁱ⁾ ; SUN et al., 2007; SILVEIRA et al., 2020 |
| 3.90 | 395.1923 | 395.1923 | 0.0 | 20 eV: 349, 289, 161, 89 | C ₁₇ H ₃₂ O ₁₀ | N.I. ^{d, f} | -- |
| 4.06 | 395.1921 | 395.1923 | -0.5 | 20 eV: 349, 289, 161, 89 | C ₁₇ H ₃₂ O ₁₀ | N.I. ^{d, f} | -- |
| 4.14 | 435.1298 | 435.1297 | 0.2 | -- | C ₂₁ H ₂₄ O ₁₀ | N.I. ^{c, f} | -- |
| 4.25 | 197.0457 | 197.0455 | 1.0 | 20 eV: 182, 166, 138, 123, 121, 106, 95, 78 | C ₉ H ₁₀ O ₅ | Ácido seringico ^{b, f} (XXII) | Metilin ⁽ⁱ⁾ ; SUN et al., 2007; SHARMA et al., 2020b |
| 4.30 | 289.0719 | 289.0718 | 0.3 | 10 eV: 289, 271, 245, 179, 125 | C ₁₅ H ₁₄ O ₆ | (Epi)catequina ^{a, b, d, f} (XXIII) | Metilin ⁽ⁱ⁾ ; BYSTROM et al., 2008; ABU-REIDAH et al., 2015a; SILVA et al., 2019; |
| 4.45 | 405.1403 | 405.1402 | | 10 eV: 371, 329, 243 | C ₁₇ H ₂₆ O ₁₁ | N.I. ^{c, d, f} | -- |
| 4.35 | 135.0453 | 135.0452 | 0.7 | 10 eV: 135, 120, 107, 93, 92 | C ₈ H ₈ O ₂ | N.I. ^{b, f} | -- |
| 4.68 | 225.1135 | 225.1132 | 1.3 | 20 eV: 165, 137, 59 | C ₁₂ H ₁₈ O ₄ | Ácido tuberônico ^{b, c, d} (XXIV) | BALCKE et al., 2012 |

Tabela 7 - Proposta de identificação dos compostos das P-HF, P-DF, P-AEF, P-BF, P-AF, e do extrato EEF das flores de *C. bakeriana*. (continua).

| | | | | | | | |
|------|----------|----------|------|--|--|--|--|
| 4.80 | 305.0700 | 305.0700 | 0.0 | 20 eV: 225, 165, 96 , 59 | C ₁₂ H ₁₈ O ₇ S | Ácido tuberônico sulfato ^d f (XXV) | GIDDA et al., 2003 |
| 4.85 | 163.0403 | 163.0401 | 1.2 | 15 eV: 119 , 93, 65 | C ₉ H ₈ O ₃ | Ácido 2-hidroxicinâmico (ácido <i>p</i> -cumárico) ^{b, c, f} (XXVI) | Metlin ⁰ ; SHARMA et al., 2020b |
| 5.05 | 303.0514 | 303.0510 | 1.3 | 10 eV: 285 , 275, 259, 241, 217, 177, 125 | C ₁₅ H ₁₂ O ₇ | Taxifolina ^{b, c, f} (XXVII) | Metlin ⁰ ; SUN et al., 2007; EL- WAKIL et al., 2015 |
| 5.15 | 449.1091 | 449.1091 | 0.0 | 20 eV: 329, 287, 269 , 225, 179, 151, 125 | C ₂₁ H ₂₂ O ₁₁ | Hexosídeo de eriodictiol ^b c, f (XXVIII) | GUIMARÃES et al., 2013 |
| 5.20 | 193.0504 | 193.0506 | -1.0 | 10 eV: 178, 160, 149, 134 | C ₁₀ H ₁₀ O ₄ | Ácido ferúlico ^b (XXIX) | WOJTANOWSKI; MROCZEK, 2018; SILVA et al., 2019; SILVEIRA et al., 2020 |
| 5.26 | 439.1820 | -- | -- | 10 eV: 393 , 352, 291, 231 | -- | N.I. ^{d, f} | -- |
| 5.50 | 609.1461 | 609.1461 | 0.0 | 20 eV: 609 , 429, 285, 284, 121 | C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆ | Kaempferol ou hexosídeo-hexosídeo de luteolina ^{c, d, f} (XXX) | CHEN et al., 2011 |
| 5.63 | 449.1092 | 449.1091 | 0.2 | 10 eV: 405, 357, 303, 285, 195, 179, 151 , 125 | C ₂₁ H ₂₂ O ₁₁ | Astilbina ^{a, b, f} (XXXI) | ZHAO et al., 2014; SILVA et al., 2019 |
| 5.76 | 137.0245 | 137.0244 | 0.7 | 10 eV: 125, 94, 93 , 65 | C ₇ H ₆ O ₃ | Ácido <i>o</i> -hidroxibenzoico ^b c, f (Ácido salicílico) (XXXII) | SUN et al., 2007 |
| 5.91 | 463.0883 | 463.0882 | 0.2 | 10 eV: 301 , 300, 271, 179 | C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂ | Quercetin 3-O-beta-D- glucosídeo / galactosídeo ^a b, d, f (XXXIII) | Metlin ⁰ ; GUIMARÃES et al., 2013; SILVA et al., 2019 |
| 6.19 | 433.1126 | 433.1129 | -0.6 | 15 eV: 287, 269 , 259, 209, 180, 179, 152, 151, 125 | C ₂₁ H ₂₁ O ₁₀ | Diidrokaempferol-3-O- ramnosídeo ^{a, b, f} (XXXIV) | SILVA et al., 2019 |
| 6.33 | 447.0933 | 447.0933 | 0.0 | 15 eV: 301 , 300, 285, 284, 271, 255, 227, 179, 151, 121 | C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁ | Quercetina-3-O- rhamnosídeo ^{b, c, d, f} (XXXV) | Metlin ⁰ ; (PLAZONIC et al., 2009; ABU-REIDAH et al., 2015b; MOHSEN et al., 2020) |
| 6.50 | 447.0933 | 447.0933 | 0.0 | 15 eV: 447 , 327, 301, 300, 285, 284, 255, 227, 151 | C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁ | Kaempferol-O-hexosídeo ^{a, b, c, f} (XXXVI) | Metlin ⁰ ; ABU-REIDAH et al., 2015a; SILVA et al., 2019 |

Tabela 7 - Proposta de identificação dos compostos das P-HF, P-DF, P-AEF, P-BF, P-AF, e do extrato EEF das flores de *C. bakeriana*. (continua).

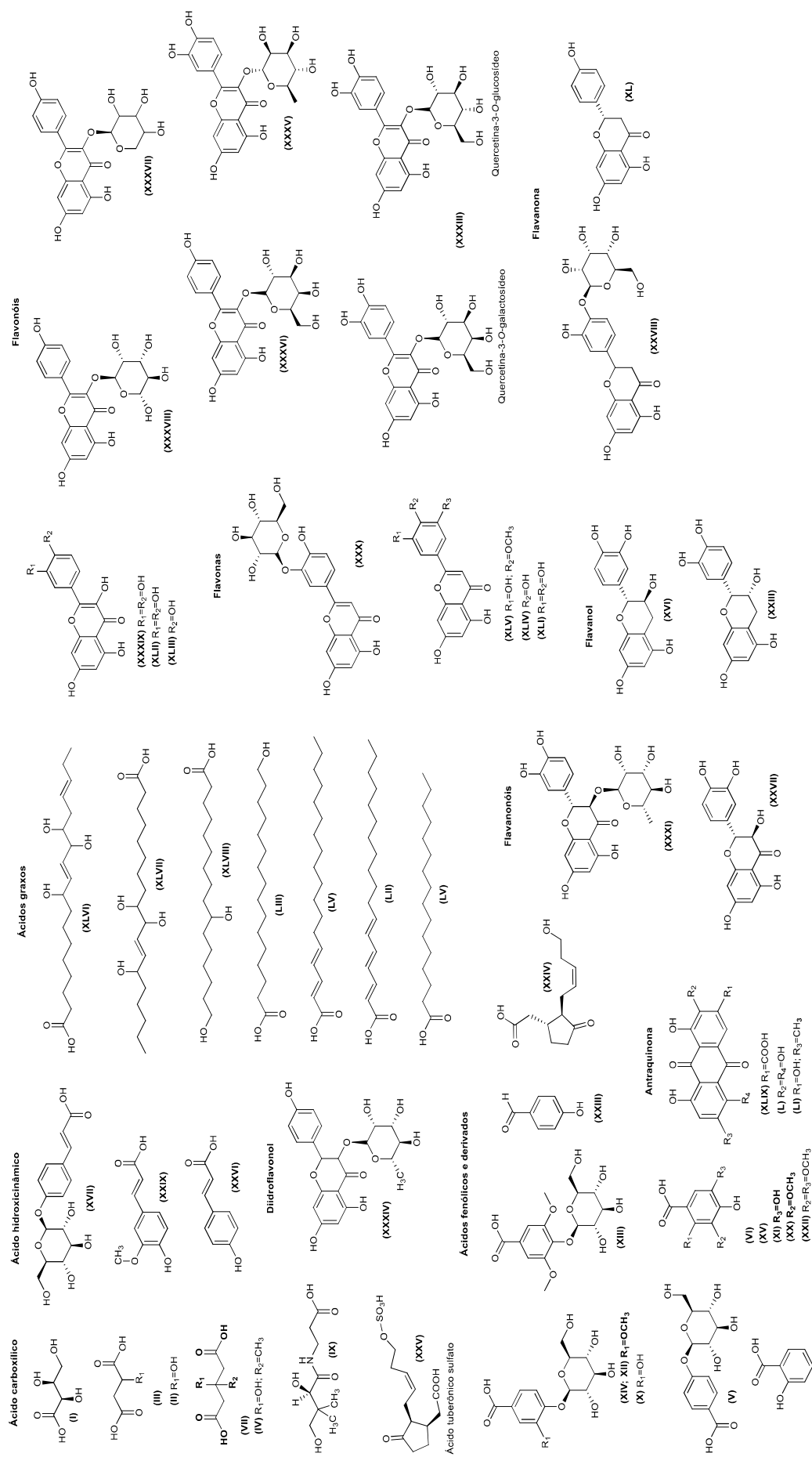
| | | | | | | | |
|------|----------|----------|------|---|---|--|---|
| 6.63 | 417.0828 | 417.0827 | 0.2 | 5 eV: 417, 329, 285, 284, 227 20 eV: 327, 299, 285, 284 , 255, 227, 151 | C ₂₀ H ₁₇ O ₁₀ | Kaempferol-O-pentose b, c, f (XXXVII) | MOHSEN et al., 2020 |
| 6.69 | 479.2488 | -- | -- | 10 eV: 433 , 361, 271, 179, 161, 119, 101 | -- | N.I d, f | -- |
| 6.94 | 431.0984 | 431.0984 | 0.0 | 10 eV: 327 , 285 , 255, 227 | C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀ | kaempferol-3-O-rhamnosídeo (afzelina) a, b, c, f (XXXVIII) | WOJTANOWSKI; MROCZEK, 2018; SILVA et al., 2019 |
| 7.14 | 301.0352 | 301.0354 | 0.6 | 10 eV: 273, 229, 179, 151 , 121 | C ₁₅ H ₁₀ O ₇ | Quercetina b, c, f (XXXIX) | Metlin ⁰ ; ZHAO et al., 2014; BRITO et al., 2014; SILVA et al., 2019 |
| 7.14 | 271.0617 | 271.0617 | 0,0 | 20 eV: 229, 177, 165, 151 , 145, 119, 107 | C ₁₅ H ₁₂ O ₅ | Naringenina b, f (XL) | Metlin ⁰ ; GOMEZ-ROMERO et al., 2010; SUN et al., 2007 |
| 7.44 | 285.0406 | 285.0405 | 0.3 | 20 eV: 243, 241, 217, 199, 175, 151, 133 , 107 | C ₁₅ H ₁₀ O ₆ | Luteolina b, c, f (XLI) | Metlin ⁰ ; SUN et al., 2007; SHARMA et al., 2020b |
| 7.57 | 199.1341 | 199.1340 | 0.5 | 20 eV: 164, 151, 139 | C ₁₁ H ₂₀ O ₃ | N.I b | -- |
| 7.57 | 301.0356 | 301.0354 | 0.6 | 10 eV: 273, 229, 179, 151 , 121 | C ₁₅ H ₁₀ O ₇ | Quercetina II b, c (XLII) | Metlin ⁰ ; ZHAO et al., 2014; BRITO et al., 2014; ABU-REIDAH et al., 2015a; SILVA et al., 2019 |
| 7,82 | 285.0408 | 285.0405 | 1.0 | 20 eV: 285 , 257, 255, 229, 227, 185, 169, 151, 135, 107 | C ₁₅ H ₁₀ O ₆ | Kaempferol b, c, d, f (XLIII) | Metlin ⁰ ; PETROVICIU et al., 2014; SILVA et al., 2019 |
| -- | 269.0454 | 269.0453 | 0.3 | 20 eV: 225, 201, 181, 159, 151 , 149, 117, 107 | C ₁₅ H ₁₀ O ₅ | Apigenina b, c, f (XLIV) | Metlin ⁰ ; Wang et al. 2017; Sharma et al., 2020b |
| 8,11 | 299.0562 | 299.0561 | 0.3 | 15 eV: 284 , 256, 207, 178, 151, 121 | C ₁₆ H ₁₂ O ₆ | Diosmetina b, c, f (XLV) | Metlin ⁰ ; SARIKAHYA et al., 2019 SHARMA et al., 2020b |
| 8,11 | 523.2381 | -- | -- | 5 eV: 489, 477 , 449, 431 | -- | N.I c, e, f | -- |
| 8.44 | 327.2176 | 327.2177 | -0.3 | 15 eV: 327 , 309, 291, 229, 211, 183, 171, 137 | C ₁₈ H ₃₁ O ₅ | Ácido trihidroxioctadecadienóico (ác. fulgídico) b, f (XLVI) | GOMEZ-ROMERO et al., 2010; NASTIC et al. 2020; MOHSEN et al., 2020 |

Tabela 7 - Proposta de identificação dos compostos das P-HF, P-DF, P-AEF, P-BF, P-AF, e do extrato EEF das flores de flores de *C. bakeriana*. (conclusão).

| | | | | | | | |
|-------|----------|----------|------|--|--|--|--|
| 8,79 | 329.2335 | 329.2333 | 0.6 | 15 eV: 329 , 311, 295, 229, 211, 201, 183, 171, 137 | C ₁₈ H ₃₄ O ₅ | Ácido trihidroxioctadecenoico ^{a, b, f} (XLVII) | GOMEZ-ROMERO et al., 2010 |
| 9.07 | 287.2228 | 287.2227 | 0.3 | 15 eV: 287 , 269, 241, 211, 183, 141 | C ₁₆ H ₃₂ O ₄ | Ácido dihidroxiohexadecanoico (ác. dihidroxio-palmitico) ^{a, b, f} (XLVIII) | GOMEZ-ROMERO et al., 2010 |
| 9.54 | 283.0250 | 283.0248 | 0.7 | 15 eV: 255, 239 , 240, 211, 183 | C ₁₅ H ₈ O ₆ | Reina ^{b, f} (XLIX) | Metlin ⁽ⁱ⁾ ; CUNHA et al., 2017; SILVA et al., 2019 |
| 9.67 | 271.0248 | 271.0248 | 0.0 | 10 eV: 271 , 243, 227, 215, 199, 187, 183, 171, 159 | C ₁₄ H ₈ O ₆ | Quinalizarina ^{b, f} (L) | Metlin ⁽ⁱ⁾ ; RAFAELLY et al., 2008 |
| 10.44 | 269.0454 | 269.0455 | -0.3 | 20 eV: 269 , 241, 225, 197, 181 | C ₁₅ H ₁₀ O ₅ | Emodina ^{b, f} (LI) | Metlin ⁽ⁱ⁾ ; CHEN et al., 2013 |
| 11.88 | 277.2172 | 277.2173 | -0.3 | -- | C ₁₈ H ₂₉ O ₂ | Ácido octadecatrienoico (ácido linolênico) ^f (LII) | GOMEZ-ROMERO et al., 2010 |
| 12.08 | 271.2277 | 271.2278 | -0.3 | 20 eV: 253, 225 , 223 | C ₁₆ H ₃₂ O ₃ | Ácido 16-hidroxiohexadecanoico (ác. palmitico) ^{b, f} (LIII) | Metlin ⁽ⁱ⁾ |
| 12.28 | 279.2329 | 279.2330 | -0.3 | 20 eV: 279 , 261, 166 | C ₁₈ H ₃₂ O ₂ | Ácido 9,12-octadecadienoico (ác. linolêico) ^f (LIV) | Metlin ⁽ⁱ⁾ |
| 12.61 | 255.2330 | 255.2330 | 0.0 | 15 eV: 170, 112, 68 | C ₁₆ H ₃₁ O ₂ | Ácido hexadecanoico (Ácido palmitico) ^d LV | GOMEZ-ROMERO et al., 2010 |
| 14.93 | 619.4201 | -- | -- | 10 eV: 574, 513, 345, 217 | -- | N.I ^{b, f} | -- |
| 15.48 | 621.4361 | -- | -- | 20 eV: 575, 460 | -- | N.I ^{b, f} | -- |
| 15.68 | 758.5404 | -- | -- | 20 eV: 712 , 643, 532, 466 | -- | N.I ^{b, f} | -- |
| 15.81 | 826.5275 | -- | -- | 10 eV: 826 , 780, 712, 640, | -- | N.I ^{b, f} | -- |
| 16.29 | 887.5110 | -- | -- | 20 eV: 513, 277 | -- | N.I ^f | -- |

Nota: Tr: Tempo de retenção (min); n.i: não identificado; --: não obtido; *: a P-HF: partição hexânica das flores; b P-DF: partição diclorometano das flores; c P-AEF: partição acetato de etila; d P-BF: partição n-butanólica das flores; e P-AF: partição aquosa das flores; f EEF: extrato etanólico das flores; Biblioteca online disponível em: ^(g) <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/MeglutoI#section=LC-MS>; ^(h) <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/4-Hydroxybenzaldehyde#section=Mass-Spectrometry>; ⁽ⁱ⁾ <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Vanillic-acid>; ^(j) https://metlin.scripps.edu/landing_page.php?pgcontent=simple_search. Fonte: o autor.

Figura 17 - Estrutura dos compostos identificados no extrato etanólico (EEF) e nas partições P-HF, P-DF, P-AEF, P-BF, P-AF das flores de *C. bakeriana*.



Fonte: o autor.

5.4.1 Proposta de fragmentação do ácido protocatecuico e da taxifolina

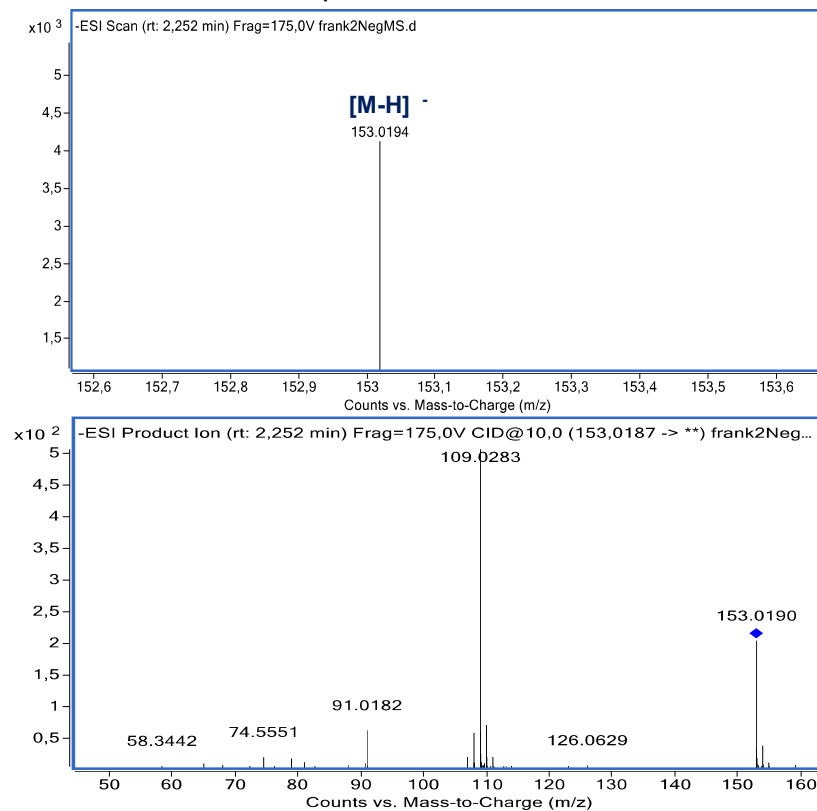
De forma ilustrativa apresentamos uma proposta de fragmentação do ácido protocatecuico e da taxifolina. Uma vez que o ácido protocatecuico (íon m/z 153.0194, um ácido fenólico) e a taxifolina (íon m/z 303.0514, um flavonoide) foram identificadas nas partições P-DF e P-AEF apresentam atividades antibacteriana, antifúngica, citotóxica, antiglicante e antioxidante (TANAKA; TANAKA; TANAKA, 2011; KAKKAR; BAIS 2014). Assim propostas de fragmentações desses dois compostos foram realizadas. As Figura 18 e Figura 20 mostram o EM-IES (-) em alta resolução do ácido protocatecuico e da taxifolina e seus respectivos EM/EM-IES e tempo de retenção. As Figura 19 e Figura 21 apresentam as propostas de fragmentação para o ácido protocatecuico e a taxifolina identificados por EM/EM-IES (-) nas partições P-DF e P-AEF das flores de *C. bakeriana*.

O ácido protocatecuico (m/z 153.0194; T_R 2.25. min), (Figura 19) apresentou 2 fragmentos como os principais sinais (Figura 19), incluindo o pico base de íon m/z 109, de maior intensidade, e o íon m/z 91, característicos do ácido protocatecuico (KAKKAR; BAIS, 2014). O íon fragmento de m/z 109 é formado através da eliminação neutra de 44 u (eliminação de CO_2), que ocorre através da descarboxilação. Quanto a formação do íon fragmento m/z 91, pode ser justificado pela eliminação neutra de 18 u (DEMARQUE et al., 2016) referente à eliminação de H_2O , formando um heterocíclo altamente tensionado (Figura 26).

