



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DESENVOLVIMENTO E
INOVAÇÃO TECNOLÓGICA EM MEDICAMENTOS**

JÉSSICA KARINA DA SILVA MACIEL

Caracterização fitoquímica do extrato de *Pilosocereus gounellei* A. Weber ex K. Schum. Bly. ex Rowl. (Cactaceae) e avaliação de suas atividades antioxidante e microbiológica

JOÃO PESSOA – PB

2016

JÉSSICA KARINA DA SILVA MACIEL

Caracterização fitoquímica do extrato de *Pilosocereus gounellei* A. Weber ex K. Schum. Bly. ex Rowl. (Cactaceae) e avaliação de suas atividades antioxidante e microbiológica

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos, como requisito para a obtenção do título de Doutor em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos.

Área de concentração: Desenvolvimento de Produtos e Processos.

ORIENTADORA: Prof.^a Dr.^a. Maria de Fátima Vanderlei de Souza
COORIENTADOR: Prof. Dr. Túlio Flávio Accioly de Lima e Moura

JOÃO PESSOA – PB

2016

Catálogo na Publicação
Seção de Catalogação e Classificação

M152c Maciel, Jéssica Karina da Silva.
Caracterização fitoquímica do extrato de *Pilosocereus gounellei* A. Weber ex K. Schum. Bly. ex Rowl. (Cactaceae) e avaliação de suas atividades antioxidante e microbiológica / Jéssica Karina da Silva Maciel. - João Pessoa, 2016.
158 f. : il. -

Orientadora: Dra. Maria de Fátima Vanderlei de Souza.
Coorientador: Dr. Túlio Flávio Accioly de Lima e Moura.
Tese (Doutorado) - UFPB/UFC/UFRPE/UFRN/PPGDITM

1. Farmacologia. 2. Medicamentos - Inovação tecnológica.
3. Cactaceae - *Pilosocereus gounellei*. 4. Cactáceas - Xique-
xique. I. Título.

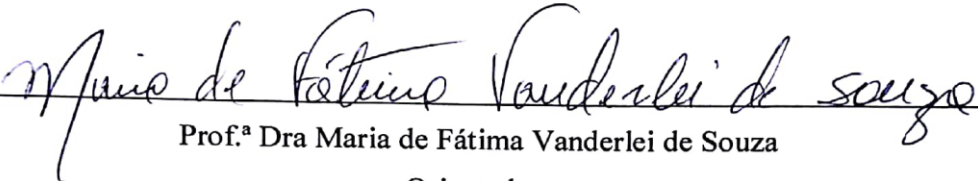
UFPB/BC

CDU - 615(043)

JÉSSICA KARINA DA SILVA MACIEL

Caracterização fitoquímica do extrato de *Pilosocereus gounellei* A. Weber ex K. Schum. Bly. ex Rowl. (Cactaceae) e avaliação de suas atividades antioxidante e microbiológica

BANCA EXAMINADORA


Prof.ª Dra Maria de Fátima Vanderlei de Souza

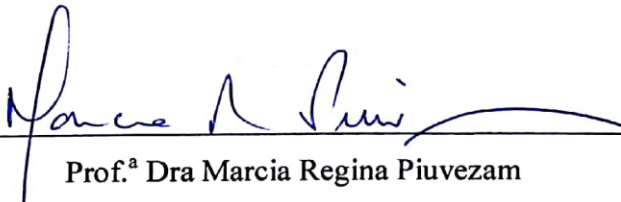
Orientadora

Prof.º Dr. Eduardo de Jesus Oliveira

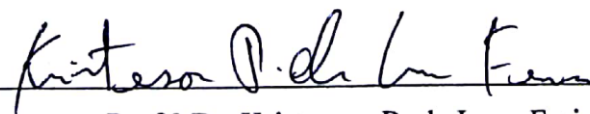
Examinador Externo

Prof.ª Dra Renata Mendonça Araújo

Examinador Exteno


Prof.ª Dra Marcia Regina Piuvezam

Examinador Interno


Prof.º Dr. Kristerson R. de Luna Freire

Examinador Interno

*Aos meus queridos e amados pais, Cláudio Brito Maciel
e Josefa Silva Maciel, pelo carinho, amor, dedicação e
incentivo de sempre, meus exemplos!*

*A minha irmã, Ananda Maciel, pela nossa amizade e
cumplicidade!*

*Ao meu amado esposo, Marcos Vinícius Souza, pela
generosidade, companheirismo e amor!*

*Ao meu filho, Enzo Maciel Souza, pelo amor mais puro e
sublime!*

DEDICO!

*Todos estes que aí estão
Atravancando o meu caminho,
Eles passarão.
Eu passarinho!
(Mário Quintana)*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por me amar e cuidar de mim, por me dar forças mesmo quando eu penso que já não tenho mais; por Ele reservar sempre o que é melhor para mim!

Aos meus familiares, que sempre me apoiaram em minhas decisões especialmente aos meus pais, Josefa Maciel e Cláudio Maciel; minha irmã, Ananda Maciel, a todos os meus tios, tias e primos; sem esquecer de “Mel” e “Oliver” que deixam meus dias mais alegres.

Ao meu amado esposo, Marcos Vinícius Souza, por toda compreensão, carinho, amor e incentivo.

A querida Professora Dra Maria de Fátima Vanderlei de Souza pelos conhecimentos transmitidos, por ter me corrigido sempre que necessário, pela confiança em mim depositada, amizade e contribuição em todo meu crescimento como profissional e como pessoa.

Aos Professores Eduardo Oliveira de Jesus, Fábio Correia Sampaio, Tânia Maria Sarmiento da Silva e Temilce Cantalice de Assis, por todo apoio, pelos ensinamentos transmitidos e pelas ricas contribuições à pesquisa realizada.

Ao Professor Túlio Flávio Accioly de Lima e Moura pela coorientação.

Aos meus queridos amigos que me acompanharam durante toda a minha trajetória e compreenderam, principalmente, meus momentos de ausência, em especial: Maria José Lourenço, Cida Lourenço, Juan Diego Lourenço, Renata Pinto, Thatyanna Guimarães e Lucila Queiroz.

A todos que fazem ou fizeram parte da equipe da Prof^a. Fátima Vanderlei pelo aprendizado e amizade: Anna Cláudia, Davi Antas, Marianne Fernandes (*in memoriam*), Otemberg Chaves, Rafael Rodrigues, Roosevelt Gomes, Severino Brito-Filho, Wemerson Matias, Tiago Bezerra, Yanna Teles, Milen Fernandes, Mikaelly Silva, Yngred Mangueira, Anderson Ângelo, Denise Leite, Nayara Cristina, Rafaella Maciel e Diégina Fernandes.

Aos meus amigos de laboratório que vivenciaram comigo de forma mais intensa toda a trajetória do doutorado: Yanna Teles, Milen Fernandes, Otemberg Chaves, Mikaelly Silva, Denise Leite, Anderson Ângelo e Yngred Mangueira.

Aos meus amigos, Girliane Silva e Allan Albuquerque, pela colaboração com o trabalho, pela amizade dedicada, pelos momentos de força e incentivo, pelos conhecimentos compartilhados e por toda compreensão.

Aos Professores da graduação e pós-graduação, cujos ensinamentos me acompanharão por toda vida.

A todos os colegas de pós-graduação pela ótima convivência e pelos aprendizados compartilhados, em especial, Consuelo Fernanda e Yanna Teles, pelas inúmeras viagens e noites em claro, que se tornavam divertidas, quando compartilhadas com vocês!

A banca examinadora pela disponibilidade e contribuição para o aprimoramento deste trabalho.

Aos técnicos e funcionários dos laboratórios pela colaboração na realização da pesquisa.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), pela bolsa concedida.

A Universidade Federal da Paraíba pelo espaço físico.

**A todos,
O meu muito obrigada por tudo!**

RESUMO

A espécie *Pilosocereus gounellei* A. Weber ex K. Schum. Bly. ex Rowl (Cactaceae), conhecida popularmente como xique-xique é endêmica do semiárido brasileiro com habitat desde o Maranhão até a Bahia. Há relatos do uso do macerado das suas raízes, pela medicina popular, para o tratamento de doenças do trato urinário e inflamação da próstata; e o macerado da medula dos cladódios, para o tratamento de gastrite. O estudo fitoquímico de *P. gounellei* proporcionou o isolamento e identificação de nove substâncias, sendo três esteroides, β -sitosterol, a mistura do β -sitosterol com o estigmasterol e a mistura do β -sitosterol e estigmasterol glicosilados; três flavonoides, pinostrobin, quercetina e canferol; um composto porfirínico, feofitina a; além de duas alcanidas, a *trans*-feruloiltiramina e a 7'-etoxi *trans*-feruloiltiramina (mariannéina), que foi descrita pela primeira vez na literatura. A caracterização estrutural das substâncias foi feita por métodos espectroscópicos de RMN uni e bidimensionais de ^1H , ^{13}C . A análise da atividade antioxidante da fração metanólica e extratos dos cladódios, raízes, flores e frutos revelou que o extrato dos frutos possui alto potencial antioxidante, frente aos demais extratos analisados de *P. gounellei*, sendo um candidato a possível produto nutracêutico. A triagem da atividade antimicrobiana, frente a microrganismos da cavidade oral, revelou que as amostras de *P. gounellei*, com exceção do extrato dos frutos e fração metanólica, possuem uma discreta atividade frente à *E. coli*. A metodologia analítica validada, utilizando-se HPLC-ELSD, possibilitou quantificar o β -sitosterol, no extrato dos cladódios ($0,38 \pm 0,023$ mg de β -sitosterol/g de extrato dos cladódios) além de contribuir para o controle de qualidade da matéria-prima vegetal. Os resultados obtidos no presente estudo sugerem que *P. gounellei* possui grande potencial para tornar-se um nutracêutico com excelente atividade no combate a radicais livres.

Palavras-chave: *Pilosocereus gounellei*; Cactaceae; 7'-etoxi *trans*-feruloiltiramina; β -sitosterol.

ABSTRACT

The species *Pilosocereus gounellei* A. Weber ex K. Schum. Byl. ex Rowl (Cactaceae), popularly known as “xique-xique” is endemic in Brazilian semiarid with habitat from Maranhão to Bahia. It has been reported that the roots macerated is used in popular medicine to treat urinary diseases and prostate inflammation, and the cladodes macerated has been used to treat gastritis. The phytochemical study of *P. gounellei* provided the isolation and identification of nine compounds, being three steroids, β -sitosterol, a mixture of β -sitosterol with stigmasterol and a mixture of β -sitosterol and stigmasterol glucosides; three flavonoids, pinostrobin, quercetin and kaempferol; one porphyrin compound, pheophytin a; besides two alkamides, trans-feruloyl thiramine and 7'-ethoxytransferyleryramine (mariannein), which is being described for the first time in the literature. The structural characterization of the substances was performed by spectroscopic methods such as uni and bi -dimensional ^1H and ^{13}C NMR. The antioxidant activity analysis of methanolic fraction, cladodes, roots, flowers and fruits extracts showed that the fruit extract possess great antioxidant potential, being a candidate for nutraceutical product. The antimicrobial screening revealed that all the samples of *P. gounellei*, except for the fruits extract and methanol fraction, have a moderate activity against *E. coli*. The validated analytical method, using HPLC-ELSD, led to quantify the β -sitosterol in cladodes extract (0.38 ± 0.023 mg β -sitosterol / g cladodes extract) and contributed to the quality control of raw-material plant. The present study suggests that *P. gounellei* has great potential to become a nutraceutical product with excellent activity against free radicals.

Keywords: *Pilosocereus gounellei*; Cactaceae; 7'-ethoxy-trans-feruloyltyramine; β -sitosterol.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	22
1.1 Importância das plantas medicinais	22
1.2 Fundamentação teórica	25
1.2.1 Consideração sobre a família Cactaceae	25
1.2.3 Considerações sobre o gênero <i>Pilosocereus</i> Byles & Rowley	31
1.2.4 Considerações sobre a espécie <i>Pilosocereus gounellei</i> A. Weber ex K. Schum. Bly. ex Rowl.	33
1.2.5 Considerações sobre a atividade de agentes antioxidantes	37
1.2.6 Considerações sobre a atividade antimicrobiana das plantas medicinais	38
1.2.7. Validação de metodologias analíticas para controle de qualidade de matérias-primas vegetais	39
1.2.8. β - sitosterol como marcador químico da espécie <i>Pilosocereus gounellei</i>	40
2. OBJETIVOS	43
2.1 Objetivo Geral	43
2.2 Objetivos Específicos	43
3 EXPERIMENTAL	45
3.1 Isolamento dos Constituintes Químicos de <i>Pilosocereus gounellei</i>	45
3.1.1 Levantamento bibliográfico	45
3.1.2 Coleta do material botânico	45
3.1.3 Procedimentos cromatográficos para isolamento dos constituintes químicos de <i>P. gounellei</i>	45
3.1.3.1 Procedimentos cromatográficos	45
3.1.4 Caracterização estrutural dos constituintes químicos	46
3.2 Obtenção, fracionamento dos extratos e isolamento dos constituintes químicos de <i>Pilosocereus gounellei</i>	47
3.2.1 Processamento da planta	47
3.2.2 Processamento cromatográfico dos cladódios de <i>P. gounellei</i>	47
3.2.3 Processamento cromatográfico das raízes de <i>P. gounellei</i>	48
3.3 Quantificação e validação de metodologia analítica para o β-Sitosterol, isolado dos cladódios de <i>Pilosocereus gounellei</i>, utilizando cromatografia líquida de alta eficiência com detector de espalhamento de luz.	57
3.3.1 Solventes e padrão utilizados	57
3.3.2 Instrumentação e condições cromatográficas	57
3.3.3 Preparo de soluções	57
3.3.4 Validação da metodologia analítica por HPLC-ELSD para determinação e quantificação do β -Sitosterol no EEB dos cladódios de <i>Pg</i>	58
3.4 Avaliação da atividade antioxidante dos Extratos Etanólicos Brutos dos cladódios, raízes, flores, frutos e fração metanólica do Xad-2 de <i>Pilosocereus gounellei</i>.	60
3.4.1 Fenólicos totais	60
3.4.2 Flavonas e flavonóis totais	60

