



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE QUÍMICA

Gilberto Arantes Koch

Prospecção fitoquímica e avaliação da atividade antifúngica da partição acetato
de etila das folhas de *Cassia bakeriana* Craib

Uberlândia

2019

Gilberto Arantes Koch

Prospecção fitoquímica e avaliação da atividade antifúngica da partição acetato de etila das folhas de *Cassia bakeriana* Craib

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de graduação em bacharelado em Química Industrial da Universidade Federal de Uberlândia como requisito para a disciplina Trabalho de Conclusão de Curso (GQB056).

Orientador: Professor Dr. Alberto de Oliveira

Coorientadora: M.^a Tiara da Costa Silva

Uberlândia

2019

Prospecção fitoquímica e avaliação da atividade antifúngica da partição acetato de etila das folhas de *Cassia bakeriana* Craib

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de graduação em bacharelado em Química Industrial da Universidade Federal de Uberlândia como requisito para a disciplina Trabalho de Conclusão de Curso (QGB056).

Orientador: Professor Dr. Alberto de Oliveira

Coorientadora: M.^a Tiara da Costa Silva

Aprovado em 11 de Julho de 2019.

COMISSÃO EXAMINADORA



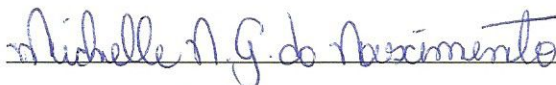
Prof. Dr. Alberto de Oliveira

(Orientador)



Prof. Dr. Sérgio Antônio Lemos de Moraes

(Examinador)



Doutoranda Michelle Nauara Gomes do Nascimento

(Examinador)

*A minha mãe, Vânia, e meu pai, Gilmar, pelo amor,
carinho, força, cuidado e dedicação.*

*Aos meus demais familiares, por seus exemplos e por
sempre me ajudarem.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por me dar forças, por sempre estar comigo e iluminou meu caminho durante essa caminhada.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Alberto de Oliveira pela oportunidade e por confiar e acreditar em mim.

Agradeço também a M.^a Tiara da Costa Silva, por todo o conhecimento transmitido, material disponibilizado, convívio, paciência e ajuda que me ajudaram bastante a concluir este trabalho.

Aos meus familiares, por acreditarem em mim e me incentivarem a nunca desistir.

Aos meus amigos de graduação, Tomás, Karoline, Nayane, Hanna, Wiler e Simone por estarem comigo nos momentos mais difíceis e por todo apoio dado.

Aos colegas de laboratório do Núcleo de Pesquisa em Produtos Naturais (NuPPEN) por toda ajuda.

Ao Instituto de Química e a Universidade Federal de Uberlândia (UFU).

À FAPEMIG e a CAPES pelo apoio financeiro.

*“Há apenas uma
maneira de evitar
críticas: não falar, não
fazer e não ser nada”.*

(Aristóteles)

RESUMO

Doenças causadas por fungos podem ser tanto superficiais como invasivas e representam uma ameaça crescente para a saúde humana em todo o mundo, principalmente para pessoas com imunidade comprometida, que em alguns casos pode levar à morte. Estudos têm demonstrado que os agentes antifúngicos mais utilizados não são completamente eficazes devido ao desenvolvimento da resistência antifúngica, toxicidade e efeitos colaterais indesejáveis desses fármacos nos pacientes. Portanto, a busca por novas substâncias bioativas se faz necessária e os produtos naturais têm sido uma fonte para o desenvolvimento de novos fármacos. Nesse contexto, o Brasil é um país com uma rica biodiversidade, tornando-se importante para os estudos dos produtos naturais. O gênero *Cassia* mostrou grande potencial uma vez que estudos tem comprovado as atividades biológicas de várias espécies. Assim, esse trabalho estudou a espécie *Cassia bakeriana* Craib, com o objetivo de determinar a atividade antifúngica dos extratos e das partições e avaliar a composição química da partição acetato de etila (P-AE), obtida por extração líquido-líquido a partir do extrato etanólico das folhas, utilizando cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas em alta resolução (CLAE-EM). A P-AE apresentou valores de concentração inibitória mínima (CIM) de 187,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ contra *Candida glabrata*, 375 $\mu\text{g mL}^{-1}$ contra *Candida albicans* e 750 $\mu\text{g mL}^{-1}$ contra *Candida tropicalis*, e devido a estes resultados a partição foi selecionada para a identificação dos compostos. Através da CLAE-EM da P-AE foi possível determinar a presença de flavonoides como a quercetina (m/z 301,0356), o ácido protocatecuico (m/z 153,0194), proantocianidinas como a (epi)afzelequina-(epi)catequina (m/z 561,1401) e a antocianina cianina (m/z 611,1610). Esses compostos podem estar relacionados com a atividade antifúngica apresentada pela P-AE, uma vez que a atividade antifúngica de alguns deles já foi descrita na literatura.

Palavras-chave: *Cassia bakeriana*, atividade antifúngica, *Candida* spp., CLAE-EM, flavonoides, proantocianidinas, ácido hidroxibenzoico, antocianina.

ABSTRACT

Diseases caused by fungus can be both superficial and invasive and pose a growing threat to human health worldwide, especially to people with compromised immunity, which in some cases can lead to death. Studies have shown that the most commonly used antifungal agents are not completely effective due to the development of antifungal resistance, toxicity and undesirable side effects of these drugs in patients. Therefore, the search for new bioactive substances is necessary and natural products have been a source for the development of new drugs. In this context, Brazil is a country with a rich biodiversity, becoming important for the study of natural products. The genus *Cassia* has shown great potential since studies have proven the biological activities of various species. Thus, this work studied *Cassia bakeriana* Craib species, aiming to determine the antifungal activity of extracts and partitions and to evaluate the chemical composition of ethyl acetate partition (P-EA), obtained by liquid-liquid extraction from ethanolic extract of leaves using high performance liquid chromatography coupled with high resolution mass spectrometry (HPLC-MS). P-AE presented minimum inhibitory concentration (MIC) values of 187.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ against *Candida glabrata*, 375 $\mu\text{g mL}^{-1}$ against *Candida albicans* and 750 $\mu\text{g mL}^{-1}$ against *Candida tropicalis*, and due to these results the partition was selected for compound identification. Through the HPLC of P-AE it was possible to determine the presence of flavonoids such as quercetin (m/z 301,0356), protocathechuic acid (m/z 153,0194), proanthocyanidins such as (epi)afzelechin-(epi)catechin (m/z 561.1401) and cyanine anthocyanin (m/z 611.1610). These compounds may be related to the antifungal activity presented by P-AE, once the antifungal activity of some of them has been described in the literature.

Keywords: *Cassia bakeriana*, antifungal activity, *Candida* spp., HPLC-MS, flavonoids, proanthocyanidins, hydroxybenzoic acid, anthocyanin.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Rendimento obtido do extrato hexânico e do extrato etanólico das folhas de <i>Cassia bakeriana</i>	30
Tabela 2 - Rendimento das partições obtidas através da extração líquido-líquido do extrato etanólico das folhas de <i>Cassia bakeriana</i>	31
Tabela 3 - Prospeção fitoquímica dos extratos e da partição acetato de etila das folhas de <i>Cassia bakeriana</i>	32
Tabela 4 - Valores de concentração inibitória mínima dos extratos e partições da <i>Cassia bakeriana</i>	33
Tabela 5 - Concentração inibitória mínima de alguns compostos presentes na partição acetato de etila.....	34
Tabela 6 - Proposta de identificação dos compostos da partição acetato de etila das folhas de <i>Cassia bakeriana</i>	37

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Principais fatores que podem influenciar o acúmulo de metabólitos secundários em plantas	14
Figura 2	Relações biossintéticas que levam aos metabólitos secundários	15
Figura 3	Estruturas dos compostos isolados da <i>Centaurea pullata</i>	17
Figura 4	Estruturas dos compostos isolados da <i>Hopea exalata</i>	17
Figura 5	Estrutura do composto reína isolado das cascas de <i>C. bakeriana</i> e das flores da <i>C. fistula</i>	19
Figura 6	Estrutura do composto isolado das folhas da <i>Cassia nigricans</i>	20
Figura 7	Estrutura do composto isolado da <i>Cassia tora</i>	20
Figura 8	<i>Cassia bakeriana</i> Craib.....	21
Figura 9	Folhas, flores e frutos de <i>Cassia bakeriana</i> Craib	22
Figura 10	Esquema do preparo do material vegetal	24
Figura 11	Primeira extração dos extratos hexânico e etanólico	25
Figura 12	Procedimento de preparação dos extratos e partições.....	26
Figura 13	Cromatogramas da partição acetato de etila CLAE-EM-IES	36
Figura 14	Estrutura dos compostos identificados na partição acetato de etila das folhas de <i>Cassia bakeriana</i>	40
Figura 15	Espectro de massa do ácido protocatecuico no modo negativo	41
Figura 16	Proposta de mecanismo de fragmentação para o ácido protocatecuico em modo negativo	41
Figura 17	Espectro de massa da (epi)afzelequina-(epi)catequina no modo negativo	42
Figura 18	Proposta de mecanismo de fragmentação para (epi)afzelequina-(epi)catequina no modo negativo	42
Figura 19	Espectro de massa da cianina no modo positivo.....	43
Figura 20	Proposta de mecanismo de fragmentação para cianina no modo positivo.....	44
Figura 21	Espectro de massa da quercetina no modo negativo	44
Figura 22	Proposta de mecanismo de fragmentação para quercetina no modo negativo.....	45

LISTA DE ABREVIATURAS

ATCC: American Type Culture collection

CIM: Concentração inibitória mínima

CCD: Cromatografia em camada delgada

CLAE-EM: Cromatografia líquida de alta eficiência acoplado a espectrômetro de massas

DMSO: Dimetilssulfóxido

DNA: Ácido desoxirribonucleico

EE: Extrato etanólico

EH: Extrato hexânico

EM/EM: Espectrometria de massas sequencial

HIV: Vírus da imunodeficiência humana

HRF: Clivagem heterocíclica do anel

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

IES: Ionização por eletrospray

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

MOPS: 3-*N*-morfolinapropanossulfônico

NP: Difenilboriloxietilamina

P-AE: Partição acetato de etila

P-A: Partição água

P-D: Partição diclorometano

P-nB: Partição *n*-butanol

QM: Quinona metídeo

RDA: Retro Diels-Alder

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	11
2	OBJETIVOS	12
3	REFERENCIAL TEÓRICO	13
3.1	Metabolismo secundário	13
3.2	Atividade antifúngica	16
3.3	Aspectos da família Leguminosae e do Gênero <i>Cassia</i>	18
3.4	A espécie <i>Cassia bakeriana</i> Craib	21
4	MATERIAIS E MÉTODOS	23
4.1	Instrumentação	23
4.2	Reagentes e soluções	23
4.3	Coleta e preparo do material vegetal	23
4.4	Preparo dos extratos e extração líquido-líquido	24
4.5	Prospecção fitoquímica	26
4.6	Atividade antifúngica	28
4.7	Identificação dos compostos por CLAE-EM-IES	29
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
5.1	Rendimento dos extratos e extração líquido-líquido	30
5.2	Prospecção fitoquímica	31
5.3	Atividade antifúngica	32
5.4	Identificação dos compostos da partição acetato de etila	36
6	CONCLUSÃO	45
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

O Brasil sustenta a maior biodiversidade do planeta em consequência da enorme riqueza de sua flora e fauna, e isto se deve à presença de diferentes biomas nesse país de proporções continentais. O bioma Cerrado é a segunda maior região biogeográfica da América do Sul, possui 2.036.448 km² de extensão, correspondendo a 24% do território brasileiro abrangendo os estados de Goiás, Tocantins, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Distrito Federal, Minas Gerais, Bahia, Maranhão, Piauí, Rondônia, Paraná e São Paulo, sendo considerada a formação savânica com a maior biodiversidade do mundo (INPE, 2018). No que se refere a diversidade biológica, o Cerrado brasileiro é reconhecido como a savana mais rica do mundo, abrigando 11.627 espécies de plantas nativas já catalogadas (MMA, 2018). Segundo Machado e outros (2004), apenas cerca de 20% da cobertura original do cerrado permanece intacta e somente 2,2 % de sua área original de ocorrência está inserida em áreas protegidas.

É de suma importância a preservação da biodiversidade brasileira pois ela é considerada uma fonte de substâncias biologicamente ativas com um enorme potencial para a criação de novos fármacos. A pesquisa para descoberta de protótipos de fármacos, além de propiciar o avanço de estudos básicos multidisciplinares, pode contribuir também para o desenvolvimento tecnológico nacional (BARREIRO; BOLZANI, 2009).

Os produtos naturais são derivados de várias fontes, como plantas, animais e micro-organismos, precedem a história humana registrada e têm sido utilizados para tratar doenças desde o surgimento da medicina, sendo indiscutível sua importância nos dias atuais para a sociedade moderna (LI; LARREGIEU; BENET, 2016). De acordo com Newman e Cragg (2016), a pesquisa na área de moléculas bioativas não apenas permite identificar novos compostos, como também propõe novas estruturas moleculares para serem utilizadas como modelos para novos medicamentos. Dos 1.562 fármacos produzidos entre 1981 a 2014, 73% apresentam sua origem baseada nesse campo. Sendo a subárea mais antiga da química orgânica, a química dos produtos naturais tem parte de seus aspectos formais já estabelecidos desde os tempos da alquimia, assim é natural que seja bem consolidada e reconhecida. Em 1960 os estudos relacionados a eles começaram a se desenvolver rapidamente devido a criação de ferramentas de análises espectroscópicas, e em conjunto com métodos estatísticos e/ou computacionais, auxiliaram o isolamento e identificação de compostos bioativos, assim esse ramo da química cresceu e se diversificou de modo notável no século XXI (BERLINCK et al., 2017).

Essas substâncias são uma alternativa para a descoberta de novos fármacos que possam ser utilizados no tratamento de doenças causadas por fungos. Essas doenças, podem ser tanto superficiais como invasivas, representam uma ameaça crescente para a saúde humana em todo o mundo, principalmente às pessoas com imunidade comprometida como portadores do vírus HIV e pessoas transplantadas, que em alguns casos podem levar a morte. Entretanto, apenas alguns medicamentos antifúngicos estão atualmente disponíveis para o tratamento de infecções fúngicas que apresentam risco à vida, entre eles estão os análogos da fluo-pirimidina, polienos, azóis e equinocandinas. Os agentes antifúngicos mais utilizados não são completamente eficazes devido ao desenvolvimento de resistência microbiana, toxicidade e efeitos colaterais indesejáveis nos pacientes, limitando assim seu uso na prática médica (CAMPOY; ADRIO, 2016; EL-HOSSARY et al., 2016). Desta forma, torna-se necessário os estudos para a descoberta de novos fármacos com atividade antifúngica.

Nesse contexto, este trabalho avaliou a atividade antifúngica dos extratos e partições das folhas de *Cassia bakeriana* e determinou a composição química da partição acetato de etila (P-AE), uma vez que esta partição foi uma das que apresentaram melhor atividade antifúngica. O gênero *Cassia* mostrou grande potencial, uma vez que em todo mundo, estudos têm comprovado atividades farmacológicas e propriedades medicinais de várias espécies, como atividade hepatoprotetora apresentada pela *Cassia fistula* Linn (PAWAR; PATIL; KILLEDAR, 2017), atividade anti-inflamatória apresentada pela *Cassia alata* Linn (DA et al., 2018), atividade hipolipemiante apresentada pela *Cassia occidentalis* Linn (ALI et al., 2019), atividade antibacteriana e antifúngica apresentada pela *Cassia auriculata* (PAVUNRAJ et al., 2019), atividade antioxidante e antidiabética apresentada pela *Cassia nemophila* (REHMAN et al., 2018) dentre outras. Assim este trabalho colaborou de modo geral para o estudo de espécies presentes e adaptadas ao Cerrado, através do conhecimento da composição química e avaliação do potencial antifúngico das folhas de *C. bakeriana*.