Já a taxifolina (T_R 5.05 min) apresentou o pico referente ao íon precursor $[\text{M} - \text{H}]^-$ em m/z 303.0514 (Figura 21) (MURAMATSU et al., 2019). Quando este sinal foi submetido a espectrometria de massa sequencial no modo negativo (Figura 20) foi observado íon fragmento m/z 285, este apresentou maior intensidade (pico base). A formação deste íon ocorre através da eliminação neutra de 18 u (correspondente a H_2O). A formação do íon em m/z 177 foi atribuído à clivagem do anel C através de um mecanismo retro-Diels-Alder (RDA) (DEMARQUE et al., 2016; OLIVEIRA et al., 2018). O íon fragmento de m/z 275 é formado por meio da eliminação neutra de 28 u (eliminação de CO , que ocorre através da clivagem heterolítica da ligação entre C3 e C4. Quanto a formação dos íons m/z 125, m/z 259 e m/z 241, a princípio ocorre clivagem heterocíclica no anel C para a formação do íon fragmento m/z 125, seguida de eliminação neutra de 178 u. Já a formação do íon 259, levou a eliminação neutra

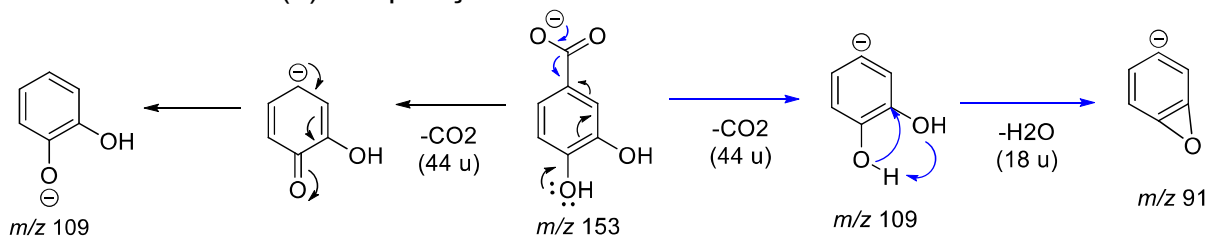
de 44 u (que corresponde ao CO₂), através da descarboxilação. Os íons fragmentos m/z 241 e m/z 199 foram obtidos através da eliminação neutra de 18 u, que corresponde novamente a H₂O, formando desta forma novo heterocíclo, altamente tensionado (DEMARQUE et al., 2016; OLIVEIRA et al., 2018; NASCIMENTO et al., 2020). A formação do íon fragmento m/z 217 ocorre através da contração do anel B, através da eliminação neutra de 58 u, formando assim novamente um novo heterocíclo altamente tensionado.

Figura 18 - Espectros de EM-IES (-) em alta resolução do ácido protocatecuico (a,b) e seus respectivos EM/EM-IES



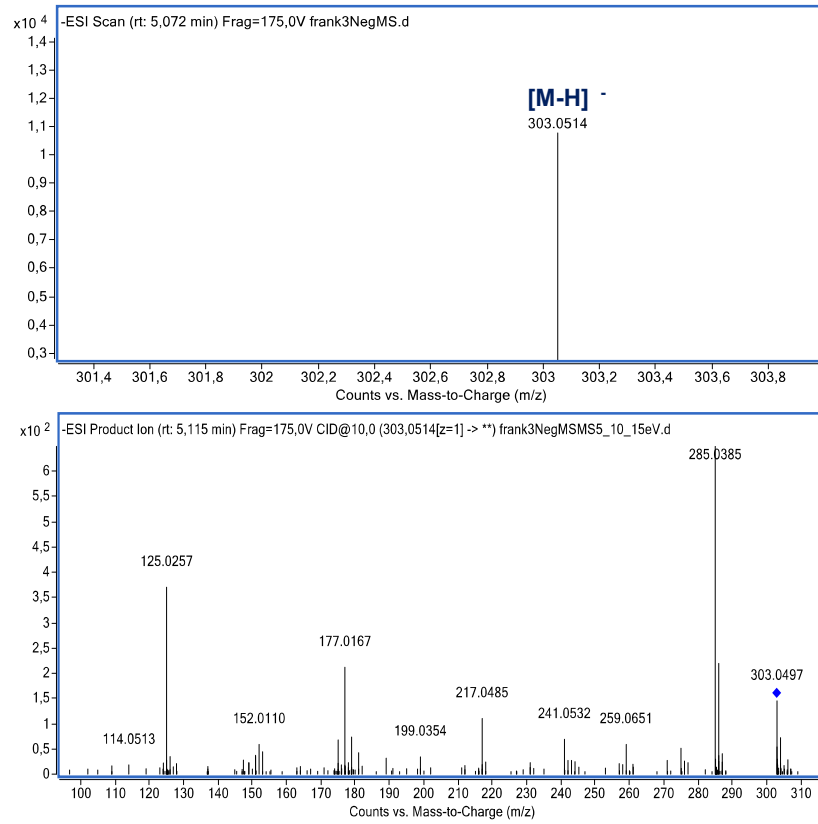
Fonte: o autor.

Figura 19- Proposta de fragmentação para o ácido protocatecuico identificado por EM/EM-IES (-) nas partições P-DF e P-AEF das flores de *C. bakeriana*



Fonte : o autor.

Figura 20 – Espectros de EM-IES (-) em alta resolução da taxifolina (c,d) e seus respectivos EM/EM-IES.

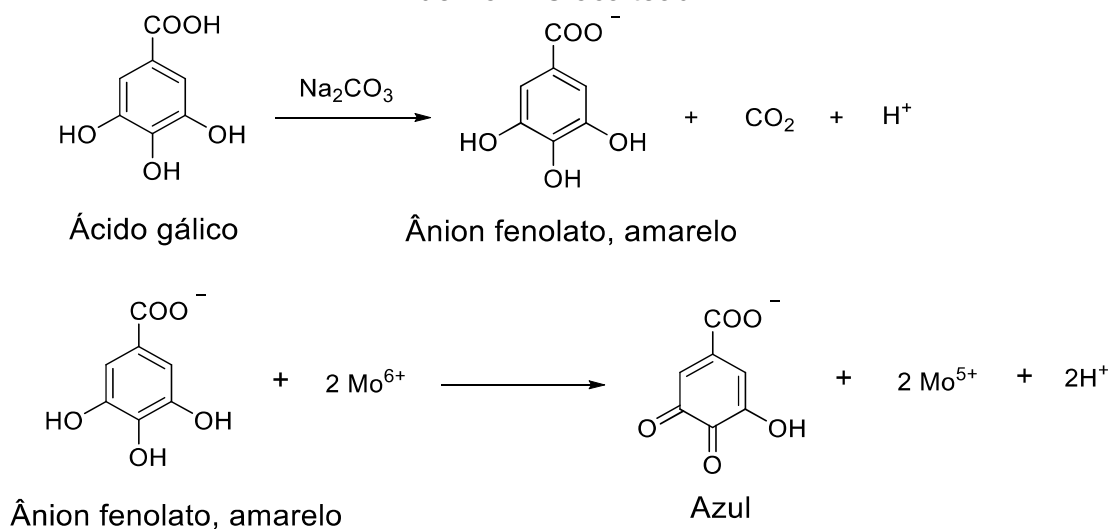


Fonte: o autor

5.4.2 Análise do teor de fenóis totais

A quantificação do teor de fenóis totais foi estabelecida através do método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu, que é realizado por meio da redução do reagente de Folin, consistindo na mistura dos ácidos fosfomolibdídico ($H_3PMo_{12}O_{40}$) e fosfotungstístico ($H_3PW_{12}O_{40}$). Na presença dos compostos fenólicos, há a formação de um complexo azul, cuja intensidade aumenta na mesma proporção, de acordo com a concentração das substâncias observadas a 760 nm. O molibdênio de cor amarela presente no reagente de Folin, também é encontrado no estado de oxidação +6. Essa reação, transcorrente em meio básico, no qual ocorre a desprotonação e formação de ânions fenolatos, formando complexos de molibdênio-tungstênio, os quais apresentam estado de oxidação que podem variar entre +5 e +6. O complexo de molibdênio-tungstênio corresponde à cor azul, conforme a reação mostrada na Figura 22 (OLIVEIRA et al., 2009; ARYAL et al., 2019).

Figura 22 - Reação entre o ácido gálico e o íon molibdênio, componente do reagente de Folin-Ciocalteu.



Fonte: Oliveira et al., (2009).

Para quantificar o teor de fenóis totais foi construída uma curva analítica com padrões de ácido gálico, que se encontra no apêndice B. Assim, o teor de fenóis totais foi expresso em (mg EAG/ g_{extrato}). Na Tabela 8 encontram-se os resultados para os extratos brutos e partições das flores de *C. bakeriana*.

Tabela 8 - Teores de fenóis totais dos extratos brutos e partições das flores de *C. bakeriana*.

| Amostras | | Fenóis totais (mg EAG/ g _{extrato} ± média e desvio padrão) |
|-----------|-------------------|---|
| Extratos | <i>n</i> -Hexano | 28,8±2,6 |
| | Etanólico | 123,4±1,2 |
| Partições | Hexânica | 39,5±8,1 |
| | Diclorometano | 95,4±0,6 |
| | Acetato de etila | 56,3±0,2 |
| | <i>n</i> -butanol | 73,3±5,0 |
| | Água | 57,8±1,4 |

Fonte: o autor.

Observa-se que o extrato etanólico bruto apresentou maior conteúdo de fenóis totais do que o extrato hexano e as demais partições analisadas. Esse alto conteúdo era esperado devido ao elevado rendimento do extrato bruto (Tabela 3), correlacionando com a intensidade forte da presença de compostos fenólicos na prospecção fitoquímica (Tabela 5) e os compostos da classe de flavonoides previamente identificados por CLAE-EM-IES nesta amostra.

Em outro estudo, porém, com o extrato etanólico das flores de *C. auriculata*, Prasath e colaboradores (2019) relataram que o teor de fenóis totais se constituiu de 262,31 ± 3,01 mg, valor 2,1 vezes maior do que o extrato etanólico da *C. bakeriana*. Os autores ainda mencionam que este valor pode estar relacionado à presença de compostos fenólicos e flavonoides.

Segundo Kaisoon e colaboradores (2011) o extrato etanólico das flores de *Cassia siamea* apresentou conteúdo fenólico de 88 mg EAG/ g_{extrato}, valor 30% inferior ao reportado pelo atual trabalho. No estudo de Luximon-ramma e colaboradores (2002), o extrato etanólico das flores de *Cassia fistula* apresentou teor fenólico de 32 ± 2.4 mg EAG/ g_{extrato}, conteúdo este 68% inferior ao abordado no presente trabalho.

De acordo com Tabela 8, o extrato hexano bruto e a partição *n*-hexânica de *C. bakeriana* apresentaram menor conteúdo de fenóis totais em relação aos estudos relatados anteriormente, quando comparado ao extrato bruto etanólico e suas partições. Este fato é esperado uma vez que, à medida que a polaridade do solvente da partição aumenta, maior teor de compostos fenólicos será extraído.

Em contrapartida, dentre as partições avaliadas, a diclorometano indicou maior quantidade do teor de fenóis totais ($95,4 \pm 0,0$ mg EAG/ g_{extrato}) na sua composição química, valor esta cerca de 1,1 vez maior do que encontrado na *Cassia siamea* e cerca de 3,0 vezes maior do que encontrado na *Cassia fistula*. Esse alto teor está relacionado com presença dos compostos fenólicos identificados nesta amostra, por CLAE-EM-IES, além de outros compostos com caráter apolar e polar, ainda não identificados.

Subramanian e Venugopal (2011), avaliaram o teor de fenóis das partições das flores de *C. auriculata* e *C. siamea*. Os resultados estão mostrados na Tabela 9.

Tabela 9 - Teor de fenóis totais nas flores de *C. auriculata* e *C. siamea*

| Espécies | Teor de fenóis ($\mu\text{g mL}^{-1}$) | | | | |
|----------------------|--|-------|-------|-------|-------|
| | I | II | III | IV | V |
| <i>C. auriculata</i> | 20 | 31,43 | 52,92 | 59,92 | 48,06 |
| <i>C. siamea</i> | 18 | 27,51 | 38,14 | 46,22 | 31,38 |

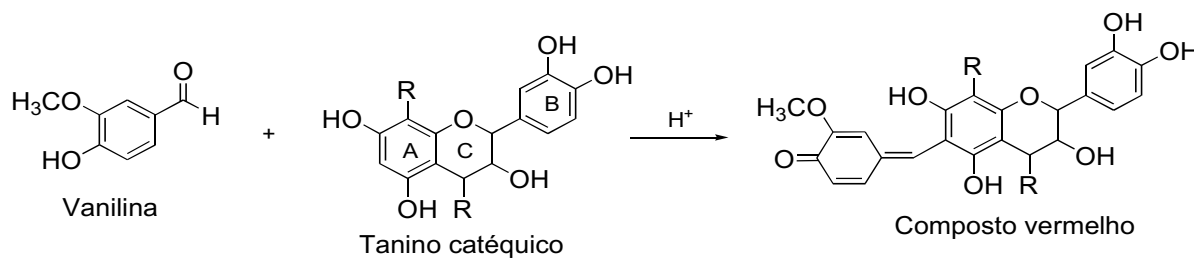
Nota: I – Partição hexânica; II - Partição clorofórmica; III - Partição acetato de etila; IV - Partição metanólica; V - Partição água. Fonte: Subramanian e Venugopal (2011).

Observando os valores das duas *Cassias* estudadas, fica nítido o baixo conteúdo de fenóis totais para ambas as espécies, quando comparada ao do atual trabalho.

5.4.3 Análise do teor de proantocianidinas

A quantificação do teor de proantocianidinas presentes nos extratos brutos e partições foi baseada no método da vanilina sulfúrica. Nesse método, a vanilina em meio ácido reage com moléculas de taninos condensados, formando um composto vermelho observado em 500 nm, com o aumento da contração (GUIMARÃES-BEELLEN et al., 2006). A reação de vanilina sulfúrica com um monômero de tanino condensado está representada na Figura 23.

Figura 23 - Reação da vanilina sulfúrica com tanino catéuico, em que R é o monômero de tanino condensado.



Fonte: adaptado de Schofield, Mbugua e Pell (2001).

Nesse parâmetro, o teor de proantocianidinas foi expresso em miligramas de equivalentes de catequina por grama de extrato (mg EC/ g_{extrato}). Na quantificação do conteúdo de proantocianidinas foi construída uma curva analítica com padrões de catequina, e que se encontra no apêndice B. Os resultados para teores de proantocianidinas dos extratos brutos e partições de *C. bakeriana* encontram-se na Tabela 10.

Tabela 10 - Teores de proantocianidinas dos extratos brutos e partições das flores de *C. bakeriana*.

| Amostras | | Teor de proantocianidinas (mg EC/ g _{extrato} ± média e desvio padrão) |
|-----------|--------------------|--|
| Extratos | Hexano | 49,6±2,0 |
| | Etanólico | 59,2±0,7 |
| Partições | <i>n</i> -Hexânica | 74,5±0,6 |
| | Diclorometano | 63,2±5,1 |
| | Acetato de etila | 83,9±1,2 |
| | <i>n</i> -butanol | 92,9±1,0 |
| | Água | 83,9±1,2 |

Fonte: o autor.

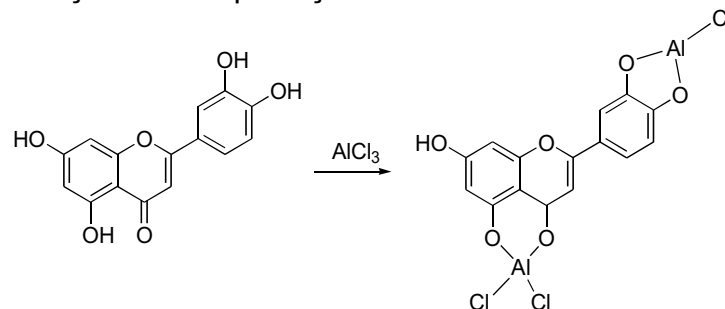
De acordo com resultados obtidos da Tabela 10, o extrato etanólico bruto apresentou maior teor de proantocianidinas comparado ao extrato hexano. Esse fato é observado também nos teores de fenóis totais, e o teor está linearmente associado ao rendimento obtido. Vale ressaltar que já foram previamente identificados diversos compostos de proantocianidinas em flores de outras espécies de *Cassia*. De acordo com o estudo realizado por Luximon-ramma e colaboradores (2002) o extrato etanólico das flores de *C. fistula* possui 14±2,1 mg EC/ g_{extrato} do teor de proantocianidinas, valor bastante inferior (24%) do que valor encontrado neste

trabalho. Dentre as partições, destacam-se a partição *n*-butanólica ($92,9 \pm 1,0$ mg EC/ g_{extrato}) onde apresentou moderado teor de proantocianinas identificado por CLAE neste trabalho.

5.4.4 Análise do teor de flavonoides

A quantificação do teor de flavonoides baseou-se no método utilizando uma solução de $AlCl_3$ (WOISKY e SALATINO 1998; ARYAL et al., 2019). Nesta análise o cátion alumínio (Al^{3+}) forma complexos estáveis com os flavonoides, como lustrado na Figura 24. O complexo formado apresenta absorção em comprimento de onda maior que o flavonoide não complexado. Desta forma, o monitoramento desta complexação é realizado em espectrofotométrico de absorção em 425 nm.

Figura 24 - Reação de complexação de uma estrutura de flavonoide $AlCl_3$.



Fonte: Mabry; Markham; Thomas, (1970).

O teor de flavonoides foi calculado através de uma curva analítica com padrões de quercetina e apresentada no apêndice B. Para quantificar o teor de flavonoides foi utilizada a mesma curva obtida da reação entre a quercetina e o $AlCl_3$ versus a concentração de quercetina. O resultado foi dado em mg de equivalente de quercetina (mg EQ g_{extrato}) e por grama de material vegetal seco (mg EQ/ g_{extrato}). Este último considera o rendimento de extração. Quanto maior esse valor maior o teor. Os resultados para o teor de flavonoides encontram-se na Tabela 11.

Tabela 11 - Teores de flavonoides dos extratos brutos e partições das flores de *C. bakeriana*.

| Amostras | | Teor de flavonoides (mg EQ/ g _{extrato} ± média e desvio padrão) |
|-----------|--------------------|--|
| Extratos | Hexano | 72,8±3,5 |
| | Etanólico | 109,6±0,4 |
| Partições | <i>n</i> -Hexânica | 54,0±0,0 |
| | Diclorometano | 73,1±0,5 |
| | Acetato de etila | 128,6±0,6 |
| | <i>n</i> -butanol | 18,4±6,9 |
| | Água | 0,9±0,5 |

Fonte: o autor.

O extrato etanólico indicou maior teor de flavonoides do que o extrato hexano. Este resultado já era esperado, assim como já destacado e discutido para os teores de fenóis totais e proantocianidinas nas amostras polares. Novamente esse alto teor no extrato etanólico (109,6±0,4 mg EQ/ g_{extrato}) é observado na prospecção fitoquímica (Tabela 5), que também é correlacionada com flavonoides previamente identificados por CLAE-ESI-EM nesta amostra.

A investigação de Prasath e colaboradores (2019) com o extrato etanólico das flores de *C. auriculata* indicou um valor de teor de flavonoides de 262,31 ± 3,01 mg, valor 2,4 vezes maior do que o valor encontrado neste trabalho. O extrato etanólico das flores de *C. siamea* apresentou o maior teor de flavonoides (68,9 mg EQ / g_{extrato}) (Tabela 11). Kaisoon e colaboradores (2011) observaram um conteúdo abaixo (68,9%) do valor do extrato etanólico neste presente trabalho (109,6 mg EQ / g_{extrato}), e que resultou numa baixa atividade antioxidante das flores de *C. siamea*. Outro estudo com o extrato etanólico das flores de *C. fistula* Luximon-ramma e colaboradores (2002) apresentou teor de 8,0 ± 0.3 mg EQ/ g_{extrato}, teor bem abaixo (7,0%) do encontrado no atual trabalho (109,6±0,4 mg EQ/ g_{extrato}).

Quanto às partições, o maior conteúdo de flavonoides é apresentado pela partição acetato de etila (128,6±0,0 mg EQ/ g_{extrato}). O alto teor desta partição estar associado à prospecção fitoquímica (Tabela 5), e confirmada na análise de CLAE-EM-IES. Seguidamente, a partição diclorometano apresentou o segundo conteúdo de flavonoides (73,1±0,0 mg EQ/ g_{extrato}), correlacionado também com a prospecção fitoquímica (Tabela 5).

O baixo teor de flavonoides na partição *n*-butanol 18,4±0,0 mg EC/ g_{extrato} pode estar relacionado à retenção dos compostos com maior polaridade contida na partição acetato de etila e diclorometano, e de acordo com a prospecção fitoquímica.

Subramanian e Venugopal (2011) avaliaram também o teor de flavonoides das partições das flores de *Cassia auriculata* e *C. siamea*, apresentado pela Tabela 12.

Tabela 12 - Teor de flavonoides nas partições das flores de *C. auriculata* e *C. siamea*.

| Espécie | Teor de flavonoides ($\mu\text{g mL}^{-1}$) | | | | |
|----------------------|---|--------|--------|--------|--------|
| | I | II | III | IV | V |
| <i>C. auriculata</i> | 93,5 | 109,65 | 140,72 | 156,88 | 121,11 |
| <i>C. siamea</i> | 77,6 | 80,36 | 117,45 | 143,08 | 86,15 |

Nota: I – Partição hexânica; II - Partição clorofórmica; III - Partição acetato de etila; IV - Partição metanólica; V - Partição água. Fonte: Subramanian; Venugopal, (2011).

As partições das flores da *C. auriculata* e da *C. siamea* apresentaram valores de flavonoides maiores do que aqueles encontrados nas partições das flores de *C. bakeriana*, que apresentou valores significativos de flavonoides somente na partição acetato de etila (128,6 mg EQ/ g_{extrato}).

5.5 ATIVIDADE ANTIFÚNGICA

Para a avaliação da atividade antifúngica foi empregado o método da microdiluição em caldo, a qual permite determinar o valor da concentração inibitória mínima (CIM), que é considerada como a mínima concentração de amostra capaz de inibir visivelmente o crescimento dos microrganismos (CAVLING ARENDRUP et al., 2014; APAK et al., 2013). O agente revelador utilizado neste método para fazer a leitura da viabilidade dos microrganismos foi a resazurina (CASTILHO et al 2015; NEPOMUCENO et al.,2017; MATSUURA et al., 2019). Os resultados das CIM's para extratos e partições estão apresentados na Tabela 13.

Tabela 13 – Atividade antifúngica dos extratos e partições das flores de *C. bakeriana* Craib.

| Amostra | CIM ($\mu\text{g mL}^{-1}$) | | |
|---------|-------------------------------|----------------------|--------------------|
| | <i>C. albicans</i> | <i>C. tropicalis</i> | <i>C. glabrata</i> |
| EHF | 375,0 | 375,0 | 375,0 |
| EEF | 750,0 | 11,7 | 11,7 |
| P-HF | 46,9 | 5,9 | 5,9 |
| P-DF | 93,8 | 5,9 | 11,7 |
| P-AEF | 375,0 | 187,5 | 23,4 |
| P-BF | 1500,0 | 5,9 | 5,0 |
| P-AF | 1500,0 | 5,9 | 2,9 |

| Anfotericina B | 0,25 | 0,25 | 0,12 |
|----------------|------|------|------|
|----------------|------|------|------|

Fonte: EHF – extrato hexânico flores; EEF- extrato etanólico flores; P-HF- partição *n*-hexânica flores; P-DF- partição diclorometano flores; P-AEF- partição acetato de etila flores; P-BF- partição *n*-butanol flores; Leveduras utilizadas para controle da metodologia segundo o protocolo M27-A3 CLSI (2008): *Candida krusei* (CIM 1 µg mL⁻¹) e *Candida parapsilosis* (CIM: 0.25 µg mL⁻¹).