3.4.3 DPPH [•] atividade sequestradora de radical	61
3.4.4 Determinação da Atividade Antioxidante contra o cátion ABTS ^{•+}	62
3.5. Ensaio microbiológicos preliminares dos extratos e fração metanólica (Xad-2) de <i>P.gounellei</i>.	63
3.5.1 Preparação dos meios de cultura	63
3.5.2 BHI líquido (caldo)	63
3.5.3 Preparação da solução salina	63
3.5.4 Cultivo de bactérias e fungo	63
3.5.5 Preparo das soluções mãe (SM) dos extratos e fração metanólica (Xad-2) de <i>P. gounellei</i>	64
3.5.6 Preparo das SM 1, SM 2 e SM 3	64
3.5.7 Preparo do Inóculo bacteriano/fúngico para a realização do MIC	64
3.5.8 Preparação das microplacas	65
3.5.9 Controle positivo da Clorexidina (CLX)	67
3.5.10 Leitura visual das microplacas com resazurina	67
3.5.11 Plaqueamento	68
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	70
4.1 Identificação estrutural das substâncias isoladas de <i>Pilosocereus gounellei</i>	70
4.1.1 Caracterização estrutural de <i>Pg-2</i>	70
4.1.2 Caracterização estrutural de <i>Pg-3</i>	77
4.1.3 Caracterização estrutural de <i>Pg-7</i>	84
4.1.4 Caracterização estrutural de <i>Pg-1</i>	91
4.1.5 Caracterização estrutural de <i>Pg-4</i>	97
4.1.6 Caracterização Estrutural de <i>Pg-5</i>	104
4.1.7 Caracterização estrutural de <i>Pg-6</i>	109
4.1.8 Caracterização estrutural de <i>Pg-8</i>	120
4.1.9 Caracterização Estrutural de <i>Pg-9</i>	132
4.2 Desenvolvimento e validação de metodologia analítica	138
4.2.1 Desenvolvimento do método analítico para quantificação do β -sitosterol	138
4.2.2 Seletividade	138
4.2.3 Linearidade e limites de detecção e quantificação	140
4.2.4 Precisão	141
4.2.5 Exatidão	141
4.2.6 Robustez	142
4.3 Avaliação da atividade antioxidante	143
4.3.1 Teor de Fenólicos, flavonas e flavonois totais e atividade antioxidante dos extratos e fração metanólica de <i>P. gounellei</i>	143
4.4 Avaliação da atividade antimicrobiana	147
4.4.1 Avaliação preliminar da atividade antimicrobiana dos extratos etanólicos e fração metanólica (Xad-2) de <i>P. gounellei</i>	147
5- CONCLUSÕES	150
REFERÊNCIAS	151

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E FÓRMULAS

AcOEt: Acetato de etila

APT: Attached Proton Test

CCDA: Cromatografia em Camada Delgada Analítica

CDCl₃: Clorofórmio deuterado

CHCl₃: Clorofórmio

COSY: Correlation Spectroscopy

C₅D₅N: Piridina deuterada

d: Dubleto

dd: Duplo dubleto

DEPTQ: Distortionless Enhancement by Polarisation Transfer with Retention of Quaternaries

DMSO-d₆: Dimetil sulfóxido deuterado

EEB: Extrato Etanólico Bruto

HMBC: Heteronuclear Multiple Bond Correlation

HMQC: Heteronuclear Multiple Quantum Correlation

Hz: Hertz

J: Constante de acoplamento

m: Multipleteo

MHz: Mega hertz

NP: difenilboriloxietilamina

Pg : *Pilosocereus gounellei*

RMN ¹H: Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

RMN ¹³C: Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13

s: Singleto

t: Tripleto

UV: Ultravioleta

δ: Deslocamento químico em ppm

LISTA DE QUADROS

- Quadro 1** - Finalidades de uso das espécies de cactáceas citadas por moradores do município do Congo (comunidade rural de Santa Rita), Paraíba, Nordeste, Brasil **28**
- Quadro 2** - Categoria de uso da espécie *Pilosocereus gounellei* A. Weber ex K. Schum. Bly. ex Rowl **35**
- Quadro 3** - Substâncias isoladas da espécie *P. gounellei* por Fernandes (2013) **36**
- Quadro 4** - Diluição para microplacas SM1: A1 até A7; SM2: A8 até A12 e SM3: B1 até B8 **66**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Dados comparativos de RMN ^{13}C da substância <i>Pg-2</i> (δ , CDCl_3 , 50 MHz) o com dados literatura (<i>Mo-2</i> ; δ , CDCl_3 , 100 MHz) (GOMES <i>et al.</i> ,2010)	72
Tabela 2. Dados comparativos da mistura <i>Pg-3a/ Pg-3b</i> (δ $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 200 e 50 MHz) com dados da literatura (δ $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 400 e 100 MHz), <i>Mo-3a e Mo-3b</i> (KOJIMA <i>et al.</i> , 1990)	79
Tabela 3. Dados de RMN ^1H e RMN ^{13}C -APT (δ , CDCl_3 , 200 e 50 MHz, respectivamente) das substâncias <i>Pg-7 a/ Pg-7b</i>)	85
Tabela 4. Dados comparativos de RMN ^{13}C da substância <i>Pg- 7 a/Pg-7b</i> (δ , CDCl_3 , 50 MHz) com modelos <i>Mo-7a e Mo-7b</i> (δ , $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 100 MHz), (KOJIMA <i>et al.</i> , 1990)	86
Tabela 5. Dados comparativos de RMN ^1H e ^{13}C de <i>Pg-1</i> (δ , CDCl_3 , 500 e 125 MHz) com os modelos <i>Mo-1</i> (δ , CDCl_3 , 400 e 100 MHz- Pinostrobin) e <i>Mo-1.1</i> (δ , DMSO-d_6 , 400 e 100 MHz- Crisina) (MURILLO, <i>et al.</i> , 2014)	93
Tabela 6. Comparação dos dados de RMN de ^{13}C e de RMN de ^1H da substância <i>Pg-4</i> com dados da literatura (<i>Mo-4</i> , GOMES, <i>et al.</i> ,2011) e (<i>Mo- 4.1</i> , MACIEL, <i>et al.</i> , 2016)	99
Tabela 7. Comparação dos dados de RMN de ^{13}C e de RMN de ^1H da substância <i>Pg-5</i> com dados da literatura (<i>Mo-5</i> , PIZZOLATTI, <i>et al.</i> , 2003) e (<i>Mo-5.1</i> , δ , $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$, 400 e 100 MHz- Galangina) (MURILLO, <i>et al.</i> , 2014)	106
Tabela 8. Dados comparativos de RMN ^1H e ^{13}C de <i>Pg-6</i> (δ , CDCl_3 , 500 e 125 MHz, respectivamente) com os modelos <i>Mo-6</i> (δ , CDCl_3 , 500 e 125 MHz; TOMAZ <i>et al.</i> , 2008) e <i>Mo-7</i> (δ , CDCl_3 , 200 e 50 MHz; SILVA, <i>et al.</i> , 2006)	111
Tabela 9. Dados comparativos de RMN ^{13}C da cadeia fitila de <i>Pg-6</i> (δ , CDCl_3 , 50 MHz) com os modelos <i>Mo-3</i> (δ , CDCl_3 , 125 MHz; TOMAZ, 2008) e <i>Mo-4</i> (δ , CDCl_3 , 75 MHz; MELOS, <i>et al.</i> , 2007)	112
Tabela 10. Dados comparativos de RMN ^1H e ^{13}C de <i>Pg-8</i> (δ , DMSO-d_6 , 400 e 100 MHz) com os modelos <i>Mo-8</i> (δ , CDOD_3 , 500 e 125 MHz) (GRECA <i>et al.</i> , 2006) e <i>Mo-8.1</i> (δ , CDCl_3 , 200 e 50 MHz) (CAVALCANTE <i>et al.</i> , 2010)	123
Tabela 11. Dados espectrais de ^{13}C -NMR (100 MHz), ^1H -NMR (400 MHz), HMQC e HMBC (DMSO-d_6 , δ). de <i>Pg-8</i> ($7'$ -etoxy- <i>trans</i> -feruloil tiramina)	124
Tabela 12. Dados espectrais comparativos de RMN ^1H e ^{13}C de <i>Pg-9</i> (δ , DMSO-d_6 , 400 e 100 MHz) com o modelo <i>Mo-8</i> (δ , CDCl_3 , 200 e 50 MHz) (CAVALCANTE <i>et al.</i> , 2010) e <i>Mo-8.1</i> (δ , DMSO-d_6 , 400 e 100 MHz, MACIEL <i>et al.</i> , 2016)	134
Tabela 13. Dados do parâmetro linearidade para padrão β -sitosterol	140
Tabela 14. Dados da Precisão intra-dia e inter-dia do β -sitosterol presente no extrato dos cladódios de <i>P. gounellei</i>	141

Tabela 15. Dados da exatidão do β -sitosterol presente no extrato dos cladódios de <i>P. gounellei</i>	142
Tabela 16. Teor de fenólicos, flavonas e flavonóis totais e atividade sequestradora de radicais livres DPPH e ABTS	145
Tabela 17. Concentração Inibitória Mínima (CIM) da atividade antimicrobiana preliminar dos extratos e fração metanólica (Xad-2) de <i>P.gounellei</i>	145
Tabela 18. Concentração Inibitória Mínima (CIM) da atividade antimicrobiana preliminar dos extratos e fração metanólica (Xad-2) de <i>P.gounellei</i>	148

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1:	Obtenção dos extratos etanólicos brutos dos cladódios, flores, frutos e raízes de <i>Pilosocereus gounellei</i>	50
Esquema 2:	Primeiro fracionamento cromatográfico do EEB dos cladódios de <i>Pilosocereus gounellei</i>	51
Esquema 3:	Segundo fracionamento cromatográfico do EEB dos cladódios de <i>Pilosocereus gounellei</i>	52
Esquema 4:	Fracionamento cromatográfico da fração hexânica obtida através da cromatografia realizada com Xad-2 do EEB dos cladódios de <i>Pilosocereus gounellei</i>	53
Esquema 5:	Rota laboratorial para extração dos alcaloides do EEB das raízes de <i>Pilosocereus gounellei</i>	54
Esquema 6:	Fracionamento cromatográfico da fração clorofórmica ácida obtida através do EEB das raízes de <i>Pilosocereus gounellei</i>	55
Esquema 7:	Segundo fracionamento cromatográfico do EEB das raízes de <i>Pilosocereus gounellei</i>	56

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição geográfica da família Cactaceae representada pelos pontos em amarelo	25
Figura 2. Espécies de Cactaceae: A. <i>Cereus jamacaru</i> ; B. <i>Melocactus bahiensis</i> ; C. <i>Opuntia. ficus indica</i> ; D. <i>Pilosocereus gounellei</i> ; E. <i>Pilosocereus pachycladus</i>	27
Figura 3. Distribuição geográfica do gênero <i>Pilosocereus</i> no estado da Paraíba	32
Figura 4. <i>Pilosocereus gounellei</i> em seu habitat	34
Figura 5. Estrutura química do β -sitosterol	41
Figura 6. CLAE-DAD do grupo 88/44 da fração clorofórmica ácida obtida através do EEB das raízes de <i>Pilosocereus gounellei</i> .	55
Figura 7. Placa de 96 poços	66
Figura 8. Placa de 96 poços com resarzurina	67
Figura 9. Espectro de RMN ^1H (δ , CDCl_3 , 400 MHz) de <i>Pg-2</i>	73
Figura 10. Expansão do espectro de RMN ^1H (δ , CDCl_3 , 400 MHz) de <i>Pg-2</i>	74
Figura 11. Expansão do espectro de RMN ^1H (δ , CDCl_3 , 400 MHz) de <i>Pg-2</i>	74
Figura 12. Espectro de RMN ^{13}C , BB, (δ , CDCl_3 , 100 MHz) de <i>Pg-2</i>	75
Figura 13. Expansão espectro de RMN ^{13}C , BB, (δ , CDCl_3 , 100 MHz) de <i>Pg-2</i>	76
Figura 14. Espectro de RMN ^1H (δ , $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500 MHz) de <i>Pg-3a</i> e <i>Pg-3b</i> .	80
Figura 15. Expansão do espectro de RMN ^1H (δ , $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500 MHz) de <i>Pg-3a</i> e <i>Pg-3b</i>	81
Figura 16. Espectro de RMN ^{13}C ,APT, (δ , $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 125 MHz) de <i>Pg-3a</i> e <i>Pg-3b</i>	82
Figura 17. Expansão do espectro de RMN ^{13}C (δ , $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 125 MHz) de <i>Pg-3a</i> e <i>Pg-3b</i>	83
Figura 18. Espectro de RMN ^1H (δ , CDCl_3 , 200 MHz) de <i>Pg-7a</i> e <i>Pg-7b</i>	87
Figura 19. Expansão do espectro de RMN ^1H (δ , CDCl_3 , 200 MHz) de <i>Pg-7a</i> e <i>Pg-7b</i>	88
Figura 20. Espectro de RMN ^{13}C -APT (δ , CDCl_3 , 50 MHz) de <i>Pg-7a</i> e <i>Pg-7b</i>	89
Figura 21. Expansão do espectro de RMN ^{13}C -APT (δ , CDCl_3 , 50 MHz) de <i>Pg-7a</i> e <i>Pg-7b</i> .	90
Figura 22. Expansão do espectro de RMN ^{13}C -APT (δ , CDCl_3 , 50 MHz) de <i>Pg-7a</i> e <i>Pg-7b</i>	90
Figura 23. Espectro de RMN ^1H (δ , 500 MHz, CDCl_3) de <i>Pg-1</i>	94
Figura 24. Expansão do espectro de RMN ^1H (δ , 500 MHz, CDCl_3) de <i>Pg-1</i>	95
Figura 25. Expansão do espectro de RMN ^1H (δ , 500 MHz, CDCl_3) de <i>Pg-1</i>	95
Figura 26. Espectro de RMN ^{13}C (δ , 125 MHz, CDCl_3) de <i>Pg-1</i>	96
Figura 27. Espectro de ^1H (δ , 500 MHz, CD_3OD) de <i>Pg-4</i>	100

Figura 28. Espectro de ^1H (δ , 500 MHz, CD_3OD) de <i>Pg-4</i>	101
Figura 29. Espectro de ^{13}C , APT, (δ , 125 MHz, CD_3OD) de <i>Pg-4</i>	102
Figura 30. Expansão do espectro de ^{13}C (δ , 125 MHz, CD_3OD) de <i>Pg-4</i>	103
Figura 31. Espectro de ^1H (δ , 500 MHz, CD_3OD) de <i>Pg-5</i>	107
Figura 32. Expansão do espectro de ^1H (δ , 500 MHz, CD_3OD) de <i>Pg-5</i>	107
Figura 33. Espectro de ^{13}C , APT, (δ , 125 MHz, CD_3OD) de <i>Pg-5</i>	108
Figura 34. Expansão do espectro de ^{13}C , APT, (δ , 125 MHz, CD_3OD) de <i>Pg-5</i>	108
Figura 35. Espectro de RMN ^1H (δ , CDCl_3 , 500 MHz) de <i>Pg-6</i>	113
Figura 36. Expansão do espectro de RMN ^1H (δ , CDCl_3 , 500 MHz) de <i>Pg-6</i>	114
Figura 37. Expansão do espectro de RMN ^1H (δ , CDCl_3 , 500 MHz) de <i>Pg-6</i>	115
Figura 38. Expansão do espectro de RMN ^1H (δ , CDCl_3 , 500 MHz) de <i>Pg-6</i>	116
Figura 39. Espectro de RMN ^{13}C , APT, (δ , CDCl_3 , 125 MHz) de <i>Pg-6</i>	117
Figura 40. Expansão do espectro de RMN ^{13}C , APT, (δ , CDCl_3 , 125 MHz) de <i>Pg-6</i>	118
Figura 41. Expansão do espectro de RMN ^{13}C , APT (δ , CDCl_3 , 125 MHz) de <i>Pg-6</i>	119
Figura 42. Espectro de RMN ^1H (δ , DMSO, 400 MHz) de <i>Pg-8</i>	125
Figura 43. Expansão do espectro de RMN ^1H (δ , DMSO, 400 MHz) de <i>Pg-8</i>	125
Figura 44. Espectro de RMN ^{13}C , BB (δ , DMSO, 100 MHz) de <i>Pg-8</i>	126
Figura 45. Espectro de HMQC (δ , DMSO, 400 e 100 MHz) de <i>Pg-8</i>	127
Figura 46. Espectro de HMBC (δ , DMSO, 400 e 100 MHz) de <i>Pg-8</i>	128
Figura 47. Espectro de COSY (δ , DMSO, 400 MHz) de <i>Pg-8</i>	129
Figura 48. Composto 7' etoxy <i>trans</i> -feruloiltiramina (<i>Pg-8</i>) correlações de RMN HMBC (3J and 2J) e COSY	130
Figura 49. Espectro de massas ESI $[\text{M} - \text{H}]^-$ de <i>Pg-8</i>	131
Figura 50. Espectro de RMN ^1H (δ , DMSO, 400 MHz) de <i>Pg-9</i>	135
Figura 51. Expansão do espectro de RMN ^1H (δ , DMSO, 400 MHz) de <i>Pg-9</i>	136
Figura 52. Expansão do espectro de RMN ^1H (δ , DMSO, 400 MHz) de <i>Pg-9</i>	136
Figura 53. Espectro de RMN ^{13}C , BB (δ , DMSO, 100 MHz) de <i>Pg-9</i>	137
Figura 54. Cromatogramas do padrão β -sitosterol e desenvolvimento da metodologia analítica para o extrato dos cladódios de <i>P. gounellei</i>	139

Figura 55. Cromatogramas que demonstram a seletividade do método para a análise do padrão β -sitosterol	139
Figura 56. Curva de calibração do padrão β -sitosterol utilizada no ensaio de linearidade	140
Figura 57. Correlação entre teor de fenólicos totais e a atividade anti-radicalar DPPH e ABTS ^{•+} dos extratos e fração metanólica de <i>P. gounellei</i>	146

I Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1 Importância das plantas medicinais

O homem utiliza as plantas com fins medicinais para o tratamento de doenças desde a antiguidade, sendo este conhecimento acumulado e transmitido de geração para geração (AGENTA *et al.*, 2011), fato este que atua como ferramenta para a ciência, na busca por substâncias que possam se tornar ponto de partida para o desenvolvimento de novos fármacos (MACIEL *et al.*, 2002).