2. OBJETIVOS

– Objetivo geral:

Determinar a atividade antifúngica dos extratos e partições e avaliar a composição química da fração acetato de etila das folhas de *Cassia bakeriana* Craib.

– Objetivos específicos:

- Fracionar o extrato etanólico (EE) obtido das folhas de *C. bakeriana* utilizando solventes com polaridades crescentes através do método da extração líquido-líquido;
- Realizar a prospecção fitoquímica dos extratos e partições;
- Avaliar a atividade antifúngica dos extratos e partições;
- Determinar a composição química da P-AE por CLAE-EM-IES.

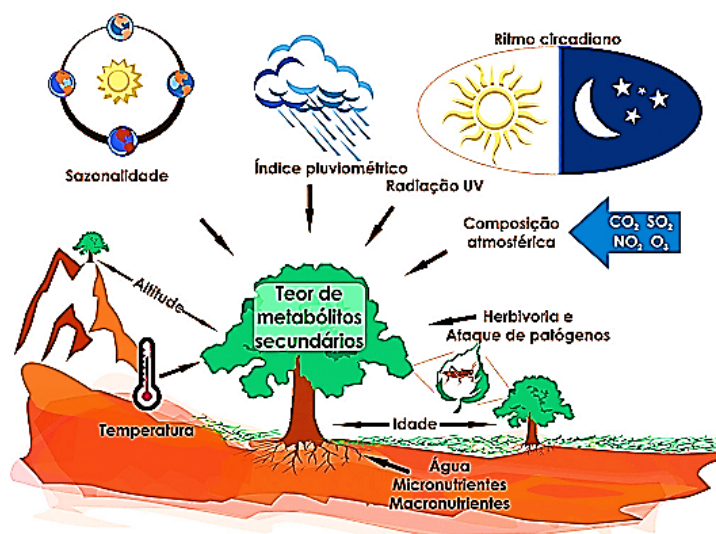
3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Metabolismo secundário

As plantas produzem metabólitos primários e secundários. Metabólitos primários estão diretamente relacionados com o crescimento e o metabolismo das plantas, enquanto os metabólitos secundários são compostos que as plantas têm capacidade de sintetizar e armazenar para se protegerem contra herbívoros, patógenos (vírus, bactérias, fungos) e competição de outras plantas via alelopatia. Em contraste com os metabólitos primários, que são essenciais para a vida de cada planta, os metabólitos secundários não são essenciais, mas colaboram absolutamente para sua adaptação e sobrevivência. São mais de 100.000 estruturas de metabólitos secundários descritas até o momento e o número real na natureza é sem dúvidas muito maior, pois apenas 20-30% das plantas foram investigadas (WINK, 2010; CLEMENSEN et al., 2017).

Os metabólitos secundários são encontrados em várias combinações em diferentes partes da planta (folhas, raízes, brotos, casca, flores) e em diferentes estágios de crescimento (muda, semente, plântula e árvore adulta). Eles são produzidos segundo as demandas provocadas por fatores ambientais demonstrados na Figura 1 (DELGODA; MURRAY, 2017).

Figura 1 – Principais fatores que podem influenciar o acúmulo de metabólitos secundários em plantas



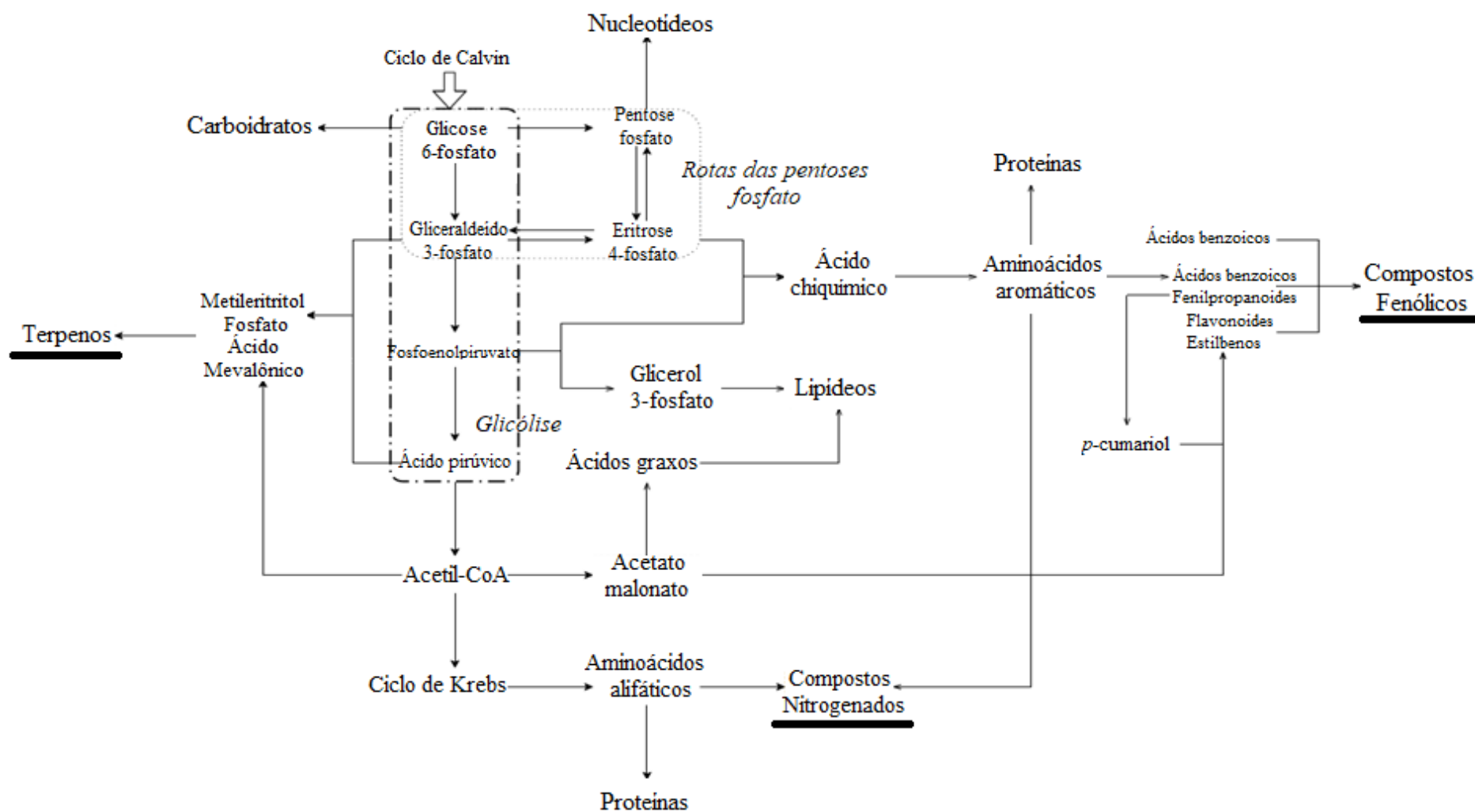
Fonte: Gobbo-Neto e Lopes, (2007).

Os metabólitos secundários podem ser divididos em três grupos quimicamente distintos: terpenos, compostos fenólicos e compostos nitrogenados. São quatro vias de biossíntese em que essas substâncias podem ser sintetizadas. A Figura 2 mostra de forma simplificada as rotas envolvidas na biossíntese dos metabólitos secundários e suas inter-relações com o metabolismo primário (TAIZ; ZEIGER, 2009; DEWICK, 2012).

As vias que levam a formação dos metabólitos secundários estão inter-relacionadas pois, apresentam como precursores compostos provenientes do metabolismo primário. O esquema da Figura 2 mostra como os metabólitos do processo de glicólise, ciclo das pentoses e ciclo de Krebs são retirados do processo de geração de energia para fornecer intermediários biossintéticos (KABERA et al., 2014).

Os terpenos são biossintetizados a partir da via do ácido mevalônico e da via do metileritritol fosfato. Já os compostos nitrogenados são sintetizados majoritariamente a partir de aminoácidos aromáticos ou a partir de aminoácidos alifáticos. Os compostos fenólicos possuem pelo menos um grupo hidroxílico ligado a um hidrocarboneto aromático e sua síntese se dá pela ação de duas vias metabólicas, a via do ácido chiquímico e a via do ácido malônico (DEWICK, 2009; WALTERS, 2011; WATSON, 2014).

Figura 2 - Relações biossintéticas que levam aos metabólitos secundários



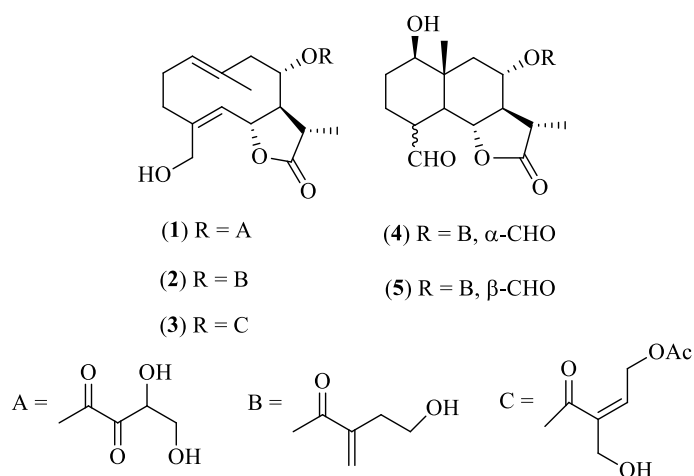
Fonte: Adaptado de Moreira, (2015).

3.2 Atividade antifúngica

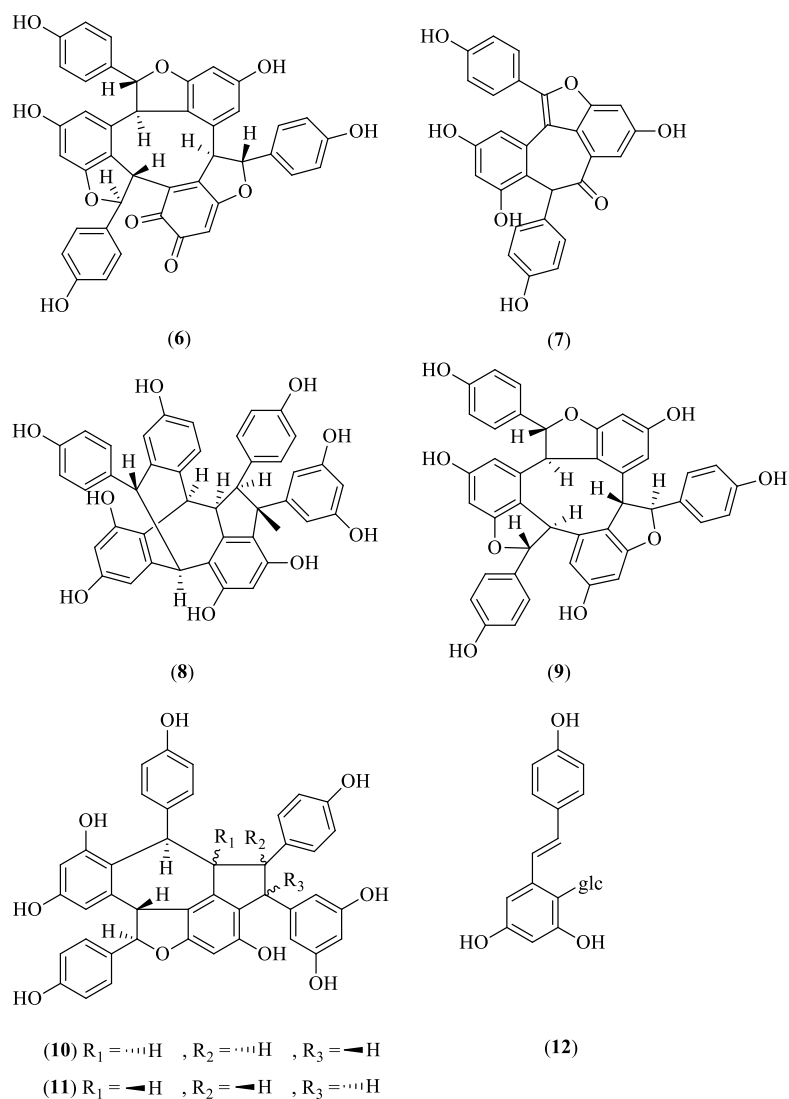
Os patógenos fúngicos são um grupo altamente diversificado de agentes infecciosos, incluindo leveduras e fungos. Estimativas indicam que mais de 300 milhões de pessoas são afetadas por doenças fúngicas graves em todo o mundo, resultando em 1,6 milhão de mortes anualmente (COWEN et al., 2014; DENNING; BROMLEY, 2015). Esses patógenos não só causam impacto direto na saúde humana global, como também comprometem a segurança alimentar, causando devastação de culturas e produzindo toxinas que contaminam o fornecimento de alimento levando ao desenvolvimento de cânceres. Nos últimos anos, foram registrados um número sem precedentes de doenças fúngicas, causando extinções em espécies selvagens, como a mortalidade em massa de morcegos e anfíbios, ameaçando a biodiversidade (REVIE et al., 2018).

Como os fungos são organismos eucariontes, estão mais relacionados aos humanos do que outros patógenos, o que representa um desafio único para a descoberta de novos medicamentos. Em geral, os agentes antifúngicos são classificados como drogas fungistáticas que inibem o crescimento ou levam à morte das células fúngicas, assegurando ao mesmo tempo danos limitados à função celular humana durante o tratamento (MAUBON et al., 2014; GEDDES-MCALISTER; SHAPIRO, 2018). Além disso, um aumento e uma mudança no espectro de fungos patogênicos tem sido observado. Por exemplo, infecções causadas por leveduras que não sejam *Candida* e fungos que não sejam *Aspergillus* estão se tornando cada vez mais frequentes e tipicamente difíceis de tratar. Como resultado, o arsenal antifúngico é excessivamente limitado, com polienos, azóis e equinocandinas representando as principais classes de antifúngicos usados nas clínicas. Além disso, a toxicidade (particularmente no caso dos polienos) e o surgimento de resistência antifúngica (para os azólicos e equinocandinas) representam desafios adicionais no manejo clínico das infecções fúngicas. Todos esses fatos ressaltam uma necessidade de novos medicamentos antifúngicos (WIEDERHOLD et al., 2016).

Os produtos naturais têm se mostrado uma fonte de compostos bioativos com potencial antifúngico, um exemplo são os compostos encontrados e isolados da parte aérea da *Centaurea pullata*, que apresentaram atividade antifúngica, entre eles: 11 β ,13-di-hidrocnicina (**1**), 11 β ,13-di-hidro-19-desoxicnicina (**2**), 8 α -O-(4-acetoxi-5-hidroxiangeloil)-11 β ,13-di-hidrocnicina (**3**), 8 α -O-(4-hidroxi-2-metilenobutanoiloxi)-11 β ,13-di-hidrosonchucarpolideo (**4**), 8 α -O-(4-hidroxi-2-metilenobutanoiloxi)-11 β ,13-di-hidro-4-*epi*-sonchucarpolideo (**5**) (Figura 3) (DJEDDI et al., 2007).

Figura 3 – Estrutura dos compostos isolados da *Centaurea pullata*

Fonte: adaptado de Djeddi e outros, (2007).

Figura 4 – Estrutura dos compostos isolados da *Hopea exalata*

Fonte: adaptado de Ge e outros, (2006).