De acordo com Kuete (2010), a atividade antifúngica dos extratos de vegetais pode ser considerada como significativa quando o valor da CIM é inferior a 100 µg mL⁻¹; moderados para CIM entre 100 e 625 µg mL⁻¹ e fracos quando a CIM é superior a 625 µg mL⁻¹.

Tendo em vista este indicativo de atividade antifúngica, observou-se que o extrato EEF e partições apresentaram significativa atividade antifúngica, notadamente contra as cepas *C. tropicalis* e *C. glabrata*. Com relação à levedura *C. albicans*, as partições P-HF e P-DF apresentaram significativa atividade, a P-AEF apresentou moderada, enquanto que o EEF e as partições P-BF e P-AF evidenciaram fraca atividade.

Já o extrato EHF das flores de *C. bakeriana* apresentou uma atividade moderada, com CIM de 375,0 µg mL⁻¹ para todas as cepas avaliadas. Já a partição P-HF também apresentou altíssima atividade antifúngica, com CIM variando de 5,9 a 46,9 µg mL⁻¹. Este fato deve estar associado aos possíveis biocompostos mais apolares presentes nas flores, como os terpenos (RAO et al., 2010; POLONI et al., 2020), que podem penetrar as membranas das hifas, por serem mais lipossolúveis.

Estudos tem reportado que a classe de flavonoides é também um potente agente antifúngico (RAO et al., 2010; YADAV et al., 2010; ZHAO et al., 2016; ZACCHINO et al., 2017; ERECEVIT; KIRBAG, 2017; FATMAWATI et al., 2020).

As partições P-DF e P-BF apresentaram também altíssima atividade antifúngica, com valores de CIM's 5,9 µg mL⁻¹ contra os fungos *C. tropicalis* e *C. glabrata*. Esta altíssima atividade antifúngica se deve, possivelmente, a seus altos teores de compostos fenólicos (Tabela 8, Tabela 10, Tabela 11), e identificados por CLAE-EM-IES (Tabela 7), e já amplamente relacionados com esta atividade na literatura (SIMONETTI et al. 2020; PERES, 2012; ZIDA et al., 2017).

Os flavonoides e terpenos, em geral, tem apresentado efeito anti-*Candida*, e esta atividade em muitos extratos foi relacionada com a presença desses compostos (ERECEVIT; KIRKBAG, 2017; ZACCHINO et al., 2017;).

Outra classe de compostos identificada na partição P-HF e P-DF (Tabela 7) nas flores de *C. bakeriana*, foram os derivados de ácidos graxos e os flavonoides, que

podem ter contribuído para a atividade antifúngica apresentada nas amostras, uma vez que esses compostos têm sido reportados pela literatura como antifúngicos (MARTIN et al., 2006; PERES et al., 2012; ZACCHINO et al., 2017).

Outro ponto a ser destacado é a mesma potencialidade das partições P-DF e P-AEF das flores foi também encontrada nas folhas da mesma planta com CIM's 93,75 e 187,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente, apresentando os melhores resultados contra *C. glabrata* (SILVA et al., 2019). Em contrapartida, as partições P-BF e P-AF das flores de *C. bakeriana* apresentaram fraca atividade (CIM de 1500,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$) contra *C. albicans*.

Algumas espécies de *Cassia* já foram avaliadas contra diferentes espécies de *Candida* (Tabela 14). A *C. fistula*, mais conhecida popularmente como Cassia imperial e chuva de ouro, destaca-se por inúmeros estudos e pela diversidade existente por todas as regiões do Brasil. Na investigação de Duraipandiyar e Ignacimuthu (2007), os extratos em hexano, clorofórmio, acetato de etila, metanol e água, obtidos das flores de *C. fistula* foram avaliados frente ao fungo *C. albicans*. Todos os extratos avaliados apresentaram CIM de 5000 $\mu\text{g mL}^{-1}$, concentração bem maior do que as usadas neste presente trabalho.

Segundo Abubacker e colaboradores (2008), o extrato aquoso das flores de *C. alata* apresentou excelentes resultados frente a fungo *C. albicans*, com valores de CIM entre de 5,75 a 8,00 mg mL^{-1} , o que é considerado significativo. Os extratos das flores de *C. javanica* também foram avaliadas contra *C. albicans* com diferentes extratos (Tabela 14). O extrato aquoso apresentou uma zona de inibição com diâmetro de 18.6 mm, seguidamente do extrato benzênico, clorofórmico, etanólico, acetato de etila, com zonas de inibição de diâmetro de 11.6 mm, 15.8 mm, 18.2 mm, 21.3 mm, respectivamente (BHUVANESWARI; GOBALAKRISHNAN, 2015).

Outro estudo recente com flores de distintas subfamílias de *Cassia* é destacado no trabalho de Nascimento e colaboradores (2020). O extrato etanólico de flores da *S. macranthera* exerceu efeito antifúngico significativo, com valores de CIM variando de 5,9 a 23,4 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Tabela 16). Ainda, no trabalho de revisão de Hafez e colaboradores (2019), foi estudada a composição química e a atividade farmacológica de diversas espécies do gênero *Cassia*. Destaca-se nesta revisão trabalhos com diversos extratos de flores com atividade antifúngica.

No trabalho relatado por Silva e colaboradores (2019) a partição P-AE das folhas de *C. bakeriana* apresentou CIM de 187,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 375 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 750 $\mu\text{g mL}^{-1}$ contra os fungos *C. glabrata*, *C. albicans* e *C. tropicalis*, respectivamente. No mesmo trabalho de Silva e colaboradores (2019) as partições de folhas mais ativas para a *C. glabrata* foi a diclorometano (P-D) e a acetato de etila (P-AE), com CIM de 93,75 e 187,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente (Tabela 13).

A Tabela 14 a seguir apresenta de forma resumida os CIM's e os DI's (diâmetros inibitórios) para extratos e partições das flores e folhas da espécie de *Cassia*.

Tabela 14- CIM's e DI's da atividade antifúngica dos extratos e partições de folhas e flores das espécies de Cassia.

| Matriz | Extrato | CIM/DI | Candida spp. | Referência | Espécie/Cassia |
|---------------|--|---------------|----------------------|------------------------------------|---------------------------|
| Flores | Extrato hexano ^c | >5 | <i>C. albicans</i> | DURAI PANDIYAN; IGNACIMUTHU (2007) | <i>C. fistula</i> L. |
| Flores | Extrato clorofórmico ^c | >5 | <i>C. albicans</i> | DURAI PANDIYAN; IGNACIMUTHU (2007) | <i>C. fistula</i> L. |
| Flores | Extrato acetato de etila ^c | >5 | <i>C. albicans</i> | DURAI PANDIYAN; IGNACIMUTHU (2007) | <i>C. fistula</i> L. |
| Flores | Extrato metanólico ^c | >5 | <i>C. albicans</i> | DURAI PANDIYAN; IGNACIMUTHU (2007) | <i>C. fistula</i> L. |
| Flores | Extrato água ^c | >5 | <i>C. albicans</i> | DURAI PANDIYAN; IGNACIMUTHU (2007) | <i>C. fistula</i> L. |
| Flores | Extrato aquoso ^c | 18.6 | <i>C. albicans</i> | BHUVANESWARI; GOBALAKRISHNAN, 2015 | <i>C. javanica</i> L. |
| Flores | Extrato benzênico ^c | 11.6 | <i>C. albicans</i> | BHUVANESWARI; GOBALAKRISHNAN, 2015 | <i>C. javanica</i> L. |
| Flores | Extrato clorofórmico ^c | 15.8 | <i>C. albicans</i> | BHUVANESWARI; OBALAKRISHNAN, 2015 | <i>C. javanica</i> L. |
| Flores | Extrato etanólico ^c | 18.2 | <i>C. albicans</i> | BHUVANESWARI; OBALAKRISHNAN, 2015 | <i>C. javanica</i> L. |
| Flores | Extrato acetato de etila ^c | 21.3 | <i>C. albicans</i> | BHUVANESWARI; OBALAKRISHNAN, 2015 | <i>C. javanica</i> L. |
| Flores | Extrato aquoso ^c | 5.75 | <i>C. albicans</i> | ABUBACKER et al., (2008) | <i>C. alata</i> Linn |
| Flores | Extrato etanólico ^a | 5,9 | <i>C. albicans</i> | NASCIMENTO et al., (2020) | <i>S. macranthera</i> |
| Flores | Extrato etanólico ^a | 23,4 | <i>C. tropicalis</i> | NASCIMENTO et al., (2020) | <i>S. macranthera</i> |
| Flores | Partição acetato de etila ^a | 5,9 | <i>C. glabrata</i> | NASCIMENTO et al., (2020) | <i>S. macranthera</i> |
| Folhas | Partição acetato de etila ^a | 187,5 | <i>C. glabrata</i> | SILVA (2019) | <i>C. bakeriana</i> Craib |
| Folhas | Partição acetato de etila ^a | 375 | <i>C. albicans</i> | SILVA (2019) | <i>C. bakeriana</i> Craib |
| Folhas | Partição acetato de etila ^a | 750 | <i>C. tropicalis</i> | SILVA (2019) | <i>C. bakeriana</i> Craib |

Nota: ^amétodo da microdiluição em caldo ($\mu\text{g mL}^{-1}$); ^bmétodo de difusão em poço; ^cmétodo de difusão em ágar; DI - diâmetro inibitório (mm). Fonte o autor.

As flores de *C. bakeriana* evidenciaram relevante atividade antifúngica, uma vez que o extrato etanólico e partições apresentaram valores de CIM abaixo de 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e também mais baixos que outros estudos da literatura.

5.6 ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

A atividade antimicrobiana dos extratos e partições das flores de *C. bakeriana* foi determinada frente aos microrganismos bucais aeróbicos e anaeróbicos, sendo os resultados dado em Concentração Inibitória Mínima (CIM), correspondente à concentração mais baixa de um composto, partição ou extrato capaz de inibir o crescimento de um microrganismo (CLSI, 2012a). Os resultados da atividade antimicrobiana estão apresentados na Tabela 15.

Segundo Holetz e colaboradores (2002), valores de CIM, abaixo de 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$, indicam que a atividade antimicrobiana é considerada boa; valores de 100 e 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ é moderada; valores entre 500 e 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ é fraca; valores acima de 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ é considerada inativo. Estevam e colaboradores (2016), salientam que, os valores da CIM abaixo de 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ podem ser consideradas atividades promissoras. Considerando os valores na Tabela 15, de forma geral, os extratos e partições apresentaram moderada atividade antibacteriana para todas as bactérias testadas (CIM's de 400 $\mu\text{g mL}^{-1}$), sejam anaeróbicas ou aeróbicas. As partições de P-DF e P-BF indicaram os melhores valores, ambos com CIM de 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ frente a *A. naeslundii*. Assim como foi discutido na atividade antifúngica, a atividade antibacteriana encontrada, pode também estar associada aos teores de fenóis totais obtidos e aos possíveis compostos fenólicos previamente identificados nestas amostras por CLAE-EM-IES, apresentados na Tabela 7

Tabela 15 - Atividade antibacterina dos extratos e partições das flores da *C. bakeriana* contra bactérias bucais aeróbicas e anaeróbicas.

| Microrganismos | Extratos e partições de flores de <i>C. bakeriana</i> | | | | | | | | |
|----------------|--|-----|------|------|-------|------|------|-----|------|
| | Concentração inibitória mínima (MIC) - $\mu\text{g mL}^{-1}$ | | | | | | | | |
| | EH | EE | P-HF | P-DF | P-AEF | P-BF | P-AF | CDH | |
| Aeróbicas | <i>S. mutans</i> ² | 400 | 400 | 400 | 400 | 400 | 400 | 400 | 0.92 |
| | <i>S. mitis</i> ² | 400 | 400 | 400 | 400 | 400 | 400 | 400 | 3.68 |
| | <i>S. sanguinis</i> ² | 400 | 400 | 400 | 400 | 400 | 400 | 400 | 0.92 |
| | <i>A. actinomyces-temcomitans</i> ² | 400 | 400 | 400 | 400 | 400 | 400 | 400 | 7.37 |
| Anaeróbicas | <i>P. gingivalis</i> ¹ | 400 | 400 | 400 | 400 | 400 | 400 | 400 | 3.68 |
| | <i>F. nucleatum</i> ¹ | 400 | 400 | 400 | 400 | 400 | 400 | 400 | 1.84 |
| | <i>A. naeslundii</i> ¹ | 400 | 400 | 400 | 50 | 400 | 50 | 400 | 1.84 |

Nota: EHF- extrato hexânico flores; EEF- extrato etanólico flores; P-HF- partição hexano flores; P-DF- partição diclorometano flores; P-AEF- partição acetato de etila flores; P-BF- partição *n*-butanol flores 1. Bactéria Gram-negativa; 2. Bactéria Gram-positiva; Controle positivo: CDH (dicloridrato de clorexidina); Bactérias controle da metodologia segundo o protocolo M11-A7 CLSI (2012b): *Bacteroides fragilis* (CIM = 0.7 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e *bacteroides thetaiotaomicron* (CIM = 1.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Fonte: o autor.

Na literatura, estudos com flores do gênero *Cassia* têm demonstrado resultados significativos frente a agentes antibacterianos, Gram-positivo e Gram-negativo. A revisão de Hafez e colaboradores (2019) traz estudos da composição química e atividade farmacológica de diversas espécies do gênero *Cassia*, relatando diversas atividades biológicas, inclusive potencial antibacteriano. Vale destacar que muitos valores expressos em miligramas por mililitro são superiores aos resultados encontrados neste estudo com as flores da *C. bakeriana*.

Ainda segundo Nascimento e colaboradores (2020), o extrato etanólico das flores *S. macranthera* apresenta também atividades antimicrobianas moderadas, com CIM's variando entre 200,0 e 400,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para todas as bactérias bucais testadas. No estudo de Daniyan e colaboradores (2011), ao investigar as flores de *C. occidentalis*, os autores encontraram valor de CIM de 55 mg mL^{-1} para os extratos frente ao microorganismo *Klebsiella pneumoniae*. Já no estudo de Duraipandiyan e Ignacimuthu (2007), os extratos em *n*-hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol obtidos das flores de *C. fistula* foram avaliados frente as bactérias *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Bacillus subtilis* e todos os extratos avaliados apresentaram atividade diâmetros de inibições variando de 8 a 23 mm. Em outro

estudo, Bhuvanewari e Gobalakrishnan (2015), encontraram que os extratos das flores de *C. javanica* contra as bactérias *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, e *Streptococcus pyogenes* apresentaram atividade com diâmetros de inibição variando entre 8.4 a 24.1 mm.

No estudo com a espécie *C. bakeriana*, de Cunha e colaboradores (2013a), os óleos essenciais das folhas apresentaram considerável atividade antibacteriana, com CIM de 62,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para a maioria das bactérias bucais, incluindo *Streptococcus mutans*. Em outro estudo de Cunha e colaboradores (2017) com folhas da *C. bakeriana*, o extrato etanólico e partições das folhas mostraram um efeito antibacteriano significativo, com valores de CIM's variando de 12,5 a 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para a maioria dos microrganismos testados.

Vale ressaltar que alguns dos compostos aqui identificados, por CLAE-ESI-EM/EM previamente, nas partições P-DF e P-BF das flores da *C. bakeriana* foram reportados pela literatura como anti-inflamatório, antialérgico, antiviral, antitumoral e, principalmente, pela atividade antibacteriana, exemplo a diosmetina, a naringenina e a quercetina-3-O-ramnosídeo, (PATEL et al., 2013; CHERRAK; MERZOUK; MOKHTARI-SOULIMANE, 2020), entre outros. Abaixo são apresentados os valores de CIM's e DIs dos extratos e das partições das flores, folhas e óleos da espécie de *Cassia* (Tabela 16).

Tabela 16 - CIM's e DI's da atividade antibacteriana dos extratos e partições de flores, folhas das espécies de Cassia. (continua).

| Matriz | Extrato | CIM/DI | Bactérias | Referência | Espécie/Cassia |
|---------------|---------------------------------------|---------------|-------------------------|-------------------------------------|-------------------------|
| Flores | Extrato etanólico ^a | 400.0 | <i>S. mutans</i> | NASCIMENTO et al., (2020) | <i>S. macranthera</i> |
| Flores | Extrato etanólico ^a | 5.9 | <i>A. naeslundii</i> | NASCIMENTO et al., (2020) | <i>S. macranthera</i> |
| Flores | Extrato etanólico ^a | 55 | <i>K. pneumoniae</i> | DANIYAN et al., (2011) | <i>C. occidentalis</i> |
| Flores | Extrato hexano ^c | 9 | <i>S. aureus</i> | DURAIPANDIYAN; IGNACIMUTHU, (2007) | <i>C. fistula</i> L |
| Flores | Extrato hexano ^c | 8 | <i>S. epidermidis</i> , | DURAIPANDIYAN; IGNACIMUTHU, (2007) | <i>C. fistula</i> L |
| Flores | Extrato hexano ^c | 9 | <i>B. subtilis</i> | DURAIPANDIYAN; IGNACIMUTHU, (2007) | <i>C. fistula</i> L |
| Flores | Extrato clorofórmico ^c | 11 | <i>S. aureus</i> | DURAIPANDIYAN; IGNACIMUTHU, (2007) | <i>C. fistula</i> L |
| Flores | Extrato clorofórmico ^c | 18 | <i>S. epidermidis</i> | DURAIPANDIYAN; IGNACIMUTHU, (2007) | <i>C. fistula</i> L |
| Flores | Extrato clorofórmico ^c | 10 | <i>B. subtilis</i> | DURAIPANDIYAN; IGNACIMUTHU, (2007) | <i>C. fistula</i> L |
| Flores | Extrato acetato de etila ^c | 13 | <i>S. aureus</i> | DURAIPANDIYAN; IGNACIMUTHU, (2007) | <i>C. fistula</i> L |
| Flores | Extrato acetato de etila ^c | 23 | <i>S. epidermidis</i> | DURAIPANDIYAN; IGNACIMUTHU, (2007) | <i>C. fistula</i> L |
| Flores | Extrato acetato de etila ^c | 15 | <i>B. subtilis</i> | DURAIPANDIYAN; IGNACIMUTHU, (2007) | <i>C. fistula</i> L |
| Flores | Extrato metanólico ^c | 8 | <i>S. aureus</i> | DURAIPANDIYAN; IGNACIMUTHU, (2007) | <i>C. fistula</i> L |
| Flores | Extrato metanólico ^c | 10 | <i>S. epidermidis</i> | DURAIPANDIYAN; IGNACIMUTHU, (2007) | <i>C. fistula</i> L |
| Flores | Extrato metanólico ^c | 15 | <i>B. subtilis</i> | DURAIPANDIYAN; IGNACIMUTHU, (2007) | <i>C. fistula</i> L |
| Flores | Extrato água ^c | 11 | <i>S. aureus</i> | DURAIPANDIYAN; IGNACIMUTHU, (2007) | <i>C. fistula</i> L |
| Flores | Extrato etanólico ^c | 8.4 | <i>E. coli</i> | BHUVANESWARI; GOBALAKRISHNAN (2015) | <i>C. javanica</i> Linn |
| Flores | Extrato acetato de etila ^c | 24.1 | <i>E. coli</i> | BHUVANESWARI; GOBALAKRISHNAN (2015) | <i>C. javanica</i> Linn |
| Flores | Extrato aquoso ^c | 11.5 | <i>B. subtilis</i> | BHUVANESWARI; GOBALAKRISHNAN (2015) | <i>C. javanica</i> Linn |
| Flores | Extrato benzênico ^c | 11 | <i>B. subtilis</i> | BHUVANESWARI; GOBALAKRISHNAN (2015) | <i>C. javanica</i> Linn |
| Flores | Extrato etanólico ^c | 10.2 | <i>B. subtilis</i> | BHUVANESWARI; GOBALAKRISHNAN (2015) | <i>C. javanica</i> Linn |
| Flores | Extrato acetato de etila ^c | 21.8 | <i>B. subtilis</i> | BHUVANESWARI; GOBALAKRISHNAN (2015) | <i>C. javanica</i> Linn |

Tabela 16 - CIM's e DI's da atividade antibacteriana dos extratos e partições de flores, folhas das espécies de *Cassia*. (conclusão).

| | | | | | |
|--------|-------------------------------------|------|--------------------|--|---------------------------|
| Flores | Extrato etanólico ^c | 8.6 | <i>S. pyogenes</i> | BHUVANESWARI; GOBALAKRISHNAN (2015) | <i>C. javanica</i> Linn |
| Flores | Extrato aquoso ^c | 13.7 | <i>S. pyogenes</i> | BHUVANESWARI; GOBALAKRISHNAN (2015) | <i>C. javanica</i> Linn |
| Folhas | Óleos essencial ^a | 62,5 | <i>B. fragilis</i> | CUNHA et al., (2013a) | <i>C. bakeriana</i> Craib |
| Folhas | Óleos essencial ^a | 62,5 | <i>S. mutans</i> | CUNHA et al., (2013a) | <i>C. bakeriana</i> Craib |
| Folhas | Extrato etanólico ^a | 100 | <i>B. fragilis</i> | CUNHA et al., (2017) | <i>C. bakeriana</i> Craib |
| Folhas | Partição diclorometano ^a | 12.5 | <i>S. mutans</i> | CUNHA et al., (2017) | <i>C. bakeriana</i> Craib |
| Folhas | Partição diclorometano ^a | 25 | <i>S. sobrinus</i> | CUNHA et al., (2017) | <i>C. bakeriana</i> Craib |

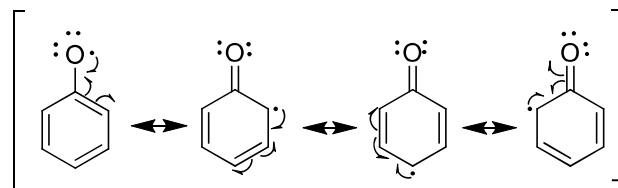
Nota: ^amétodo da microdiluição em caldo ($\mu\text{g mL}^{-1}$); ^bmétodo de difusão em poço; ^cmétodo de difusão em ágar; DI - diâmetro inibitório (mm). Fonte o autor.

Conclui-se, portanto, que as flores de *Cassia bakeriana* também possuem considerável atividade antibacteriana contra bactérias bucais aeróbicas e anaeróbicas.

5.7 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Uma vez que extratos e partições das flores de *C. Bakeriana* apresentaram, de forma geral, moderado teor de compostos fenólicos (Tabela 8, Tabela 10 e Tabela 12), a atividade antioxidante de cada amostra foi analisada por diferentes métodos. Os compostos fenólicos apresentam elevada atividade antioxidante por reagir com espécies sequestradoras de radicais. A estabilidade destes compostos fenólicos ocorre pela deslocalização do radical que se forma durante a reação com espécies radicalares, através de estruturas de ressonâncias (Figura 25).