Durante o século XIX, o interesse por produtos naturais dotados de atividade farmacológica, levou ao isolamento dos primeiros constituintes químicos de origem vegetal (SNEADER, 2005; SCHENKEL *et al.*, 2010) e também ao reconhecimento de que as propriedades terapêuticas das plantas medicinais estavam atreladas à sua constituição química e não às crendices relacionadas a componentes sobrenaturais (HILL-RANG, 2013). Este fato foi um marco para o desenvolvimento científico de novos medicamentos.

Várias substâncias, oriundas de produtos naturais, foram isoladas e identificadas neste período, destacando-se a morfina (1804), analgésico eficaz obtido a partir da *Papaver somniferum* L. Posteriormente foram isoladas a atropina (1833), substância anticolinérgica isolada da *Atropa belladonna* L., a digitoxina (1820), glicosídeo cardiotônico isolado a partir da *Digitalis purpurea* L. e muitos outros (SNEADER, 2005). Como outros exemplos, pode-se citar o isolamento e purificação da vimblastina (1954) e vincristina, alcaloides isolados e purificados da *Catharanthus roseus* (L.), conhecida como vinca. Estes alcaloides impedem a multiplicação dos glóbulos brancos e são utilizados no combate a leucemia. Atualmente estas substâncias são de grande utilidade no tratamento de linfoma de Hodgkin, sarcoma de Kaposi, câncer de ovário e testículos e leucemia linfoblástica aguda (EFFERTH, KOCH, 2011; BRANDÃO, *et al.*, 2010).

Os remédios derivados de plantas medicinais, utilizados na forma bruta ou de extrato vegetal, passaram a despertar o interesse de estudos científicos, incorporando o conhecimento da química e das ciências biológicas contribuindo, portanto, para o desenvolvimento da farmacologia e da terapêutica moderna (PEREIRA, 2013).

De acordo com Newman, os medicamentos derivados de produtos naturais são capazes de tratar 87% das enfermidades humanas, incluindo, por exemplo, os indicados

como antibacterianos, anticoagulantes, antiparasitários, imunossupressores e anticancerígenos (NEWMAN, 2003).

O Brasil está inserido no que se chama megabiodiversidade representada também por Austrália, China, Colômbia, Equador, Índia, Indonésia, Madagascar, Malásia, México, Peru e Zaire. Segundo as estimativas da Convenção da Diversidade Biológica, o Brasil possui a maior diversidade continental, abrigando de 15 a 20% de toda biodiversidade do planeta (BARREIRO E BOLZANI, 2009) e se destaca pela presença de dois biomas extremamente importantes, o cerrado e a caatinga, estando a caatinga localizada no semiárido nordestino e se caracterizando como detentora de uma porção significativa da biodiversidade do país (ARAÚJO e ALBUQUERQUE, 2007). Estes biomas são considerados, segundo Norman Myers (1988), *hotspot* mundiais, termo este que define quais áreas são mais importantes para a preservação da biodiversidade, tendo em vista que esta não é igualmente distribuída pelo planeta (MYERS *et al.*, 2000).

O estudo fitoquímico de matérias-primas vegetais tem por objetivo conhecer, isolar e identificar os constituintes químicos ou quantificar a sua presença. O panorama da fitoquímica no Brasil é de extrema importância quando se considera sua grande riqueza vegetal e as possibilidades para o desenvolvimento de novos medicamentos, onde grande parte das suas plantas nativas ainda não tem estudos que permitam a elaboração de monografias completas e modernas. Muitas espécies da nossa flora são adotadas de modo empírico de acordo com a medicina popular, sem respaldo científico quanto à sua eficácia e segurança, demonstrando que em um país com imensa biodiversidade como o Brasil, ainda existe uma enorme distância entre a oferta de plantas e o estudo científico. Este fato se torna um grande incentivo ao avanço do estudo destas plantas (FOGLIO *et a.*, 2006).

Atualmente no mercado mundial, cerca de 50% das plantas são usadas na alimentação, 25% em cosméticos, 20% pela indústria farmacêutica e 5% em outras atividades (CAÑIGUERAL *et al.*, 2003). Assim, o potencial de inovação tecnológica empregando produtos naturais segue em avanço notável, levando pesquisadores a buscarem o desenvolvimento de produtos que tragam multiplicidade de benefícios à saúde humana (MAW *et al.*, 2011).

As várias metodologias para a obtenção de fármacos estão dentro da abordagem biotecnológica e as correspondentes técnicas genéticas, que possibilitaram identificar e preparar diversas proteínas; a química combinatória, que permite o desenvolvimento de

técnicas de triagem em larga escala como o *HTS* (*High-throughput screening*) que permitem que até 100 mil compostos sejam testados num único dia em relação a sua atividade biológica e a química computacional que correlaciona a estrutura molecular com a atividade biológica (BRANDÃO *et al.*, 2010; YUNES e CHECHINEL FILHO, 2001).

Com base nestes dados e buscando aprofundar o conhecimento desenvolvido a partir de estudos compilados nas áreas de farmacoquímica, farmacologia e indústria farmacêutica, optou-se pelo estudo da espécie *Pilosocereus gounellei*, pesquisada anteriormente por FERNANDES (2013). Esta espécie é utilizada pela população tanto na alimentação quanto para a cura de males, desta forma, busca-se com este trabalho, obter informações científicas quanto a sua constituição química e suas propriedades farmacológicas, bem como desenvolver metodologias analíticas para quantificação de ativos, de forma que se garanta o controle de qualidade da matéria-prima vegetal, condição essencial para a obtenção de um produto seguro, eficaz e de qualidade comprovada. Este trabalho e o de FERNANDES (2013), encontram-se inseridos no projeto Universal, no qual busca também, retornar todas as informações adquiridas nestes estudos para a população, em forma de cartilhas e ministração de palestras.

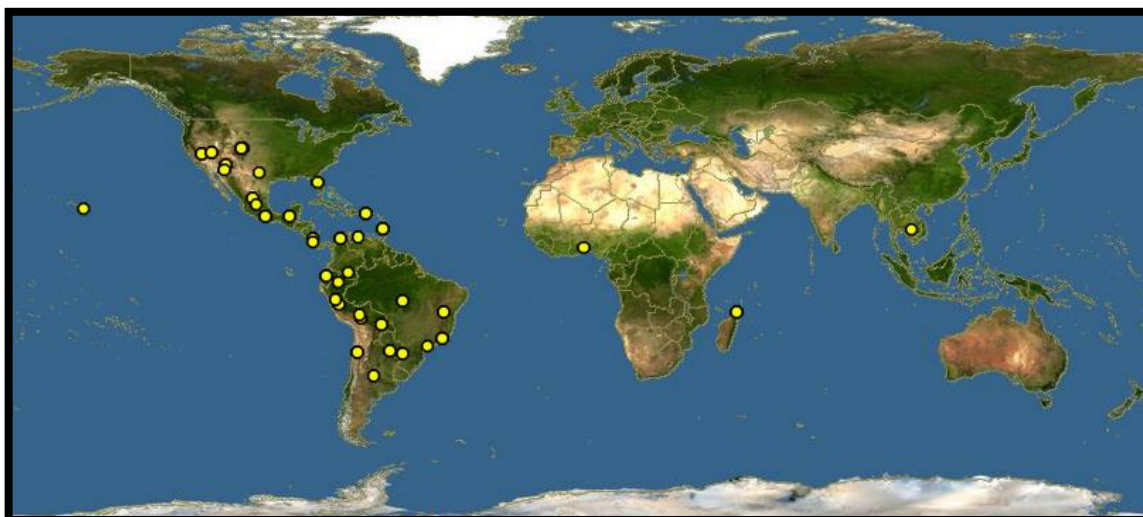
1.2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

1.2.1 Consideração sobre a família Cactaceae

O Brasil é o país que guarda a maior biodiversidade do planeta, possuindo 13% das espécies já catalogadas pelo mundo, onde uma porção significativa destas encontra-se na caatinga do Semiárido nordestino (QUEIROZ *et al.*, 2006). A caatinga apesar de parecer uma região pobre é extremamente rica em sua biodiversidade vegetal, destacando-se pela presença da família Cactaceae.

A família Cactaceae é composta por cerca de 124 gêneros e 1438 espécies, (HUNT *et al.*, 2006) e se subdivide em quatro sub-famílias: Maihuenioideae, Pereskioideae, e Cactoideae Opuntioideae, sendo as duas primeiras detentoras de maior biodiversidade (WALLACE *et al.*, 1995). Possui ocorrência em todo território americano, em regiões tropicais e temperadas, com maior variedade de espécies no México (SOUZA *et al.*, 2005) e com o terceiro maior centro de diversidade presente no Brasil (TAYLOR e ZAPPI, 2004), com espécies distribuídas nos biomas: amazônico, caatinga, cerrado, floresta atlântica, pampa e pantanal (TAYLOR *et al.*, 2016) (**Figura 1, Pág. 25**). A família Cactaceae se distribui por todo território brasileiro onde está representada por 39 gêneros e 260 espécies, com 14 gêneros e 187 espécies endêmicas, (ZAPPI *et al.*, 2016). Estas espécies ganharam relevância pela utilização na alimentação humana e de animais, principalmente em épocas de seca (LUCENA, 2012).

Figura 1. Distribuição geográfica da família Cactaceae representada pelos pontos em amarelo (**Fonte:** http://www.discoverlife.org/mp/20m?act=make_map - Acessado em: 16 de janeiro de 2016).



As espécies da família Cactaceae são geralmente representadas, por plantas perenes, com características adaptativas que possibilitam a sobrevivência em ambientes de grande aridez, são em grande parte, suculentas, com caules desprovidos de folhas e em contrapartida, detentores de ramos espinhosos; além de possuírem suas flores, solitárias e vistosas, que apresentam ovários receptacular (BARTHLOTT; HUNT, 1993; ROCHA *et al.*, 2007).

As Cactáceas são utilizadas também como plantas ornamentais, cercas vivas, na alimentação humana com a produção de doces, farinhas, biscoitos, cuscuz, além de serem utilizadas como combustível, adsorvente de gasolina, cosmético e quando florescem atuam como bioindicador de chuvas (ZAPPI e TAYLOR, 2011; SILVA, 2015).

Suas espécies também são utilizadas para fins medicinais. A mucilagem composta majoritariamente de água e polissacarídeos obtida da espécie *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill. é utilizada para prevenir desidratação, para curar furúnculos, dores de barriga, infecção urinária, inflamações tópicas e ulcerações da pele (MORTON, 1990; SILVA, 2015). Agra e colaboradores (2008) citam utilização das raízes de *Pilosocereus gounellei* (xique-xique) e *Pilosocereus pachycladus* F. Ritter (facheiro) contra inflamações prostáticas. *Cereus jamacaru* (mandacaru) destaca-se no tratamento de afecções geniturinárias, do aparelho digestório, respiratório e renal, além de ser utilizado como diurético e para tratar inflamações de modo geral. *Melocactus zehntneri* (Britton & Rose) Luetzelb, conhecido popularmente como coroa-de frade (TAYLOR *et al.*, 2016) é utilizado no tratamento de afecções respiratórias, inflamações, para tratar cólicas e “limpar o útero” após o parto (SILVA, 2015) (**Figura 2, Pág. 27**). No México, as cactáceas são amplamente utilizadas na medicina tradicional por curandeiros e tribos indígenas, com diversas atividades etnofarmacológicas, tais como: analgésicas, antibióticas, anti-inflamatórias e diuréticas; para tratar problemas intestinais, tosses, curar alguns tipos de úlceras e para o controle de diabetes e colesterol, dentre outras (**Quadro 1, Pág. 28**) (HOLLIS & SHEINVAR, 1995; BARBERA *et al.*, 1999).

No tocante a quimiotaxonomia, a família Cactacea, vem sendo estudada desde 1917, relatando a presença de diversas classes de constituintes químicos, como: ácidos, alcaloides, triterpenos, esteroides, saponinas, heterosídeos, betacianinas, betaxantinas, flavonoides e álcoois (FERNANDES, 2013). A presença de flavonoides, como quercetina, rutina, canferol e seus derivados, atrelados a suas atividades antioxidantes foram relatados em várias espécies de Cactaceae como em *Opuntia monacantha*,

Opuntia ficus-indica e *Pilosocereus arrabidaei* (GONÇALVES *et al.*, 2015). A ocorrência de substâncias nitrogenadas como β -feniletilaminas, alcaloides tetra-hidroisoquinolínicos e seus derivados também são bastante citados nesta família (SMITH, 1977; LUNDSTROM, 1983). Entre espécies do gênero *Neobuxbaumia* foi relatado o isolamento de três derivados de alcaloides tetrahydroisoquinólicos, salsolidina, carnegina e anhalidina, (FLORES ORTIZ *et al.*, 2012) e no gênero *Gymnocalycium* foi citada a presença de seis substâncias derivadas de β - feniletilaminas e nove substâncias derivadas de alcaloides tetrahydroisoquinolínicos (STARHA, 1997).

Figura 2. Espécies de Cactaceae: A. *Cereus jamacaru*; B. *Melocactus bahiensis*; C. *Opuntia ficus indica*; D. *Pilosocereus gounellei*; E. *Pilosocereus pachycladus*; (Fonte: LUCENA *et al.*, 2015).



Quadro 1. Finalidades de uso das espécies de cactáceas citadas por moradores do município do Congo (comunidade rural de Santa Rita), Paraíba, Nordeste, Brasil. **Fonte:** Lucena Adaptação *et al.*, 2015.