O Hopeanolin (6), um resveratrol trímico com um núcleo *orto*-quinona isolada da casca do caule de *Hopea exalata*, mostrou uma potente atividade contra seis tipos de fungos patogênicos com valores de CIM na faixa de 0,10 – 22,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Esta planta possui seis estilbenos, shoremphinol (7), vaticanol (8), α -viniferina (9), pauciflorol A (10), vaticanol A (11), e trans-3,5,4'-tri-hidroxiestilbeno 2-C-glucosídeo (12) que também apresentaram atividade antifúngica (Figura 4) (GE et al., 2006).

3.3 Aspectos da família Leguminosae e do gênero *Cassia*

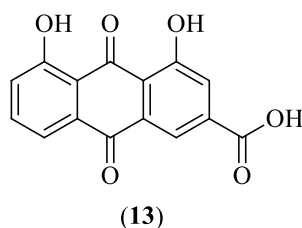
A família Leguminosae constitui a terceira maior família de angiospermas, com cerca de 751 gêneros e cerca de 20.000 espécies de árvores, arbustos, videiras e ervas que estão presentes em todo o mundo. São distribuídas em três subfamílias: Faboideae, Mimosoideae e Caesalpinioideae. No Brasil, essa família tem ocorrência em todos os estados e é representada aproximadamente por 215 gêneros e 2.756 espécies, das quais 54,7% são endêmicas. Algumas espécies representam um grupo de culturas com importância agrícola e nutricional, incluindo ervilhas, soja, alfafa, lentilhas, amendoim e muitos outros grãos, fornecendo ricas fontes de proteína vegetal para humanos e animais. Também são economicamente valiosas, pois obtêm-se numerosos produtos de uso industrial, como: taninos, corantes, tinturas, vernizes, colas e bálsamos. Além disso, apresentam valores ecológicos pois ajudam na incorporação de nitrogênio e matéria orgânica ao solo e podem ser empregadas na recuperação de áreas degradadas. Várias espécies desta família apresentam propriedades medicinais, como efeitos anti-inflamatório, antisséptico, adstringente, expectorante, sedativo, estimulante, tônico para o sistema nervoso, febrífugo, antioxidante, tratamentos de dores gástricas, úlcera, doenças do sistema urinário, dentre vários outros efeitos relatados na literatura (KAEHLER et al., 2014; MARTINS et al., 2015; ARYA et al., 2017; ANTONIO-DOMINGUES et al., 2018; COSTA et al., 2018; LIONHEART et al., 2018; GHOURI et al., 2018).

O gênero *Cassia* pertence à família Leguminosae e subfamília Caesalpinioideae. Compreende cerca de 600 espécies de ervas, arbustos e árvores, que são amplamente distribuídas em todo o mundo. É caracterizado por possuir inflorescências dispostas em racemos axilares com grande número de flores; suas pétalas podem ter coloração amarela, rosa ou vermelha. Certas espécies de plantas pertencentes ao gênero têm sido usadas na medicina tradicional para o tratamento de diversas doenças como diarreia, gastrite e infecções fúngicas de pele. Estudos fitoquímicos mostraram que o gênero possui compostos como: flavonoides, alcaloides, glicosídeos, taninos, antraquinonas, esteroides, cromonas e terpenos. Estes

compostos químicos estão associados a várias atividades farmacológicas apresentada por diferentes espécies. Em todo o mundo, a pesquisa científica está ganhando força para avaliar as atividades farmacológicas e propriedades medicinais das espécies de *Cassia* (SINGH et al., 2013; KOLAR et al., 2018; SANTOS, 2018; CHAERUNISAA; MILANDA; SUSILAWATI, 2018; KONG et al., 2018).

O extrato de algumas espécies de *Cassia* mostrou atividade antifúngica significativa contra vários fungos. Por exemplo, *Cassia fistula* L. é uma árvore ornamental com belos cachos de flores amarelas conhecida como chuva-de-ouro, está presente em vários países e a planta inteira é usada na medicina tradicional para o tratamento de doenças de pele, febre, dor abdominal, diarreia, repelente de insetos e antiofídica. O extrato em acetato de etila das flores da *Cassia fistula* mostrou inibição do crescimento dos fungos: *Trichophyton mentagrophytes*, *T. simii*, *T. rubrum* e *Epidermophyton floccosum*, através do fracionamento do extrato ativo foi isolado a antraquinona reína (13) (Ácido 1,8-di-hidroxiantraquinona-3-carboxílico) (Figura 5) (DURAIPANDIYAN; IGNACIMUTHU, 2012). Esse composto também foi isolado através do fracionamento bioguiado da partição diclorometano das cascas de *C. bakeriana* no estudo de Cunha e outros (2017). Foi reportado em outro estudo que a reína apresentou atividade contra vários fungos, incluindo *Candida albicans* (YANG et al., 2015).

Figura 5 – Estrutura do composto reína isolado das cascas de *C. bakeriana* e das flores da *C. fistula*

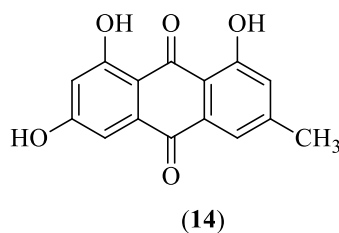


Fonte: o autor.

Outra espécie de *Cassia* com potencial antimicrobiano é a *Cassia nigricans* Vahl, uma planta lenhosa entre 1,2 m e 1,5 m de altura com pequenas flores amarelas. As folhas e o pó da raiz são usados para tratar doenças de pele tais como micose, sarna e eczema, infusões de partes da planta são usadas para tratamento de dor de garganta e também utilizadas como purgante e vermífugo. O fracionamento do extrato em acetato de etila levou ao isolamento da antraquinona emodina (14) (1,6,8-tri-hidroxi-3-metilantraquinona) (Figura 6). O valor da CIM apresentada pela emodina foi de $2 \times 10^3 \mu\text{g mL}^{-1}$ contra *Staphylococcus aureus* e *Corynebacterium*

pyogenes, enquanto para *Streptococcus pyogenes*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhi* e *Escherichia coli*, a avaliação foi de $3 \times 10^3 \mu\text{g mL}^{-1}$. Para *Pseudomonas aeruginosa*, *C. albicans* e *Neisseria gonorrhoea*, o valor de CIM foi $4 \times 10^3 \mu\text{g mL}^{-1}$, enquanto que o de *Klebsiella pneumonia* foi de $5 \times 10^3 \mu\text{g mL}^{-1}$. (AYO; AMUPITAN; ZHAO, 2007).

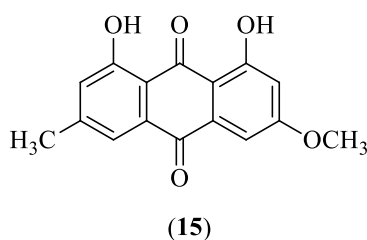
Figura 6 - Estrutura do composto emodina isolado das folhas da *Cassia nigricans*



Fonte: o autor.

Cassia tora é uma espécie de arbusto com cerca de 0,30-0,90 m de altura. As principais partes úteis da planta são as folhas, raízes e sementes. As folhas e sementes têm propriedades laxantes, vermífugas, oftálmicas, cardiotônicas e expectorantes, sendo úteis para o tratamento da lepra, micose, flatulência, cólicas, dispepsia, constipação, tosse, bronquite e distúrbios cardíacos. O extrato em clorofórmio de *C. tora* apresentou forte atividade antifúngica contra vários micro-organismos. As antraquinonas reína (13), emodina (14) e parietina (15) (1,8-dihidroxi-3-metoxi-6-metilantraquinona) (Figura 7) isoladas de sementes de *C. tora* apresentaram propriedades antifúngicas contra vários fungos fitopatogênicos (JAIN; PATIL, 2010). Em outro trabalho foi relatado que o composto parietina (15) possui atividade antifúngica contra *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Trichophyton mentagrophytes* e *Aspergillus fumigatus* (BARROS et al., 2011).

Figura 7 - Estrutura do composto parietina isolado da *Cassia tora*



Fonte: o autor.

Devido ao grande potencial biológico que diferentes espécies de *Cassia* apresentaram, torna-se importante o estudo da espécie *Cassia bakeriana* para conhecimento de sua composição química, bem como avaliação do seu potencial biológico.

3.4 A espécie *Cassia bakeriana* Craib

A espécie estudada nesse trabalho foi a *Cassia bakeriana* Craib (Figura 8), pertencente à família Leguminosae e subfamília Caesalpioideae. Popularmente conhecida como cássia-rósea, essa árvore de médio a grande porte (12-15 m de altura) é nativa da Tailândia, e seu clima original é o tropical úmido, porém suporta condições com invernos moderados como as da região sul e sudeste do Brasil, sendo adaptado ao Cerrado. É uma árvore com rápido crescimento e bem copada que possui folhas com forma pinadas com 12-15 pares de folíolos oblongos que caem no período seco ou invernal (Figura 9). A floração ocorre de novembro a janeiro, com grandes flores róseas com cinco pétalas ovaladas (Figura 9). O fruto é uma vagem marrom de 20-30 cm de comprimento, lenhoso, cilíndrico, indeiscente, contendo muitas sementes castanhas ovaladas (Figura 9). A árvore é utilizada na arborização urbana, uso paisagístico de parques e grandes jardins (LORENZI et al., 2003).

Figura 8 – *Cassia bakeriana* Craib



Fonte: o autor.

Figura 9 – Folhas, flores e frutos de *Cassia bakeriana* Craib



Fonte: Lorenzi e outros, (2003)

Na literatura, há um estudo químico e biológico de *C. bakeriana* em que foi determinada a composição química e avaliada a atividade antimicrobiana e a citotoxicidade do óleo essencial da madeira, cascas e folhas de *C. bakeriana*. Utilizando o teste CIM, os óleos essenciais das folhas e cascas mostraram elevada atividade antimicrobiana contra micro-organismos aeróbios e anaeróbios. O óleo essencial da madeira é rico em ácidos graxos e as cascas e folhas apresentaram álcoois, aldeídos e ácidos graxos, como principais componentes. O efeito citotóxico foi maior para óleo da madeira e menor para o das folhas (CUNHA et al., 2013).

Em outro estudo, a atividade antimicrobiana do extrato e partições das cascas e folhas de *C. bakeriana* foi avaliada contra bactérias da cavidade oral. A partição diclorometano das cascas apresentou elevada atividade antibacteriana, onde o composto isolado foi a reína (**13**) (Figura 5, pág. 19). A reína apresentou elevada atividade contra micro-organismos anaeróbios. O extrato das folhas também apresentou atividade contra alguns micro-organismos, porém sua composição química não foi estudada (CUNHA et al., 2017).

Esses estudos mostram que a *C. bakeriana* apresenta potencial biológico tornando-se importante os estudos químicos das folhas de *C. bakeriana* na busca de compostos bioativos.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Instrumentação

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

4.2 Reagentes e soluções

- Solventes usados para a extração e na cromatografia: hexano, etanol, acetato de etila, diclorometano, *n*-butanol e metanol de diversas marcas: Synth, Vetec, Merck, Neon;
- Anidrido acético e os ácidos: acético, sulfúrico e fórmico também foram de marcas diversas: Synth, Merck, Vetec;
- Ácido hexacloroplatínico (Vetec);
- Reagentes químicos: nitrato de bismuto (Isofar), iodeto de potássio (Chemicals), difenilboriloxietilamina NP (Sigma-Aldrich), polietilenoglicol 400 (Vetec), cloreto de alumínio (Vetec) e sulfato cérico pentahidratado (Vetec);
- Metanol HPLC foram da Sigma- Aldrich e J. T. Baker.

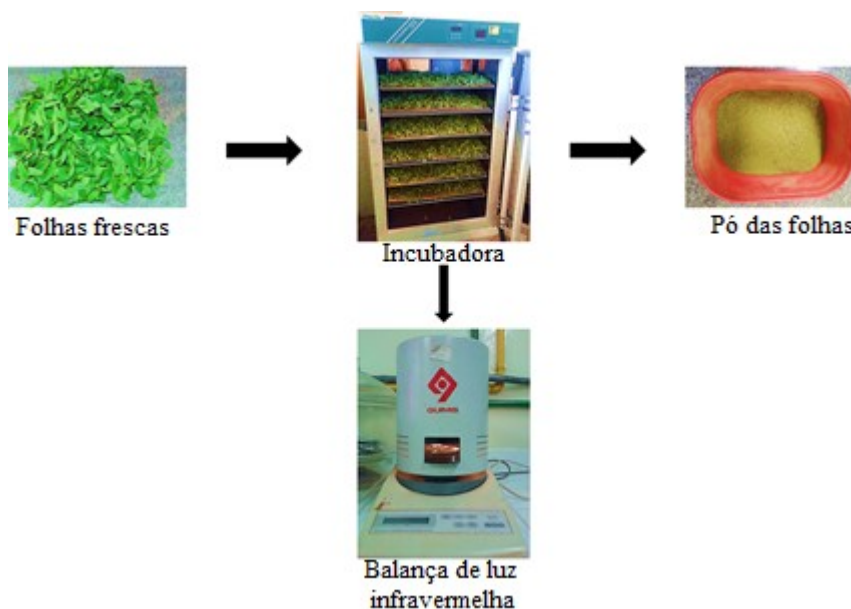
4.3 Coleta e preparo do material vegetal

As folhas de *Cassia bakeriana* foram coletadas na Universidade Federal de Uberlândia (UFU) (18°55'06.6"S 48°15'29.4"W). A espécie foi identificada em 2009 no Instituto de Biologia da Universidade Federal de Uberlândia pelos professores Dr. Glein Monteiro de

Araújo e Dr. Ivan Schiavini. A exsicata do espécime foi depositada no Herbário da UFU com número 63584 a qual foi consultada para coleta das folhas.

Elas foram secas em uma incubadora a 35 °C e retiradas quando apresentaram 7,3% de umidade. O teor de umidade foi determinado pelo método gravimétrico através de uma balança de luz infravermelha, onde cerca de 1,0 g de folhas foram monitorados a uma temperatura de 105 °C por 15 min. Em seguida as folhas secas foram trituradas utilizando um multiprocessador até se obter um pó. A Figura 10 mostra o esquema do preparo do material vegetal.

Figura 10 - Esquema do preparo do material vegetal

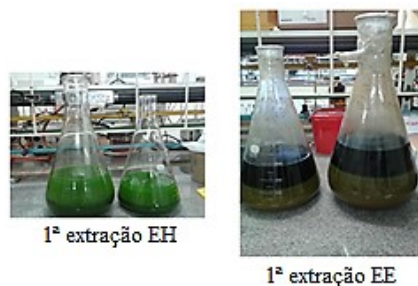


Fonte: o autor.

4.4 Preparo dos extratos e extração líquido-líquido

O extrato das folhas foi obtido através do processo de maceração, onde 1,0 Kg das folhas trituradas foram submetidas a extração com hexano (6x 2,3 L) durante 48 horas à temperatura ambiente, o extrato hexânico (EH) foi filtrado e o solvente removido em um evaporador rotatório (à pressão reduzida e banho a 40 °C). Repetindo o mesmo procedimento foi obtido o extrato etanólico (EE) sendo adicionado etanol 98% (6x 2,3 L) ao material remanescente da extração em hexano. Os extratos foram secos, congelados e liofilizados para remoção de água. A Figura 11 mostra a primeira extração do EH e do EE.