Figura 25 - Estruturas de ressonância do radical fenoxila.



Fonte: o autor

Os compostos fenólicos são grupos fitoquímicos que inclui famílias distintas de metabólitos aromáticos, especializados em plantas. Esses compostos fenólicos são uma fonte eficiente de ação antioxidante na prevenção do envelhecimento precoce, diabetes e doenças degenerativas relacionadas aos danos causados ao organismo humano, pelos radicais livres, como câncer, doenças cardiovasculares, disfunções cerebrais, e responsáveis pelo estresse oxidativo. Estes danos também têm sido o principal responsável na progressão das complicações do diabetes, que é causado pela glicose e ácidos graxos nos músculos (LÓPEZ-ALARCÓNA; DENICOLA, 2012; ZHONG; SHAHIDI, 2015; ASMAT, ABAD, ISMAIL, 2016; HAMEISTER et al., 2019).

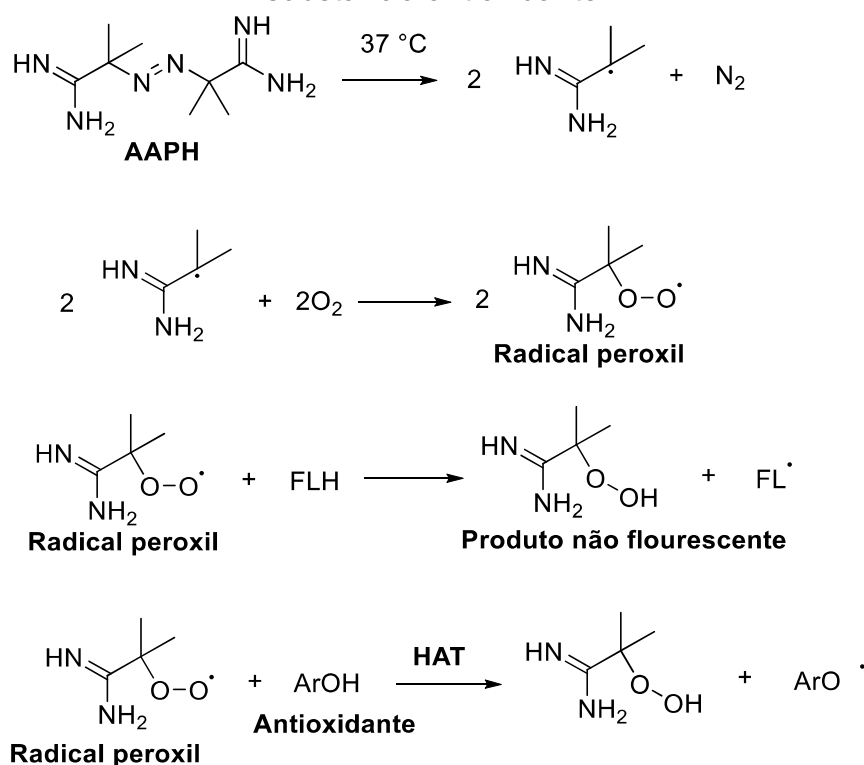
Deste modo, a atividade antioxidante de extratos e partições de flores da *C. bakerina* foi avaliada, nesse trabalho, por três métodos: Capacidade de Absorbância de Radical Oxigênio ou “*Oxygen radical absorbance capacity*” (ORAC), método do

sequestro do radical DPPH•, e o Poder Antioxidante Redutor Férrico ou “*Total radical-trapping antioxidant parameter*” (FRAP) (QUARESMA et al. 2020).

O método ORAC baseia-se na perda de fluorescência do indicador fluoresceína pela atividade do radical peróxil (ROO•). Neste ensaio, o radical peróxil, gerado pela reação do 2,2'-azobis (2-amidinopropano di-hidrocloro) (AAPH) com o radical peróxil que gera um produto com carbono radicalar, que reage com oxigênio atmosférico, gerando dessa forma o radical ROO• que reage com o indicador fluorescente (ALVES et al., 2010; LÓPEZ-ALARCÓNA; DENICOLA, 2012; ZHONG; SHAHIDI, 2015; ZYGULA et al., 2018).

O mecanismo de reação no método ORAC (Figura 26) consiste na transferência de um átomo de hidrogênio (HAT, do inglês “*hydrogen atom transfer*”), em que o ROO• abstrai um átomo de hidrogênio do composto antioxidante (ArOH), resultando na formação de um radical antioxidante estável (ArO•) (LÓPEZ-ALARCÓNA; DENICOLA, 2012; LITESCU et al., 2014; ZYGULA et al., 2018; ZHONG; SHAHIDI, 2015; HAMEISTER et al., 2019).

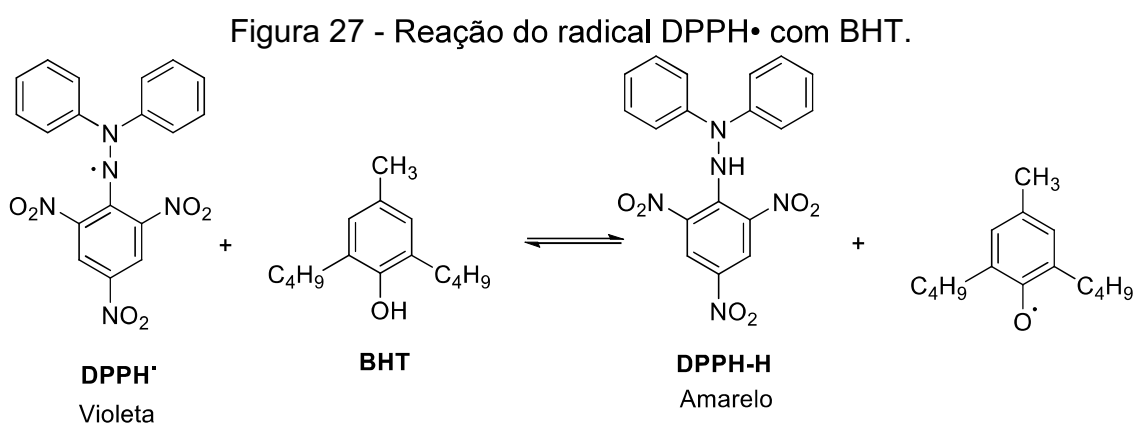
Figura 26 - Formação do radical peróxil e sua reação com a fluoresceína e a substância antioxidante.



Nota: FLH= fluoresceína; ArOH = fenol
Fonte: Litescu e colaboradores (2014).

O método do sequestro do radical DPPH• é bastante empregado para a análise da capacidade antioxidante de compostos fenólicos por ser preciso, rápido e simples. Consiste na avaliação da atividade sequestradora do DPPH• que possui coloração roxa, absorvendo em comprimento de onda de 517 nm. Assim, o composto antioxidante (o DPPH•) é reduzido, formando 2,2-difenilpicrilidrazina (DPPH-H) de coloração amarela (LÓPEZ-ALARCÓNA; DENICOLA, 2012; LITESCU et al., 2014; ZHONG; SHAHIDI, 2015; HAMEISTER et al., 2019).

A Figura 27 ilustra as reações entre o DPPH• e os compostos antioxidantes, que também podem ocorrer pelo mecanismo de transferência de átomos de hidrogênio (HAT) ou pelo mecanismo de perda sequencial de próton, na transferência de elétron (SPLET, do inglês “*sequential próton loss electron transfer*”; LÓPEZ-ALARCÓNA; DENICOLA, 2012; ZHONG; SHAHIDI, 2015; HAMEISTER et al., 2019).



Fonte: Oliveira e colaboradores (2009).

O método de FRAP baseia-se na medida da capacidade de redução do íon ferro da forma férrica para a ferrosa (Fe^{+3} a Fe^{+2} , respectivamente), quelado com a molécula 2,4,6-tris(2-piridil)-s-triazina (TPTZ), formando o complexo TPTZ- Fe^{+2} . Esse complexo, quando formado, desenvolve uma coloração azul bem intensa, com máxima absorção em 593 nm. Nesse ensaio, as moléculas de TPTZ se quelam ao íon férrico, formando o complexo férrico, o reagente de FRAP. Então, o poder antioxidante das amostras é medido pela capacidade em que ele tem de se reduzir o íon à Fe^{2+} . (LÓPEZ-ALARCÓNA; DENICOLA, 2012; ZHONG; SHAHIDI, 2015; ZYGULA et al., 2018).

Os resultados da atividade antioxidante de *C. bakeriana* pelo método ORAC e FRAP foram expressos em μmol de equivalente do antioxidante trolox por grama de extrato/partição ($\mu\text{mol ET/g}$ amostra). Portanto, quanto maior o valor, maior é a atividade antioxidante. Quanto ao método do DPPH[•], foi calculado o percentual de DPPH[•] sequestrado (%), e para as amostras que apresentaram percentual superior a 80%, foi calculado a IC₅₀ que é a concentração necessária para sequestrar 50% do DPPH[•]. Deste modo, quanto menor esse valor, maior a atividade antioxidante (Tabela 17).

Tabela 17 - Atividade antioxidante apresentada pelos extratos, partições de *C. bakeriana* pelos métodos ORAC, DPPH[•] e FRAP.

| Amostra | ORAC | DPPH [•] | | FRAP |
|----------------------|---------------------------------|-------------------|--|---------------------------------|
| | ($\mu\text{mol trolox eq/g}$) | (%) sequestro | (IC ₅₀ , $\mu\text{g L}^{-1}$) | ($\mu\text{mol trolox eq/g}$) |
| EHF | 202,1 ± 75,9 | 0,0 ± 0,0 | - | 27,9 ± 11,4 |
| EEF | 2039,6 ± 396,9 | 91,8 ± 0,2 | 59,9 ± 5,3 | 516,5 ± 47,0 |
| P-HF | 924,0 ± 79,9 | 88,5 ± 2,9 | 75,2 ± 5,5 | 337,3 ± 29,3 |
| P-DF | 1728,8 ± 241,6 | 91,1 ± 0,3 | 53,4 ± 7,3 | 518,8 ± 36,5 |
| P-AEF | 3982,9 ± 67,8 | 92,8 ± 0,5 | 9,8 ± 0,4 | 1403,2 ± 150,7 |
| P-BF | 1312,8 ± 41,7 | 84,6 ± 4,9 | 118,3 ± 12,5 | 387,5 ± 44,3 |
| P-AF | 478,0 ± 120,5 | 88,5 ± 2,9 | 64,8 ± 14,2 | 310,0 ± 21,0 |
| Ác. Ascórbico | 4165,3 ± 129,4 | 93,7 ± 0,2 | 2,4 ± 0,0 | 1317,2 ± 11,3 |

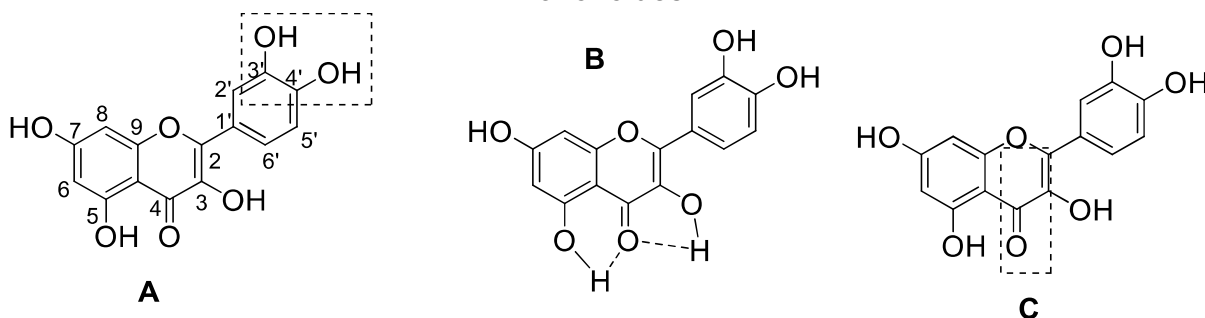
Nota: Concentração dos extratos e partições 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$; -: não obtido. Ácido ascórbico: controle positivo. EHF= extrato hexano das flores; EEF= extrato etanólico das flores; P-HF= partição hexânica das flores; P-DF= partição diclorometano; P-AEF=partição acetato de etila; P-BF= partição butanol das flores; P-AF=partição aquosa das flores

O EHF apresentou menor atividade antioxidante para todos os ensaios testados, sendo menor que o controle positivo (ácido ascórbico), nos ensaios ORAC e FRAP, além de apresentar percentual nulo de sequestro no ensaio DPPH[•], resultado pelo qual já era esperado, devido aos baixos teores obtidos de fenóis, proantocianidinas e flavonoides nesta amostra (Tabela 8Tabela 10Tabela 11). Em contrapartida, o EEF apresentou alta atividade antioxidante, o que pode ser também relacionado aos teores de compostos polifenólicos, previamente identificados nesta amostra.

As partições P-HF e P-AF, seguida da P-BF, apresentaram nos métodos ORAC e FRAP atividades antioxidantes moderadas, e percentuais bons de sequestro do radical DPPH[•]. Este fato está associado às mais altas concentrações de compostos fenólicos presentes nestas partições (Tabela 8Tabela 10Tabela 11) e identificados por

CLAE-EM-IES. Estudos epidemiológicos têm mostrado que os compostos fenólicos e flavonoides tem potente atividade antioxidante e estão associados a uma menor incidência de doenças cardiovasculares, câncer, diabetes e doenças neurodegenerativas (ADEBOOYE; VIJAYALAKSHMI; SINGH, 2008). As principais características estruturais da classe de flavonoides que proporcionam a atividade antioxidante estão ilustradas na Figura 28.

Figura 28 - Características estruturais que favorecem a atividade antioxidante dos flavonoides.



Nota: (A) O-di-hidroxi (catecol), (B) ligações de hidrogênio, (C) dupla ligação conjugada com Carbonila. Fonte: adaptado de Procházková e colaboradores (2011).

Neste ensaio de DPPH•, destaca-se a partição P-AEF, com o valor de percentual de sequestro de $92,8 \pm 0,5$, bem próximo do controle ácido ascórbico ($93,7 \pm 0,2$) e IC_{50} de $9,8 \pm 0,4 \mu\text{g L}^{-1}$, demonstrando altíssima atividade antioxidante por este e, também, pelos demais métodos estudados. Dentre os métodos empregados, DPPH• e ORAC são os mais utilizados para avaliar a atividade antioxidante de extratos. O extrato metanólico de flores da *Cassia Siamea* Lam, neutralizou 96% dos radicais DPPH• a uma concentração de $0,25 \text{ mg mL}^{-1}$ (KAUR et al., 2006; KAMAGATÉ et al., 2014). O estudo de Panichayupakaranant e Kaewsuwan (2004) mostrou que o extrato etanólico das flores de *Cassia alata* apresentou menor poder oxidante (IC_{50} de $175.36 \pm 2.07 \mu\text{g mL}^{-1}$), valor superior (cerca de três vezes) ao IC_{50} para o EEF ($59,9 \mu\text{g mL}^{-1}$) no presente trabalho.

O método DPPH• também foi utilizado no estudo de Kumaran e Karunakaran, (2007), que investigaram o extrato etanólico das flores de *C. auriculata*, e que apresentou IC_{50} de $55.45 \pm 1.34 \text{ mg mL}^{-1}$. Portanto, atividade antioxidante semelhante ao presente trabalho, que apresentou IC_{50} $59,9 \pm 5,3 \mu\text{g L}^{-1}$. Ainda Kumaran e Karunakaran, (2007), também avaliaram o extrato metanólico das flores de *C.*

auriculata, e encontraram IC₅₀ de 52.41±1.78 mg/mL, valor muito inferior ao encontrado neste trabalho.

Outro estudo que ressalta ainda a atividade antioxidante das flores de espécie de *Cassia* é o relatado por Subramanian e Venugopal, (2011), utilizando o método DPPH[•], em que os extratos metanólicos das flores de *C. auriculata* e *C. simea*, apresentaram altíssima atividade antioxidante (IC₅₀ de 0.196 e 0.534 µg mL⁻¹, respectivamente). Já no estudo de Kaisoon e colaboradores (2011), em que se aplicou o método FRAP para o extrato etanólico das flores de *C. siamea*, o valor de IC₅₀ foi de 7.30 ± 0.22 mg, atividade antioxidante bem inferior ao valor de IC₅₀ do EEF de *C. bakeriana* (516,5±47,0).

Na investigação de Prasath e colaboradores (2019), o extrato de flores de *C. auriculata* eliminou significativamente 82% dos radicais DPPH[•], com um IC₅₀ de 724,44 µg o que representa uma atividade antioxidante muitíssima baixa em relação ao encontrado neste trabalho.

Luximon-ramma e colaboradores (2002) investigaram o extrato metanólico das flores de *C. fistula*, que apresentou valor de IC₅₀ de 317 ± 0.8 µg mol⁻¹, empregando o método de FRAP. Mas, em relação ao presente trabalho, o EEF apresentou atividade antioxidante moderada, com valor de IC₅₀ de 516,5 ± 47,0 µmol trolox eq/g.

Dessa forma, considera-se que as flores de *C. bakeriana* apresentam atividade antioxidante promissora, especialmente a partição acetato de etila.

5.8 ATIVIDADE INIBITÓRIA DE GLICAÇÃO

A avaliação da capacidade inibitória da glicação dos extratos e partições de *C. bakeriana* foi avaliada sobre a glicação da albumina sérica bovina (BSA) por ser usualmente utilizada para inibição da glicação que previnem a formação de (AGEs), e que é um dos principais alvos desencadeadores das doenças associadas ao diabetes mellitus, incluindo que incluem cardiopatias, retinopatias, neuropatias e nefropatias (BARBOSA; OLIVEIRA; SEARA, 2009). Os resultados do percentual de inibição e o IC₅₀ dos extratos e partições das flores de *C. bakeriana* encontram-se na Tabela 18. As amostras que apresentaram maiores percentuais de inibições foram submetidas novamente ao ensaio para determinar a IC₅₀. Quanto menor o valor de IC₅₀, maior a atividade inibitória.

Tabela 18 - Percentual de inibição (%) e IC₅₀ da inibição da glicação dos extratos e partições das flores de *C. bakeriana*.

| Amostras | Inibição da Glicação | |
|--------------------------------|----------------------|---|
| | % de inibição | IC ₅₀ (µg mL ⁻¹) |
| EHF | 9,3 ± 1,1 | - |
| EEF | 98,1 ± 0,3 | 198,2 ± 6,6 |
| P-HF | 97,8 ± 0,2 | 350,6 ± 9,7 |
| P-DF | 91,8 ± 0,2 | 230,6 ± 7,0 |
| P-AEF | 100,0 ± 0,0 | 38,6 ± 0,4 |
| P-BF | 74,5 ± 0,2 | 350,8 ± 2,1 |
| P-AF | 52,0 ± 0,9 | 457,5 ± 1,0 |
| QUERCETINA (controle positivo) | 100,0 ± 0,0 | 14,9 ± 0,2 |

Nota: Concentração dos extratos e partições foi 625 µg mL⁻¹; -: não obtido; Quercetina: controle positivo; EHF: extrato hexano das flores; EEF: extrato etanólico das flores; P-HF: partição hexânica das flores; P-DF: partição diclorometano; P-AEF: partição acetato de etila; P-BF: partição butanol das flores; P-AF: partição aquosa das flores

Observa-se que as amostras, EHF, P-BF, P-DF e P-AF exibiram percentuais próximos da quercetina (controle). As demais amostras avaliadas apresentaram percentuais de inibição bons. Dentre as partições estudadas, destaca-se a partição P-AEF com percentual de inibição igual ao controle (Quercetina). Novamente, a partição P-AEF apresentou ótima atividade antiglicante, com valor de IC₅₀ de 38,6 ± 0,4 µg mL⁻¹. Acredita-se que essa ação esteja também associada a alta atividade oxidante observada na Tabela 18, e aos compostos polifenóis previamente identificados na P-AEF por CLAE-EM-IES, o que corrobora também a prospecção fitoquímica, indicando forte intensidade para esta classe.

No que se refere ao mecanismo de ação desses compostos fenólicos, pesquisas anteriores relataram que o principal mecanismo para inibirem formação da AGEs está associado à eliminação da carbonila reativa destas estruturas químicas (PENG et al., 2008; YANG et al., 2017).

Algumas espécies de *Cassia* já foram avaliadas quanto ao potencial de inibição da glicação, destacando-se o extrato das flores de *Cassia auriculata*, que apresentou IC₅₀ de 110 µg mL⁻¹ de glicação (PERERA; EKANAYAKE; RANAWEERA, 2015), valor maior do que encontrado pelas flores de *C. bakeriana*. Vale ressaltar, que um estudo clínico com o extrato etanólico e extrato aquoso de flores de *C. auriculata* apresentou resultados significativamente (18.4 ± 0.3 e 15.2 ± 0.4) em animais diabéticos (HAKKIM et al., 2007),

Em outro estudo, verificou-se que o extrato butanólico de flores de *Cassia fistula* não afetou o crescimento das células dos fibroblastos de pele, apresentando valor de IC₅₀ de 200 µg mL⁻¹ (LIMTRAKUL et al., 2016), podendo ser uma escolha apropriada para formulação de produtos para o cuidado da pele facial, e para antienvhecimento. Já na investigação de Yang e colaboradores (2017), a fração acetato das flores inibiu a formação de AGEs (*advanced glycation end-products*) de forma significativa, com o percentual de inibição de 90,49%, a uma concentração de 5 mg mL⁻¹, valor este de IC₅₀ muito maior do que o encontrado para as flores de *C. bakeriana*.

Na investigação realizada por Matsuda e colaboradores (2003) a relação da estrutura química com a atividade antiglicação de 62 flavonoides apresentou-se maior que 50% de inibição, incluindo os flavonoides quercetina e a catequina que também foram identificadas na P-AEF de *C. bakeriana* por meio da CLAE-EM-IES.

Assim como na atividade antioxidante, destaca-se neste ensaio, novamente a partição acetato de etila, com alta atividade antiglicação.

5.9 AVALIAÇÃO DA CITOTOXIDADE

Os extratos e partições obtidas das flores de *C. bakeriana*, foram submetidos à análise da atividade citotóxica contra células Vero (ATCC CCL 81), sendo o valor expresso em concentração citotóxica (CC₅₀), concentração em que se tem 50% de viabilidade celular. Adicionalmente, e para estabelecer a relação entre citotoxicidade e os ensaios biológicos realizados, os valores de Índice de Seletividade (IS) foram calculados de acordo com a (1(8) (p. 70).

De acordo com os ensaios de citotoxicidade, todos os extratos e partições avaliadas não apresentaram nenhuma toxicidade (CC₅₀ > 1024 µg mL⁻¹; p>0.05) nos intervalos testados (Tabela 19), mesmo na concentração mais alta (1024 µg mL⁻¹). Estes resultados são significativos e surpreendentes, o que justificava o uso das flores como fonte possível de fitoterápicos, bem como fonte promissora de agentes antifúngicos e antioxidante.