Nome Científico	Nome Popular	Finalidade de Uso	Porção utilizada	Forma de Preparo	Indicação
<i>Cereus jamacaru</i> DC. Subsp. <i>jamacaru</i>	Mandacaru	Alimento	Fruto	<i>In natura</i> , suco e doce	Nutrição
			Miolo (polpa)	Cozido	Nutrição
		Medicinal	Raiz	Decocção	Apêndice e vesícula
				Infusão	Doença da mulher e próstata
				Lambedor	Bronquite, caroço, problema de pele e tuberculose
				Molho por 24 horas	Coluna, cólica e excesso de sangue em menstruação
				Molho	Alergia, problemas de coluna, diabetes, reumatismo, problemas nos rins e vermes
		Fruto	Lambedor	Gripe e tosse	

Quadro 1. Finalidades de uso das espécies de cactáceas citadas por moradores do município do Congo (comunidade rural de Santa Rita), Paraíba, Nordeste, Brasil. **Fonte:** Lucena Adaptação *et al.*, 2015.

Nome Científico	Nome Popular	Finalidade de Uso	Porção utilizada	Forma de Preparo	Indicação
<i>Melocactus zehntneri</i> (Britton & Rose) Lutzclb.	Coroa-de-frade	Alimento	Fruto	<i>In natura</i>	Nutrição
			Miolo (polpa)	Doce, assado	Nutrição
		Medicinal	Baba “parênquima aquífero”	Passar no local	Retirar caroço e espinhas da pele
			Miolo (polpa)	Lambedor	Bronquite, câncer, dor de cabeça, gripe, tosse e verme
			Raiz	Decocção	Resfriado
Infusão	Tumor e verme				
<i>Napalea cochenillifera</i> (L.) Salm-Dyck	Palma doce	Alimento	Folha (raquete)	Cozido	Nutrição
			Fruto	<i>In natura</i>	Nutrição
<i>Opuntia ficus-indica</i> (L.) Mill.	Palma-forrageira	Alimento	Folha (raquete)	Cozida e picolé	Nutrição
			Fruto	<i>In natura</i> ou suco	Nutrição
			Miolo (polpa)	Cozido e ensopado	Nutrição
		Medicinal	Miolo (polpa)	Coloca em cima do local afetado	Retirar espinhas da pele
<i>Opuntia</i> sp.	Palma-redonda	Alimento	Fruto	<i>In natura</i>	Nutrição

Quadro 1. Finalidades de uso das espécies de cactáceas citadas por moradores do município do Congo (comunidade rural de Santa Rita), Paraíba, Nordeste, Brasil. **Fonte:** Lucena Adaptação *et al.*, 2015.

Nome Científico	Nome Popular	Finalidade de Uso	Porção utilizada	Forma de Preparo	Indicação
<i>Pilosocereus gounellei</i> (F.A.C. Weber) Byles & G.D. Rowley subsp. <i>gounellei</i>	Xique-xique	Alimento	Fruto	<i>In natura</i>	Nutrição
			Miolo (polpa)	Assado ou cozido	Nutrição
		Medicinal	“Baba” (Parênquima aquífero)	Passa no local afetado	Para retirar espinhas da pele
			Fruto	<i>In natura</i>	Prisão de ventre
			Miolo (polpa)	Passa no local afetado	Para retirar espinhas da pele
<i>Pilosocereus pachycladus</i> F. Ritter subsp. <i>pernambucoensis</i> (F. Ritter) Zappi	Facheiro	Alimento	Fruto	<i>In natura</i> e suco	Nutrição
			Miolo (polpa)	Doce e cocada	Nutrição
		Medicinal	Miolo (polpa)	Queimadura	Auxiliar na queimadura
<i>Tacinga inamoena</i> (K. Schum.) N.P. Taylor & Stuppy	Cumbeba	Alimento	Fruto	Geleia e suco	Nutrição
		Medicinal	Miolo (polpa)	Passa no local afetado	Retirar espinhas da pele
			Não informado	Não informado	Uretra

1.2.3 Considerações sobre o gênero *Pilosocereus* Byles & Rowley

O gênero *Pilosocereus* Byles & Rowley pertence à subfamília *Cactoideae*, tribo *Cereae*, possui 35 espécies distribuídas do México ao Paraguai, com maior diversidade de espécies no Brasil, onde habitam diferentes ambientes, incluindo a caatinga, restinga, e campos rupestres (MARTINS, 2007). Este gênero se diferencia dos demais, principalmente pelas características do fruto, que é globoso-achatado, deiscente com fissuras irregulares e polpa funicular (ZAPPI, 1994). Suas flores se abrem à noite, quando são polinizadas pelos morcegos e permanecem abertas por 24 horas (TAYLOR & ZAPPI, 2004). Os ramos são relativamente curtos, colunares e retos. O porte do cacto varia de arbóreo a arbustivo, existindo espécies anãs com 30 cm de altura, como *Pilosocereus machrisii* (ZAPPI, 1994).

Pilosocereus é o terceiro gênero mais representativo do Estado do Rio de Janeiro, sendo representado principalmente pelas espécies: *Pilosocereus ulei* (K. Schum.) Byles & Rowley, *Pilosocereus brasiliensis* (Britton & Rose) Backeberg e *P. arrabidae*, conhecido como facheiro da praia.

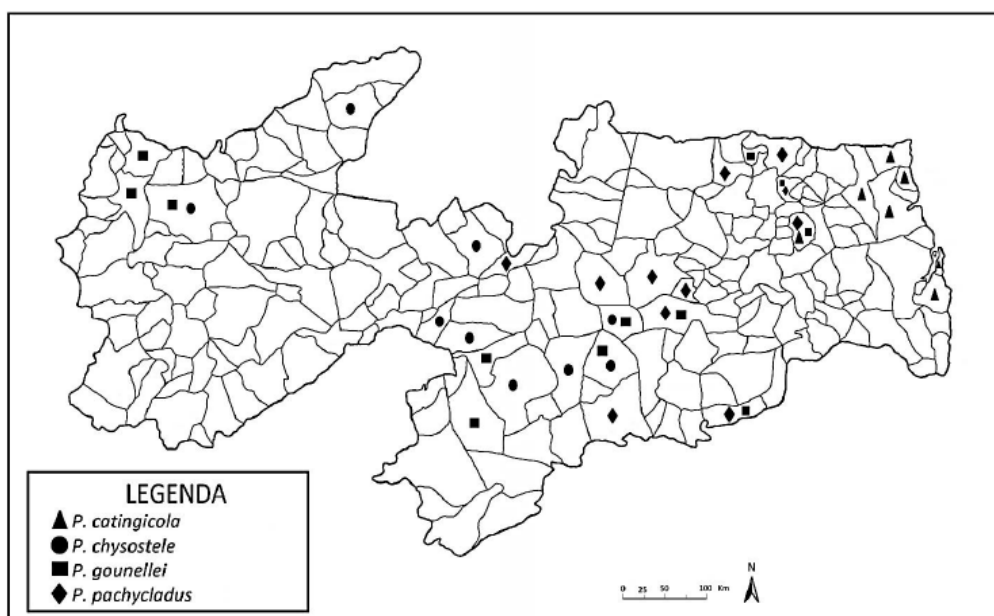
Lima (2012) relata que as espécies *Pilosocereus pachycladus*, *Pilosocereus gounellei* e *Cereus jamacaru* são as espécies mais amplamente distribuídas em todas as mesorregiões do estado da Paraíba (**Figura 3, Pág. 32**), sendo também consideradas como três das espécies mais utilizadas no nordeste brasileiro para fins na alimentação humana e animal, além do seu uso medicinal (SILVA, 2015).

No que tange a quimiotaxonomia, Meiado e colaboradores (2009) realizaram um screening fitoquímico na polpa dos frutos das espécies *Pilosocereus tuberculatus* (Werdermann) Byles & G.D.Rowley (caixacubri), *Pilosocereus pachycladus* (facheiro) e *Pilosocereus gounellei* (xique-xique). Não foi observada a presença de alcaloides na polpa dos frutos das espécies estudadas. *Pilosocereus tuberculatus* (Werdermann) Byles & G.D.Rowley e *Pilosocereus pachycladus* demonstraram possuir cumarinas, flavonoides, saponinas, taninos e triterpenos. Na polpa de xique-xique foram detectadas apenas cumarinas, flavonoides e traços de saponinas.

A atividade antioxidante do extrato dos frutos de *P. arrabidae* foi avaliada por Gonçalves e colaboradores (2015), onde foi possível detectar uma excelente atividade antirradicalar além da presença de flavonoides como quercetina, rutina, canferol e catequina. Nascimento e colaboradores (2010) consideraram discreto o valor nutricional de *P. gounellei* e *P. pachycladus*, porém podem tornar-se uma excelente matéria-prima

para produção de farinhas, de bolos, biscoitos e doces, o que faz dessas espécies uma nova fonte de renda para a população rural da Caatinga.

Figura 3. Distribuição geográfica do gênero *Pilosocereus* no estado da Paraíba (LIMA, 2012).



1.2.4 Considerações sobre a espécie *Pilosocereus gounellei* A. Weber ex K. Schum. Bly. ex Rowl.

A espécie *Pilosocereus gounellei*, conhecida popularmente como xique-xique, é endêmica do semiárido brasileiro, com ampla distribuição na caatinga e possui habitat desde a Bahia até o Maranhão (BARBOSA, 1998). Na Paraíba, o xique-xique é encontrado nas regiões do Brejo, Agreste, Cariri e Sertão do estado (LIMA, 2012) (**Figura 4, Pág. 34**). Ela se desenvolve em solos arenoso-pedregosos, afloramentos rochosos com altitude e rochas graníticas em até 800 m de altitude (BARBOSA, 1998).

No que tange a sua descrição botânica, *P. gounellei*, trata-se de um arbusto em torno de 1-1,3 m de altura, possui cladódios multiarticulados em ramificações candelabriformes, decumbentes; artículos cilíndricos, angulosos, medindo de 40-65 cm de comprimento com 10 costelas e aréola armada. Seus espinhos são rígidos, de coloração cinzenta a esverdeada e diferentes entre si em números e tamanhos. As flores são de hábito noturno, medindo 7 cm de comprimento, são isoladas, sésseis, inseridas nas aréolas e protegidas por tricomas sedosos; Seu perianto é infundibiliforme, alvo-esverdeado e o tubo tem 4,5 cm, filetes curtos, inseridos no perianto e antera subglobosa. O seu fruto succulento do tipo baga com 3-6 x 4-6 cm, subglobosa, deiscente lateralmente. O epicarpo é glabro, purpúreo e sua polpa funicular é mucilagínosa, purpúrea. Suas sementes medem 2 mm de comprimento possui formato de obovoide a cordiforme e estão expostas no fruto maduro (LIMA, 2012).

Araújo e colaboradores (2010) citam a utilização de *Pilosocereus gounellei*, xique-xique, como planta forrageira, já Cavalcante e Rezende (2013) citam que toda a planta é queimada e utilizada como alimento para rebanhos bovinos, ovinos e caprinos em época de seca e escassez de alimentos.

Na alimentação humana, o miolo dos cladódios pode ser consumido cozido ou assado, sendo empregado também na produção de farinhas, biscoitos, bolos e doces (ALMEIDA *et al.* 2007; LUCENA *et al.* 2013). Além disso, o xique-xique é utilizado como planta ornamental. Seu espinho é usado, no estado da Paraíba, para a confecção de renda e também como protetor contra o mal olhado (LUCENA *et al.*, 2012; SILVA, 2015) (**Quadro 2, Pág. 35**).

Os frutos de *P. gounellei* são considerados pouco calóricos, com quantidade discreta de flavonoides em sua composição, considerada uma fruta ácida por possuir um

pH em torno de 4,5 o que lhe atribui a redução no desenvolvimento de microorganismos (LUCENA *et al.*, 2013).

Na medicina popular, o macerado das raízes de *P. gounellei* é utilizado no tratamento de infecções do trato urinário e no combate da inflamação da próstata (ROQUE *et al.*, 2010, AGRA *et al.*, 2008); já o miolo dos cladódios é utilizado no tratamento de gastrite (LUCENA *et al.*, 2012). Além disso, o xique-xique é citado no tratamento de icterícia, infecção renal, no tratamento de ferimentos e também possui atividade hipoglicemiante (SILVA, 2015).

No que tange a constituição química da espécie, Meiado e colaboradores (2009) citaram a presença de cumarinas, flavonoides e traços de saponinas e Fernandes (2013) isolou e purificou uma feofitina (13²-hidroxi-(13²-S)-feofitina **a**) e um alcaloide (Ácido benzóico 11a-isoquinolínico), substância inédita na literatura (**Quadro 3, Pág. 36**).

Figura 04. *Pilosocereus gounellei* em seu habitat.

Fonte: <http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/79882/1/XIQUE-XIQUE.pdf> (Acessado em 17/01/2016)



Quadro 2. Categoria de uso da espécie *Pilosocereus gounellei* A. Weber ex K. Schum. Bly. ex Rowl. Adaptação (LUCENA et al, 2015)

Nome científico	Nome Popular	Categorias de uso	Parte usada	Utilização	Finalidades diversas
<i>Pilosocereus gounellei</i> A. Weber ex K. Schum. Bly. ex Rowl.	Xique-xique	Alimento	Fruto	<i>In natura</i>	
			Miolo (polpa)	Assado ou cozido	
		Bioindicação	Flor	Indica chuva	
		Construção	Toda a planta	Cerca viva	
		Forragem	Fruto, galhos, ramificações e/ou toda a planta.	<i>In natura</i> cortada ou queimada cortada ou queimada.	Alimentação de animais (pássaros e rebanhos: bovino, ovino e caprino).
			Miolo	Cortado	
		Medicinal	“Baba” (parênquima aquífero)	Passa no local afetado	Para retirar espinhos da pele
			Fruto	<i>In natura</i>	Prisão de ventre
			Miolo (polpa)	Passa no local afetado	Para retirar espinhos da pele
		Ornamental e sombra	Toda a planta	Para jardins e quintais	
		Veterinário	“Baba”	Coloca nas feridas do animal	
			Miolo (polpa)	Coloca na garganta do animal	Para desengasgar e má digestão.

Quadro 3. Substâncias isoladas da espécie *P. gounellei* por Fernandes (2013).

Estrutura Química	Nome químico
	<p>13²-hidroxi-(13²-S)-feofitina a</p>
	<p>Ácido benzóico 11a-isoquinolínico</p>

1.2.5 Considerações sobre a atividade de agentes antioxidantes

Os agentes oxidantes, como os radicais livres e espécies reativas de oxigênio (ERO's) podem causar danos ao DNA ou oxidar lipídios e proteínas. Eles são responsáveis, em grande parte, pelo envelhecimento e por doenças degenerativas associadas ao envelhecimento, como câncer, doenças cardiovasculares, catarata, declínio do sistema imune e disfunções cerebrais (ATOUI *et al.*, 2005).

A produção de radicais livres é controlada nos seres vivos por diversos compostos antioxidantes, que podem ter origem endógena, por exemplo, superóxido dismutase, ou ser oriundo da dieta alimentar e outras fontes, como os tocoferóis (vitamina E), ácido ascórbico (vitamina C), polifenóis, selênio e carotenoides (VALKO *et al.*, 2004).