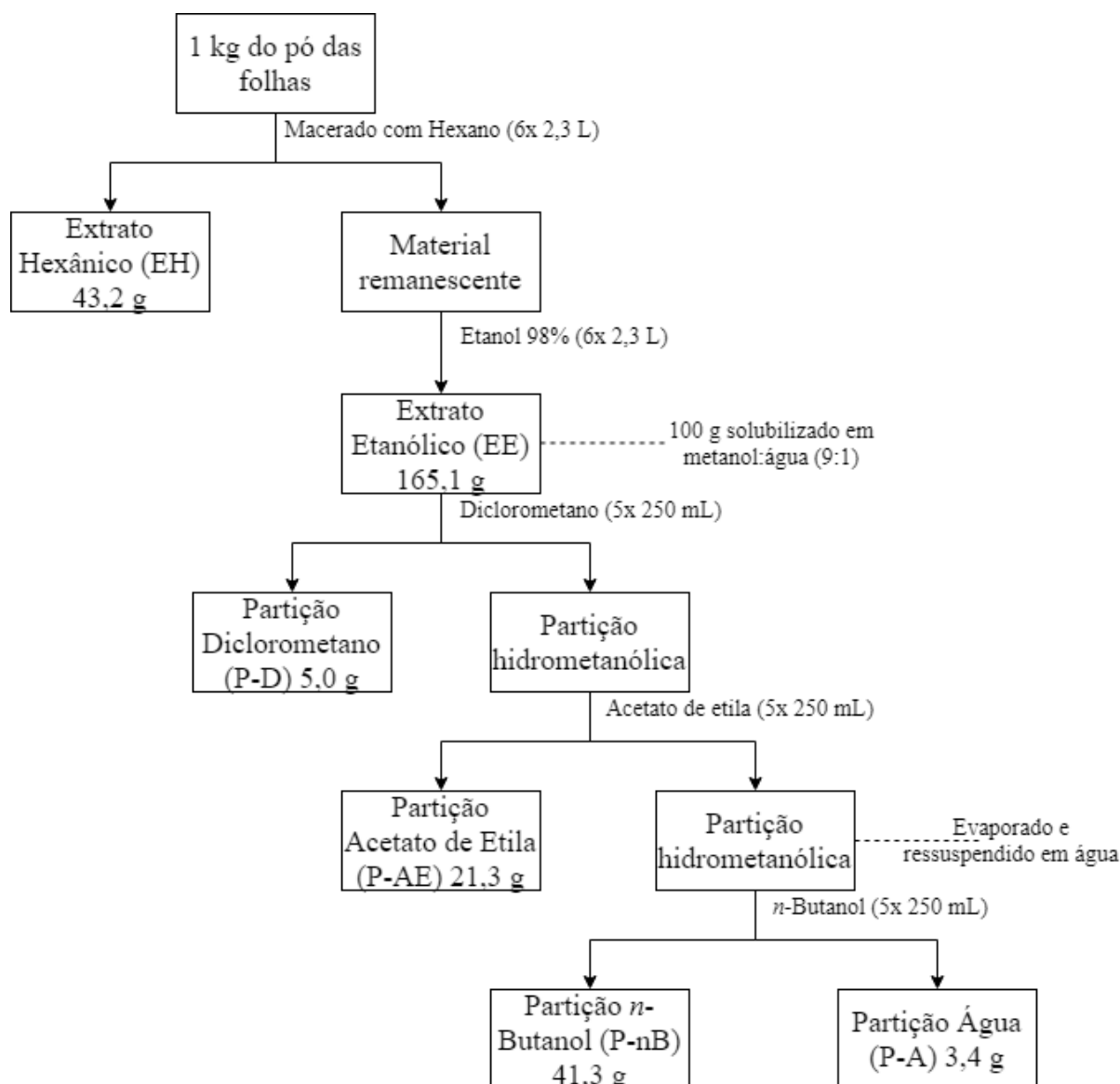
Figura 11 - Primeira extração do EH e EE



Fonte: o autor.

Em seguida foi realizada a extração líquido-líquido com solventes com polaridades crescentes, onde 100,0 g do EE foi solubilizado em 600 mL de metanol:água (9:1). Utilizando um funil de separação, foi adicionado diclorometano (5x 250 mL), sendo obtido a partição diclorometano (P-D). O processo foi repetido utilizando acetato de etila, sendo obtida a partição (P-AE). A partição hidrometanólica remanescente foi evaporada em um evaporador rotatório e ressuspensa em água. Seguindo o processo, foram obtidas as partições *n*-butanol (P-nB) e pôr fim a partição aquosa (P-A). Todas essas partições foram concentradas utilizando o evaporador rotatório à pressão reduzida e banho a 40 °C e em seguida liofilizadas para remoção de água. Para garantir um maior grau de pureza os solventes hexano, etanol e acetato de etila foram destilados. A Figura 12 mostra um fluxograma do procedimento de preparação dos extratos e das partições.

Figura 12 - Procedimento de preparação dos extratos e partições



Fonte: o autor.

4.5 Prospecção fitoquímica

Para identificar as classes de compostos presentes nos extratos e partições das folhas de *Cassia bakeriana*, foi realizada a prospecção fitoquímica utilizando cromatografia em camada delgada (CCD). Os extratos e partições foram solubilizados em metanol com concentração 1 mg mL^{-1} e aplicadas em placas de CCD comerciais de Sílica gel 60 (Macherey-Nagel) com indicador de fluorescência (UV 254 e 365 nm) e 0,20 mm de espessura. Foram utilizados 3 sistemas de fases móvel. A fase móvel 1- hexano:acetato de etila (5:1) foi utilizada para o EH, a fase móvel 2- éter etílico:acetato de etila:ácido fórmico (75:25:1) foi utilizada para o EE, P-

D, P-AE e P-nB, e a fase móvel 3-acetato de etila:metanol (10:3) para a P-A. Todas as placas foram reveladas com reveladores que foram preparados seguindo a metodologia proposta por Wagner e Bladt, (1996):

a) Detecção de alcaloides:

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

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

b) Detecção de flavonoides:

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

- Cloreto de alumínio: foi preparada uma solução contendo 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:

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

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

- Sulfato Cérico: 2,1 g de $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ dissolvido em 15 mL de H_2SO_4 concentrado e adicionado a 800 mL de água (CHAVES, 1997). A mistura foi aplicada na placa e os compostos revelados apresentaram coloração marrom.

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

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

4.6 Atividade antifúngica

A atividade antifúngica foi determinada utilizando o método da microdiluição em caldo para determinação da CIM. A CIM corresponde a menor concentração dos extratos/partições capaz de inibir o crescimento de micro-organismos. As análises foram realizadas no Laboratório de Pesquisa em Microbiologia Aplicada da Universidade de Franca (LaPeMA-UNIFRAN), com a colaboração do professor Dr. Carlos Henrique Gomes Martins.

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

Também foi realizado o controle de esterilidade do meio de cultura (caldo RPMI), do inóculo (o qual apresentou crescimento devido à ausência de agentes antimicrobianos), esterilidade dos antifúngicos, dos extratos e do solvente (DMSO). O controle do solvente foi realizado nas concentrações de 1% a 5% em v v^{-1} para que não houvessem dúvidas a respeito da inibição do crescimento do micro-organismo.

Para a determinação da CIM foram preparadas soluções dos extratos e das partições em DMSO na concentração $192.000 \mu\text{g mL}^{-1}$. Essas soluções foram diluídas até $12.000 \mu\text{g mL}^{-1}$ utilizando-se o caldo RPMI com solução tampão de ácido 3-*N*-morfolinopropanossulfônico (MOPS) a pH 7,2. Utilizando placas de microdiluição com 96 poços, foram feitas as diluições seriadas com concentrações de 3.000 a $1,46 \mu\text{g mL}^{-1}$ dos extratos e das partições para a determinação da CIM. O meio de cultura realizado foi o caldo RPMI tamponado com MOPS e pH final de 7,2. Cada poço recebeu $100,0 \mu\text{L}$ da suspensão do inóculo sendo o volume final do poço de $200 \mu\text{L}$. Para o controle positivo, foi utilizado o antifúngico anfotericina B, onde foi realizado o mesmo processo com concentrações de $16,0$ a $0,031 \mu\text{g mL}^{-1}$. Esse controle foi testado frente às cepas de referência *Candida krusei* (ATCC6258) e *Candida parapsilosis* (ATCC22019) com concentrações de $0,25$ a $2,0 \mu\text{g mL}^{-1}$, garantindo assim a validação dos ensaios. Depois da montagem das microplacas, estas foram incubadas por 48 h a 37°C , e assim foi determinada a CIM através do revelador resazurina ($0,02\% \text{ m v}^{-1}$). A leitura foi realizada a partir da mudança de coloração da resazurina que muda de coloração azul para coloração vermelha se houver presença do crescimento fúngico.

4.7 Identificação dos compostos por CLAE-EM-IES

As análises de cromatografia líquida de alta eficiência acoplado ao espectrômetro de massas (CLAE-EM) foram realizadas no Laboratório de Nanobiotecnologia do Instituto de Biotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia (IBTEC-UFU) em um CLAE (marca Agilent modelo Infinity 1260) acoplado ao espectrômetro de massas de alta resolução do tipo Q-TOF da marca Agilent® modelo 6520 B com fonte de ionização por eletrospray (IES). Os parâmetros cromatográficos foram: coluna Agilent modelo Poroshell, 2,1 mm de diâmetro interno, 10 cm de comprimento, partículas de $2,7 \mu\text{m}$, a fase móvel: água acidificada com ácido fórmico ($0,1\% \text{ v v}^{-1}$) (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 8 L/min a uma temperatura de 220°C e no capilar foi aplicado uma energia de 4,5 KV.

Para as análises de espectrometria de massas sequencial (EM/EM) as energias de colisões foram ajustadas de acordo com cada íon molecular. Através da m/z (razão massa carga) obtida nos espectros em alta resolução foi possível identificar os compostos. Utilizando o Software MassHunter® foi obtido a fórmula molecular proposta de cada composto, seguindo a menor diferença entre a massa experimental e a massa teórica, erro em ppm, (Equação 1)

equivalência de ligações dupla e regra do nitrogênio. As possíveis estruturas, fragmentos e classe de metabólitos foram propostos de acordo com outros trabalhos na literatura, biblioteca Metlin e bancos de dados (Chempider, Pubchem e Massbank), analisando sistema de solventes, tempos de retenção e espectro de massas.

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

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Rendimento dos extratos e extração líquido-líquido

A extração é um processo fundamental para a separação e recuperação de compostos bioativos das plantas, que pode ser realizada utilizando métodos de decocção, maceração, infusão, digestão e percolação para converter a matriz vegetal em uma amostra adequada para o procedimento analítico subsequente (BELWAL et al., 2018).

Os extratos foram preparados utilizando-se a extração por maceração, que é uma técnica realizada em temperatura e pressão atmosférica ambientes, que certifica a remoção dos compostos sem que sua estrutura seja comprometida. O EH foi obtido inicialmente a fim de remover compostos de natureza apolar como as clorofilas e em seguida foi obtido o EE, permitindo assim a extração de substâncias com diferentes polaridades devido a sua baixa constante dielétrica (MEDEIRO; KANIS, 2010). A Tabela 1 mostra o rendimento do EH e do EE.

Tabela 1 - Rendimento obtido do EH e do EE das folhas de *Cassia bakeriana*

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

Fonte: o autor.

Foi observado que o rendimento do EE foi muito maior que o do EH, isso pode ser explicado devido a maior polaridade do etanol. No trabalho de Cunha et al. (2017), o EE das

folhas (1Kg) também foi obtido por maceração (3x a cada 7 dias) e apresentou um rendimento de 8,2%.

A extração líquido-líquido é uma das técnicas mais clássicas frequentemente utilizadas para a separação dos constituintes do extrato vegetal utilizando solventes orgânicos (TANG et al., 2018). A Tabela 2 apresenta os resultados da extração líquido-líquido a partir do EE (100g).

Tabela 2 - Rendimento das partições obtidas através da extração líquido-líquido do EE das folhas de *Cassia bakeriana*

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

Fonte: o autor.

Foi observado que os maiores rendimentos foram para as partições P-nB e P-AE indicando a presença de compostos mais polares. A P-D apresentou o menor rendimento, provavelmente, devido a maioria dos compostos apolares terem sido removidos pelo EH.

5.2 Prospecção fitoquímica

A prospecção fitoquímica foi realizada para identificar as classes de metabólitos presentes nos extratos e nas partições. Na Tabela 3 são apresentados os resultados da prospecção e todos os extratos e partições apresentaram intensidade para os indicadores universais, indicando a presença de diversos compostos. Não foi observado a presença de alcaloides em nenhum extrato e partição. Flavonoides não foram identificados no EH e a presença de antraquinona foi identificada apenas na P-D.

Tabela 3 - Prospecção fitoquímica dos extratos e partições das folhas de *Cassia bakeriana*

Amostras	Flavonoides		Alcaloides		Antraqui- nonas, Antronas, cumarinas	Terpenos, esteroides, saponinas, açúcares, fenóis, taninos, flavonoides		
	NP/ PEG	AlCl ₃	Iodocloro- platinado	Drogen- dorff	KOH	Lieberman Buchard	Sulfato Cérico	Vanilina Sulfúrica
EH	-	-	-	-	-	+++	+++	+++
EE	++	++	-	-	-	+++	+++	+++
P-D	+++	+++	-	-	++	+++	++	+++
P-AE	+++	+++	-	-	-	+++	+++	+++
P-nB	++	++	-	-	-	+++	+++	+++
P-A	++	++	-	-	-	+++	++	+++

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

Fonte: o autor.

5.3 Atividade antifúngica

A determinação da CIM foi realizada através do método colorimétrico utilizando a resazurina como corante. A resazurina apresenta colorações distintas em suas formas oxidada e reduzida. O crescimento de microrganismos faz com que o corante mude de coloração de azul para rosa. Assim a cor rosa indica crescimento positivo, enquanto que a cor azul indica inibição do crescimento. A CIM foi definida como a menor concentração de amostra que impediu essa alteração e exibiu inibição do crescimento de micro-organismos (NEPOMUCENO et al., 2017).

Utilizando o método de microdiluição em caldo, os extratos e as partições foram testados contra espécies de *Candida* spp. Os resultados das CIM apresentados encontram-se na Tabela 4.

Tabela 4 - Valores de CIM dos extratos e partições da *Cassia bakeriana*

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

Fonte: o autor.

Os extratos de vegetais podem ser classificados como significantes quando o valor da CIM é inferior a $100 \mu\text{g mL}^{-1}$; moderados para CIM entre 100 a $625 \mu\text{g mL}^{-1}$ e fracos quando CIM é superior a $625 \mu\text{g mL}^{-1}$ (CATTEAU et al., 2018). Portanto, as partições que apresentaram melhores resultados foram a P-D e a P-AE. Assim, pode-se considerar que a P-D teve significativa atividade contra *C. glabrata* e moderada atividade para as demais espécies. A P-AE apresentou fraca atividade contra *C. tropicalis* e moderada atividade para as demais espécies. Foi observado que a *Candida glabrata* foi a espécie menos resistente.

Estudos anteriores mostraram que espécies de *Cassia* foram avaliadas contra diferentes espécies de *Candida*. Os extratos metanólico e em acetona das folhas de *Cassia auriculata* apresentaram fraca atividade antifúngica contra as mesmas cepas do presente trabalho, a CIM variou de 25000 - $6250 \mu\text{g mL}^{-1}$ (CHANDA; KANERIA; BARAVALIA, 2012). Também foi relatado que o extrato em acetona e metanol das folhas de *Cassia sophera* e *Cassia Tora* possuem fraca atividade inibitória contra *C. albicans*, com CIM variando de 20000 - $40000 \mu\text{g mL}^{-1}$ (RAO; SURESH, 2012).

Em outro trabalho, o extrato etanólico e partições das folhas de *Cassia fistula* foram avaliados para as mesmas cepas do presente trabalho, a CIM variou de 40 - $320 \mu\text{g mL}^{-1}$ apresentando atividade significativa a moderada (OLIVEIRA et al., 2016).