No futuro, os extratos serão testados a nível sistêmico em camundongos. As preparações avaliadas não causaram danos à membrana celular e são potenciais ferramentas farmacológicas para testar a atividade anti-inflamatória, também.

Algumas das espécies de *Cassia*, como por exemplo, a *C. itálica*, a *C. putibunda*, e a *C. torosa* também apresentaram boa seletividade (KAMAGATÉ et al., 2014). Os resultados revelaram a ausência de efeitos toxicológicos de *C. angustifolia* (Sene) quando administrada a ratos e coelhos, em uma dose equivalente a 10 vezes a dose humana (MELLO; LANGELOH; MELLO, 2007).

Avaliações anteriores dos benefícios farmacológicos de muitas espécies de *Cassia* mostraram que a maioria delas possui muitas atividades biológicas importantes, fazendo com que algumas delas fossem incluídas na farmacopeia, como a *C. glauca*, *C. angustifolia* e *C. acutifolia*. Dentre algumas dessas atividades biológicas importantes destaca-se a atividade citotóxica (HAFEZ et al., 2019). No estudo de Suzy e colaboradores (2014) a citotoxicidade do extrato metanólico e do composto 1,8-dihidroxi-3-metil antraquinona, isolado das flores de *C. nodosa*, apresentou variabilidade de 72,4 e 60,7 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente.

Tabela 19 - Concentração Citotóxica (CC₅₀) e Índices de Seletividades (IS) dos extratos e partições de flores de *C. bakeriana*.

| Ensaios Amostras | Microorganismo/proteína antioxidante | Índice de seletividade (IS) | | | | | | | | | |
|----------------------------|---|-----------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--|--|--|
| | | EHF | EEF | P-HF | P-DF | P-AEF | P-BF | P-AF | | | |
| Leveduras | <i>C. albicans</i> | >0.43 | >0.13 | >1.33 | >1.03 | >0.43 | >0.16 | >0.16 | | | |
| | <i>C. tropicalis</i> | >0.43 | >1.94 | >2.23 | >2.23 | >0.73 | >2.23 | >2.23 | | | |
| | <i>C. glabrata</i> | >0.43 | >1.94 | >2.23 | >1.94 | >1.64 | >2.31 | >2.54 | | | |
| Bactérias anaeróbicas | <i>P. gingivalis</i> | >0.40 | >0.40 | >0.40 | >0.40 | >0.40 | >0.40 | >0.40 | | | |
| | <i>F. nucleatum</i> | >0.40 | >0.40 | >0.40 | >0.40 | >0.40 | >0.40 | >0.40 | | | |
| | <i>A. naeslundii</i> | >0.40 | >0.40 | >0.40 | >1.31 | >0.40 | >1.31 | >0.40 | | | |
| Bactérias aeróbicas | <i>S. mutans</i> | >0.40 | >0.40 | >0.40 | >0.40 | >0.40 | >0.40 | >0.40 | | | |
| | <i>S. mitis</i> | >0.40 | >0.40 | >0.40 | >0.40 | >0.40 | >0.40 | >0.40 | | | |
| | <i>S. sanguinis</i> | >0.40 | >0.40 | >0.40 | >0.40 | >0.40 | >0.40 | >0.40 | | | |
| Antiglicante | <i>A. actinomycetemcomitans</i> | >0.40 | >0.40 | >0.40 | >0.40 | >0.40 | >0.40 | >0.40 | | | |
| | Albumina sérica bovina | -- | >0.71 | >0.46 | >0.64 | >1.42 | >0.46 | >0.34 | | | |
| Antioxidante | DPPH | -- | >1.23 | >1.13 | >1.28 | >2.01 | >0.93 | >1.19 | | | |
| | CC50 (µg mL ⁻¹) | >1024 | >1024 | >1024 | >1024 | >1024 | >1024 | >1024 | | | |
| Células Vero (ATCC CCL 81) | | | | | | | | | | | |

EHF: extrato *n*-hexânico das flores; EEF= extrato etnólico das flores; P-HF: partição *n*-hexânica das flores; P-DF: partição diclorometano das flores; P- AEF: partição acetato de etila das flores; P-BF: partição *n*-butanol das flores; P-AF: partição aquosa das flores; Nota: -: não obtido; * IS = log [CC₅₀ / MIC]; ** IS = log [CC₅₀ / C₁₅₀];

Em outro estudo, Duraipandiyar e colaboradores (2012) investigaram o composto reina, isolado das flores de *C. fistula*, o qual foi considerado citotóxico para as células COLO320 DM, exibindo 59,00%, 58,26%, 65,40%, 77,92% e 80,25% de citotoxicidade, para os tempos de incubação de 6, 12, 24, 48, e 72 h, respectivamente, na concentração de 200 µg mL⁻¹. Estudos recentes com o composto reina, isolado de folhas da *C. bakeriana*, revelaram também boa seletividade contra os mesmos microrganismos orais aqui estudados e com baixa toxicidade para células Vero (CUNHA et al., 2017).

Já na investigação de Nascimento e colaboradores (2020) os resultados confirmam que os extratos das flores de *S. macranthera* (Fabaceae) são promissores na busca por novos agentes antifúngicos, associando elevada atividade antifúngica contra as três leveduras estudadas e com baixa citotoxicidade (Índice de Seletividade entre 1,34–1,94).

Os compostos, suas classes e subclasses identificadas nas partições e extrato etanólico, via CLAE-EM-IES já foram reportados como tendo atividade citotóxica. Por exemplos, o composto quercetina-3-O-glucosídeo e quercetina detectados em todas as amostras avaliadas (MILITAO et al., 2005; RAZAVI et al., 2009), assim como a taxifolina, que apresentou alta viabilidade celular (MURAMATSU et al., 2019). A epicatequina também está associada à viabilidade celular (EVACUASIANY et al., 2014; ESMAEELPANAH et al., 2017; CHANG et al., 2018; XU; GAO; GRANATO, 2020; BAE et al., 2020).

A ação citotóxica dos flavonóis e flavonas está relacionada ao número de grupos OH e presença de 3'-OMe, conforme relatado (JEONG et al., 2007; BAKR et al., 2016). A viabilidade celular está também associada à diversos ácidos fenólicos, como por exemplo o ácido vanílico e (ALMEIDA; CAVALCANTE; VICENT, 2016) e a diversos ácidos graxos, como o ácido linolênico (YUAN et al., 2014).

Compostos da classe de antraquinonas, como a reina e a emodina estão relacionadas à viabilidade celular (BARNARD et al., 1992; MUTO et al., 2007; ZHENG et al., 2021).

Diante do exposto, considera-se que as flores desta planta se constituem numa rica fonte de agentes antioxidantes, antiglicantes, antibacterianos e, principalmente, de agentes antifúngicos.

6 CONCLUSÕES

Extratos e partições das flores de *C. bakeriana* Craib foram avaliados pela primeira vez em relação a composição química e ao potencial biológico. A prospecção fitoquímica identificou a presença de flavonoides, terpenos, esteroides, fenol, açúcares, saponinas. Alcaloides não foram detectados.

A quantificação dos teores de compostos fenólicos apresentou conteúdos significativos. Os melhores conteúdos foram de flavonoides na partição acetato de etila ($128,6 \pm 0,0$ mg EQ/ g_{extrato}), fenóis no extrato etanólico ($123,4 \pm 0,0$ mg EAG/ g_{extrato}), seguidamente de proantocianidinas na partição *n*-butanol ($92,9 \pm 0,0$ mg EC/ g_{extrato}).

Através da análise de CG-EM foi possível identificar no extrato hexânico e partições das flores de *C. bakeriana* Craib os compostos pertencentes às classes sendo cinco ésteres de cadeia longa (5; 45%), dois ácidos graxos de cadeia longa (2; 18%), dois alcanos de cadeia longa (2; 18%) e dois terpenos (2; 18%).

Por meio da CLAE-EM-IES foi possível identificar uma diversidade de substâncias inéditas e bioativas nas flores de *C. bakeriana* Craib, com padrões moleculares diversos. Foram identificados ácidos carboxílicos, ácidos fenólicos, ácidos graxos de cadeia longa e derivados, além de flavonoides e antraquinonas. Estas substâncias permitiram que as partições P-HF, P-DF, P-AEF, P-BF e P-AF fossem mais ativas nos ensaios biológicos utilizados.

Na quantificação dos teores de compostos polifenólicos, foram encontrados os melhores teores para fenóis para o extrato etanólico ($123,4 \pm 1,2$ mg EAG/ g_{extrato}) seguida da partição acetato de etila $95,4 \pm 0,6$ mg EAG/ g_{extrato}, para proantocianidinas com *n*-butanol ($92,9 \pm 0,0$ mg EC/ g_{extrato}) e para teor de flavonoides, o extrato etanólico ($109,6 \pm 0,4$ mg EQ/ g_{extrato}), seguidamente da partição acetato de etila com ($128,6 \pm 0,6$ mg EQ/ g_{extrato}).

Os ensaios antifúngicos apresentaram os melhores resultados antimicrobianos deste trabalho. As partições P-HF, P-DF e P-BF mostraram altíssima atividade antifúngica, com CIM variando entre 5,86 e 11,72 $\mu\text{g mL}^{-1}$, contra as leveduras *C. tropicalis* e *C. glabrata*.

Quanto ao potencial antibacteriano, apenas as partições P-DF e P-BF apresentaram alta atividade contra a bactéria gram-negativa *A. naeslundii* (CIM 50 μg

ml⁻¹). As demais partições apresentaram atividade antibacteriana apenas moderada a fraca (> 400 µg ml⁻¹).

As flores de *C. bakeriana* apresentaram resultados significativos com relação a atividade antioxidante, destacando-se a partição P-AEF, com IC₅₀ de 9,8 ± 0,4 µg L⁻¹, demonstrando, assim, altíssima atividade antioxidante em todos os métodos avaliados.

Os valores para antiglicação foram significativos para EE, P-HF, P-DF pois apresentaram porcentagem de glicação acima de 90% e próximas do valor do controle ácido ascórbico (100 ± 0,0). A P-AE apresentou percentual de inibição da glicação idêntico ao controle (100%) e IC₅₀ de 38,6 ± 0,4 µg mL⁻¹, constituindo-se num substrato de grande interesse para estudos antiglicemia mais aprofundados.

Por fim, os índices de seletividades das atividades biológicas estudadas indicaram que os extratos e partições das flores de *C. bakeriana* não apresentaram nenhuma citotoxicidade para células Veros, nas concentrações testadas. Esses achados são auspiciosos, uma vez que o uso dessas partições ricas em polifenóis em outros ensaios “in vivo” pode ser viável. Além disso, os dados deste estudo ampliam o mapeamento do conhecimento desta espécie vegetal estudada por nosso grupo de pesquisa, contribuindo para a sua conservação e proteção no bioma Cerrado.

7 REFERENCIAS

ABDELMOHSEN, Usama Ramadan et al. Potential of marine natural products against drug-resistant fungal, viral, and parasitic infections. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 17, n. 2, p. e30-e41, 2017. DOI: [https://doi.org/10.1016/s1473-3099\(16\)30323-1](https://doi.org/10.1016/s1473-3099(16)30323-1)

ABOODY, Mohammed Saleh et al. Anti-Fungal Efficacy and Mechanisms of Flavonoids. **Antibiotics**, v. 9(2), p. 45. 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/antibiotics9020045>

ABUBACKER, M. N. et al. In vitro antifungal activity of *Cassia alata* Linn. flower extract. **Natural Product Radiance**, v. 7, n. 1, p 6-9, 2008. DOI: <https://doi.org/10.3923/rjbsci.2010.275.284>

ABU-REIDAH, I. M. et al. Comprehensive metabolite profiling of *Arum palaestinum* (Araceae) leaves by using liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Food Research International**, v. 70, 74–86. 2015b. DOI:10.1016/j.foodres.2015.01.023

ABU-REIDAH, IM. et al. HPLC–DAD–ESI-MS/MS screening of bioactive components from *Rhus coriaria* L. (Sumac) fruits. **Food Chemistry**, v. 166, 179-191. 2015a. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.06.011>

ADAMS, R. P. Identificação dos componentes do óleo essencial por cromatografia gasosa e espectrometria de massa, ed.4.130 jan.2017.

ADEBOOYE, O. C. et al. Peroxidase activity, chlorophylls and antioxidant profile of two leaf vegetables (*Solanum nigrum* L. And *Amaranthus cruentus* L.) under six pretreatment methods before cooking. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 43, n. 1, p. 173–178. 2008. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2006.01420.x>

ADIKAY, S. et al. Pharmacological evaluation of anti-ulcer activity of *Cymbopogon flexuosus*. J. Basic and Clin. **Pharmacology** v. 4, n. 2, p. 208–212. 2017. <https://doi.org/10.5455/2319-2003.ijbcp20150402>

AHARONI, A. et al. Metabolic engineering of the plant primary–secondary metabolism interface. **Current opinion in biotechnology**, v. 22, n. 2, p. 239-244, 2011. <https://doi.org/1016/j.copbio.2010.11.004>

ALMEIDA, I. V. et al. Different responses of vanillic acid, a phenolic compound, in HTC cells: cytotoxicity, antiproliferative activity, and protection from DNA-induced damage. **Genetics and Molecular Research**, v. 15, n. 4. 2016. <https://doi.org/10.4238/gmr15049388>

ALMEIDA, M. R. et al. Química de Produtos Naturais: Plantas que Testemunham Histórias. 2017. **Revista Virtual Química**, v. 9, n. 3, p. 1117-1153.2017. DOI: <https://doi.org/10.21577/1984-6835.20170068>

ALVES, C. Q. et al. Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 10, p. 2202-2210, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422010001000033>

ALVES, C. T. et al. Antifungal activity of phenolic compounds identified in flowers from North Eastern Portugal against *Candida* species. **Future Microbiology**, v. 9, n. 2, 139–146. 2014. DOI: <https://doi.org/10.2217/fmb.13.147>

ALVES, J. et al. Bactérias Anaeróbias com Relevância Clínica: Classificação Taxonômica e Morfológica, Presença na Microbiota Humana e Diagnóstico Microbiológico. **Acta médica portuguesa**, v. 30, n. 5, p. 409-417. 2017. <https://doi.org/https://doi.org/10.20344/amp.8098>

ANDRADE, A.N.P. et al. A subfamília Faboideae (*Fabaceae* Lind l.) no Parque Estadual de Guartelá, Paraná, Brasil. **Hoehnea**, v. 36, n. 4, p. 737-768, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1590/S2236-89062009000400012>

ANSARI, M. A. et al. Natural phenolic compounds: a potential antifungal agent. **Microbial pathogens and strategies for combating them: Science, technology, and education**, v. 1, p. 1189-1195. 2013.

ANWAR, A. et al. Anti-inflammatory, and antimicrobial activity of *V. aconitifolia*. **Academia Journal of Medicinal Plants**. v.6, n. 11, p. 347-352, November 2018. DOI: <https://doi.org/10.15413/ajmp.2018.0128>.

APAK, R. et al. Methods of Measurement and Evaluation of Natural Antioxidant Capacity/Activity. **Pure Applie Chemistry**, v. 85, p. 957-998. 2013. DOI: <http://dx.doi.org/10.1351/PAC-REP-12-07-15>

ARYAL, S. et al. Total Phenolic content, flavonoid Content and Antioxidant Potential of Wild vegetables from Western Nepal. **Plants**, v.8, 96. 2019. <https://doi.org/10.3390/plants8040096>

ASMAT, U. et al. 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>.

AWOMUKWU, Daniel Azubuike. Et al. Comparative Chemical Constituents of some *Cassia* Species and their Pharmacognostic Importance in South Eastern Nigeria. **Science Journal of Chemistry**. v. 3, n. 3, p. 40-49. 2015. DOI: <https://doi.org/10.11648/j.sjc.20150303.12>

AYO, R. G. et al. 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, 2007. DOI:10.4314/ajb.v6i11.57453

AZANI, N. et al. A new subfamily classification of the Leguminosae based on a taxonomically comprehensive phylogeny – The Legume Phylogeny Working Group (LPWG). **Taxon**, 66(1), 44–77. 2017. DOI: <https://doi.org/10.12705/661.3>

BAE, J. et al. Activity of catechins and their applications. **Biomedical Dermatology**, 4(1). 2020. DOI: <https://doi.org/10.1186/s41702-020-0057-8>

BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils – a review 2008. **Food and Chemical Toxicology**. v.46, p. 446-475, 2008.
<https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.09.106>.

BAKR, R. O. et al. Phenolic profile of *centaurea aegyptiaca* L. growing in egypt and its cytotoxic and antiviral activities. **African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines**, v. 13(6), p. 135–143. 2016. DOI: <https://doi.org/10.21010/ajtcam.v13i6.19>

BALCKE, Gerd Ulrich Balcke. et al. An UPLC-MS/MS method for highly sensitive high-throughput analysis of phytohormones in plant tissues. **Plant Methods** v. 8, n. 47, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1186/1746-4811-8-47>

BALIRAINÉ, F. N. et al. Quinine, an old antimalarial drug in a modern world: role in the treatment of malaria. **Malaria Journal**, v. 10, n., p. 144-144, 2011 DOI: <https://doi.org/10.1186/1475-2875-10-144>.

BARBOSA, J. H. P. et al. Produtos da glicação avançada dietéticos e as complicações crônicas do diabetes. **Revista de Nutrição**, v. 22, n. 1, p. 113–124, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1590/s1415-52732009000100011>

BARNARD, D. L. et al. Evaluation of the antiviral activity of anthraquinones, anthrones and anthraquinone derivatives against human cytomegalovirus. **Antiviral Research**, v. 17(1), 63–77, 1992. DOI: [10.1016/0166-3542\(92\)90091-i](https://doi.org/10.1016/0166-3542(92)90091-i)

BHALERAO, S. A. Bioactive Constituents, Ethnobotany and Pharmacological perspectives of *Cassia tora* Linn. **International Journal of Bioassays**, v. 2, n. 11, p. 1421-1427, 2013. DOI: <https://doi.org/10.21746/ijbio.2013.11.003>.

BHUVANESWARI, Rameshbabu et al. Antimicrobial potential and structural elucidation of bioactive compounds from flower extract of *Cassia javanica* L. **Indian Journal of Natural Products and Resources (IJNPR) [Formerly Natural Product Radiance (NPR)]**, v. 5, n. 1, p. 34-39, 2015.

BOHNEBERGER, G. et al. Fitoterápicos na odontologia, quando podemos utilizá-los? /Phytotherapy in dentistry, when can we use them? **Brazilian Journal of Health Review**, v. 2, n. 4, p. 3504-3517, 2019. DOI: <https://doi.org/10.34119/bjhrv2n4-114>

BONAN, R. F. et al. Comparação do uso do hipoclorito de sódio e da clorexidina como solução irrigadora no tratamento endodôntico: revisão de literatura. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, v. 15, n. 2, p. 237-244, 2011. Disponível em: http://revodonto.bvsalud.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1981-86372011000500018#:~:text=Os%20autores%20conclu%C3%ADram%20que%20o,%2C2%25%20como%20agente%20antibacteriano.

- BRITO, A. et al. HPLC-UV-MS profiles of phenolic compounds and antioxidant activity of fruits from three citrus species consumed in Northern Chile. **Molecules**, v. 19, n. 11, p.17400-17421, 2014. DOI: 10.3390/molecules191117400.
- BROUILLARD, R. et al. Loss of colour, a prerequisite to plant pigmentation by flavonoids. *Phytochemistry* v. 29, p. 3457–3460, 1990. DOI: [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(90\)85257-G](https://doi.org/10.1016/0031-9422(90)85257-G)
- BROWN, G. D. et al. Hidden Killers: Human Fungal Infections. **Science Translational Medicine**, v. 4, n. 165, p. 1-9, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3004404>.
- BROWNLEE, M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. **Nature**, v. 414, n. 6865, p. 813–820. 2001. <https://doi.org/10.1038/414813a>
- BYSTROM, L. M. et al. Characterization of phenolics by LC–UV/Vis, LC–MS/MS and sugars by GC in *Mel coccus bijugatus* Jacq. “Montgomery” fruits. **Food Chemistry**, v. 111, n. 4, p. 1017–1024. 2008. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.04.058>
- CAIRNS, T. C. et al. How a fungus shapes biotechnology: 100 years of *Aspergillus niger* research. **Fungal biology and biotechnology**, v. 5, n. 1, p. 13, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1186/s40694-018-0054-5>
- CARRIS, L. M. et al. Introduction to Fungi. **Apsnet**. 2012. DOI:10.1094/PHI-I-2012-0426-01
- CASE, R. J. et al. Ethnopharmacological evaluation of the informant consensus model on antituberculosis claims among the Manus. **Journal of ethnopharmacology**, v. 106, n. 1, p. 82-89, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.12.005>.
- CASTILHO, A. L. et al. Detection of drug susceptibility in rapidly growing mycobacteria by resazurin broth microdilution assay. **Journal of Microbiological Methods**, v. 111, p.119-121, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2015.02.007>.
- CAVLING ARENDRUP, M. et al. EUCAST Technical Note on Candida and micafungin, anidulafungin and fluconazole. **Mycoses**, v. 57(6):377-9. 2014. DOI:10.1111/myc.12170
- CHANDRA, P. et al. Quantification of multianalyte by UPLC–QqQLIT–MS/MS and in-vitro anti-proliferative screening in *Cassia* species. **Industrial Crops and Products**, 76, 1133–1141. 2015. DOI:10.1016/j.indcrop.2015.08.030
- CHANG, E. H. et al. Catechin-Mediated Restructuring of a Bacterial Toxin Inhibits Activity. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**. v.1863(1):191-198. 2018. DOI: 10.1016/j.bbagen.2018.10.011
- CHAUDHARI, S. S. et al. Analgesic, anti-inflammatory and anti-arthritic activity of *Cassia uniflora* Mill. Asian Pacific **Journal of Tropical Biomedicine**, v. 2, n. 1,

Supplement, p. S181-S186, 2012. DOI: [https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(12\)60155-5](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(12)60155-5).

CHAVES, M. H. Análise de extratos de plantas por CCD: uma metodologia aplicada **Chemistry**, v. 49, n. 8, p. 4083-4089, 2001. DOI: <https://10.1021/jf0103572>.

CHEN, H.-J. et al. Determination of Phenolic Acids and Flavonoids in *Taraxacum formosanum* Kitam by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Coupled with a Post-Column Derivatization Technique. **International Journal of Molecular, Sciences**, v. 13(1), 260–285. 2011. DOI:10.3390/ijms13010260

CHEN, L. et al. A Scientometric visualization analysis for Global Toxicology and Pharmacology Research of Natural Products from 1962 to 2018, **Phytomedicine**, v. 68:153190, 2020. DOI: 10.1016/j.phymed.2020.153190

CHEN, X. et al. Identification and characterization of anthraquinones in *Cassia tora* L. by liquid chromatography connected with time of flight mass spectrometry and ion trap mass spectrometry. **Asian Journal of Chemistry**, v. 25, 7840-7842 2013. DOI: <https://10.1021/jf0478861>

CHERRAK, S. A. et al. Potential bioactive glycosylated flavonoids as SARS-CoV-2 main protease inhibitors: A molecular docking and simulation studies. **Plos one**, v. 15, n. 10, p. e0240653, 2020. DOI:10.1371/journal.pone.0240653.