Em geral, denominam-se antioxidantes as substâncias que em concentrações baixas, comparadas ao substrato oxidável, retardam significativamente ou inibem a oxidação do substrato. Os radicais formados a partir de antioxidantes não são reativos para propagar a reação em cadeia, sendo neutralizados por reação com outro radical, formando produtos estáveis ou podem ser reciclados por outro antioxidante (ATOUI *et al.*, 2005; VALKO *et al.*, 2004).

Os agentes antioxidantes são capazes de estabilizar ou desativar os radicais livres antes que ataquem os alvos biológicos nas células. A vitamina E é um grupo de compostos antioxidantes lipossolúveis, entre os quais o α -tocoferol é a forma mais ativa, que atua no bloqueio de reações em cadeia da peroxidação lipídica, através do sequestro do radical peroxila. Entre as muitas funções fisiológicas da vitamina C, cita-se seu alto poder antioxidante de reciclar a vitamina E no processo de peroxidação lipídica das membranas e lipoproteínas (SOUSA *et al.*, 2007).

As plantas, de um modo geral, possuem um complexo vegetal com variadas classes de metabolitos secundários e diversos constituintes químicos, dentre os quais pode-se destacar os compostos fenólicos que enquadram-se em diversas categorias como: fenóis simples, ácidos fenólicos (derivados de ácidos benzóico e cinâmico), cumarinas, flavonoides, taninos condensados e hidrolisáveis; e lignanas. Os compostos fenólicos vêm recebendo bastante atenção por inibirem a peroxidação lipídica e a lipooxigenase, esta atividade deve-se principalmente às suas propriedades redutoras e devido à ressonância do anel aromático presente na estrutura destas substâncias (SOUSA *et al.*, 2007).

Gonçalves e colaboradores (2015) avaliaram a atividade antioxidante dos extratos dos frutos de *Pilosocereus arrabidaei* e puderam observar um alto teor de flavonoides em sua constituição. A excelente atividade antioxidante do extrato Acetato de etila dos frutos de *P. arrabidaei* foi atribuída à presenças de flavonoides, constituintes majoritários nesta amostra, destacando-se dentre eles a quercetina e o canferol.

Os agentes antioxidantes naturais são extremamente importantes para a proteção do corpo contra doenças ocasionadas por radicais livres e para retardar o progresso de doenças crônicas e degenerativas (GULCIN, *et al.*, 2003).

1.2.6 Considerações sobre a atividade antimicrobiana das plantas medicinais

As propriedades antimicrobianas de substâncias oriundas de plantas medicinais estão atribuídas à produção de metabólitos secundários bioativos como os óleos essenciais, terpenoides e substâncias fenólicas, que tiveram suas atividades metabólicas reconhecidas empiricamente durante séculos, porém atualmente são confirmadas cientificamente (DUARTE, 2006).

Diversos grupos de pesquisadores buscam comprovar cientificamente as atividades farmacológicas das plantas medicinais, orientados pelos seus usos na medicina popular. Por outro lado, os microrganismos que causam prejuízos à saúde humana estão se mostrando cada vez mais resistentes à maioria dos antimicrobianos já conhecidos, tornando-se desta forma, um incentivo à busca por novas substâncias potencialmente ativas de ocorrência natural. Espera-se a descoberta de compostos que atinjam as células-alvo, através de um mecanismo de ação diferente dos agentes antimicrobianos já conhecidos e que sejam ativos contra patógenos resistentes (DUARTE, 2006).

Atualmente não existe um consenso sobre o nível de inibição aceitável para produtos naturais quando comparados com antibióticos padrões. Alguns autores consideram somente resultados similares aos de antibióticos, enquanto outros consideram com um bom potencial antimicrobiano, níveis de inibições superiores.

Aligianis e colaboradores (2001) propuseram uma classificação para materiais vegetais com base nos resultados de CIM, considerando como: forte inibição - CIM até 500 µg/mL; inibição moderada – CIM entre 600 e 1500 µg/mL e como fraca inibição – CIM acima de 1600 µg/mL.

1.2.7 Validação de metodologias analíticas para controle de qualidade de matérias-primas vegetais

O controle de qualidade, através da padronização dos extratos vegetais, é o ponto chave para a produção de fitoterápicos com qualidade assegurada. Portanto, desenvolver e validar um método analítico para a quantificação e identificação de marcadores químicos torna-se uma etapa indispensável na cadeia produtiva do medicamento fitoterápico (MATIAS, 2009).

O processo de validação de metodologias analíticas é uma ferramenta utilizada para garantir a confiabilidade do método desenvolvido, através de estudos experimentais, de forma que as exigências da legislação sejam atendidas e a confiabilidade dos resultados obtidos seja assegurada. Portanto, em outras palavras, validar uma metodologia significa garantir os resultados esperados, obedecendo aos limites de tolerância, rigorosamente pré-estabelecidos pela legislação vigente do país. (BRASIL, 2003; VALENTINI, *et al.*, 2007).

A validação de metodologias analíticas para matérias-primas vegetais ou medicamentos fitoterápicos é realizada com base na concentração de uma substância, ou grupo de substâncias marcadoras presentes no analito (VALENTINI, *et al.*, 2007).

Segundo a RE 899, a análise de matérias-primas e princípios ativos se enquadra na categoria de testes I em que os ensaios preconizados são: especificidade, linearidade, limites de detecção e quantificação; precisão, exatidão e robustez.

A especificidade caracteriza-se pelo ensaio que verifica a capacidade de detectar um dado composto em presença de outros componentes, tais como impurezas ou produtos de degradação (BRASIL, 2003).

A linearidade é a habilidade que o método tem de produzir resultados que são diretamente proporcionais à concentração da substância em análise na amostra, dentro de uma variação determinada de cinco concentrações diferentes (BRASIL, 2003).

Os limites de detecção e quantificação são outros dois atributos da validação analítica. O primeiro refere-se a menor quantidade de uma substância presente em uma amostra que possa ser detectada, porém sem quantificá-la. O segundo está relacionado à menor quantidade de um composto presente em uma amostra que possa ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis (BRASIL, 2003).

A exatidão de um método analítico é a proximidade entre os resultados por ele obtidos comparados ao valor verdadeiro, aplicando-se a metodologia analítica proposta

na análise de uma substância de pureza conhecida (padrão de referência) (BRASIL, 2003).

A precisão é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla originada de uma mesma amostra. Este ensaio se divide em repetibilidade (precisão intra-corrída), que consiste na concordância entre os resultados em um mesmo dia por um mesmo analista e em precisão intermediária (precisão inter-corrídas), que se refere a concordância entre os resultados do mesmo laboratório, obtidos em dias diferentes, com analistas diferentes e/ou equipamentos diferentes (BRASIL, 2003).

A robustez do método é a medida da capacidade que o mesmo apresenta em se manter inalterável através de pequenas, mas deliberadas modificações em seus parâmetros (BRASIL, 2003).

1.2.8 β - sitosterol como marcador químico da espécie *Pilosocereus gounellei*

Segundo a Instrução Normativa N ° 4, de 18 de junho 2014, princípio ativo é a substância ou grupo delas, quimicamente caracterizadas, cuja ação farmacológica é responsável, total ou parcialmente, pelos efeitos terapêuticos do produto fitoterápico, já os marcadores químicos são constituintes quimicamente definidos, presentes na matéria-prima vegetal, destinados ao seu controle de qualidade e dos preparados intermediários e finais dos fitoterápicos (BRASIL, 2014). A grande diferença entre a definição de princípio ativo e a de marcadores é que o marcador é a substância escolhida para o vegetal, que pode ser determinada para atestar a qualidade do produto. Ao contrário dos medicamentos sintéticos, nos fitoterápicos, o marcador pode ser ou não o princípio ativo, assim, o marcador pode ser utilizado apenas para assegurar a qualidade da planta escolhida (BRASIL, 2014).

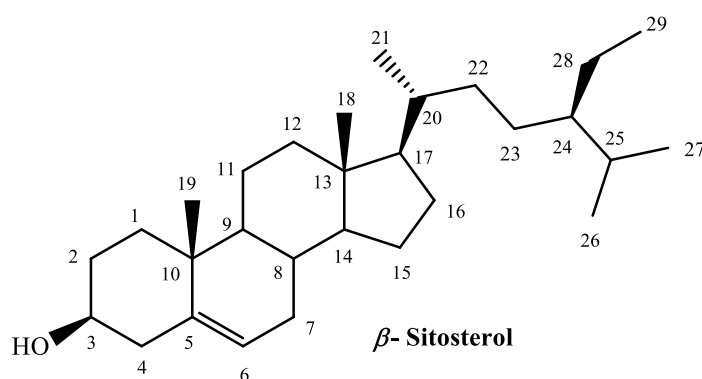
Os fitoesteóis, substâncias esteroidais oriundas de plantas, que podem ser classificados tanto como princípios ativos quanto como marcadores químicos, possuem um núcleo estrutural 1,2-ciclopentanoperidrofenantreno e fazem parte de uma gama de compostos naturais com ampla distribuição na natureza (DEWIK, 2009). Estes atuam reduzindo a absorção intestinal do colesterol (EUSSEN, 2010), como adjuvantes no tratamento de tuberculose pulmonar, artrite reumatoide, sinusite e rinite alérgica (GUPTA *et al.*, 2010). Park e colaboradores (2001) realizaram um estudo com o extrato de *Opuntia ficus-indica* em um modelo de inflamação crônica induzida em ratos e

constatarem uma boa atividade anti-inflamatória atribuída ao β -sitosterol, quando comparado ao controle e com a hidrocortisona. Esta foi a primeira evidência direta da ação anti-inflamatória do β -sitosterol no extrato da espécie.

Estudos fitoquímicos prévios da espécie *P. gounellei* identificaram a presença de flavonoides, alcanoides, feofitinas e fitoesteróis como o β -sitosterol, a mistura de β -sitosterol/ estigmasterol e a mistura do β -sitosterol/estigmasterol 3-O-D-glicopiranosídeo (MACIEL *et al.*, 2016).

Mediante a relevância da substância β -sitosterol, optou-se por desenvolver e validar um método analítico prático, rápido, exato e preciso, utilizando HPLC acoplado ao detector de espalhamento de luz, cuja principal vantagem é detectar, praticamente, todos os tipos de compostos químicos, independente de grupos cromóforos (URANO, 2012), para a determinação e quantificação do β -sitosterol (**Figura 5, Pág. 41**) no extrato etanólico bruto dos cladódios de *P. gounellei*.

Figura 5. Estrutura química do β -sitosterol



II Objetivos

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Realizar o estudo fitoquímico e padronização do extrato da espécie *P. gounellei*, contribuir com a quimiotaxonomia da família Cactaceae, bem como, avaliar a atividade antioxidante e antimicrobiana dos seus extratos.

2.2 Objetivos Específicos

1. Realizar o seu fracionamento cromatográfico e obter os extratos etanólicos dos cladódios e raízes de *P. gounellei*;
2. Isolar e identificar constituintes químicos de *P. gounellei* a fim de conhecer o perfil de metabólitos secundários produzidos pela espécie;
3. Avaliar o teor de compostos fenólicos e analisar a atividade antioxidante dos extratos (cladódios, raízes, flores e frutos) e fração metanólica originada do extrato dos cladódios de *P. gounellei*;
4. Realizar uma triagem preliminar da atividade antimicrobiana dos extratos e fração metanólica de *P. gounellei*;
5. Desenvolver e validar metodologia analítica para a quantificação e identificação do marcador químico β - sitosterol por HPLC-ELSD;
6. Transferir conhecimentos científicos para as comunidades que não tenha acesso a pesquisa através da elaboração e distribuição da cartilha “Plantas medicinais seus riscos e benefícios”.

III Experimental

3 EXPERIMENTAL

3.1 Isolamento dos Constituintes Químicos de *Pilosocereus gounellei*

3.1.1 Levantamento bibliográfico

O levantamento bibliográfico para a realizações desta pesquisa foi realizado, em todo decorrer do estudo no Chemical Abstracts, Biological Abstracts, SciFinder, bem como pesquisas na Internet e em anais de eventos nacionais e internacionais.

3.1.2 Coleta do material botânico

A espécie, *P. gounellei*, foi coletada no município de Boa Vista –PB (Brasil) em novembro de 2010 e sua identificação botânica foi realizada pelo Prof. Dr. Leonardo Pessoa Felix (DF/CCAUFPPB). Uma exsicata foi depositada, sob o código 15437, no Herbário Prof. Jaime Coelho de Moraes do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal da Paraíba (CCA/UFPB).

3.1.3 Procedimentos cromatográficos para isolamento dos constituintes químicos de *P. gounellei*

Os experimentos relativos ao isolamento dos constituintes químicos de *P. gounellei* foram realizados no Laboratório de Fitoquímica Prof. Dr. Raimundo Braz Filho (IPeFarM/UFPB) e no laboratório de prospecção fitoquímica (Labiofito/UFRPE).

3.1.3.1 Procedimentos cromatográficos

Os procedimentos adotados para o isolamento e purificação dos constituintes químicos foram cromatografia em coluna, CCDP e CLAE.

As cromatografias em coluna foram desenvolvidas utilizando-se como fase estacionária sílica gel 60 (Merck) 7734 (partículas com 0,063-0,2 mm, 70-230 mesh), sílica flash (0,04-0,0063 mm, 230- 400 mesh), Amberlite Xad-2 ou Sephadex LH-20 (Merck), tendo como suportes colunas de vidro cilíndricas com dimensões variando de acordo com a quantidade de amostra a ser cromatografada.

A cromatografia líquida de alta eficiência foi desenvolvida em um cromatógrafo de bomba binária (LC-6AD), detector de arranjo diodos SPD-M20A (Shimadzu) e injetor Rheodyne (7125) com loop 20 µL para coluna analítica e loop de 500µL para coluna semi-preparativa, utilizou-se uma coluna Luna C-18 100A (250 x 4.6mm x 5 µm, Phenomenex), uma coluna semi-preparative Luna C-18 (250 x 21.20 mm x 5 µm, Phenomenex) e filtros de membrana (0.45 µm -Supleco®).

Os solventes comerciais P.A. hexano, clorofórmio, diclorometano, acetato de etila e metanol foram utilizados como fase móvel nas cromatografias em coluna e utilizou-se metanol grau HPLC (Tedia®) e água ultra-pura Millipore® MilliQ, para a cromatografia em CLAE-DAD.

Para a análise e reunião das frações obtidas pelos processos cromatográficos foi adotada a Cromatografia em Camada Delgada Analítica (CCDA).

As substâncias em análise foram evidenciadas pelo uso de radiação ultravioleta nos comprimentos de onda de 254 e 366 nm e impregnação das placas em cubas de vidro saturadas por vapores de iodo, bem como reagentes específicos para alcaloides (Dragendorff), esteroides (Liebermann-Burchard) e flavonoides (NP).

3.1.4 Caracterização estrutural dos constituintes químicos

A caracterização estrutural dos constituintes químicos isolados de *P. gounellei* foi realizada por análise dos espectros de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (¹H) e Carbono (¹³C), utilizando técnicas uni e bidimensionais (COSY, HMQC, HMBC e NOESY), obtidos pelos espectrômetros Bruker - 400MHz (*Strathclyde* Institute of Pharmacy and Biomedical Sciences – SIPBS -University of Strathclyde) e Bruker – 200 e 500 MHz (Nucal-UFPB), além de Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas e rotação específica $[\alpha]_D^{25^\circ}$.

Os solventes deuterados utilizados para solubilizar as substâncias e obter seus espectros foram: CDCl₃, MeOH, C₅D₅N e DMSO-d₆.