Esses resultados mostraram o potencial antifúngico de vários extratos de *Cassia*, o que motivou a avaliação da *C. bakeriana* para essa atividade. Entretanto, a atividade antifúngica dos extratos da *C. bakeriana* foi considerada fraca mas, o fracionamento do EE foi importante para a concentração das espécies com potencial antifúngico. Dessa forma a P-AE foi escolhida para ser avaliada em relação a composição química no presente trabalho, uma vez que essa

partição foi a segunda com melhor atividade e a P-D (mais ativa) foi avaliada no trabalho de Prado (2018).

Alguns compostos identificados na P-AE já foram avaliados contra espécies de *Candida*. A Tabela 5 mostra o valor da CIM para esses compostos e a espécie de *Candida* para qual foram avaliados. Com a análise desses resultados sugere-se que a atividade apresentada pela partição pode estar relacionada a presença desses compostos.

Tabela 5 - CIM de alguns compostos presentes na P-AE.

Composto	CIM ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Espécie de <i>Candida</i>	Referência
Ácido	500	<i>C. albicans</i>	(PRETTO et al., 2004(apud TEODORO et al., 2015))
Protocatecuico	400	<i>C. tropicalis</i>	
Catequinas	125	<i>C. albicans</i>	(ANAND; RAI, 2017)
	250	<i>C. glabrata</i>	
Quercetina	1,25	<i>C. albicans</i>	(METWALLY et al., 2010)
Quercetin-3-	2,5	<i>C. albicans</i>	(YUN et al., 2015)
O-glicosídeo (isoquecitrina)	2,5	<i>C. parapsilosis</i>	
Canferol	256-512	<i>C. albicans</i>	(SHAO et al., 2016)
	6,25	<i>C. krusei</i>	(TAJUDDEEN et al., 2014)
	31,2	<i>C. glabrata</i>	(SALAZAR-ARANDA et al., 2015)
Canferol-3-O- ramnosídeo	16	<i>C. albicans</i>	(TATSIMO et al., 2012)
	4	<i>C. parapsilosis</i>	

Fonte: o autor.

Extratos naturais ricos em ácidos fenólicos demonstraram possuir uma ação promissora contra espécies de *Candida*. Derivado do ácido hidroxibenzoico, o ácido protocatecuico isolado a partir desses extratos apresentou atividade antifúngica (TEODORO et al., 2015). A atividade

antifúngica dos ácidos fenólicos é determinada pela sua estrutura química, em particular o número e posição de substituição no anel de benzeno e o comprimento da cadeia saturada. O efeito antifúngico aumenta com o aumento do comprimento da cadeia alquílica (SÁNCHEZ-MALDONADO; SCHIEBER; GÄNZLE, 2011).

A (epi)catequina apresentou CIM $>2.048 \mu\text{g mL}^{-1}$ contra *C. albicans*, entretanto, quando avaliada com a teaflavina na proporção de 2:1 (teaflavina:(epi)catequina) revelou um efeito antifúngico maior ($128 \mu\text{g mL}^{-1}$) do que o observado usando soluções contendo somente teaflavina ($1.024 \mu\text{g mL}^{-1}$). O notável e significativo aumento na atividade antifúngica sugere que existe sinergia entre os dois polifenóis (BETTS et al., 2013).

O canferol demonstrou atividade antifúngica relativamente moderada contra *C. albicans*, entretanto foi considerado um candidato promissor para aumentar a eficácia do fluconazol (SHAO et al., 2016). O canferol e a quercetina quando combinados com butirato de sódio reduziram a formação de biofilmes de *C. tropicalis* (RAJASEKHARAM et al., 2015).

A atividade inibitória de proantocianidinas (taninos condensados) em fungos tem sido atribuída a diferentes mecanismos. A atividade antifúngica pode ser estabelecida pela inibição de enzimas microbianas extracelulares devido ao caráter adstringente típico dos taninos, privação de substratos e íons metálicos necessários para o crescimento microbiano, e ação direta no metabolismo microbiano através da inibição da fosforilação oxidativa (BASSIRI-JAHROMI et al., 2015).

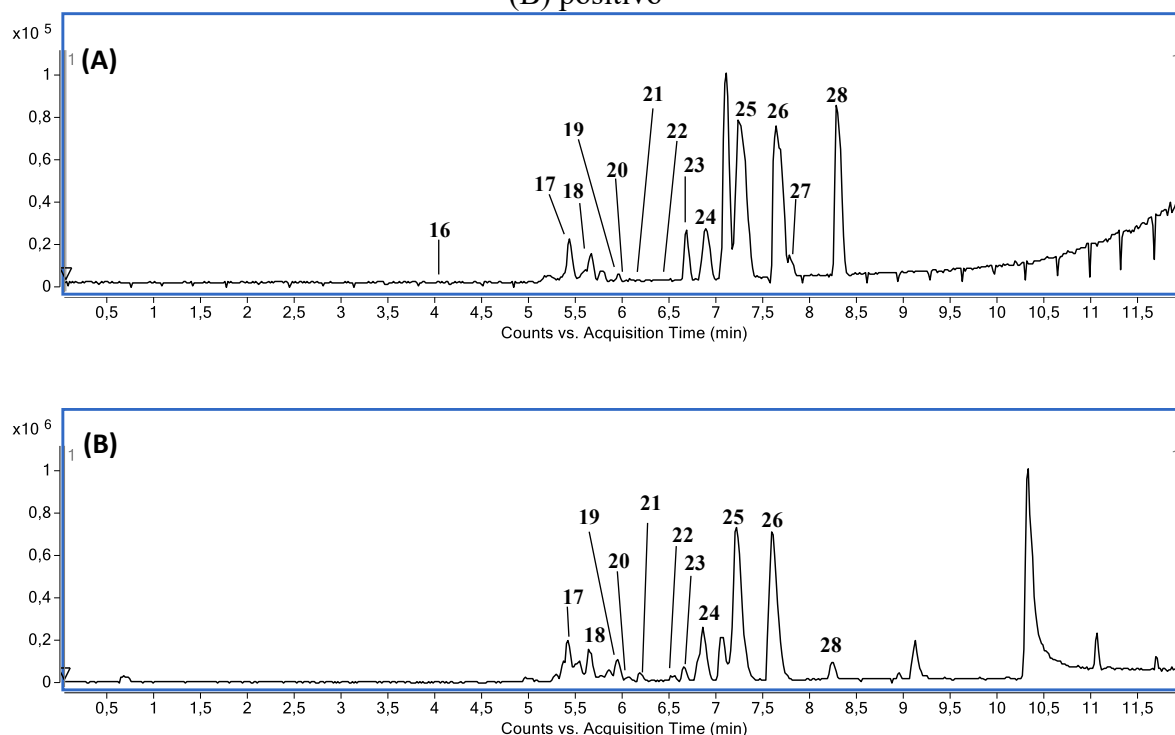
Antocianinas apresentaram atividade contra várias espécies de *Candida* (SUKET; SRISOOK; HRIMPENG, 2014) e utilizadas como agentes antimicrobianos nos alimentos, apresentaram várias vantagens, incluindo um baixo nível de efeitos colaterais tóxicos e propriedades não residuais e de não resistência. Portanto, as antocianinas podem ser usadas como conservantes naturais de alimentos (WEN, 2016).

A melhor atividade antifúngica apresentada pela P-D em relação a P-AE pode estar relacionada aos compostos presentes nesta partição. No trabalho de Prado (2018) foram identificados flavonoides (canferol, (epi)catequina, quercetina, flavonoides glicosilados), ácidos fenólicos (ácido *p*-cumárico, ácido ferúlico), ácidos graxos (ácido tri-hidroxiotadecadienoico, ácido hidroxiotadecanodioico) e uma antraquinona (reína), sugerindo que esses compostos, principalmente os flavonoides e os ácidos fenólicos, sejam os responsáveis por essa boa atividade antifúngica observada.

5.4 Identificação dos compostos da partição acetato de etila

A P-AE foi escolhida para ser analisada por CLAE-EM-IES no modo positivo e negativo para identificação dos compostos, uma vez que ela foi uma das amostras mais ativas contra as espécies de *Candida* e a P-D foi avaliada separadamente em um outro trabalho (PRADO, 2018). A Figura 13 mostra os cromatogramas obtidos da P-AE no modo negativo e positivo e na Tabela 6 encontra-se uma proposta de identificação dos compostos. As estruturas dos compostos identificados encontram-se na Figura 14. Pode-se observar que a P-AE apresentou algumas proantocianidinas, quercetina, canferol e uma antocianina, estando de acordo com a prospecção fitoquímica.

Figura 13 - Cromatogramas da P-AE obtidos por CLAE-EM-IES nos modos (A) negativo e (B) positivo



Fonte: o autor.

Tabela 6 - Proposta de identificação dos compostos da P-AE das folhas de *C. bakeriana*. (continua)

tr	[M – H] [–]	[M + H] ⁺	Massa exata	Erro (ppm) - / +	Fragmentos EM/EM - / +	Fórmula molecular	Tentativa de identificação	Referências
4,66	153,0194	–	153,0193	0,6	10eV: 136, 109 , 108	C ₇ H ₆ O ₄	ácido protocatecuico (16)	(SUN et al., 2007)
5,43	561,1401	563,1562	561,1402 563,1548	-0,2/ 0,5	20eV: 543, 435, 425, 407, 329, 289 , 271, 245, 165, 125/ 20eV: 528, 427, 411, 393, 291, 273 , 243, 231, 167, 147, 123	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₁	(epi)afzelequina- (epi)catequina ^a (17)	(GU et al., 2003, SOUZA et al., 2008, KAJDŽANOSKA; GJAMOVSKI; STEFOVA, 2010, GE et al., 2016)
5,56	289,0717	291,0863	289,0718 291,0863	0,3/ 0,0	20eV: 245, 221, 205, 203, 188, 187, 179, 165, 164, 151, 149, 137, 125, 109 / 20eV: 273, 259, 207, 189, 165, 147, 139 , 123, 107	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	(±)-(epi)catequina ^a (18)	(SUN et al., 2007, PERESTRELO et al., 2012, PANDEY et al., 2014, ABU-REIDAH et al., 2015a, BEN SAID et al., 2017) Metlin ¹
5,78	431,1902	–	–	–	20eV: 385, 223, 189, 161, 153 , 119, 113, 101	–	n.i	–
	465,1376	–	–	–	20eV: 451, 419, 313, 273 , 255, 229, 171, 137, 103	–	n.i	–
5,96	545,1456	547,1598	545,1453 547,1599	0,5/ -0,2	20eV: 419, 345, 313, 312, 273 , 255, 229, 187, 164, 125, 101/ 20eV: 394, 275 , 231, 188, 139, 107	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₀	(epi)afzelequina- (epi)afzelequina ^a (dímero) (19)	(GE et al., 2016)
6,06	273,0767	275,0912	273,0768 275,0914	-0,4/ -0,7	20 eV: 255, 229, 205, 187, 169, 137 , 125, 109/ 20eV: 257, 234, 191, 163, 149, 139 , 121, 107	C ₁₅ H ₁₄ O ₅	(epi)afzelequina ^a (20)	Metlin ¹
6,19	833,2081	835,2230	833,2087 835,2233	0,7/ -0,3	20eV: 561, 543, 435, 289 , 271, 245, 164, 125/ 20eV: 563 , 545, 409, 291, 273, 231, 151, 107	C ₄₅ H ₃₈ O ₁₆	(epi)afzelequina– (epi)afzelequina– (epi)catequina ^a (21)	(GU et al., 2003, SOUZA et al., 2008, GE et al., 2016)

Tabela 6 - Proposta de identificação dos compostos da P-AE das folhas de *C. bakeriana*. (continuação)

tr	[M – H] [–]	[M + H] ⁺	Massa exata	Erro (ppm) - / +	Fragmentos EM/EM - / +	Fórmula molecular	Tentativa de identificação	Referências
6,36	609,1462	611,1610	609,1461 611,1607	0,2/ 0,5	15eV: 528, 447, 283, 219, 161/ 20eV: 539, 449, 287 , 145	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	cianina (22)	(ZHU; ZHANG; LU, 2012, MIZGIER et al., 2016, CHENG et al., 2017) Metlin ¹
6,68	449,1091	451,1238	449,1089 451,1235	0,4/ 0,7	10eV: 431, 303, 285, 151 , 125, 107/ 20eV: 415, 397, 305, 287, 259, 195, 153, 129	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₁	(epi)astilbina ^a (23)	(CHEN; LU; ZHAO, 2014, ZHAO et al., 2014, DONG et al., 2017)
6,89	463,0882	465,1029	463,0882 465,1028	0,0/ 0,2	20eV: 300 , 301, 271, 255, 243, 151, 107 / 20eV: 304, 303 , 285, 153, 145, 127, 109	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	quercetina-3- <i>O</i> -glucosídeo/galactosídeo (isoquercetina/hiperosídeo) (24)	(SUN et al., 2007, KRASTEVA; NIKOLOV, 2008, BRAUNBERGER et al., 2013) Metlin ¹
7,10	433,1148	435,1287	–	–	20eV: 287, 269, 259, 180 , 152, 151, 125, 107 / 20eV: 289, 271, 243, 153, 129 , 107		n.i	
7,24	447,0937	449,1085	447,0933 447,1078	0,9/ 1,5	20eV: 301, 285, 284 , 255, 151, 107/ 20eV: 303, 287 , 288	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	canferol-3- <i>O</i> -glicosídeo/galactosídeo (astragalina/trifolina) (25)	(PIKULSKI; BRODBELT, 2003, ABU-REIDAH et al., 2015b) Metlin ¹
7,65	431,0991	433,1125	431,0984 433,1129	1,6/ -0,9	20eV: 285 , 284, 255, 227, 107/ 20eV: 288, 287 , 129, 107	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	canferol-3- <i>O</i> -ramnosídeo (afzelina) (26)	(WOJTANOWSKI; MROCZEK, 2018)

Tabela 6 - Proposta de identificação dos compostos da P-AE das folhas de *C. bakeriana*. (conclusão)