CHIBLI, L. A. **Caracterização química e atividades biológicas de *Bryophyllum pinnatum* (Lam.) Oken**. Orientador: Orlando Vieira de Sousa. 2013 (Dissertação de mestrado) - Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de fora, 2013

CHIEN, S. Y. et al. Nimbolide induces apoptosis in human nasopharyngeal cancer cells. **Environmental Toxicology**, v. 32(8), 2085–2092. 2017. DOI: 10.1002/tox.22423

CHINCHANSURE, A. A. et al. Recent development of plant products with anti-glycation activity: a review. **RSC Advances**, v. 5(39), 31113–31138. 2015. DOI:10.1039/c4ra14211j

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

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

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

COOPOOSAMY, R. M. et al. Antibacterial activity of aloe emodin and aloin An isolated from *Aloe excelsa*. **African Journal of Biotechnology**, v. 5, n. 11, 2006. DOI: 10.5897/AJB2006.000-5055

CORRALES, L. C. et al. Anaerobic bacteria: processes they perform and their contribution to life sustainability on the planet. **Nova**. v.13, n.24, pp.55-81. ISSN 1794-2470 2015. DOI: 10.22490/24629448.1717

CORREIA, A. F. et al. Activity of crude extracts from Brazilian cerrado plants against clinically relevant *Candida* species. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 16, n. 1, p. 203, 2016. DOI: [https://10.1186/s12906-016-1164-3](https://doi.org/10.1186/s12906-016-1164-3).

COUTINHO, M. A. S. et al. Flavonoides: Potenciais agentes terapêuticos para o processo inflamatório, **Revista. Virtual Química**. 1 (3), 241-256. 2009. DOI: 10.5935/1984-6835.20090024. ISSN 1984-6835.

COUTINHO-NETO, A. A. et al. – São Paulo: Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, **Departamento de Botânica**, 332 p. 2017.

CUNHA, L. C. S. et al. 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: 10.1016/j.bjp.2016.08.002.

CUNHA, L. S. et al. 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, 2013a DOI: 10.3390/molecules18044588.

CUNHA, Luís Carlos Scalón. **Estudo fitoquímico, atividades antioxidante, antimicrobiana e citotóxica da espécie *Cassia bakeriana* Craib**. 2013b. 285 f. Tese (Doutorado em Ciências Exatas e da Terra) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2013b. Disponível em: <https://repositorio.ufu.br/bitstream/123456789/17518/1/EstudoFitoquimicoAtividades.pdf>. Acesso em 02 de mar. 2019.

DANELUTTE, A. P. et al. Antifungal Flavanones and Prenylated Hydroquinones from *Piper crassinervium* Kunth. **ChemInform**, v.35(2). 2004 DOI:10.1002/chin.200402241

DANIYAN, S.Y. et al. Antibacterial activity of *Cassia occidentalis* flower vegetable extract on selected bacteria. **Asian Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences**, v. 1, n. 1, p. 23-27, 2011.

DAVE, H. et al. A review on anthraquinones isolated from *Cassia* species and their applications. *Industria Journal. Nature. Product. Resour.* v. 3(3), pp. 291-319. 2012. DOI: <http://hdl.handle.net/123456789/14810>

- DELPHINE M. et al. 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. **Front Plant Sci.**, 28 Jun. 2019. DOI: 10.3389/fpls.2019.00835.
- DELKER, C. et al. Jasmonate Biosynthesis in *Arabidopsis thaliana* - Enzymes, Products, Regulation. **Plant Biology**, v 8(3), p. 297–306. 2006. DOI:10.1055/s-2006-923935
- DEMARQUE, D. P. et al. 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(3), 432–455. 2016. DOI:10.1039/c5np00073d
- DEWICK, P. M. A biosynthetic approach. Medicinal Natural Product, 3rd edition. John Wiley & Sons, Ltd, **Chichester** p. 546. 2009.
- DHANASEKARANA, M. et al. Potential hepatoprotective activity of ononitol monohydrate isolated from *Cassia tora* L. on carbon tetrachloride induced hepatotoxicity in wistar rats. **Phytomedicine**, v. 16, n. 9, p. 891–895, 2009. DOI: 10.1016/j.phymed.2009.02.006.
- DI STASI, L. C. Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica. 2. ed. São Paulo: **UNESP**, 2002. 281-284 p.
- DIAS, J. N. et al. O uso de fitoterápicos à base de aroeira como coadjuvante no tratamento da gengivite: Revisão Sistemática. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17(4 suppl 3), 1187–1191. 2015. DOI:10.1590/1983-084x/14_164
- DRYFLOR. Plant diversity patterns in neotropical dry forests and their conservation implications. **Science**. v. 353(6306) 1383-1387. 2016. DOI: <http://10.1126/science.aaf5080>
- DURAI PANDIYAN, V. et al. Anticancer activity of Rhein isolated from *Cassia fistula* L. flower. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v. 2, S517–S523. 2012:10.1016/s2222-1808(12)60213-8
- DURAI PANDIYAN, V. et al. Antibacterial and antifungal activity of *Cassia fistula* L.: an ethnomedicinal plant. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 112, n. 3, p. 590–594, 2007. DOI: 10.1016/j.jep.2007.04.008.
- DUTTA, S. et al. Natural products: An upcoming therapeutic approach to cancer. **Food and Chemical Toxicology**, v. 128, n., p. 240-255, 2019. DOI: 10.1016/j.fct.2019.04.012
- E SILVA, J. et al. Evaluation of antibacterial and antifungal activity of ethanolic extract of *Cochlospermum regium* (Cochlospermaceae) leaf, a medicinal plant from the Cerrado of Brazil. **BMC Proceedings**, v. 8(Suppl 4), P72. 2014. DOI:10.1186/1753-6561-8-s4-p72

ELFIKY, A. A. Natural products may interfere with SARS-CoV-2 attachment to the host cell. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, p. 1–16. 2020. DOI:10.1080/07391102.2020.1761881

ELSHIKH, M. et al. Resazurin-based 96-well plate microdilution method for the determination of minimum inhibitory concentration of biosurfactants. **Biotechnology Letters**, v. 38, n., p. 1015-1019, 2016. DOI: <https://10.1007/s10529-016-2079-2>

EL-WAKIL, E. A. et al. Identification of the chemical composition of the methanolic extract of *Salix tetrasperma* Roxb. using LC-ESI-MS and evaluation its potential as antioxidant agent. **Scholars Research Library**, 7(2):168-177, 2015. Disponível em: <https://www.derpharmachemica.com/pharma-chemical/identification-of-the-chemical-composition-of-the-methanolic-extract-of-salixtetrasperma-roxb-using-lcesims-and-evaluati.pdf>

EMBRAPA, **Cerrado**, Disponível em: <<https://www.embrapa.br/contando-ciencia/bioma-cerrado>>. Acesso em: 01 de julho, 2020.

ERECEVIT, P. et al. Determination of some biological properties over *Kluyveromyces lactis* 1 of *Rheum ribes* L. (Rhubarb) as a traditional medicinal and food plant. **International Journal of Nature and Life Sciences**, v. 1, n. 1, p. 22-31, 2017.

ESCALANTE, A. et al. Metabolic engineering for the production of shikimic acid in an evolved *Escherichia coli* strain lacking the phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase system. **Microbial Cell Factories**, v. 9(1), 21.2010. DOI:10.1186/1475-2859-9-21

ESMAEELPANAH, E., RAZAVI, B. M., VAHDATI HASANI, F., & HOSSEINZADEH, H. Evaluation of epigallocatechin gallate and epicatechin gallate effects on acrylamide-induced neurotoxicity in rats and cytotoxicity in PC 12 cells. **Drug and Chemical Toxicology**, p. 1–8. 2017. DOI:10.1080/01480545.2017.1381108

ESTEVAM, C. S. et al. Constituintes químicos e avaliação preliminar in vivo da atividade antimalárica de *Ouratea nitida* Aubl (Ochnaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15(3), 195-198. 2005. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2005000300005>

ESTEVAM, E. B. B. et al. Avaliação das atividades antibacteriana, tripanocida e citotóxica do Extrato hidroalcoólico das raízes de *Tradescantia sillamontana* Matuda (Veludo Branco) (Commelinaceae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 18(2), p. 415-422. 2016. DOI: https://doi.org/10.1590/1983-084X/15_215

FALCÓ, V. et al. An overview of lefamulin for the treatment of community acquired bacterial pneumonia, **Expert Opinion on Pharmacotherapy**. v. 21(6):629-636 2020. DOI:10.1080/14656566.2020.1714592

FALCONE, F. M. L. et al. Flavonoids: biosynthesis, biological functions, and biotechnological applications. **Frontiers in Plant Science**, v. 3, n., p., 2012. DOI:10.3389/fpls.2012.00222.

FARKAS, J. et al. Safety of Food and Beverages: Spices and Seasonings. **Encyclopedia of Food Safety**, p. 324–330. 2014. DOI:10.1016/b978-0-12-378612-8.00290-0

FATMAWATI, S. et al. Chemical constituents, usage and pharmacological activity of *Cassia alata*. **Heliyon**, v. 6(7), 11;6(7): e04396. 2020. DOI:10.1016/j.heliyon.2020.e04396

FINGER, Z. et al. Fitossociologia em comunidades arbóreas remanescentes de Cerrado sensu stricto no Brasil Central. **Revista Floresta**, v. 45, n. 4, p. 769-780, 2015. Disponível em: <https://revistas.ufpr.br/floresta/article/view/30860/26953>. Acesso em: 27 de maio 2020.

FIORAVANTI, C. A maior diversidade de plantas do mundo revista pesquisa **FAPESP**. Ed. 241, p. 42-47, 2016. Disponível em: https://revistapesquisa.fapesp.br/wp-content/uploads/2016/03/042-047_Botanica_241.pdf. Acesso em: 14 abril 2020.

FLORA DO BRASIL. Lista de Espécies da Flora do Brasil. **Jardim Botânico do Rio de Janeiro**. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br>. Acesso em 27 maio 2020.

FRANCISCO, K. S. F. Fitoterapia: uma opção para o tratamento odontológico. *RevistaSaúde*, v.4, n.1, p.18- 24, 2010. DOI: https://doi.org/10.1590/1983-084x/14_164

FREITAS, D. A. et al. Levantamento de dados de espécies florestais nativas do Cerrado: um meio para bancos de sementes implantados que permitem restauração e conservação de ecossistemas florestais. **Brazilian Journal of Animal and Environmental Research**, v. 2(5), 1569-1583. 2019. ISSN 2595-573X

FRIEDMAN, M. et al. The inhibitory activity of anthraquinones against pathogenic protozoa, bacteria, and fungi and the relationship to structure. **Molecules**, v 25(13), 3101. 2020. DOI: 10.3390/molecules25133101

GARCEZ, F. R. et al. 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. DOI:[10.5935/1984-6835.20160008](https://doi.org/10.5935/1984-6835.20160008)

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

GIADA, M. Food phenolic compounds: Main classes, sources, and their antioxidant power. In: MORALES-GONZÁLE, J. A. Oxidative Stress and Chronic degenerative

Diseases—A Role for Antioxidants, **Rijeka: InTech**. cap. 4, p. 87–112. 2013. DOI: 10.5772/51687

GIDDA, Satinder Kaur. et al. Biochemical and Molecular characterization of a hydroxyjasmonate sulfotransferase from *Arabidopsis thaliana*. **The Journal of Biological Chemistry**. Vol. 278, No. 20, v. 16, pp. 17895–17900. 2013. DOI:10.1074/jbc.M211943200

GOMES, G. S. et al. **Diversidade de leguminosas no cerrado do Município de São João do Sóter**, Maranhão, Brasil. p.10, 2017. DOI: 10.18677/Agrarian_Academy_2017a15

GOMES, M. S. et al. Anti-inflammatory and antioxidant activity of hydroethanolic extract of *Spondias mombin* leaf in an oral mucositis experimental model. **Archives of Oral Biology**, v 104, 664. 2020a DOI: 10.1016/j.archoralbio.2020.104664

GOMES, S. et al. Floristic and phytosociological composition of the Leguminosae Juss., family, in Cerrado fragments of the East of Maranhão, Brazil. **Research, Society and Development**, v 9(5), 78953128. 2020b. DOI:10.33448/rsd-v9i5.3128

GÓMEZ-ROMERO, M. et al. A. Metabolite profiling and quantification of phenolic compounds in methanol extracts of tomato fruit. **Phytochemistry**, v. 71(16), 1848–1864. 2010 doi:10.1016/j.phytochem.2010.08.002

GOTTLIEB, O. R., & BORIN, M. R. DE M. B. Químico-Biologia Quantitativa: um novo paradigma? **Química Nova**, v. 35(11), 2105–2114. 2012. DOI:10.1590/s0100-40422012001100002

GUIMARÃES, R. et al. Characterisation of phenolic compounds in wild fruits from Northeastern Portugal. **Food Chemistry**, v. 141(4), 3721–3730. 2013. DOI: 10.1016/j.foodchem.2013.06.071

GUIMARÃES-BEELLEN, P. M. et al. Characterization of condensed tannins from native legumes of the Brazilian northeastern semi-arid. **Scientia Agricola**, 63(6), 522-528. 2006. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0103-90162006000600002>

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

DOI: <https://doi.org/10.1002/9781118391815.ch1> ISBN: 978-1-118-10117-9

HADJITHOMAS, M. et al. IMG-ABC: A Knowledge Base to Fuel Discovery of Biosynthetic Gene Clusters and Novel Secondary Metabolites. **mBio**, v. 6(4). 2015. DOI:10.1128/mbio.00932-15

HAFEZ, S.A. et al. Chemical Constituents and Biological Activities of Cassia Genus: Review. **Arch Pharm Sci ASU**, v. 3, n. 2, p. 195-227, 2019. DOI: <https://doi.org/10.21608/aps.2019.15746.1008>

HAKKIM, F. L. et al. Effect of aqueous and ethanol extracts of *Cassia auriculata* L. flowers on diabetes using alloxan induced diabetic rats. **Int J Diabetes Metab**, v. 15, p. 100-106. 2007

HALAKE, K. et al. Structural implications of polyphenolic antioxidants. **Journal of industrial and Engineering Chemistry**, v. 35, 1–7. 2016. DOI: 10.1016/j.jiec.2016.01.003

HAMEISTER, R. et al. Reactive oxygen/nitrogen species (ROS/RNS) and oxidative stress in arthroplasty. **J Biomed Mater Res**. v. 2020;1–15. 2019. DOI: 10.1002/jbm.b.34546

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

HASENCLEVER, L. et al. A indústria de fitoterápicos brasileira: desafios e oportunidades. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 22(8), 2559-2569. 2017. DOI: <https://doi.org/10.1590/1413-81232017228.29422016>

HÖFS, S. et al. Interaction of *Candida albicans* with host cells: virulence factors, host defence, escape strategies, and the microbiota. **J. Microbiol.** v. 54, 149–169. 2016 DOI: 10.1007/s12275-016-5514-0

HOLETZ, F.B. et al. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, no. 7, pp. 1027-1031. 2002. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762002000700017>.

HWANG, J. H. et al. The efficacy and safety of arbekacin and vancomycin for the treatment in skin and soft tissue MRSA infection: preliminary study. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v. 45, n. 1, p. 62-8, 2013. DOI:10.3947/ic.2013.45.1.62

JEONG, J.-M. et al. Antioxidant and Chemosensitizing Effects of Flavonoids with Hydroxy and/or Methoxy Groups and Structure-Activity Relationship. **Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences**, v. 10(4), 537. 2007. DOI:10.18433/j3kw2z

KABERA, J. N. et al. Plant secondary metabolites: biosynthesis, classification, function, and pharmacological properties. **Journal pharms pharmacol**, v. 2, p. 377-392, 2014. Disponível em: <https://silo.tips/download/plant-secondary-metabolites-biosynthesis-classification-function-and-pharmacolog>

KADOWAKI, A. et al. The Antioxidative Effect of Fullerenes during the Peroxidation of Methyl Linoleate in Toluene. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 76(1), 212–214. 2012. DOI:10.1271/bbb.110739

KAISOON, O. et al. Phenolic compounds and antioxidant activities of edible flowers from Thailand. **Journal of Functional Foods**, v. 3(2), 88–99. 2011 DOI: 10.1016/j.jff.2011.03.002

KAKKAR, S. et al. A Review on Protocatechuic Acid and Its Pharmacological Potential. **ISRN Pharmacology**, v. 2014, 1–9. 2014. DOI:10.1155/2014/952943

KAMAGATÉ, M.; KOFFI C.; KOUAMÉ, N'G.; M.; AKOUBET, A.; YAO N'G.; A.; R.; DIE-KAKOU H.; M.; Ethnobotany, phytochemistry, pharmacology and toxicology profiles of *Cassia siamea* lam. **The Journal of Phytopharmacolog**. ISSN 2230-480X, v. 3(1): 57-76, 2014. Disponível em: http://www.phytopharmajournal.com/Vol3_Issue1_09.pdf

KANDI, S. et al. Biomedical significance of terpenes: an insight. *Biomedicine*, v. 3(1), 8-10. 2015. DOI: 10.12691/bb-3-1-2

KATZ, L. BALTZ, R. H. Natural product discovery: past, present, and future. **Journal Ind Microbiol Biotechnol**. v. 43(2-3):155-76, 2016. DOI:10.1007/s10295-015-1723-5.

KAUR, G. et al. Evaluation of antioxidant activity of *Cassia siamea* flowers. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 108(3), 340–348. 2006. DOI: 10.1016/j.jep.2006.05.021

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

KHODDAMI, A. et al. Techniques for analysis of plant phenolic compounds. **Molecules**, v. 18, p. 2328–2375, 2013. DOI:10.3390/molecules18022328

KIM, J.-Y. Human fungal pathogens: Why should we learn? **Journal of Microbiology**, v. 54(3), 145–148. 2016 DOI:10.1007/s12275-016-0647-8.

KITANAKA, S. et al. Bitetrahydroanthracenes from Flowers of *Cassia torosa* CAV. *Chem. Pharm. Bull* v. 21, 2103. 1994. DOI: <https://doi.org/10.1248/cpb.42.2588>

KITANAKA, S. et al. Studies on the Constituents of the Leaves of *Cassia torosa* Cav. II. The Structure of Two Novel Flavones, Torosa flavone C and D. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 39(12), 3254–3257. 1991. DOI:10.1248/cpb.39.3254

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

KUERBAN, A. et al. Natural compounds that inhibit protein glycation: a review for recent findings. **Indo American Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 4, n. 11, p. 4027-4042, 2017. DOI:10.5281/zenodo.1045214.

KUETE, V. Potential of Cameroonian Plants and Derived Products against Microbial Infections: A Review. **Planta Medica**, v. 76(14), 1479–1491. 2010. DOI:10.1055/s-0030-1250027

KUMAR, J. S. P. et al. *Cassia auriculata* flower extract articulate its antidiabetic effects by regulating antioxidant levels in plasma, liver and pancreas in T2DM rats. **AJPCT**, v. 2, 705-722. 2014

- KUMAR, K. et al. H. Nature Inspired Small Molecules for Chemical Biology. **Israel Journal of Chemistry**. v. 58, 1 – 12, 2018. DOI:10.1002/ijch.201800105
- KUMAR, P. S. Oral microbiota, and systemic disease. **Anaerobe**, v 24, 90-93. 2013. DOI: 10.1016/j.anaerobe.2013.09.010
- KUMAR, R. et al. A new chromone from *Cassia nodosa*. **J Asian Nat Prod Res**. v. 8(7):595-8. 2006. DOI: 10.1080/10286020500179470. PMID: 17135042.
- KUMARAN, A. et al. Antioxidant activity of *Cassia auriculata* flowers. **Fitoterapia**, v. 78(1), 46–47. 2007. DOI:10.1016/j.fitote.2006.09.031
- LANGER, L. T. A. et al. Biofilmes em infecção por *Candida*: uma revisão da literatura. **Revista interdisciplinar em ciências da saúde e biológicas–RICSB**, v. 2, n. 2, 2018. DOI:10.31512/ricsb.v2i2.2548
- LAVOIE, J.-C. Light-Induced Byproducts of Vitamin C in Multivitamin Solutions. **Clinical Chemistry**, v. 50(1), 135–140. 2004. DOI:10.1373/clinchem.2003.025338
- LEWIS, G.P. et al. Legumes of the World. **Royal Botanic Gardens, Kew**. p.8, 2005. ISSN: 0967-8018
- LI, D.; FU, D. et al. Isolation, purification, and Identification of Taxol and Related Taxanes from Taxol-Producing Fungus *Aspergillus niger* subsp. *taxi*. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 27, n. 8, p. 1379-1385, 2017. DOI: 10.4014/jmb.1701.01018.
- LIMA, A. P. Electrochemical oxidation of chlorhexidine and its amperometric determination by flow-injection analysis. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 25, n. 3, p. 448- 452, Mar. 2014. DOI: <https://doi.org/10.5935/0103-5053.20130267>
- LIMA, F. et al. Flavonoides e radicais livres. **Disciplinarum Scientia| Naturais e Tecnológicas**, v. 13, n. 1, p. 111-124, 2012. ISSN 2176-462X. Disponível em: <https://periodicos.ufn.edu.br/index.php/disciplinarumNT/article/view/1298>
- LIMTRAKUL, P. et al. Anti-aging and tyrosinase inhibition effects of *Cassia fistula* flower butanolic extract. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 16(1). 2016. DOI:10.1186/s12906-016-1484-3
- LITESCU, S. C. et al. Chapter 25 - The Use of Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) and Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC) Assays in the Assessment of Beverages' Antioxidant Properties. In: PREEDY, V. **Processing and Impact on Antioxidants in Beverages**, San Diego: Academic Press, cap. 25, p. 245-251. 2014. DOI: 10.1016/B978-0-12-404738-9.00025-8

LÓPEZ-ALARCÓNA, C. et al. Evaluating the antioxidant capacity of natural products: A review on chemical and cellular-based assays. *Anal. Chim. Acta*, v. 763, p. 1-10, 2012. DOI: 10.1016/j.aca.2012.11.051

LORENZI, H. et al. Árvores exóticas no Brasil: madeiras, ornamentais e aromáticas. 1. ed. São Paulo: Nova Odessa, **Instituto Plantarum de Estudos da Flora**, 368 p. 2003

LPWG. A new subfamily classification of the Leguminosae based on a taxonomically comprehensive phylogeny – **The Legume Phylogeny Working Group (LPWG)**. *Taxon*, v. 66(1), 44–77. 2017. DOI:10.12705/661.3

LUXIMON-RAMMA, A. et al. Antioxidant Activities of Phenolic, Proanthocyanidin, and Flavonoid Components in Extracts of *Cassia fistula*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50(18), 5042–5047. 2002. DOI:10.1021/jf0201172

MABRY, T.J. et al. The systematic identification of flavonoids. **Springer: Berlin**, 1970. p.51-2.