3.2 Obtenção, fracionamento dos extratos e isolamento dos constituintes químicos de *Pilosocereus gounellei*

3.2.1 Processamento da planta

Os materiais botânicos coletados (cladódios, flores, frutos e raízes) foram desidratados em estufa com ar circulante a 40 °C durante 72 horas. Em seguida, o material seco foi pulverizado em moinho mecânico fornecendo seus respectivos pós. Os pós das raízes, cladódios, flores e frutos, foram submetidos a uma maceração exaustiva por 72h, com EtOH. As soluções extrativas obtidas foram evaporadas em rotaevaporador, fornecendo: 237,13 g do EEB dos cladódios; 47,00 g do EEB das raízes; 130,00g do EEB das flores e 225,00 g do EEB frutos (**Esquema 1, Pág. 50**).

3.2.2 Processamento cromatográfico dos cladódios de *P. gounellei*

Uma alíquota de 10,00 g do EEB dos cladódios de *P. gounellei* foi submetida a uma filtração rápida com sílica gel e eluída com hexano, clorofórmio e metanol, sozinhos ou em misturas binárias, fornecendo seis frações (**Esquema 2, Pág. 51**). A fração clorofórmica (8,00 g) foi submetida a uma cromatografia em uma coluna filtrante com Sílica gel 60 eluída com Hex, CH₂Cl₂ e MeOH resultando seis subfrações. As subfrações Hex:CH₂Cl₂ (3:7), CH₂Cl₂ e CH₂Cl₂:MeOH (9:1) foram reunidas e denominadas de Fração A. A fração A (2,90 g) (**Esquema 2, Pág. 51**) foi submetida a uma cromatografia em coluna seguindo a metodologia adotada para o processo cromatográfico anterior, obtendo-se 160 frações, que foram reunidas em 11 grupos de acordo com suas semelhanças por CCDA. O grupo 35/38 (6,00 mg), apresentou-se em forma de cristais incolores, sendo codificada como **Pg-1** (**Esquema 02, Pág. 51**). O grupo 54/59 (65,00 mg), apresentou-se como cristais, sendo denominado de **Pg-2** e a fração 121/150 (1,72 g) formou um precipitado branco em forma de pó, e recebeu o código de **Pg-3** (**Esquema 02, Pág. 52**).

Uma porção de 132,00 g do EEB dos cladódios de *P. gounellei* foi submetida a uma cromatografia em coluna com amberlite Xad-2 e eluída com H₂O, MeOH, Hex, AcOEt e Acetona, sozinhos ou em misturas binárias. A fração MeOH (9,00 g) foi submetida a sucessivas cromatografias em coluna com Sephadex- LH20, eluídas com uma solução de MeOH e CH₂Cl₂, resultando em 20 frações. As frações 10 (15,00 mg) e

12 (12,00 mg), foram comparadas por CCDA, mostrando-se puras e diferentes entre si, sendo denominadas de **Pg-4** e de **Pg-5**, respectivamente (**Esquema 3, Pág. 52**).

A fração hexânica do Xad (8,90 g) (**Esquema 3, Pág.52**) foi submetida a uma filtração rápida, em sílica gel 60, e eluída com Hex, CH₂Cl₂ and MeOH. A fração hexânica, originada desta filtração (**Esquema 4, Pág.53**), foi cromatografada em sílica flash e eluída com Hex, AcOEt e MeOH, sozinhos ou em misturas binárias, originando a subfração 28/33 (92,30 mg), que foi purificada através de uma cromatografia em camada delgada preparativa, eluída com Hex:EtOAc (80:20), e a faixa 2 mostrou-se pura levando ao composto **Pg-6** (10,20 mg) (**Esquema 4, Pág. 53**).

A fração Hex:CH₂Cl₂ (1:1) (**Esquema 4, Pág. 53**), foi cromatografada em sílica gel, seguindo a metodologia descrita anteriormente e eluída com Hex, AcOEt e MeOH, sozinhos ou em misturas binárias, de onde foram obtidas 20 frações, reunidas por CCDA, em 4 grupos. O grupo 13/15 apresentou-se puro em forma de cristais brancos, denominado de **Pg-7** (3,51 g) (**Esquema 4, Pág. 53**).

3.2.3 Processamento cromatográfico das raízes de *P. gounellei*

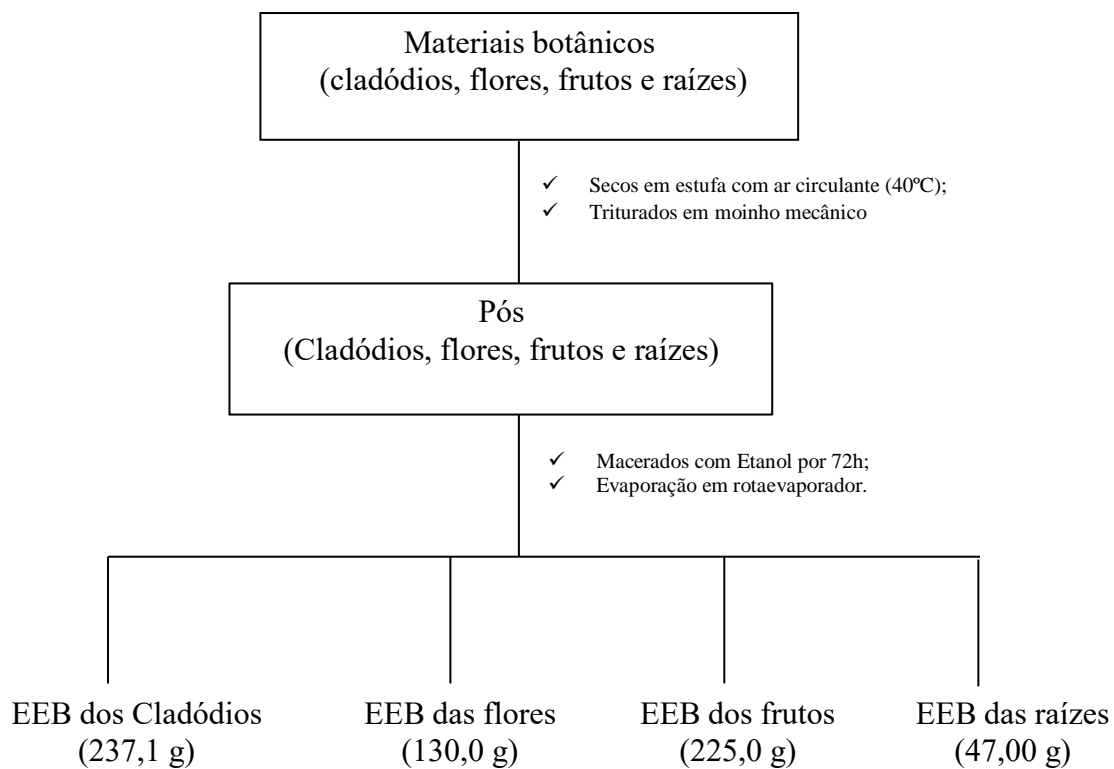
Uma amostra de 27,00 g do EEB das raízes de *P. gounellei* foi submetida a uma marcha para alcaloides seguindo a metodologia descrita por Souza & Silva (2006) (**Esquema 5, Pág. 54**).

A fração clorofórmica ácida (3,40 g) foi submetida a uma cromatografia em coluna de sílica gel 60, eluída com Hex, AcOEt e MeOH, originando 160 frações de 20 mL cada, que foram concentradas em rotaevaporador e reunidas por CCDA em 6 grupos, obedecendo suas semelhanças. O grupo 88/144 foi posteriormente submetido à cromatografia em CLAE-DAD, por 15 min, utilizando uma coluna semi-preparativa Luna C-18 (250 x 21.20 mm x 5 µm, Phenomenex) e adotando como fase móvel MeOH/ H₂O-Milli-Q, em gradiente de concentração crescente com MeOH de 50 a 100% (**Esquema 6, Pág 55**). O pico em 7,5 min foi recolhido e seco em N₂, após concentrado, este pico foi submetido a uma CCDA em vários sistemas de solventes, exibindo um bom grau de pureza, originando a substância codificada como **Pg-8** (8,00 mg), substância essa descrita pela primeira vez na literatura (**Esquema 6, Pág. 55; Figura 06, Pág. 55**).

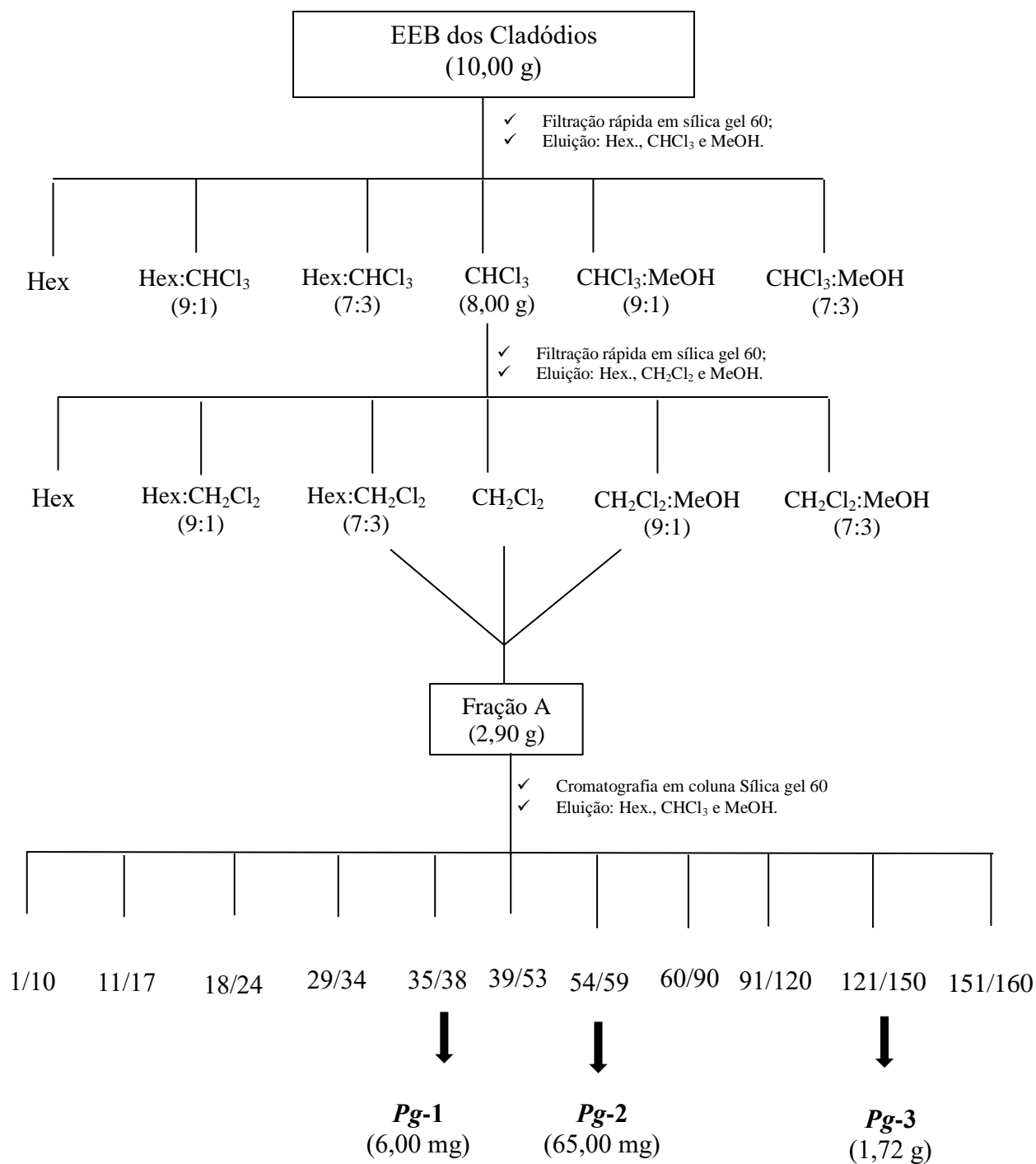
Uma alíquota de 20,00 g do EEB das raízes foi solubilizada em água, originando um sobrenadante e um precipitado de 5,00 g. Uma parte deste precipitado (2,50 g) foi

submetido a uma filtração em Sephadex-LH-20, com MeOH e CHCl_3 (**Esquema 7, Pág. 56**), obtendo as frações que foram unidas, seguindo metodologia descrita anteriormente e a subfração 06/10 mostrou-se pura e recebeu o código de **Pg-9** (10,00 mg) (**Esquema 7, Pág. 56**). Os 2,50 g remanescentes foram cromatografados em sílica gel 60, eluídos com Hex., AcOEt e MeOH, originando a fração 05/07, que mostrou-se igual a **Pg-2** (8,00 mg) (**Esquema 7, Pág. 56**).

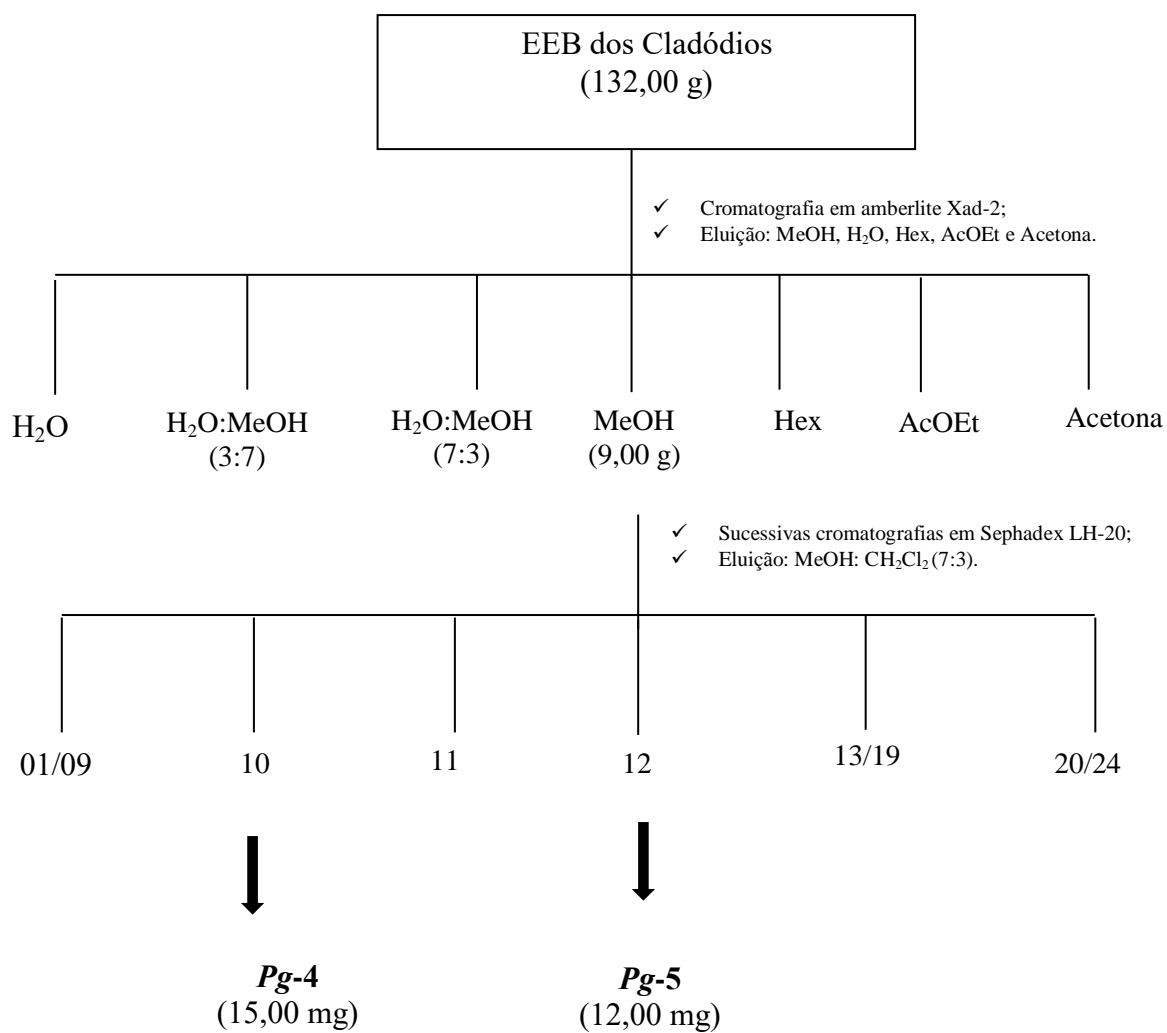
Esquema 1. Obtenção dos extratos etanólicos brutos dos cladódios, flores, frutos e raízes de *Pilosocereus gounellei*