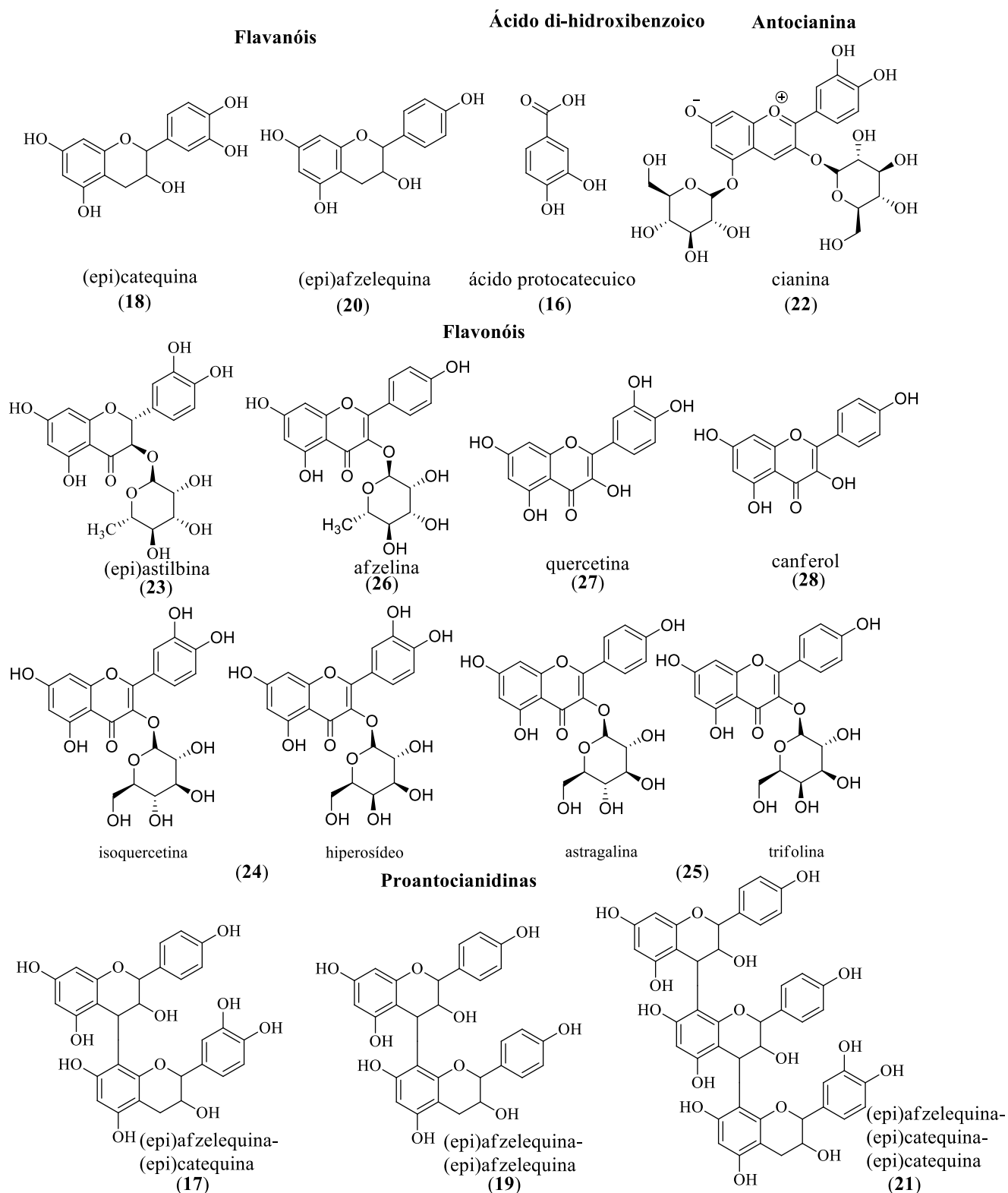
tr	[M – H] ⁻	[M + H] ⁺	Massa exata	Erro (ppm) - / +	Fragmentos EM/EM - / +	Fórmula molecular	Tentativa de identificação	Referências
7,79	301,0356	-	301,0354	0,7/	20eV: 273, 229, 179, 151 , 121, 107	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	quercetina (27)	(SOUZA et al., 2008, WOJTANOWSKI; MROCZEK, 2018)
8,29	285,0406	287,0552	285,0405 287,0550	0,3/ 0,7	20eV: 257, 255, 239, 229, 211, 199, 187, 185, 169, 159, 151, 143, 107/ 20eV: 258, 241, 231, 213, 185, 165, 153, 121, 111	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	canferol (28)	(ABU-REIDAH et al., 2015b, PANDEY et al., 2015) Metlin ¹
8,94	–	387,1800	–	–	15eV: 352, 311, 207, 121, 105	–	n.i	–
9,10	–	838,3786	–	–	30eV: 684, 548 , 506, 402, 276	–	n.i	–
10,32	–	267,1737	–	–	20eV: 211, 155 , 100	–	n.i	–
11,05	–	363,2207	–	–	20eV: 195, 177, 105	–	n.i	–

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

^aO prefixo “epi” (epímero) significa que são dois diastereoisômeros que diferem apenas pela rotação de um dos carbonos quirais.

Fonte: o autor.

Figura 14 - Estrutura dos compostos identificados na P-AE das folhas de *C. bakeriana*

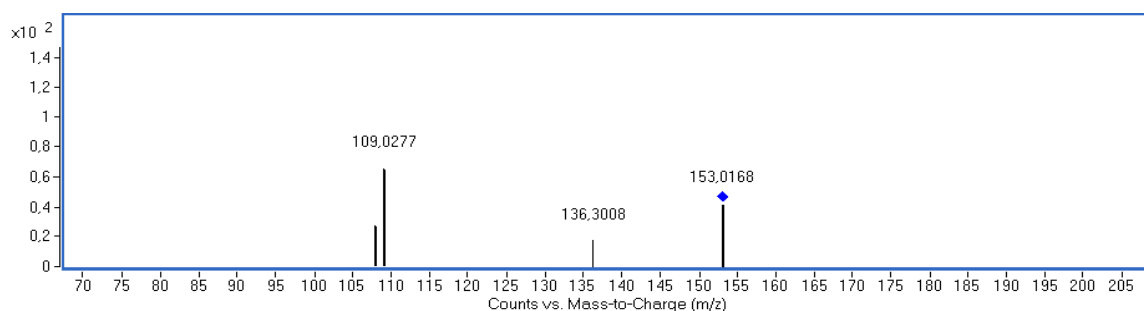


Fonte: o autor.

Algumas propostas de fragmentação para os compostos identificados serão discutidas a seguir.

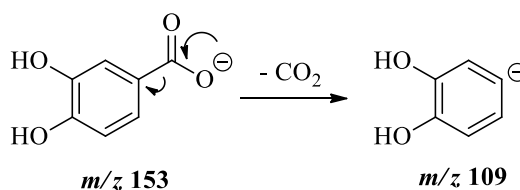
A figura 15 mostra o espectro de massas sequencial do ácido protocatecuico (**16**) no modo negativo, e na figura 16 é mostrada a proposta de fragmentação.

Figura 15 – EM/EM-IES(-) do composto **16**



Fonte: o autor.

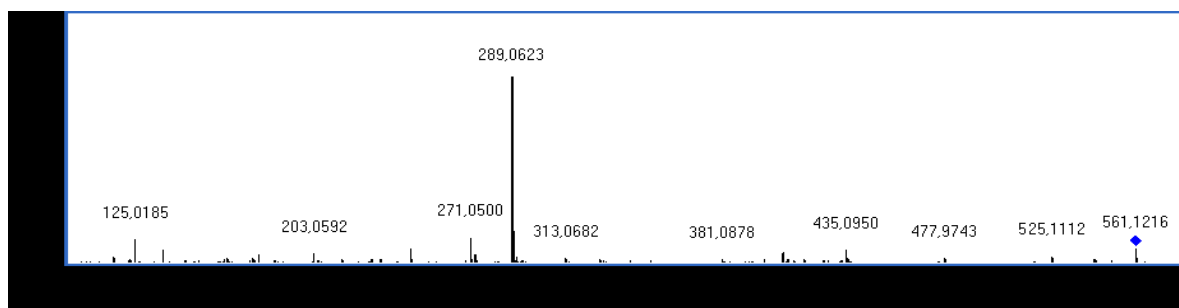
Figura 16 - Proposta de mecanismo de fragmentação para o composto **16** no modo negativo



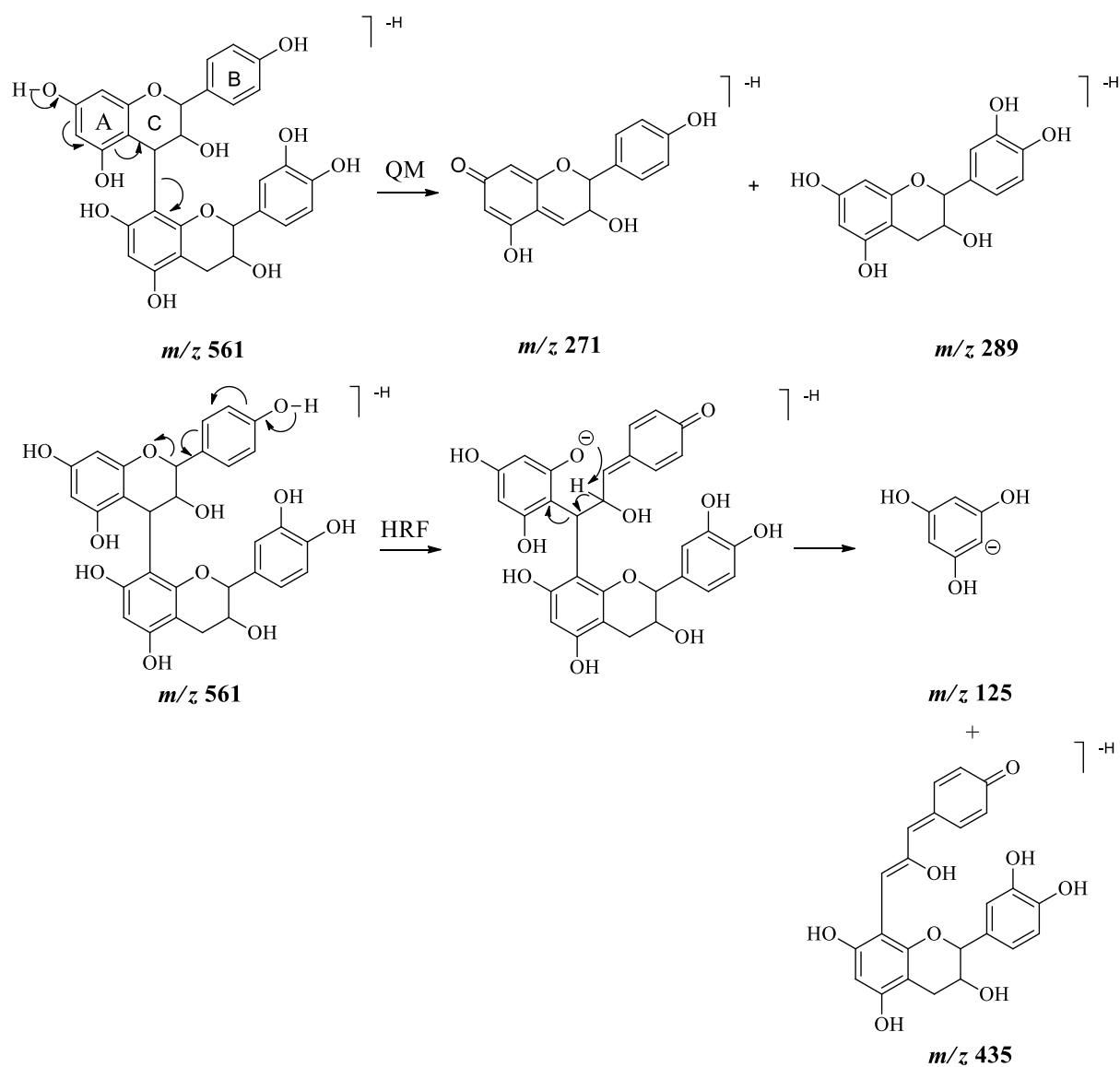
Fonte: o autor.

O espectro de massas do ácido protocatecuico (Figura 15) mostrou um íon em *m/z* 153,0168, correspondendo ao seu íon molecular desprotonado $[M - H]^-$, e um fragmento com íon em *m/z* 109 formado a partir da perda de 44 u de massas referentes a molécula de CO_2 do ácido carboxílico (LIU et al., 2007; CHEN et al., 2012). A α -eliminação é um típico mecanismo de eliminação de CO_2 a partir de produtos naturais desprotonado devido à presença do grupo carboxila na sua estrutura (DEMARQUE, et al., 2016).

A figura 17 mostra o espectro de massas da (epi)afzelequina-(epi)catequina (**17**) e posteriormente uma proposta de fragmentação para esse dímero (Figura 18).

Figura 17 – EM/EM-IES(-) do compostos **17**

Fonte: o autor.

Figura 18 - Proposta de mecanismo de fragmentação para o composto **17** no modo negativo

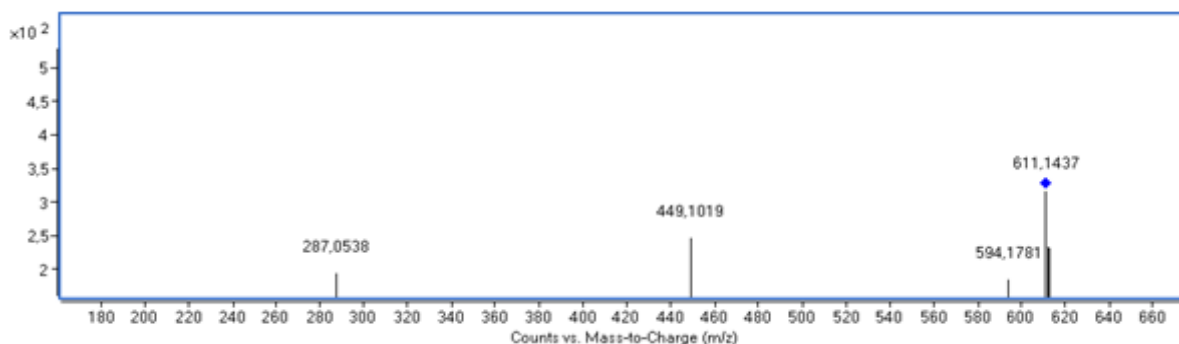
Fonte: adaptado de GU et al., 2003; SARNOSKI et al., 2016 e Ge et al., 2016.

O espectro de massas da (epi)afzelequina-(epi)catequina (Figura 18) mostrou um íon em m/z 561,1216, correspondendo ao seu íon molecular desprotonado $[M-H]^-$. A primeira fragmentação é referente a clivagem quinona metídeo (QM) da ligação interflavânica, resultando em dois íons m/z 271 e m/z 289. Esses dois íons foram formados a partir da unidade superior e da unidade base, e como a quiralidade do carbono 3 dos flavan-3-ols não pode ser diferenciada por EM, a sequência de ligação deste dímero foi deduzida como sendo (epi)afzelequina-(epi)catequina (GU et al., 2003; SARNOSKI et al., 2016).

Os íons m/z 125 e m/z 435 são formados pela clivagem do anel C da unidade superior do dímero, através do mecanismo conhecido como clivagem heterocíclica do anel (HRF) (GE et al., 2016).

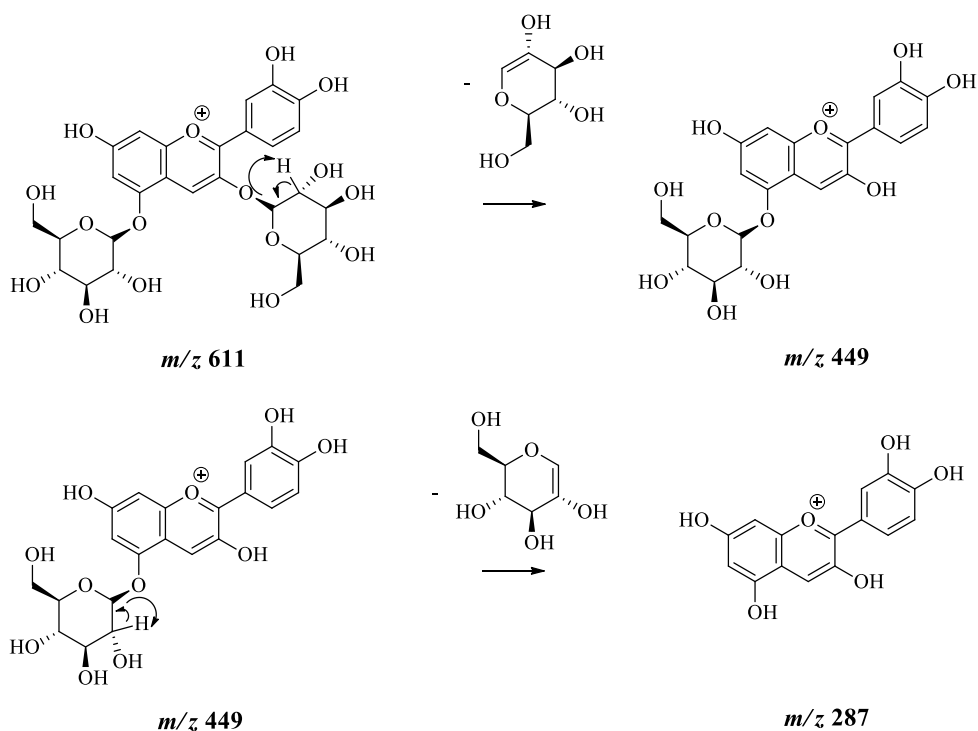
A Figura 19 mostra o espectro de massas com os fragmentos do íon m/z 611 e na figura 20 encontra-se uma proposta de fragmentação para a cianina (**22**) no modo positivo. A primeira fragmentação mostrada é referente a perda de 162 u de massas correspondente a uma das duas hexoses, formando o íon m/z 449. A segunda fragmentação é referente a perda da hexose remanescente formando então o íon m/z 287 (LUO et al., 2017).