MACÊDO, M. J. F. et al., Fabaceae medicinal flora with therapeutic potential in Savanna areas in the Chapada do Araripe, Northeastern Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 28 738-750, 2018. DOI: 10.1016/j.bjp.2018.06.010

MACHADO, A. C. et al., Medicamentos Fitoterápicos na odontologia: evidências e perspectivas sobre o uso da aroeira-do-sertão (*Myracrodruon urundeuva* Allemão). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 16(2), 283–289. 2014. DOI:10.1590/s1516-05722014000200018

MAJUMDAR, A. S. et al. Chapter 12 - Natural Products in Lifestyle Diseases: In Vitro Screening. **Natural Products and Drug Discovery, Elsevier**, cap. p. 327-347. 2018. DOI: 10.1016/B978-0-08-102081-4.00012-5

MARCHESE, C. Biodiversity hotspots: A shortcut for a more complicated concept. **Global Ecology and Conservation**. v. 3:297-309, 2015 DOI: 10.1016/j.gecco.2014.12.008

MARQUES, J. V. et al. **Antifungal Activity of Natural and Synthetic Amides from Piper species**. 2010. Disponível em: <http://static.sites.s bq.org.br/jbcs.s bq.org.br/pdf/v21n10a03.pdf?agreq=antifungal%20activity%20of%20natural%20end%20synthetic&agrep=jbcs,qn,qnesc,qnint,rvq>. Acesso em: 23 setembro 2019.

MARTIN, C. A. et al. Ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 e ômega-6: importância e ocorrência em alimentos. **Revista de Nutrição**, v.19(6), 761–770. 2006. DOI:10.1590/s1415-52732006000600011

MARTINS, C. M. et al. Chemical Composition, Antifungal, and Cytotoxicity Activities of *Inga laurina* (Sw.) Willd Leaves. **The Scientific World Journal**, v. 2019, 1–12. 2019. DOI:10.1155/2019/9423658

MARTINS, N. et al. Activity of phenolic compounds from plant origin against *Candida* species. **Industrial Crops and Products**, v. 74, p. 648-670, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.05.067>

MARTINS, N. et al., Chemical composition and bioactive compounds of garlic (*Allium sativum* L.) as effected by pre- and postharvest conditions. A review. **Food Chemistry**, v. 211, p. 41-50, 2016. DOI: [10.1016/j.foodchem.2016.05.029](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.05.029)

MARTINS, V. E. X. et al. Antimicrobial Activity of Seasonal Essential Oils from *Banisteriopsis Malifolia* (Ness & Mart.) B. Gates. **Revista. Virtual Química.**, v. 12 (2), 461-473 2020. DOI: [10.21577/1984-6835.20200037](https://doi.org/10.21577/1984-6835.20200037)

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

MATSUURA, K. et al. Paper-Based Resazurin Assay of Inhibitor-Treated Porcine Sperm. **Micromachines**, v. 10(8), 495. 2019 DOI:[10.3390/mi10080495](https://doi.org/10.3390/mi10080495)

MEDEIROS, J. D. et al. 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. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2010005000001>

MELLO, F. B. et al. Estudo de toxicidade pré-clínica de Fitoterápico contendo *Pimpinella anisum*, *Foeniculum foeniculum*, *Sambucus australis* e *Cassia augustifolia*. **Lat Am J Pharm**, v. 26, p. 230-237, 2007. ISSN 0326-2383

MENESES, H. F. et al. Leguminosas campestres no morro Pedra do Lagarto, Santa Maria, **Rio Grande do Sul, Brasil**. 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.5902/2358198024711>

MICHELON, C. M. et al. Extratos de plantas de uso popular contra infecções orais. **Revista Brasileira em Promoção da Saúde**, v. 29(4), 506-514. 2016. DOI: [10.5020/18061230.2016.p506](https://doi.org/10.5020/18061230.2016.p506)

MILITAO, G. C. G. et al. Cytotoxic Activity of Nepetin, a Flavonoid from *Eupatorium ballotaefolium* HBK. **ChemInform**, v. 36(16). 2005. DOI:[10.1002/chin.200516192](https://doi.org/10.1002/chin.200516192)

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Plantas medicinais e fitoterapia. **Portaria nº 971**, de 03 de maio de 2006. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2006/prt0971_03_05_2006.html
Acesso em: 19 junho 2019.

MOHAMMADI, A. et al. Regulation of miRNAs by herbal medicine: An emerging field in cancer therapies. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 86, n., p. 262-270, 2017. DOI:[10.1016/j.biopha.2016.12.023](https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.12.023).

MOHAMMED, H. A. et al. Anti-Oral Pathogens of *Tecoma stans* (L.) and *Cassia javanica* (L.) Flower Volatile Oils in Comparison with Chlorhexidine in Accordance with Their Folk Medicinal Uses. **Medicina**, v. 55(6), 301. 2019. DOI:10.3390/medicina55060301

MOHSEN, E. et al. Metabolites profiling of Egyptian *Rosa damascena* Mill. flowers as analyzed via ultra-high-performance liquid chromatography-mass spectrometry and solid-phase microextraction gas chromatography-mass spectrometry in relation to its anti-collagenase skin effect. **Industrial Crops and Products**, v. 155, 112818. 2020. DOI: 10.1016/j.indcrop.2020.112818

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

MONNIER, V. M. et al. Glycation Products as Markers and Predictors of the Progression of Diabetic Complications. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1043(1), 567–581. 2005. DOI:10.1196/annals.1333.065

MORAIS, S. A. L. et al. Análise de compostos bioativos, grupos ácidos e da atividade antioxidante do café arábica (*Coffea arabica*) do cerrado e de seus grãos defeituosos (PVA) submetidos a diferentes torras. **Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas**, v. 28, n. S, p. 198-207, dez. 2008. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0101-20612008000500031>.

MURAMATSU, D. et al. Cell cytotoxicity and anti-glycation activity of taxifolin-rich extract from Japanese larch, *Larix kaempferi*. **Heliyon**, v. 5(7), e02047. 2019. DOI:10.1016/j.heliyon.2019.e02047

MUTO, A. et al. Emodin has a cytotoxic activity against human multiple myeloma as a Janus-activated kinase 2 inhibitor. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 6(3), 987–994. 2007. DOI: 10.1158/1535-7163.mct-06-0605

NAGPAL, M. A. et al. Phytochemical Investigation of Methanolic Extract of *Cassia fistula* Leaves. *Pharmacognosy Journal*, v. 3, n. 26, p. 61-69, 2011. DOI: <https://doi.org/10.5530/pj.2011.26.11>.

NAMBIRAJAN, G. et al. 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, 1495–1506. 2018 DOI:10.1016/j.biopha.2018.10.007

NANDI, M. K., K. et al. "Physicochemical and phytochemical standardization of fruit of *Sesbania grandiflora*." **Der Pharmacia Lettre** v. 8(5): 297-304. ISSN 0975-5071. 2016. Disponível em: https://www.researchgate.net/profile/TryambakSingh/publication/302577404_Physicochemical_and_phytochemical_standardization_of_fruit_of_Sesbania_grandiflora/links

[/57f4b04d08ae886b897e1587/Physicochemical-and-phytochemical-standardization-of-fruit-of-Sesbania-grandiflora.pdf](#). Acesso em: 23 de mar. 2020

NASCIMENTO, M. N. G. et al. Antimicrobial and cytotoxic activities of *Senna* and *Cassia* species (Fabaceae) extracts. **Industrial Crops & Products**, v. 148 112081. 2020. DOI: 10.1016/j.indcrop.2019.112081

NASTIĆ, N. et al. A Comparative Assessment of Phytochemical Profiles of Comfrey (*Symphytum officinale* L.) Root Extracts Obtained by Different Extraction Techniques. **Molecules**, v. 25(4), 837. 2020. DOI:10.3390/molecules25040837

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

NEPOMUCENO, N. C. et al. Antimicrobial activity of PLA/PEG nanofibers containing terpinen-4-ol against *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* **Journal of Applied Polymer Science**, v. 135(6), 45782. 2017. DOI:10.1002/app.45782

NEVES, P. D. O. **Importância dos compostos fenólicos dos frutos na promoção da saúde**. Orientadora: Ana Cristina Vinha. 2015. (Tese de Doutorado). Disponível em: https://bdigital.ufp.pt/bitstream/10284/5241/1/PPG_15639.pdf. Acesso em 22 mar. 2020.

NEWMAN, D. J. Bioactive cyclic molecules and drug design, **Expert Opinion on Drug Discovery**. v. 3(5):379-385 2018 DOI: 10.1080/17460441.2018.1445085

NEWMAN, D. J. et al. Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. **Journal of Natural Products**, 2020. DOI: 10.1021/acs.jnatprod.9b01285

NOBREGA, Danúbia Roberta de Medeiros et al. Avaliação da utilização e hábitos de higiene em usuários de prótese dentária removível. **Rev. Bras. Odontol.** 2016. vol.73, n.3, pp. 193-197. ISSN 1984-3747.

O'BRIEN, C. et al. Genotypic and phenotypic diversity in *Candida tropicalis*. **Access Microbiology**, v. 1, n. 1A, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1099/acmi.ac2019.po0225>

OGUNWANDE, I. A. et al. Aromatic plants growing in Nigeria: Essential oil constituents of *Cassia alata* (Linn.) Roxb. and *Helianthus annuus* L. **Records of Natural Products**, v. 4(4), 211-217.2010

OLIVEIRA, A. C. et al. Fontes vegetais naturais de antioxidantes. *Química Nova*, São Paulo, v. 32, n. 03, p. 689-702, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422009000300013>

OLIVEIRA, D. F. et al. Estudo etnofarmacológico sobre produtos naturais e sintéticos citados para tratamento de casos suspeitos de micoses superficiais no município de

Cuité, PB. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 10, n. 2, p. 15, 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.18378/rvads.v10i2.3468>.

OLIVEIRA, D. M et al. Antifungal and cytotoxicity activities of *Banisteriopsis gyrophylla* leaves. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 70, n. 11, p. 1541–1552, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1111/jphp.12996>

OLIVEIRA, D. M. et al. Chemical Constituents and Antileishmanial and Antibacterial Activities of Essential Oils from *Scheelea phalerata*. **ACS Omega**. v. 5, n. 3, 1363–1370 2020. DOI: 10.1021/acsomega.9b01962

OLIVEIRA, K. M. S. et al. Atividade antifúngica de *Cassia fistula* frente a espécies associadas à candidíase vulvovaginal. **Investigação**, v. 15, n. 4, 2016.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Adverte sobre doenças resistentes a medicamentos**, 2010. Disponível em: <http://unicrio.org.br/omsadvertisobre-doenças-resistentes-a-medicamentos>. Acesso em: 05 de abril, 2020.

PAL, A. et al. Bioactive Compounds and Properties of Seaweeds—A Review. **OALib**, v. 01(04), 1–17. 2014. DOI:10.4236/oalib.1100752.

PANACKAL, A. A. et al. Paradoxical immune responses in non-HIV Cryptococcal meningitis. **PLoS Pathog**. v. 11, E1004884. 2015. DOI: 10.1371/journal.ppat.1004884

PANIAGUA-GARCÍA, A. I. et al. Development and validation of a HPLC-DAD method for simultaneous determination of main potential ABE fermentation inhibitors identified in agro-food waste hydrolysates. **Microchemical Journal**, v. 150, 104147. 2019. DOI: 10.1016/j.microc.2019.104147

PANICHAYUPAKARANANT, P. et al. Bioassay-guided isolation of the antioxidant constituent from *Cassia alata* L. leaves. **Songklanakarin J. Sci. Technol.** v. 26(1): 03-107, 2014

PARVEEN, S. et al. A Review on In vitro Culture of *Cassia alata* Linn. (*Senna alata*): Analysis of Metabolites and Biological Activities. **Journal of Functional and Environmental Botany**, v. 5, n. 2, 78-86. 2015 DOI: 10.5958/2231-1750.2015.00016.5

PATEL, K. et al. A review on pharmacological and analytical aspects of diosmetin: A concise report. **Chinese Journal of Integrative Medicine**, v.19(10), 792–800. 2013 DOI:10.1007/s11655-013-1595-3

PENG, X. et al. Cinnamon Bark Proanthocyanidins as Reactive Carbonyl Scavengers to Prevent the Formation of Advanced Glycation Endproducts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56(6), 1907–1911. 2008. DOI:10.1021/jf073065v

PEREIRA, I. S. P. et al. Flavonoides do Gênero *Solanum*. **Revista. Virtual Química**, v. 8 (1), 4-26, 2016. DOI: 10.5935/1984-6835.20160021. ISSN 1984-6835

PERERA, P. R. D. et al. Comparison of Antiglycation and Antioxidant Potentials and Total Phenolic Contents of Decoctions from Antidiabetic Plants. **Procedia Chemistry**, v. 16, n., p. 519-524, 2015. DOI:10.1016/j.proche.2015.12.087.

PERES, J. C. F. et al. Evaluation of antifungal activity of seaweed extracts. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 36(3), 294–299. 2012. DOI:10.1590/s1413-70542012000300004

PETROVICIU, I. et al. Flavonoid dyes detected in historical textiles from Romanian collections. **Morana. e-PS**, v. 11, 84-90. 2014. ISSN: 1581-9280 web edition

PHAM, J. V., et al. A Review of the Microbial Production of Bioactive Natural Products and Biologics. **Frontiers in Microbiology**, v. 10. 2019. DOI:10.3389/fmicb.2019.01404

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

PILLAY, P. et al. Antiplasmodial hirsutinolides from *Vernonia staehelinoides* and their utilization towards a simplified pharmacophore. **Phytochemistry**, v. 68, n. 8, p. 1200-1205, 2007. DOI: 10.1016/j.phytochem.2007.02.019

PINTO, M. E. A. et al. Antifungal and antioxidant activity of fatty acid methyl esters from vegetable oils. **Anais Da Academia Brasileira de Ciências**, v. 89(3), 1671–1681. 2017. DOI:10.1590/0001-3765201720160908

PLAZONIĆ, A. et al. Identification and Quantification of Flavonoids and Phenolic Acids in Burr Parsley (*Caucalis platycarpos* L.), Using High-Performance Liquid Chromatography with Diode Array Detection and Electrospray Ionization Mass Spectrometry. **Molecules**, v. 14(7), 2466–2490. 2009. I:10.3390/molecules14072466

POHL, CAROLINA H. et al. Antifungal free fatty acids: a review. **Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances**, v. 3, p. 61-71, 2011.

POLONI, José Antonio T. et al. Neutrophils phagocytosing fungal hyphae in urinary sediment. **Brazilian Journal of Nephrology**, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1590/2175-8239-JBN-2019-0245>

PRASANNA, G. et al. Linolenic acid prevents early and advanced glycation end-products (AGEs) modification of albumin. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 95, 121–125. 2017. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2016.11.035

PRASATH, G. S. et al. Antidiabetic and Antioxidant Properties of *Cassia auriculata* Flower Extract: An in vitro Study. **International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research**, v. 55(1), v. 17, p. 91-96, 2019 ISSN 0976 – 044X.

PRIOR, R. L. et al. Assays for Hydrophilic and Lipophilic Antioxidant Capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORACFL) of Plasma and Other Biological and Food Samples. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 11, p. 3273-3279, 2003 DOI: <https://10.1021/jf0262256>.

PROCHÁZKOVÁ, D. et al. Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. **Fitoterapia**, v. 82(4), 513–523. 2011. DOI: 10.1016/j.fitote.2011.01.018

PSOMIADOU, E. et al. On the Role of Squalene in Olive Oil Stability. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47(10), p. 4025–4032. 1999 DOI:10.1021/jf990173b

PYNE, M. E. et al. Engineering Plant Secondary Metabolism in Microbial Systems. **Plant Physiology**, v. 179. p. 844-861, 2019. DOI:10.1104/pp.18.01291

QUARESMA, A. B. et al. Antioxidant compounds from *Banisteriopsis argyrophylla* leaves as α -amylase, α -glucosidase, lipase, and glycation inhibitors, **Bioorganic Chemistry**, v. 105, 104-335 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2020.104335>

QUEIROZ, E. F. et al. A Importância das Técnicas Acopladas (CL/UV, CL/EM, CL/RMN) para Procura de Princípios Ativos. 2006. Disponível em: <https://www.arca.fiocruz.br/bitstream/icict/18408/2/7.pdf>. Acesso em: 04 mar. 2020.

RAO, A. et al. Mechanism of Antifungal Activity of Terpenoid Phenols Resembles Calcium Stress and Inhibition of the TOR Pathway. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v 54(12), p. 5062–5069. 2010 DOI:10.1128/aac.01050-10

RAFAELLY, L. et al. Optimisation of ESI-MS detection for the HPLC of anthraquinone dyes. **Dyes and Pigments**, v. 77(1), 191–203. 2008. DOI: 10.1016/j.dyepig.2007.05.007

RAMADHANI, S. et al. Antibacterial activity and structure elucidation of salicin from stem bark of *Salix tetrasperma* ROXB. **Indonesian Journal of Fundamental and Applied Chemistry**. v. 4, p. 47-52, 2019. DOI:10.24845/ijfac.v4.i2.47.

RAMESH, PETCHI R. et al. Evaluation of anti-diabetic activity of *Cassia surattensis* burm. F. Flower in streptozotocin induced diabetic rats. **Journal. Res. Pharma. Sci.**; v. 2(2), 200–205, 2011

RANAWEERA, K.K.D.S. et al. Nutraceutical potential of dietary phytochemicals in edible flowers. A review. **J Food Biochem** v. 45(4): e13642. 2021. DOI: 10.1111/jfbc.13642

RAZAVI, S. M. et al. Biological activity of quercetin-3-O-glucoside, a known plant flavonoid. **Russian Journal of Bioorganic Chemistry**, v. 35(3), 376–378. 2009. DOI:10.1134/s1068162009030133

RIBEIRO, L. H. L. "Analysis of medicinal plant and herbal medicine programs in the Unified Health System (SUS) from the territorial perspective/ Análise dos programas de plantas medicinais e fitoterapicos no Sistema Unico de Saude (SUS) sob a perspectiva territorial." **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 24, no. 5, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1590/1413-81232018245.15842017>

RICE, W. Y. et al. Structure and Configuration of Alkaloids. II. Cassine^{1,2}. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 31(4), 1010–1012. 1966. DOI:10.1021/jo01342a005

ROCHA, E. O. et al. Composição química e atividade antimicrobiana do óleo essencial das flores de *Banisteriopsis campestris* (A. Juss.) Little. **Revista. Virtual Química.**, v. 10 (5), 1562-1577, 2018. DOI: 10.21577/1984-6835.20180106

ROCHA, W. S. et al., Compostos fenólicos totais e taninos condensados em frutas nativas do cerrado. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33(4), 1215–1221. 2011. DOI:10.1590/s0100-29452011000400021

RODRIGUES, A. R. M. **Produtos Naturais na Descoberta de Fármacos**, 2018. Disponível em: https://bdigital.ufp.pt/bitstream/10284/6660/1/PPG_%2032022.pdf. Acesso em: 18 de mar. 2020.

ROLÓN, M. et al. Development of resazurin microtiter assay for drug sensibility testing of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. **Parasitology Research**, v. 99, n. 2, p. 103-107, 2006. DOI: <https://10.1007/s00436-006-0126-y>.

ROMERO-BENAVIDES, J.C. et al. Medicinal plants used as anthelmintics: Ethnomedical, pharmacological, and phytochemical studies. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 129, p. 209-217, 2017. DOI: 10.1016/j.ejmech.2017.02.005

RONDISVALLE, S. et al. Natural Flavones and Flavonols: Relationships among Antioxidant Activity, Glycation, and Metalloproteinase Inhibition. **Cosmetics**, v. 7(3), 71. 2020. DOI:10.3390/cosmetics7030071

SANTOS, Ana Lúcia Mendes dos. **Estudo químico e biológico de *Cyperus rotundus* L. aclimatada no Amazonas**. Orientadora: Maria Lúcia Belém Pinheiro. 2014a. 157 f. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2014.

SANTOS, D. S. et al. Atividades farmacológicas dos flavonoides: um estudo de revisão. **Estação Científica (UNIFAP)** v. 7, n. 3, p. 7, 2017. DOI: 10.18468/estcien.2017v7n3.p29-35.

SANTOS, M.L. et al. Antifungal activity of extracts from *Piper aduncum* leaves prepared by different solvents and extraction techniques against dermatophytes *Trichophyton rubrum* and *Trichophyton interdigitale*. **Braz J Microbiol.** v. 44(4): 1275-8, 2014b. DOI:10.1590/S1517-83822013000400035

SANTOS-SÁNCHEZ S. N. F. et al. Shikimic acid pathway in biosynthesis of phenolic compounds. In: **Plant Physiological Aspects of Phenolic Compounds**. Intech Open, 2019. DOI:10.5772/intechopen.83815

SARIKAHYA, N. B. et al. Simultaneous determination of several flavonoids and phenolic compounds in nineteen different *Cephalaria* species by HPLC-MS/MS. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 5;173:120-125. 2019. 10.1016/j.jpba.2019.05.019.

SATYENDER, K. et al. Isolation and characterization of chemical compounds from flowers of *Cassia alata*. **Der Pharma Chemica**, v. 5(5):59-62. ISSN 0975-413X <http://derpharmachemica.com/archive.html> 2013.

SCHAFRANSKI, K. et al. Evaluation of bioactive compounds and antioxidant activity of extracts of black mulberry leaves (*morus nigra* L.) using experimental design. **Química Nova**, v. 42(7), 736-744.2019. DOI: <http://dx.doi.org/10.21577/0100-4042.20170389>

SCHEIDEGGER, N. M. B. **Cassia in Flora do Brasil 2020 em construção**. 2018. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/listaBrasil/PrincipalUC/PrincipalUC.do>. Acesso em: 04 mar. 2020.

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

SCHOFIELD, P. et al. Analysis of condensed tannins: a review. **Animal Feed Science and Technology**, v. 91(1-2), 21–40. 2001 DOI:10.1016/s0377-8401(01)00228-0

SELEGATO, D. M. et al. Biological and Chemical Aspects of *Senna spectabilis*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 28, n., p. 415-426,2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.21577/0103-5053.20160322>.

SENTHAMILSELVI, M. M. et al. Isolation and characterization of 5-O-methyl-*quercetin-3-O-(3''-acetyl)-β-d-galactoside* from *Cassia auriculata* flowers. **Indo American Journal of Pharmaceutical Research**, v. 6(06) 2016.

SHARMA et al. Full-Spectrum Analysis of Bioactive Compounds in Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) as Influenced by Different Extraction Methods. **Molecules** v. 25, 4599. 2020b. DOI: 10.3390/molecules25204599

SHARMA, A. et al. Astilbin: a promising unexplored compound with multidimensional medicinal and health benefits. **Pharmacological Research**, v 10, 4894. 2020a. DOI: 10.1016/j.phrs.2020a.104894

SHARMA, A. et al. Pharmacognosy, Phytochemistry and Pharmacology of *Cassia javanica* Linn: A Review. **Journal Pharma Res Revist**. v. 3(4), pp.101-105. 2014

SHUKLA, S. et al. Fatty acid composition and antibacterial potential of *Cassia tora* (leaves and stem) collected from different geographic areas of India. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 26, n. 1, p. 107-111, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2016.12.010>.