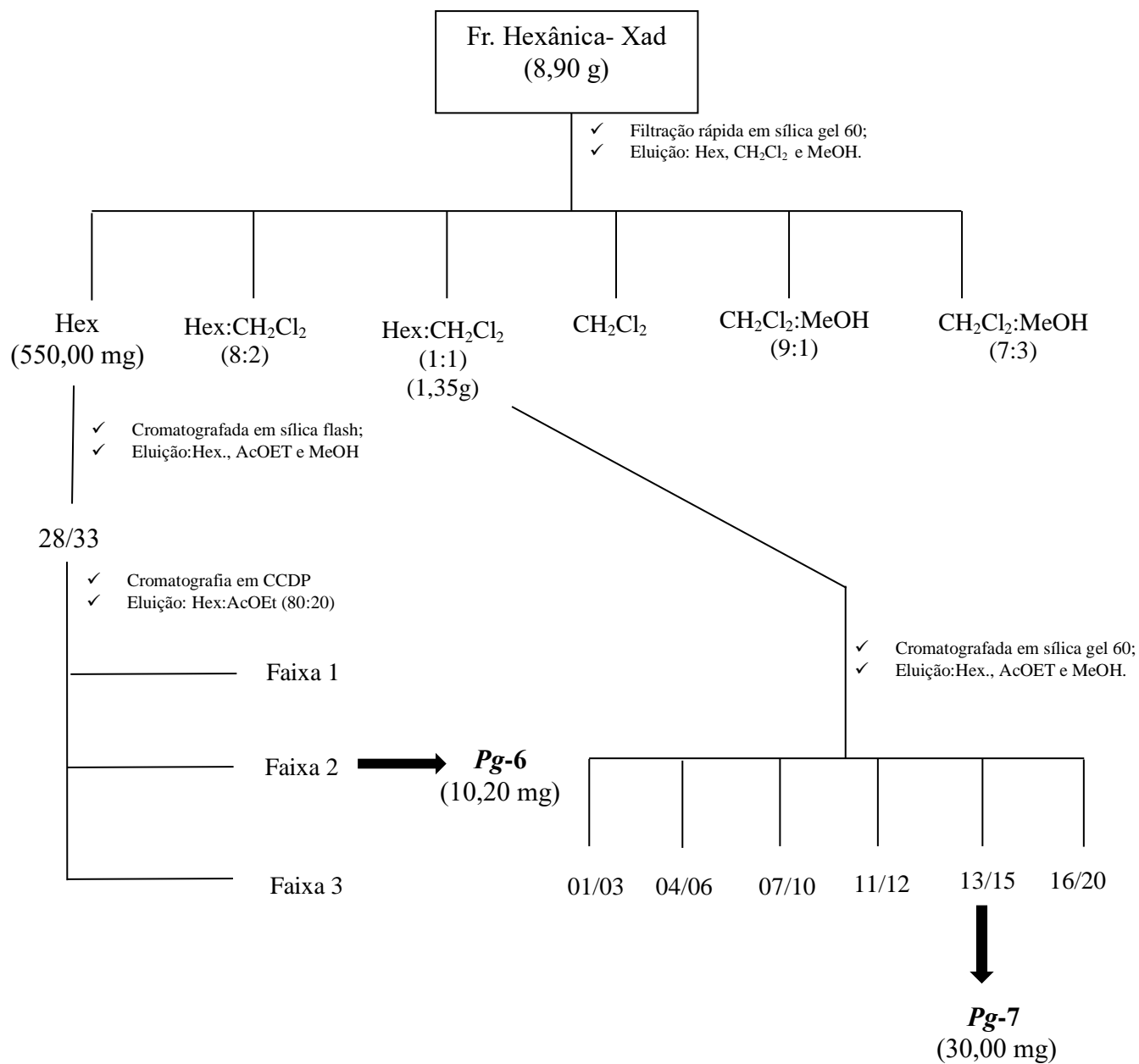
Esquema 2. Primeiro fracionamento cromatográfico do EEB dos cladódios de *Pilosocereus gounellei*



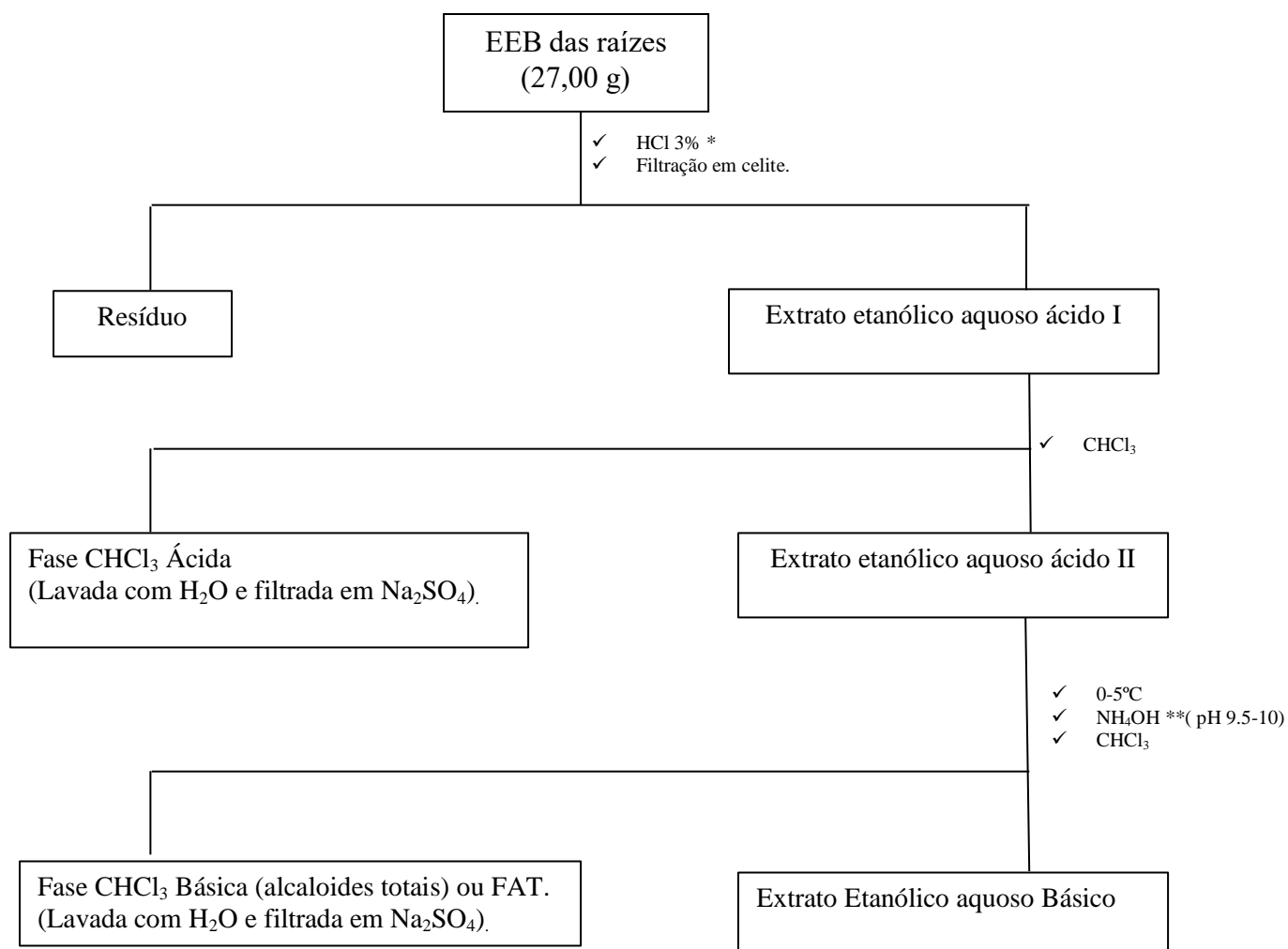
Esquema 3. Segundo fracionamento cromatográfico do EEB dos cladódios de *Pilosocereus gounellei*



Esquema 4. Fracionamento cromatográfico da fração hexânica obtida através da cromatografia realizada com Xad-2 do EEB dos cladódios de *Pilosocereus gounellei*



Esquema 5. Rota laboratorial para extração dos alcaloides do EEB das raízes de *Pilosocereus gounellei*



* Utiliza-se ácido para formar os sais de alcaloides que não serão extraídos por clorofórmio.

**NH₄OH é utilizado para quebrar o sal de alcaloide, possibilitando assim a extração dos alcaloides livres por clorofórmio.

Esquema 6. Fracionamento cromatográfico da fração clorofórmica ácida obtida através do EEB das raízes de *Pilosocereus gounellei*

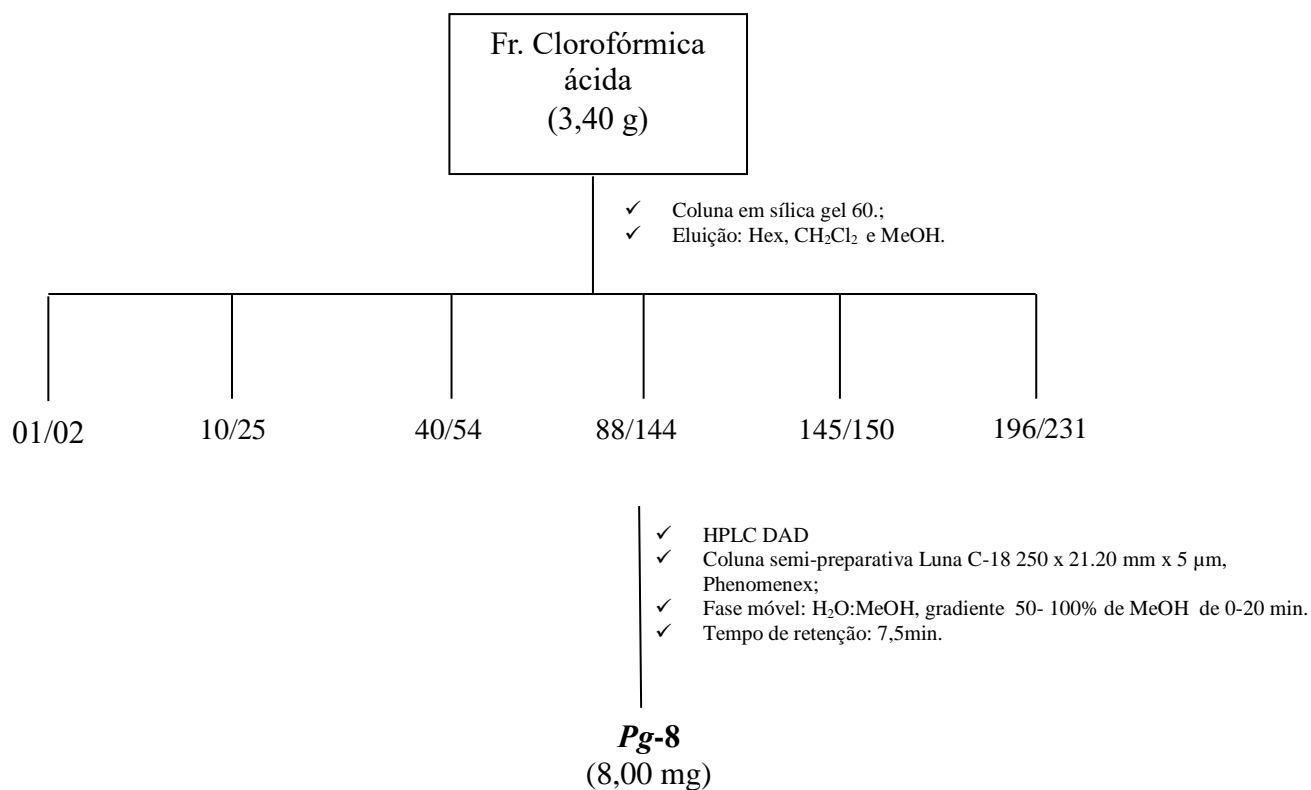
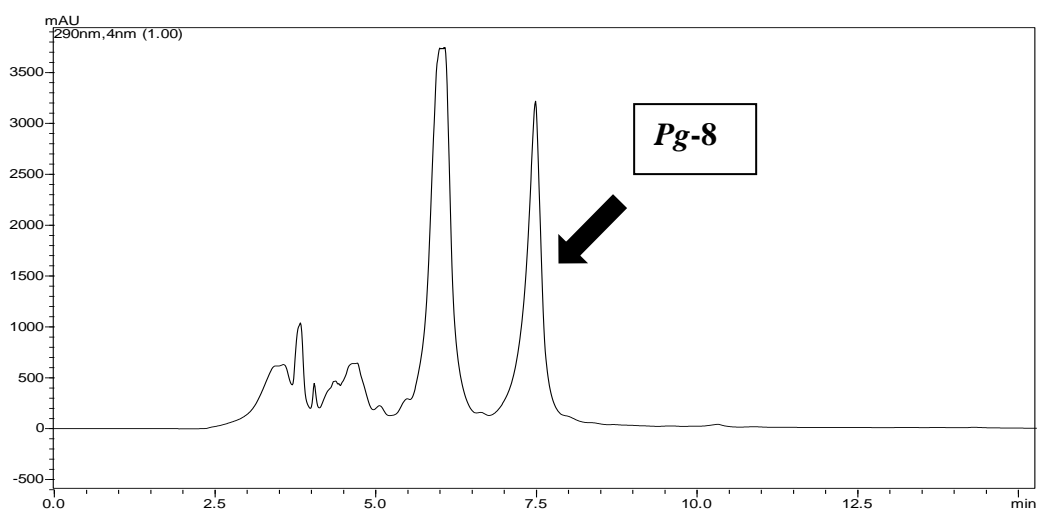
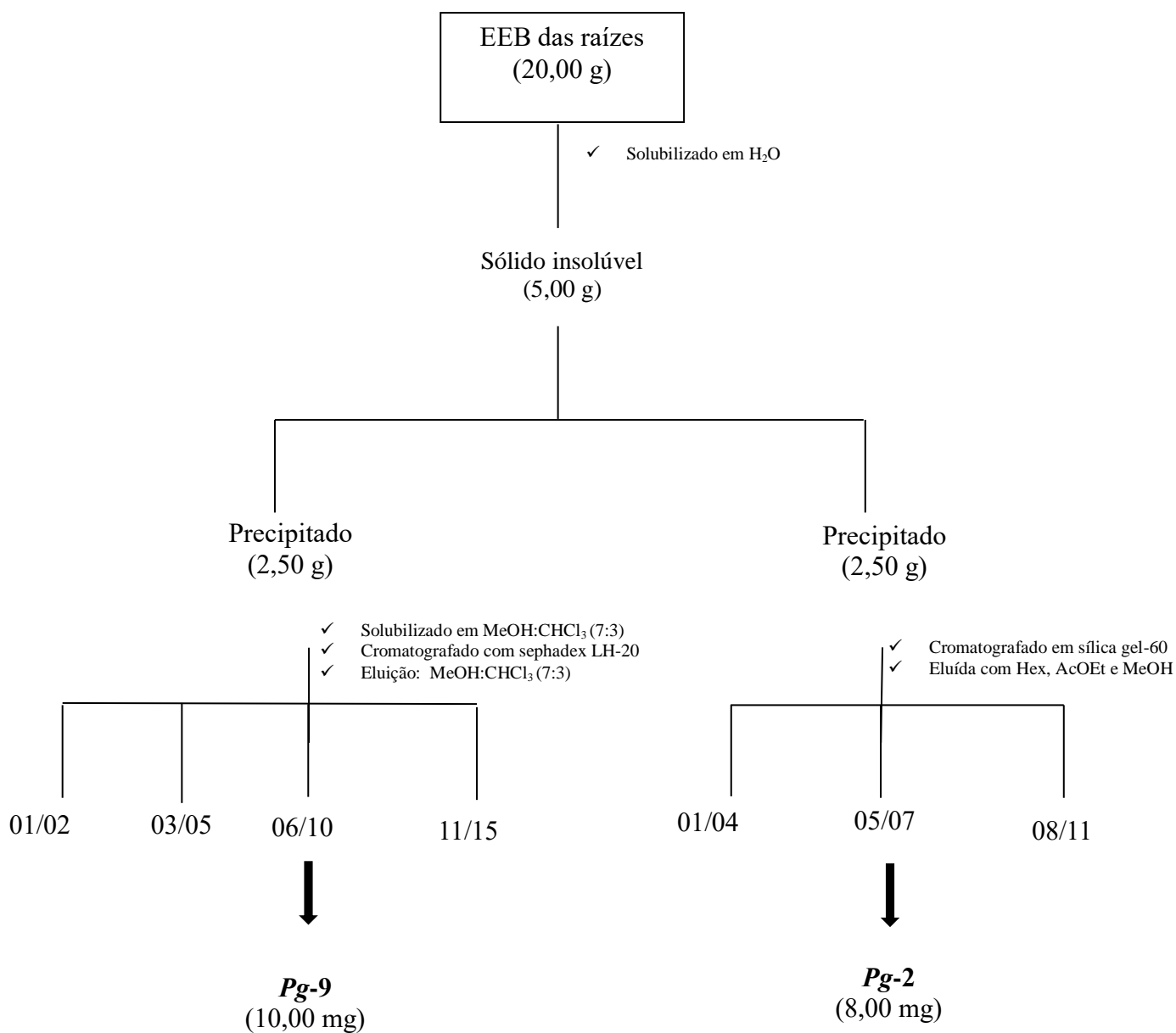