Figura 19 – EM/EM-IES(+) do composto **22**



Fonte: o autor.

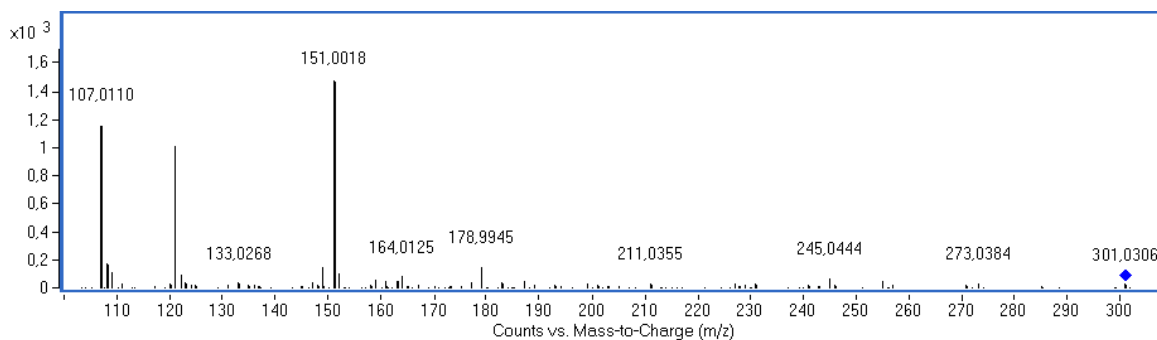
Figura 20 - Proposta de mecanismo de fragmentação para o composto **22** no modo positivo



Fonte: adaptado de LUO et al., 2017.

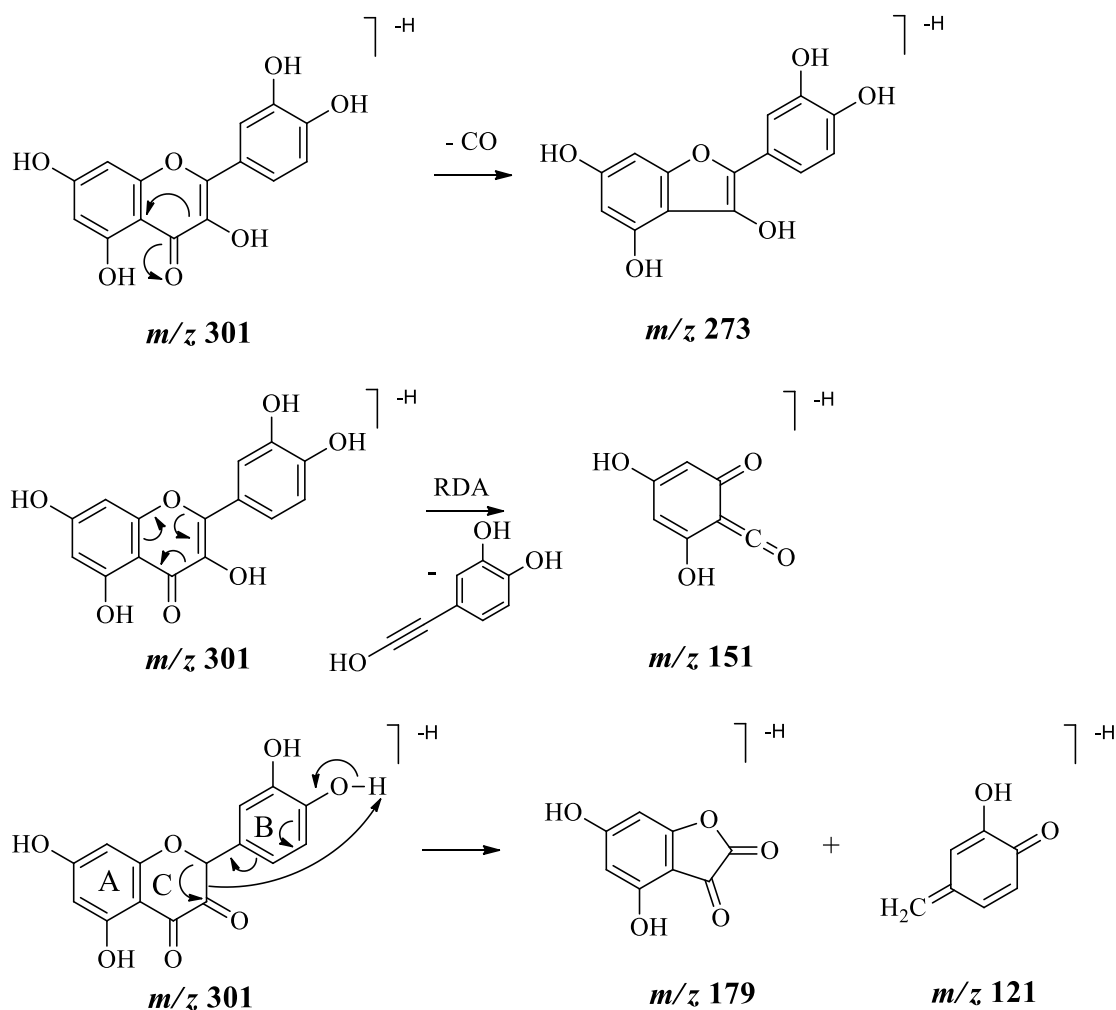
A Figura 21 mostra o espectro de massas com os fragmentos do íon m/z 301 e na figura 22 encontra-se uma proposta de fragmentação para a quercetina (**27**). A primeira fragmentação é referente a perda de 28 u de massas correspondente a molécula CO, formando o íon m/z 273. A eliminação de CO devido a uma contração do anel é um processo comum em flavonoides. Mediante a abertura do anel C pelo mecanismo retro Diels-Alder (RDA), obtém-se o íon m/z 151. Pelo mecanismo QM no anel B ocorre a formação dos íons m/z 179 e m/z 121 (DEMARQUE et al., 2016).

Figura 21 – EM/EM-IES(-) do composto **27**



Fonte: o autor.

Figura 22 - Proposta de mecanismo de fragmentação para o composto **27** no modo negativo



Fonte: adaptado de DEMARQUE et al., 2016.

6. CONCLUSÃO

Através do método da microdiluição em caldo, foi possível avaliar a atividade antifúngica dos extratos e partições das folhas de *Cassia bakeriana*. A P-AE foi uma das que apresentaram maior potencial antifúngico. Por meio da CLAE-EM-IES foi possível analisar a composição química da P-AE e a identificação mostrou a presença de ácido fenólico, flavonoides, proantocianidinas e antocianina. Esses compostos podem ser sugeridos como responsáveis pela atividade apresentada pela P-AE uma vez que muitos deles já foram avaliados na literatura contra espécies de *Candida* spp. Dessa forma, as folhas da *Cassia bakeriana* se mostram uma fonte promissora de compostos com atividade antifúngica.

E como perspectivas futuras, pretende-se fracionar a P-AE na tentativa de isolar compostos bioativos presentes nesta partição.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABU-REIDAH, I. M.; ALI-SHTAYEH, M. S.; JAMOUS, R. M.; ARRÁEZ-ROMÁN, D.; SEGURA-CARRETERO, A. Comprehensive metabolite profiling of *Arum palaestinum* (Araceae) leaves by using liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Food Research International**, v. 70, p. 74-86, 2015a.

ABU-REIDAH, I. M.; ALI-SHTAYEH, M. S.; JAMOUS, R. M.; ARRÁEZ-ROMÁN, D.; SEGURA-CARRETERO, A. HPLC–DAD–ESI-MS/MS screening of bioactive components from *Rhus coriaria* L. (Sumac) fruits. **Food Chemistry**, v. 166, p. 179-191, 2015b.

ALI, M.; ANSARI, S. H.; SAYEED AHMAD; SYEDA SANOBAR; ARSHAD HUSSAIN; SHAH ALAM KHAN; MD SARFARAZ ALAM; MD SAJID ALI; MD FARUQUE AHMAD; KHALID REHMAN HAKEEM. Phytochemical and Pharmacological Approaches of Traditional Alternate *Cassia occidentalis* L. **Plant and Human Health**, v. 3, p. 321-341, 2019.

ANAND, J.; RAI, N. Anticandidal synergistic activity of green tea catechins, antimycotics and copper sulphate as a mean of combinational drug therapy against candidiasis. **Journal de Mycologie Médicale**, v. 27, n. 1, p. 33-45, 2017.

ANTONIO-DOMINGUES, H.; CORRÊA, A. M. da S.; QUEIROZ, R. T. de; BITAR, N. A. B. Pollen morphology of some Fabaceae species from Patos de Minas, Minas Gerais State, Brazil. **Hoehnea**, v. 45, n. 1, p. 103-114, 2018.

ARYA, S.; RAJESH, K. T.; SANTHOSH, K. R.; ANJU, V. S. A study on the different pigments in *Clitoria ternatea* L. varieties (Fabaceae). **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 7, n. 1, p. 1107-1109, 2017.

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

BARREIRO, E. J.; BOLZANI, V. da S. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 679-688, 2009.

BARROS, I. B. de; DANIEL, J. F. de S.; PINTO, J. P.; REZENDE, M. I.; FILHO, R. B.; FERREIRA, D. T. Phytochemical and antifungal activity of anthraquinones and root and leaf extracts of *Coccoloba mollis* on phytopathogens. **Brazilian Archives of Biology and Technology: An International Journal**, v. 54, n. 3, p. 535-541, 2011.

BASSIRI-JAHROMI, S.; KATIRAEI, F.; HAJIMAHMOODI, M.; MOSTAFAVI, E.; TALEBI, M.; POURSHAFIE, M. R. *In Vitro* Antifungal Activity of Various Persian Cultivars of *Punica granatum* L. Extracts Against *Candida* species. **Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products**, v. 10, n. 3, p. 1-6, 2015.

BELWAL, T.; EZZAT, S. M.; RASTRELLI, L.; BHATT, I. D.; DAGLIA, M.; BALDI, A.; DEVKOTA, H. P.; ORHAN, I. E.; PATRA, J. K.; DAS, G.; ANANDHARAMAKRISHNAN, C.; GOMEZ-GOMEZ, L.; NABAVI, S. F.; NABAVI, S. M.; ATANASOV, A. G. A critical analysis of techniques used for botanicals: trends, priorities, industrial uses and optimization strategies. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 100, p. 82-102, 2018.

BEN SAID, R.; ARAFA I, H.; USAM A, M.; ABDULLAH SULAIMAN, A.-A.; KOWALCZYK, M.; MOLDOCH, J.; OLESZEK, W.; STOCHMAL, A. Tentative Characterization of Polyphenolic Compounds in the Male Flowers of *Phoenix dactylifera* by Liquid Chromatography Coupled with Mass Spectrometry and DFT. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 3, p. 1-18, 2017.

BERLINCK, R. G. S.; BORGES, W. de S.; SCOTTI, M. T.; VIEIRA, P. C. A química de produtos naturais do Brasil do século XXI. **Química Nova**, v. 40, n. 6, p. 706-710, 2017.

BETTS, J. W.; WAREHAM, D. W.; HASWELL, S. J.; KELLY, S. M. Antifungal Synergy of Theaflavin and Epicatechin Combinations Against *Candida albicans*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 23, n. 9, p. 1322-1326, 2013.

BRAUNBERGER, C.; ZEHL, M.; CONRAD, J.; FISCHER, S.; ADHAMI, H.-R.; BEIFUSS, U.; KRENN, L. LC-NMR, NMR, and LC-MS identification and LC-DAD quantification of flavonoids and ellagic acid derivatives in *Drosera peltata*. **Journal of Chromatography B**, v. 932, n., p. 111-116, 2013.

CAMPOY, S.; ADRIO, J. L. Antifungals. **Biochemical Pharmacology**, v. 133, p. 86-96, jun. 2017.

CATTEAU, L.; ZHU, L.; VAN BAMBEKE, F.; QUETIN-LECLERCQ, J. Natural and hemi-synthetic pentacyclic triterpenes as antimicrobials and resistance modifying agents against *Staphylococcus aureus*: a review. **Phytochem Ver**, v. 17, p. 1129-1163, abr. 2018.

CHANDA, S.; KANERIA, M.; BARAVALIA, Y. Antioxidant and antimicrobial properties of various polar solvent extracts of stem and leaves of four *Cassia* species. **African Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 10, p. 2490-2503, fev. 2012.

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

CHAERUNISAA, A. Y.; MILANDA, T.; SUSILAWATI, Y. Activity of *Cassia fistula* L. barks fractions as antibacterial agent. **Journal of Pharmaceutical Science and Research**, v. 10, n. 2, p. 304-309, 2018.

CHEN, W.; WANG, D.; WANG, L.; BEI, D.; WANG, J.; SEE, W. A.; MALLERY, S. R.; STONER, G. D.; LIU, Z. Pharmacokinetics of protocatechuic acid in mouse and its quantification in human plasma using LC–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 908, p. 39-44, 2012.

CHENG, G.; ZHOU, S.-H.; WEN, R.-D.; XIE, T.-L.; HUANG, Y.; YANG, Y.; GUAN, J.-X.; XIE, L.-J.; ZHANG, J. Anthocyanin characteristics of wines in *Vitis germplasm*s cultivated in southern China. **Food Science and Technology**, v. 38, n. 3, p. 13-521, 2017.

CHEN, S.-D.; LU, C.-J.; ZHAO, R.-Z. Qualitative and Quantitative Analysis of Rhizoma Smilacis glabrae by Ultra High Performance Liquid Chromatography Coupled with LTQ OrbitrapXL Hybrid Mass Spectrometry. **Molecules**, v. 19, n. 7, p. 10427-10439, 2014.

CLEMENSEN, A. K.; PROVENZA, F. D.; LEE, S. T.; GARDNER, D. R.; ROTTINGHAUS, G. E.; VILLALBA, J. J. Plant secondary metabolites in alfalfa, birdsfoot trefoil, reed canarygrass, and tall fescue unaffected by two different nitrogen sources. **Crop Science**, v. 57, p. 964-970, 2017.

CLINICAL; INSTITUTE, L. S. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. **Approved Standard-Third Edition M27-A3**, v. 28, 2008.

COSTA, R. N.; SANTOS, W. J.; LIMA, J. L.; ACCHILE, S.; SANTOS NETO, A. L.; SILVA, J.V. Avaliação de diferentes métodos pré-germinativos para três espécies arbóreas da família Fabaceae em diferentes ambientes. **Scientific Electronic Archives**, v. 11, n. 1, p. 35-43, 2018.

COWEN, L. E.; SANGLARD, D.; HOWARD, S. J.; ROGERS, P. D.; PERLIN, D. S. Mechanisms of antifungal drug resistance. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 5, n. 7, p. 1-23, 2014.

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

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

DA, F. L.; KEUGNI, A. B.; BELEMTOUGRI, G. R.; A FOTIO, T. L.; DIMO, T. Acute and subacute anti-inflammatory activities of dichloromethane extract of *Cassia alata* (Linn.) leaves in wistar rats. **African Journal of Traditional, Complementary, and Alternative Medicines**, v. 15, n. 1, p. 174-182, 2017.