SILVA, S. M. F. Q. E. et al., Atividade in vitro de extratos brutos de duas espécies vegetais do Cerrado sobre leveduras do gênero *Candida*. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 17(6), 1649–1656. 2012. DOI:10.1590/s1413-81232012000600028.

SILVA, T. C. et al. Chemical composition, antioxidant activity and inhibitory capacity of α -amylase, α -glucosidase, lipase and non-enzymatic glycation, *in vitro*, of the leaves of *Cassia bakeriana* Craib. ScienceDirect. **Industrial Crops & Products**, v. 140, 15 Nov. 2019. DOI: 10.1016/j.indcrop.2019.111641

SILVEIRA, R. D. S. et al. Determination of phenolic and triterpenic compounds in *Jatropha gossypifolia* L by Ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometric (UHPLC-MS/MS). **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 56:e17262, 1-12, 2020. DOI: 10.1590/s2175-97902019000417262

SIMÕES, C. M. O. et al. Farmacognosia do produto natural ao medicamento. ed. Porto Alegre: **Artmed**, 2017. 486 p.

SIMÕES, C. M. O. et al. O guia decepar chora de ervas: 40 receitas naturais para sua saúde perfeita. Rio de Janeiro: Campus, 2001

SIMONETTI, G. et al. Potential Use of Phenolic Acids as *Anti-Candida* Agents: A Review. **Molecules**, v. 25, n. 16, 3748, 2020 DOI:10.3390/molecules25163748

SMITH, H. Plant secondary metabolites: occurrence, structure, and role in the human diet. 1. ed. **Oxford: Blackwell Publishing**, 576 p. 2007. DOI:10.1002/ptr.2237.

SRI HARSHA, P. S. C. et al. Protective ability of phenolics from white grape inification by-products against structural damage of bovine serum albumin induced by glycation. **Food Chemistry**, v. 156, p. 220-226, 2014 DOI: 10.1016/j.foodchem.2014.01.104.

SRINIVASULU, C. et al. Syringic acid (SA) – A Review of Its Occurrence, Biosynthesis, Pharmacological and Industrial Importance. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 108, 547–557. 2018. DOI: 10.1016/j.biopha.2018.09.069

SRIVIDHYA, M. et al. Bioactive Amento flavone isolated from *Cassia fistula* L. Leaves exhibits therapeutic efficacy. **3 Biotech** v. 7, n. 1, p. 33. 2017

STAHLHUT, S. G. et al. Assembly of a novel biosynthetic pathway for production of the plant flavonoid fisetin in *Escherichia coli*. **Metabolic Engineering**, v. 31, 84–93. 2015. DOI: 10.1016/j.ymben.2015.07.002

STRASSBURG, B. B. N. et al. Moment of truth for the Cerrado hotspot. **Nature Ecology & Evolution**, v. 1, n. 4, p. 99, 2017. DOI: 10.1038/s41559-017-0099

SUBRAMANIAN, D. P. et al. Comparative study of antioxidant activities of *Cassia auriculata* and *Cassia siamea* flowers. **International Research Journal of Pharmacy**, v. 2(12), 208-212. 2011

SUDI, I. Y. et al. Nutritional and phytochemical screening of *Senna obtusifolia* indigenous to Mubi, Nigeria. **Advances in Applied Science Research**, v. 2, p. 432-437, 2011. Disponível em: <https://www.imedpub.com/articles/nutritional-and-phytochemical-screening-of-senna-obtusifolia-indigenous-to-mubi-nigeria.pdf>

SUMATHY, V. et al. In vitro and in vivo antifungal activity of *Cassia surattensis* flower against *Aspergillus niger*. **Microbiol. Pathogen**. v.77, 7–12. 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2014.10.004>

SUN, J. et al. Screening Non-colored Phenolics in Red Wines using Liquid Chromatography/Ultraviolet and Mass Spectrometry/Mass Spectrometry Libraries. **Molecules**, v. 12, n. 3, 679–693. 2007. DOI:10.3390/12030679

SUNDARAMOORTHY, S. et al. Phytopharmacological Review on *Cassia* Species. **Journal Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 8, n. 5, p. 260-264, 2016.

SÜNTAR, I. et al. Antimicrobial effect of the extracts from *Hypericum perforatum* against oral bacteria and biofilm formation. **Pharmaceutical biology**, v. 54, n. 6, 1065-1070. 2016. DOI: 10.3109/13880209.2015.1102948.

SUZY, A. E. et al. Anti-oxidant and cytotoxic activity of *Cassia nodosa* Buch. -Ham. ex Roxb. and some of its pure constituents. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 8, n. 21, 586–597. 2014. DOI:10.5897/ajpp2013.3988

TAIZ, L. et al. Metabólitos secundários e defesa vegetal. Fisiologia vegetal, Porto alegre: **Artmed**. cap. 13, p. 312-323. 2013.

TANAKA, T. et al. Potential Cancer Chemopreventive Activity of Protocatechuic Acid. **Journal of Experimental & Clinical Medicine**, v. 3, n. 1, 27–33. 2011. DOI: 10.1016/j.jecm.2010.12.005

THOMFORD, Nicholas Ekow et al. Natural products for drug discovery in the 21st century: Innovations for novel drug discovery. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 6, e1578, 2018. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms19061578>

THONGSAARD, W. et al. Potential anxiolytic extracted from *Cassia siamea*. **Pharmacol. Biochem. Behav.** v. 53, n. 3, 753–758. 1996 DOI: [https://doi.org/10.1016/0091-3057\(95\)02088-8](https://doi.org/10.1016/0091-3057(95)02088-8)

TOPAL, F. et al. Antioxidant activity of taxifolin: an activity–structure relationship. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 31, n. 4, 674–683. 2015 DOI:10.3109/14756366.2015.1057723

TOREY, A. et al. Exploration of the anticandidal mechanism of *Cassia spectabilis* in debilitating candidiasis. **Journal of traditional and complementary medicine**, v. 6, n. 1, p. 97-104, 2016. DOI: <https://10.1016/j.jtcme.2014.11.017>

TORRES, N. M. P. O. et al. Química dos Produtos Finais de Glicação Avançada. **Revista Virtual de Química**. v. 10, n. 2, 375-392, 2018. DOI: 10.21577/1984-6835.20180029

TOSCAN, Cristiane Menegotto. **Atividade antimicrobiana e antioxidante de terpenoides**. 2014. Disponível em: <
<https://repositorio.ucs.br/xmlui/bitstream/handle/11338/564/Dissertacao%20Cristiane%20Menegotto%20Toscan.pdf?sequence=1&isAllowed=y>>. Acessado em: 12 de fev. 2020.

TOZETTO, J. T. et al. Extract of *Punica granatum* L.: An Alternative to BHT as an antioxidant in smissolid emulsified systems. **Química Nova**, v. 40, n. 1, p. 97-104, 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.21577/0100-4042.20160160>

TZAKOU, O. et al. Essential Oil from the Flowers, and Leaves of *Cassia fistula* L. **Journal of Essential Oil Research**, v. 19, n. 4, 360–361. 2007. DOI:10.1080/10412905.2007.9699305

UGALDE, R et al. Quebra-pedra (*phyllanthus niruri* l) importância, compostos bioativos e uso medicinal. **Anais do Salão Internacional de Ensino, Pesquisa e Extensão**, v. 11, n. 2, 2019. Disponível em: <https://periodicos.unipampa.edu.br/index.php/SIEPE/article/view/101306>. Acesso em: 12 jul. 2020

VEIGA JUNIOR, V. F. et al. Plantas medicinais: cura segura? **Química nova**, v. 28, n. 3, p. 519-528, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422005000300026>

VELLOSA, J. C. R. et al. Pesquisa de produtos naturais: plantas e radicais livres. **Revista Eletrônica de Farmácia**. v. 5, n. 2, p. 119-130, 2007. DOI: <https://doi.org/10.5216/ref.v4i2.3026>

VIEGAS JUNIOR, C. Terpenos com atividade inseticida: uma alternativa para o controle químico de insetos. **Química Nova**, v. 26, n. 3, p. 390-400, 2003 DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422003000300017>

VIEGAS JUNIOR, C. et al. Aspectos químicos, biológicos e etnofarmacológicos do gênero *Cassia*. **Química Nova**, v. 29, n. 6, p. 1279-1286, 2006. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422006000600025>

WAGNER, H. et al. Plant drug analysis: a thin layer chromatography. **Atlas**. 2. ed. Berlin: Springer, 1996. 384 p.

WANG, H. et al. Determination of l-threonate in human plasma and urine by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of**

Chromatography B. v. 834, n. 1-2, 155–162. 2006. DOI: 10.1016/j.jchromb.2006.02.057.

WANG, J. et al. Analysis of Chemical Constituents of *Melastoma dodecandrum* Lour. by UPLC-ESI-Q-Exactive Focus-MS/MS. **Molecules**, v. 22, n. 3, 476. 2017. DOI:10.3390/molecules22030476

WANGKHEIRAKPAM, S. Traditional and Folk Medicine as a Target for Drug Discovery. In: MANDAL, S. C. et al. **Natural Products and Drug Discovery**, Elsevier, cap. 2, p. 29-56. 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102081-4.00002-2>

WATANABE, S. et al., Efficacy and safety of fosravuconazole L-lysine ethanolate, a novel oral triazole antifungal agent, for the treatment of onychomycosis: A multicenter, double-blind, randomized phase III study. **The Journal of Dermatology**. v. 45, n. 10, 2018. DOI:10.1111/1346-8138.14607

WEIDENBÖRNER, M. et al. Antifungal spectrum of flavone and flavanone tested against 34 different fungi. **Mycological Research**, v. 101, n. 6, 733–736. 1997. DOI:10.1017/s0953756296003322

WINK, M. Secondary Metabolites, the Role in Plant Diversification. **Academic press: Encyclopedia of Evolutionary Biology**. Ed. 1, p. 2132, 2016. DOI:10.1016/b978-0-12-800049-6.00263-8

WOISKY, R. G. et al. Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. **Journal Apicultural Research**, v. 37, n. 2, p. 99-105, June 1998. DOI: <https://doi.org/10.1080/00218839.1998.11100961>

WOJTANOWSKI, K. K. et al. Study of a complex secondary metabolites with potent anti-radical activity by two-dimensional TLC/HPLC coupled to electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry and bioautography. **Analytica Chimica Acta**, v. 1029, 104–115. 2018. DOI: 10.1016/j.aca.2018.03.066

WOODS, J. P. Revisiting old friends: Developments in understanding *Histoplasma capsulatum* pathogenesis. **Journal of Microbiology**, v. 54, n. 3, 265–276. 2016. DOI:10.1007/s12275-016-6044-5

WORLD HEALTH ORGANIZATION. EUA: **Oral Health** 2012. (Fact sheet n° 318). Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs318/en/> Acesso em 08 março 2020.

XU, Y.-Q. et al. Effects of epigallocatechin gallate, epigallocatechin and epicatechin gallate on the chemical and cell-based antioxidant activity, sensory properties, and cytotoxicity of a catechin-free model beverage. **Food Chemistry**, v. 39:128060. 2020 DOI: 10.1016/j.foodchem.2020.128060

YAHARA, T. et al. Global legume diversity assessment: Concepts, key indicators, and strategies. **Taxon**. v. 62, p. 249–266, 2018. DOI: <https://doi.org/10.12705/622.12>

YADAV, J. P. et al. *Cassia occidentalis* L.: A review on its ethnobotany, phytochemical and pharmacological profile. **Fitoterapia**, v. 81(4), 223–230. 2010. DOI:10.1016/j.fitote.2009.09.008

YANG, H. et al. Oxidative stress and diabetes mellitus. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 49, n. 11, p. 1773-1782, 2011. DOI: [https://10.1515/CCLM.2011.250](https://doi.org/10.1515/CCLM.2011.250).

YANG, R. et al. The inhibition of advanced glycation end-products by five fractions and three main flavonoids from *Camellia nitidissima* Chi flowers. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 26, n. 1, 252–259. 2017. DOI: 10.1016/j.jfda.2017.03.007

YAP, P.S.X. et al. Essential oils, a new horizon in combating bacterial antibiotic resistance. **The Open Microbiology Journal**, v. 8, p. 6-14, 2014. DOI:10.2174/1874285801408010006

YEHYE, W. A. et al. Understanding the chemistry behind the antioxidant activities of butylated hydroxytoluene (BHT): A review. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 101, n., p. 295-312, 2015 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.06.026>.

YILDIRIM, A. et al. Determination of Antioxidant and Antimicrobial Activities of *Rumex crispus* L. Extracts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 8, p. 4083-4089, 2001 DOI: [https://10.1021/jf0103572](https://doi.org/10.1021/jf0103572)

YUAN, G.-F. et al. Conjugated linolenic acids and their bioactivities: a review. **Food & Function**, v. 5, n. 7, 1360. 2014. DOI:10.1039/c4fo00037d

ZACCHINO, S. A. et al. Plant phenolics and terpenoids as adjuvants of antibacterial and antifungal drugs. **Phytomedicine**, v. 37, 27–48. 2017. DOI:10.1016/j.phymed.2017.10.018

ZAMBUZZI-CARVALHO, P. et al. PEREIRA, M. Transcriptional profile of Paracoccidioides induced by oenothien B, a potential antifungal agent from the Brazilian Cerrado plant *Eugenia uniflora*. **BMC Microbiology**, v. 13, n. 1, 227. 2013 DOI:10.1186/1471-2180-13-227

ZAPPI, D. C. et al. Growing knowledge: an overview of Seed Plant diversity in Brazil. **Rodriguésia**. vol. 66, n.4, p.1085-1113. ISSN 0370-6583, 2015. DOI: 10.1590/2175-7860201566411.

ZHANG, H. et al. Antioxidant Activities and Chemical Constituents of Flavonoids from the Flower of *Paeonia ostii*. **Molecules**, v. 22, n. 1, 5. 2016. DOI:10.3390/molecules22010005

ZHAO Y. et al. A Review of Flavonoids from *Cassia* Species and their Biological Activity. **Curr Pharm Biotechnol**. v.17, n. 13:1134-1146. 2016. DOI: 10.2174/1389201017666160819151153.

ZHAO, M. et al. Identification of astilbin metabolites produced by human intestinal bacteria using UPLC-Q-TOF/MS. **Biomedical Chromatography**, v. 28, n. 7, 1024–1029. 2014. DOI:10.1002/bmc.3111

ZHENG, J. et al. In Vitro Investigation of the Cytotoxic Activity of Emodin 35 Derivative on Multiple Myeloma Cell Lines. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2021. DOI: 10.1155/2021/6682787

ZHONG, Y. et al. Methods for the assessment of antioxidant activity in foods. This chapter is reproduced to a large extent from an article in press by the authors in the Journal of Functional Foods. **Handbook of Antioxidants for Food Preservation**, 287–333. 2015. DOI:10.1016/b978-1-78242-089-7.00012-9

ZIDA, A. et al. Anti-Candida albicans natural products, sources of new antifungal drugs: A review. **Journal de mycologie medicale**, v. 27, n. 1, p. 1-19, 2017. DOI: 10.1016/j.mycmed.2016.10.00

ZONG, Z. et al. Studies on the instability of chlorhexidine, part I: kinetics and mechanisms. **Journal of Pharmaceutical Sciences, Hoboken**, v. 101, n. 7, p. 2417-2427, 2012.

ZYGULA, A. et al. Oxidative stress markers in saliva and plasma differ between diet-controlled and insulin-controlled gestational diabetes mellitus. **Diabetes Research and Clinical Practice**. v. 148:72-80, 2018. DOI:10.1016/j.diabres.2018.11.0

APÊNDICE

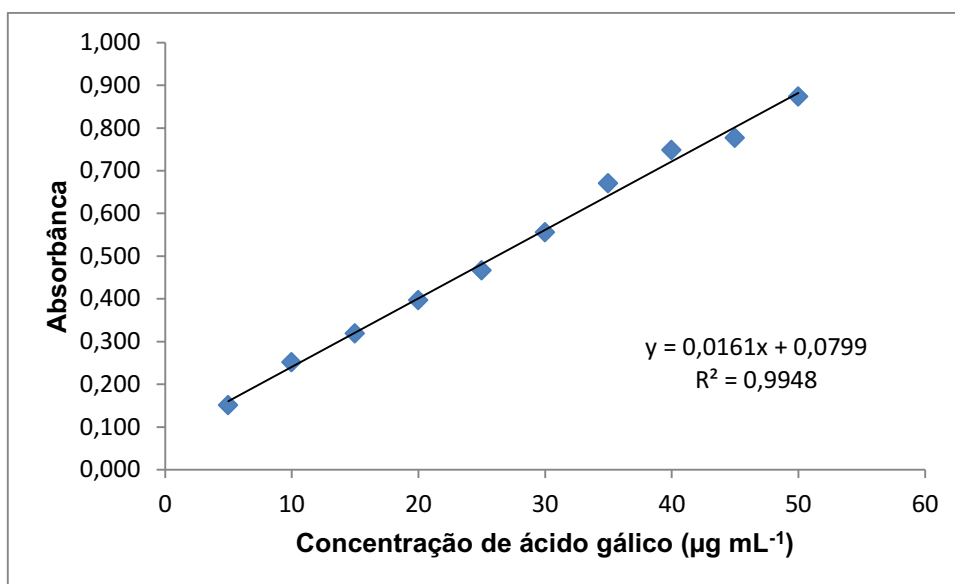
APÊNDICE A - Tempos de retenção dos padrões de alcanos (C₈-C₃₀) empregados na análise por CG-EM.

| Alcanos | Tempo de retenção (pressão constante) CG-EM | Tempo de retenção Adams (2017) |
|---------|--|-----------------------------------|
| C8 | 3,35 | N.I. |
| C9 | 5,15 | N.I. |
| C10 | 7,71 | 7,77 |
| C11 | 11,48 | 11,48 |
| C12 | 15,58 | 15,77 |
| C13 | 20,19 | 20,19 |
| C14 | 24,43 | 24,61 |
| C15 | 28,82 | 28,82 |
| C16 | 32,76 | 32,89 |
| C17 | 36,74 | 36,74 |
| C18 | 40,35 | 40,40 |
| C19 | 43,90 | 43,92 |
| C20 | 47,27 | 47,33 |
| C21 | 50,54 | N. I. |
| C22 | 53,58 | 53,54 |
| C23 | 56,63 | 56,48 |
| C24 | 59,40 | 59,33 |
| C25 | 62,27 | N. I. |
| C26 | 64,95 | 64,61 |
| C27 | 68,55 | 67,12 |
| C28 | 72,47 | 69,55 |
| C29 | 78,25 | 71,78 |
| C30 | 84,51 | 74,16 |
| C31 | 85,25 | 76,35 |
| C32 | 91,25 | 78,48 |
| C33 | 94,25 | 80,55 |

Nota: - N.I = tempo não identificado.

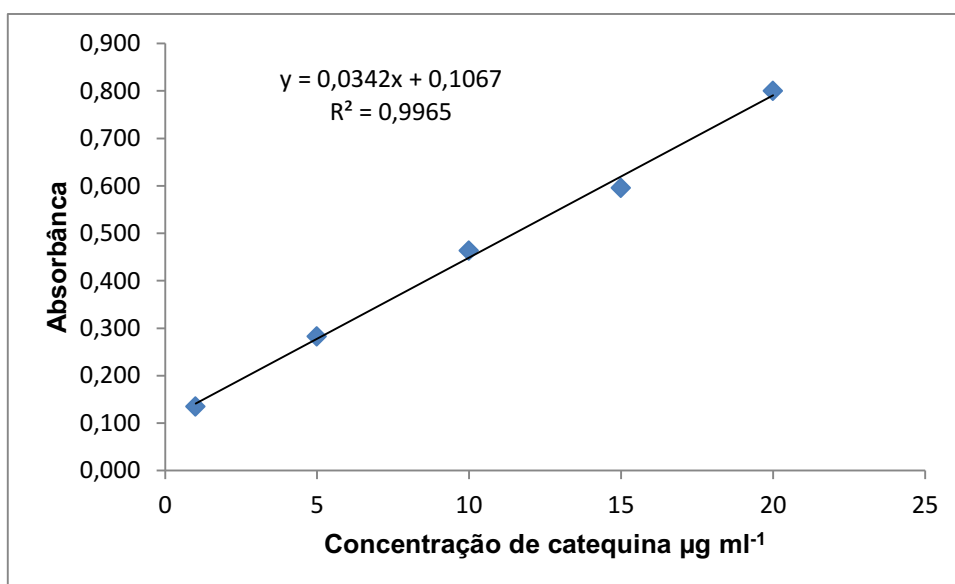
Fonte: o autor.

APÊNDICE B - Gráfico da curva-padrão obtido a partir da curva analítica para determinação de fenóis totais.



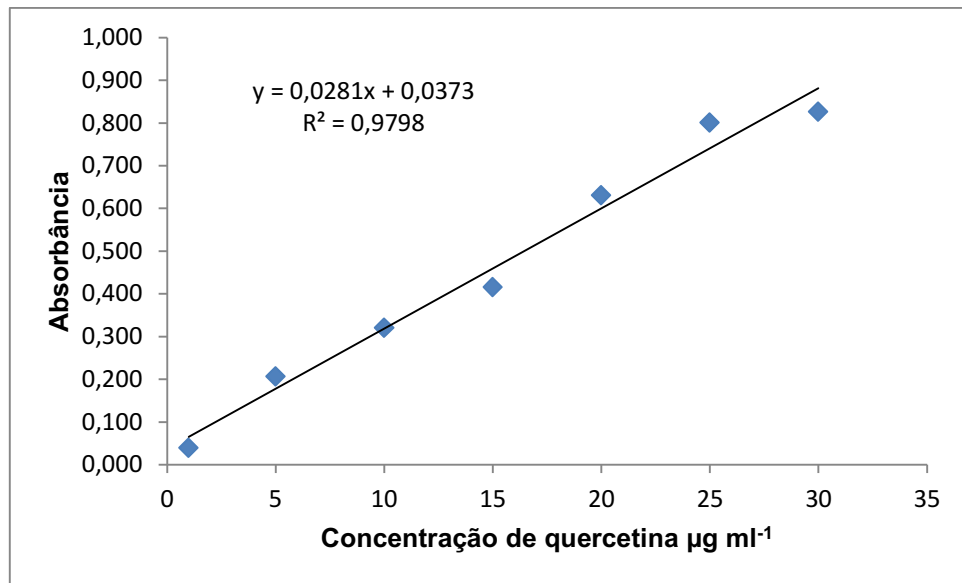
Fonte: o autor.

APÊNDICE B – Gráfico da curva-padrão obtido a partir da curva analítica para determinação de proantocianidinas.



Fonte: o autor.

APÊNDICE B – Gráfico da curva-padrão obtido a partir da curva analítica para determinação de flavonoides.



Fonte: o autor.

APÊNDICE C – Espectros EM/EM dos compostos identificados por CLAE no modo negative (-).