DELGODA, R.; MURRAY, J. E. Evolutionary perspectives on the role of plant secondary metabolites. **Pharmacognosy**, p. 93-100, 2017.

DEMARQUE, D. P.; CROTTI, A. E. M.; VESSECCHI, R.; LOPES, J. L. C.; LOPES, N. P. Fragmentation reactions using electrospray ionization mass spectrometry: an important tool for the structural elucidation and characterization of synthetic and natural products. **Natural Product Reports**, v. 33, n. 3, p. 367-524, 2016.

DENNING, D. W.; BROMLEY, M. J. How to bolster the antifungal pipeline. **Science**, v. 347, p. 1414-1416, 2015.

DEWICK, P.M. **Medicinal natural products: a biosynthetic approach**. 3. ed. Chichester: Wiley. 539p, 2009.

DEWICK, P. M. **Medicinal natural products: a biosynthetic approach**. 2. ed. Chichester: Wiley. 550p, 2012.

DJEDDI, S.; KARIOTI, A.; SOKOVIC, M.; STOJKOVIC, D.; SERIDI, R.; SKALTSA, H. Minor sesquiterpene lactones from *Centaurea pullata* and their antimicrobial activity. **Journal of Natural Products**, v. 70, n. 11, p. 1796-1799, 2007.

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

DURAIPANDIYAN, V.; IGNACIMUTHU, S. Antifungal activity of rhein from *Cassia fistula* L. flower. **Webmed Central Pharmacology**, v. 1, n. 9, p. 1-15, 2012.

EL-HOSSARY, E. M.; CHENG, C.; HAMED, M. M.; EL-SAYED HAMED, A. N.; OHLSSEN, K.; HENTSCHEL, U.; ABDELMOHSEN, U. R. Antifungal potential of marine natural products. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 126, p. 631-651, 2017.

GE, H. M.; HUANG, B.; TAN, S. H.; SHI, D. H.; SONG, Y. C.; TAN, R. X. Bioactive oligostilbenoids from the stem bark of *Hopea exalata*. **Journal of Natural Products**, v. 69, n. 12, p. 1800-1802, 2006.

GE, YUE-WEI; ZHU, S.; KAZUMA, K.; WEI, SHENG-LI; YOSHIMATSU, K.; KOMATSU, K. Molecular ion index assisted comprehensive profiling of B-type oligomeric proanthocyanidins in rhubarb by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 408, n. 13, p. 3555-3570, 2016.

GEDDES-MCALISTER. J.; SHAPIRO, R. S. New pathogens, new tricks: emerging, drug-resistant fungal pathogens and future prospects for antifungal therapeutics. **Annals of the New York Academy of Sciences**, p. 77-89, 2018.

GHAURI, A. O.; AHMAD, S.; REHMAN, T.; ABBASI, W. M.; BILAL, M.; ARSHAD, A. Screening of biological activities of some leguminosae (Fabaceae) Family plants. **RDAS Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 6, n. 2, p. 132-137, 2018.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.

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

INPE - INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS ESPACIAIS. COORDENAÇÃO GERAL DE OBSERVAÇÃO DA TERRA. PRODES. **Incremento anual de área desmatada no Cerrado Brasileiro**. Disponível em: <<http://www.obt.inpe.br/cerrado>>. Acesso em: 10 out. 2018.

JAIN, S; PATIL, U. K. Phytochemical and pharmacological profile of *Cassia tora* Linn. An Overview. **Indian Journal of Natural Products and Resources**, v. 1, n.4, p. 430-437, 2010.

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

KAEHLER, M.; GOLDENBERG, R.; EVANGELISTA, P. H. L.; RIBAS, O. dos S.; HATSCHBACH, G. G. **Plantas vasculares do Paraná**. Curitiba: Departamento de Botânica, Universidade Federal do Paraná, 198f., 2014.

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

KOLAR, F. R.; GOGI, C. L.; KHUDAVAND, M. M.; CHOUDHARI, M. S.; PATIL, S. B. Phytochemical and antioxidant properties of some *Cassia* species. **Natural Product Research**, v. 32, n. 11, p. 1324-1328, 2018.

KONG, W.; XING, H.; LI, J.; YE, L.; LIU, X.; LI, Y.; RAO, G.; ZHOU, M.; YANG, G.; HU, Q.; LI, Y.; LI, X. Two new flavones from *Cassia pumila* and their anti-tobacco mosaic virus activity. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 54, n. 6, p. 1048-1051, 2018.

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

LI, J.; LARREGIEU, C. A.; BENET, L. Z. Classification of natural products as sources of drugs according to the biopharmaceutics drug disposition classification system (BDDCS). **Chinese Journal of Natural Medicines**, v. 14, n. 12, p. 888-897, 2016.

LIONHEART, G.; VANDENBRICK, J. P.; HOEKSEMA, J. D.; KISS, J. Z. The impact of simulated microgravity on the growth of different genotypes of the model legume plant *Medicago truncatula*. **Microgravity Science and Technology**, v. 2018, n. 4, p. 491-502, 2018.

LIU, AI-HUA; GUO, H.; YE, M.; LIN, YAN-HUA; SUN, JIANG-HAO; XU, M.; GUO, DE-AN. Detection, characterization and identification of phenolic acids in Danshen using high-performance liquid chromatography with diode array detection and electrospray ionization mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, n. 1161, p. 170-182, 2007.

LORENZI, H.; SOUZA, H. M. D.; TORRES, M. A. V.; BACHER, L. B. **Árvores exóticas no Brasil: madeiras, ornamentais e aromáticas**. 1. ed. São Paulo: Nova Odessa, Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2003. 368 p.

LU, M.; LI, T.; WAN, J.; LI, X.; YUAN, L.; SUN, S. Antifungal effects of phytochemicals on *Candida* species alone and in combination with fluconazole. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 49, n. 2, p. 125-136, 2017.

LUO, Z.; YANG, Y., WANG, L.; LI, H. Isolation of three cyanins from *Lonicera caerulea* L. fruits and its anticancer activity. **Journal of Central South University**, v. 24, n. 7, p. 1573-1581, 2017.

MACHADO, R. B.; NETO, M. B. R.; PEREIRA, P. G. P.; CALDAS, E. F.; GONÇALVES, D. A.; SANTOS, N. S.; TABOR, K.; STEININGER, M. **Estimativas de perda da área do Cerrado brasileiro**. Brasília. 22 p, 2004.

MARTINS, J. L. R.; RODRIGUES, O. R. L.; SOUZA, F. B. de; FAJEMIROYE, J. O.; GALDINO, P. M.; FLORENTINO, I. F.; COSTA, E. A. Medicinal species with gastroprotective activity found in the Brazilian Cerrado, **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 29, n. 3, p. 238-251, 2015.

MAUBON, D.; GARNAUD, C.; CALANDRA, T. SANGIARD, D.; CORNET, M. Resistance of *Candida* spp. To antifungal drugs in the ICU: where are we now?. **Intensive Care Med**, v. 40, p. 1241-1255, 2014.

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

METWALLY, A. M.; OMAR, A. A.; HARRAZ, F. M.; EL SOHAFY, S. M. Phytochemical investigation and antimicrobial activity of *Psidium guajava* L. leaves. **Pharmacognosy Magazine**, v. 6, n. 23, p. 212-218, 2010.

MMA- MINISTÉRIO do Meio Ambiente. BIOMAS. CERRADO. **O bioma cerrado**. Disponível em: < <http://www.mma.gov.br/biomas/cerrado.html> >. Acesso em: 10 out. 2018.

MIZGIER, P.; KUCHARSKA, A. Z.; SOKÓŁ-ŁĘTOWSKA, A.; KOLNIAK-OSTEK, J.; KIDŃ, M.; FECKA, I. Characterization of phenolic compounds and antioxidant and anti-inflammatory properties of red cabbage and purple carrot extracts. **Journal of Functional Foods**, v. 21, n., p. 133-146, 2016.

MOREIRA, F. A. **Perfil da alteração na produção de substâncias fenólicas e açúcares livres na interação entre *Tapirira guianensis* aubl. (Anacardiaceae) parasitada por *Phoradendron crassifolium* (Pohl ex DC.) Eichler (Sapotalaceae).** 2015. 101p. Dissertação (Mestrado em Botânica)-Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

NEPOMUCENO, N. C.; BARBOSA, M. A.; BONAN, R. F.; OLIVEIRA, J. E.; SAMPAIO, F. C.; MEDEIROS, E. S. Antimicrobial activity of PLA/PEG nanofibers containing terpinen-4-ol against *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 135, n.6, p. 1-9, 2017.

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

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

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

PANDEY, R.; CHANDRA, P.; RAM ARYA, K.; KUMAR, B. Development and validation of an ultra high performance liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry method for the simultaneous determination of selected flavonoids in *Ginkgo biloba*. **Journal of Separation Science**, v. 37, n. 24, p. 3610–3618, 2014.

PAVUNRAJ, M.; RAJESHKUMAR, S.; BHUVANA, L.; BABUJANARTHANAM, R. Preparation of *Cassia auriculata* plant extracts using different solvents and its antibacterial and antifungal activity against clinical pathogens. **Drug Invention Today**, v. 11, n. 1, p. 142-146, 2019.

PAWAR, A. V.; PATIL, S. J.; KILLEDAR, S. G. Uses of *Cassia Fistula* Linn as a Medicinal Plant. **International Journal of Advance Research and Development**, v. 2, n. 3, p. 85-91, 2017.

PERESTRELO, R.; LU, Y.; SANTOS, S. A. O.; SILVESTRE, A. J. D.; NETO, C. P.; CÂMARA, J. S.; ROCHA, S. M. Phenolic profile of Sercial and Tinta Negra *Vitis vinifera* L. grape skins by HPLC–DAD–ESI–MSn: Novel phenolic compounds in *Vitis vinifera* L. grape. **Food Chemistry**, v. 135, n. 1, p. 94-104, 2012.

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

PRADO, Diego Godina. **Estudo químico dos extratos das folhas de *Cassia bakeriana* biomonitorado pela atividade antifúngica**. 2018. 62 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Química Industrial) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2018.

PRETTO, J. B.; CECHINEL-FILHO V.; NOLDIN V. F.; SARTONRI M. R.; ISAIAS D. E.; CRUZ A. B. Antimicrobial activity of fractions and compounds from *Calophyllum brasiliense* (Clusiaceae/Guttiferae). **Z Naturforsch**, v. 59, n. 9-10, p. 657-662, 2004.

RAJASEKHARAN, S. K.; RAMESH, S.; BAKKIYARAJ, D. Synergy of flavonoids with HDAC inhibitor: new approach to target *Candida tropicalis* biofilms. **Journal of Chemotherapy**, v. 27, n. 4, p. 246-249, 2015.

RAO, S.; SURESH, C. Phytochemical analysis and *in vitro* efficacy of two edible *Cassia* species on selected human pathogens. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 3, n. 12, p. 4982-4988, 2012.

REHMAN, G.; HAMAYUN, M.; IQBAL, A.; UI ISLAM, S.; ARSHAD, S.; ZAMAN, K.; AHMAD, A.; SHEHZAD, A.; HUSSAIN, A. LEE, I. Antidiabetic Effects and Antioxidant Potencial of *Cassia nemophila* Pods, **BioMed Research International**, p. 1-6, 2018.

REVIE, N. M.; IYER, K. R.; ROBBINS, N.; COWEN, L. E. Antifungal drug resistance: evolution, mechanisms and impact. **Current Opinion in Microbiology**, v. 45, p. 70-76, 2018.

SALAZAR-ARANDA, R.; GRANADOS-GUZMÁN, G.; PÉREZ-MESEGUER, J.; GONZÁLEZ, G.; DE TORRES, N. Activity of Polyphenolic Compounds against *Candida glabrata*. **Molecules**, v. 20, n. 10, p. 17903-17912, 2015.

SÁNCHEZ-MALDONADO, A. F.; SCHIEBER, A.; GÄNZLE, M. G. Structure–function relationships of the antibacterial activity of phenolic acids and their metabolism by lactic acid bacteria. **Journal of Applied Microbiology**, v. 111, p. 1176-1184, 2011.

SANTOS, M. T. A. **Desenvolvimento do óvulo de três espécies de *Cassia* L.** 2018. 16f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Ciências Biológicas)-Curso de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2018.

SARNOSKI, P. J.; JOHNSON, J. V.; REED, K. A.; TANKO, J. M.; O'KEEFE, S. F. Separation and characterisation of proanthocyanidins in Virginia type peanut skins by LC–MSⁿ. **Food Chem.**, v. 131, n. 3, p. 927-939, 2012.

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

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

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

SUKET, N.; SRISOOK, E.; HRIMPENG, K. Antimicrobial Activity of the Anthocyanins Isolated from Purple Field Corn (*Zea mays* L.) Cob against *Candida spp.* **Journal of Pharmacy and Biological Sciences**, v. 9, n. 4, p. 40-44, 2014.

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

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 4.ed. Porto Alegre: Artmed, 848p, 2009.

TAJUDDEEN, N.; SANI SALLAU, M.; MUHAMMAD MUSA, A.; JAMES HABILA, D.; MUHAMMAD YAHAYA, S. Flavonoids with antimicrobial activity from the stem bark of *Commiphora pedunculata* (Kotschy & Peyr.) Engl. **Natural Product Research**, v. 28, n. 21, p. 1915-1918, 2014.

TANG, J.; LIANG, S.; DONG, B.; LI, Y., YAO, S.; Extraction and quantitative analysis of tropane alkaloids in *Radix physochlainae* by emulsion liquid membrane with tropine-based ionic liquid. **Journal of Chromatography A**, v. 8, p. 1-36, 2018.

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

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

WAGNER, H.; BLADT, S. **Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas**. 2. ed. Berlin: Springer, 384 p., 1996.

WALTERS, D. R. **Plant defense: warding off attack by pathogens, herbivores and parasitic plants**. 1.ed. Oxford: Wiley-Blackwell. 236p, 2011.

WATSON, R. R. **Polyphenols in plants: isolation, purification and extract preparation**. London: Academic Press. 331p, 2014.

WEN, H.; KANG, J.; LI, D.; WEN, W.; YANG, F.; HU, H.; LIU, C. Antifungal Activities of Anthocyanins from Purple Sweet Potato in the Presence of Food Preservatives. **Food Science and Biotechnology**, v. 25, n. 1, p. 165-171, 2016.

WIEDERHOLD, N. P.; PATTERSON, T. F.; SRINIVASAN, A.; CHATURVEDI, A. K.; FOTHERGILL, A. W.; WORMLEY, F. L.; RAMASUBRAMANIAN, A. K.; LOPEZ-RIBOT, J. L. Repurposing auranofin as an antifungal: *In vitro* activity against a variety of medically important fungi. **Virulence**, v. 8, n. 2, p. 138-142, 2016.

WINK, M. Biochemistry of plant secondary metabolism, in Annual Plant Reviews, v. 2: **Biochemistry of Plant Secondary Metabolism**. Sheffield Academic Press, Sheffield, p. 1-445, 2010.

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

YANG, F.; DING, S.; LIU, W.; LIU, J.; ZHANG, W.; ZHAO, Q.; MA, X. Antifungal activity of 40 TCMs used individually and in combination for treatment of superficial fungal infections. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 163, p. 88-93, 2015.

YUN, J.; LEE, H.; KO, H. J.; WOO, E.-R.; LEE, D. G. Fungicidal effect of isoquercitrin via inducing membrane disturbance. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 1848, n. 2, p. 695-701, 2015.

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

ZHU, L.; ZHANG, Y.; LU, J. Phenolic contents and compositions in skins of red wine grape cultivars among various genetic backgrounds and originations. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, n. 3, p. 3492-3510, 2012.