Figura 6: CLAE-DAD do grupo 88/44 da fração clorofórmica ácida obtida através do EEB das raízes de *Pilosocereus gounellei*



Esquema 7. Segundo fracionamento cromatográfico do EEB das raízes de *Pilosocereus gounellei*



3.3 Quantificação e validação de metodologia analítica para o β -Sitosterol, isolado dos cladódios de *Pilosocereus gounellei*, utilizando cromatografia líquida de alta eficiência com detector de espalhamento de luz

A quantificação e validação da metodologia analítica para o β -Sitosterol, isolado dos cladódios de *Pilosocereus gounellei*, utilizando cromatografia líquida de alta eficiência com detector de espalhamento de luz, foram realizadas no LABIOFITO (UFRPE) sob a supervisão da Profa. Dra. Tânia Maria Sarmiento da Silva.

3.3.1 Solventes e padrão utilizados

Foram utilizados como solventes MeOH grau HPLC (Tedia[®]) e Água ultrapura Milli-Q (Millipore[®]) para as análises realizadas no cromatógrafo de alta eficiência acoplado ao detector de espalhamento de luz (HPLC-ELSD).

O padrão β - sitosterol (97%) foi adquirido da Sigma-Aldrich.

3.3.2 Instrumentação e condições cromatográficas

Os experimentos para a quantificação e validação da metodologia analítica do β -sitosterol foram realizados no cromatógrafo HPLC- Shimadzu Prominence LC-20AT com detector de dispersão de Luz por evaporação - ELSD (Alltech Associates, USA), auto injetor SIL-20AC, forno CTO-20A e um degaseificador online DGU-20A5.

Para as análises cromatográficas foi utilizada uma coluna analítica Phenomenex[®] Luna C-18 (150mm x 4,6mm x 5 μ m.). A eluição cromatográfica ocorreu de modo isocrático com MeOH, com fluxo de 1 mL/min. A temperatura do forno foi mantida em 40°C e o volume de injeção de 10 μ L. A temperatura do *drift tube* foi ajustada em 70°C e o fluxo de Nitrogênio gasoso foi de 2 mL/min.

Todas as amostras foram sonicadas (Unic 1600A, Unique) antes de serem utilizadas e as análises foram avaliadas pelo software LabSolution.

3.3.3 Preparo de soluções

Para o preparo da solução estoque do padrão β -Sitosterol, foi pesada quantidade apropriada do padrão que foi dissolvida em MeOH, com posterior sonicação por 30

min. Esta solução foi filtrada e o volume final foi ajustado com MeOH, obtendo uma solução estoque de β -Sitosterol com uma concentração final de 500 $\mu\text{g/mL}$.

Foram preparadas cinco concentrações diferentes, através de diluição da solução estoque do padrão β -Sitosterol, que variaram de 15,6 – 125,0 $\mu\text{g/mL}$. Essas soluções foram utilizadas no ensaio da linearidade, em triplicata, para a construção da curva de calibração do β -Sitosterol.

As soluções do extrato dos cladódios de *P. gounellei* foram preparadas na concentração de 20 mg/mL , em triplicata, utilizando MeOH como solvente. Todas as soluções (padrão e extrato) foram filtrados em filtros de nylon (Whatman) 0,45 μm e as soluções estocadas a 4 ° C até serem analisadas.

3.3.4 Validação da metodologia analítica por HPLC-ELSD para determinação e quantificação do β -Sitosterol no EEB dos cladódios de *Pg*

O método analítico proposto para determinação e quantificação do β -Sitosterol no EEB dos cladódios de *P. gounellei* foi validado seguindo os termos preconizados pela Resolução brasileira RE 899/2003 (BRASIL, 2003) e ICH (2005), que determinam os ensaios necessários para a validação de matérias-primas farmacêuticas. Desta forma foram avaliados os seguintes parâmetros: linearidade, limites de detecção e quantificação, seletividade, exatidão, precisão e robustez.

A seletividade foi analisada verificando a capacidade do método em determinar o β -Sitosterol diante de interferentes da matriz (TELES, 2015 e BRASIL, 2003). Foram feitas injeções do padrão, da solução amostra do EEB dos cladódios de *Pg*, espécie em estudo, β -Sitosterol glicosilado/ estigmasterol- glicosilado e do estigmasterol, como padrões de estrutura semelhante, conforme preconizado na RE 899.

A linearidade foi determinada através da curva de calibração, plotada através da relação entre as áreas dos picos obtidos pelas concentrações do padrão do β -Sitosterol em $\mu\text{g/mL}$ de solução. A curva de calibração foi construída através de cinco diluições e analisada em triplicata: 15,6; 23,4; 31,3; 62,5 e 125,0 $\mu\text{g/mL}$. Os valores foram analisados através da regressão linear e do coeficiente de correlação, que segundo a ANVISA o critério mínimo aceitável é $(r^2) = 0,99$ (BRASIL, 2003; ICH, 2005).

Os limites de detecção e quantificação, que correspondem a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser detectada e determinada, respectivamente, com precisão e exatidão aceitáveis, foram determinados matematicamente a partir dos dados

da curva de calibração. O limite de detecção (LD) foi determinado a uma relação sinal-ruído (S/N) de 3,3, e o limite de quantificação (LQ) foi determinada a razão de S/N de 10,0 (BRASIL, 2003; ICH, 2005), podendo ser calculado conforme equações a seguir:

$$LD = \frac{DPax3}{IC}$$

$$LQ = \frac{DPax 10}{IC}$$

Onde: DPa é o desvio padrão do intercepto com o eixo do Y de e IC é a inclinação da curva de calibração (BRASIL, 2003).

O ensaio da precisão, realizado para avaliar a proximidade dos resultados em múltiplas análises, foi avaliado através de três concentrações diferentes do EEB dos cladódios de *Pg*, baixa (8,00 mg/mL), média (10,00 mg/mL) e alta (12,00 mg/mL), em triplicata, correspondendo à repetibilidade (intra-dia), e da repetição desta análise em um segundo dia, com um segundo analista, para determinar a precisão intermediária (inter-dia) (BRASIL, 2003; ICH, 2005).

A exatidão avaliou os resultados obtidos com o método proposto, comparando a proximidade dos resultados com um valor verdadeiro. No caso de matérias-primas, o ensaio é realizado com uma amostra de pureza conhecida, padrão do β -sitosterol, em concentrações baixa (23,4 μ g/mL), média (31,3 μ g/mL) e alta (62,5 μ g/mL), analisadas em triplicata.

A robustez foi analisada a partir de pequenas variações no método analítico desenvolvido, com alterações no fluxo da fase móvel, temperatura e mudança de coluna. Esse ensaio é necessário para avaliar pequenas e deliberadas variações de parâmetros analíticos, a fim de obter segurança durante o uso da metodologia na rotina e incluir as precauções necessárias para manter a confiabilidade do método (BRASIL, 2003; ICH, 2005).

3.4 Avaliação da atividade antioxidante dos Extratos Etanólicos Brutos dos cladódios, raízes, flores, frutos e fração metanólica do Xad-2 de *Pilosocereus gounellei*.

3.4.1 Fenólicos totais

A análise do teor dos fenólicos totais seguiu a metodologia de Gulcin e colaboradores (2004) com algumas modificações. Foi utilizado o reagente Folin-Ciocalteu e o ácido gálico como controle positivo. 20 µL das soluções etanólicas dos extratos e fração metanólica de *P. gounellei* (5 mg/mL), foram acondicionada em um tubo tipo Eppendorf de 1 mL, com 20 µL de Folin-Ciocalteu, agitado por 1 minuto e depois adicionado 60 µL de Na₂CO₃ (15%), agitados por 30 s. Nesta solução foram adicionados 900 µL de água destilada, obtendo-se concentração final de 100 µg/mL. A reação ocorreu no escuro por 2h utilizando placa de 96 poços para realizar a leitura no espectrofotômetro Elisa a 760 nm.

A concentração dos fenólicos totais foi determinada como mg equivalente de ácido gálico por g de amostra (mg EAG/g), a partir da equação da reta ($y = 0,0816x + 0,0882$; $R^2 = 0,992$), obtida através da construção da curva de calibração feita com o padrão ácido gálico (2,5 a 15,0 µg/mL), utilizando água ultrapura como branco e considerando o erro padrão da média (EPM).

3.4.2 Flavonas e flavonóis totais

Para a determinação deste ensaio seguiu-se a metodologia de Mihai e colaboradores (2012) com algumas modificações. Uma solução metanólica dos extratos e fração metanólica de *P. gounellei* foi preparada a 1 mg/mL. 400 µL de solução de cada amostra foram adicionados com 200 µL de uma solução de cloreto de alumínio a 2% em um balão volumétrico, sendo o volume final aferido com MeOH até 10 mL. A reação ocorreu no escuro em 30 min. Para a análise das amostras foi utilizada uma placa de 96 poços e a leitura foi realizada em espectrofotômetro Elisa a 425 nm, utilizando metanol como branco.

A análise ocorreu em triplicata e o teor foi determinado a partir da equação da reta ($y = 0,0016x + 0,0448$; $R^2 = 0,998$), obtida através da construção da curva de calibração da solução do padrão quercetina (1,0 a 40,0 µg/mL), expressa em equivalente

de mg de quercetina por grama de amostra (mg EQ/g), considerando o erro padrão da média (EPM).

3.4.3 DPPH' atividade sequestradora de radical

Para a avaliação da atividade antioxidante das amostras seguiu-se a metodologia de Silva e colaboradores (2006). As soluções das amostras (extratos e fração metanólica de *P. gounellei*) foram preparadas de 0,1 a 5,0 mg/mL.

Após análise preliminar, quantidades apropriadas das soluções das amostras, mais 450 µL da solução de DPPH' (23,6 mg/mL em EtOH) foram acondicionados em tubos tipo Eppendorf de 0,5 mL e este volume foi completado com EtOH e em seguida homogeneizado, obtendo-se concentrações finais de (2,5-200,0 µg/mL). Como controle, adicionou-se 50 µL de EtOH e 450 µL de solução de DPPH em tubos tipo Eppendorf de 0,5 mL. Todas as amostras foram sonicadas por 30 min no escuro.

A análise das amostras foi feita em placas de 96 poços, utilizando EtOH como branco e a leitura foi realizada em espectrofotômetro Elisa à 517 nm. O ácido ascórbico foi utilizado como controle positivo e todas as soluções foram testadas em triplicata. O percentual de atividade antioxidante foi calculado Segundo a equação:

$$\% AA = 100 \times \frac{(Abs_{controle} - Abs_{amostra})}{Abs_{controle}}$$

Onde $A_{controle}$ é a absorbância do controle, contendo apenas a solução etanólica do radical DPPH', e $A_{amostra}$ é a absorbância do radical na presença do padrão ácido ascórbico.

O índice da atividade antioxidante (IAA) foi calculada de acordo com Scherer e Godoy (2009) de acordo com a equação abaixo:

$$IAA = \frac{\text{Concentração final do DPPH } (\mu\text{g.mL}^{-1})}{CE_{50}(\mu\text{g.mL}^{-1})}$$

Os valores do IAA abaixo de 0,5 indicam baixa atividade antioxidante, valores entre 0,5 e 1,0 indicam atividade moderada, valores entre 1,0 e 2,0 indicam a atividade forte e valores acima de 2,0 indicam atividade antioxidante muito forte.

A eficiência antirradicalar foi estabelecida utilizando a análise de regressão linear no intervalo de confiança de 95% ($p < 0,05$) obtido pelo programa estatístico GraphPad Prism 5.0 (DEMO). Os resultados foram expressos através da concentração da amostra necessária para eliminar 50% dos radicais DPPH disponíveis, mais ou menos o erro padrão médio ($CE_{50} \pm E.P.M.$).

3.4.4 Determinação da Atividade Antioxidante contra o cátion ABTS^{•+}

Para a determinação da atividade antioxidante dos extratos e fração metanólica de *P. gounellei* seguiu-se a metodologia descrita por Re (1999), utilizando trolox como padrão, um análogo da vitamina E solúvel em água. O cátion radical ABTS^{•+} foi preparado pela mistura de uma solução de ABTS (7,0 mM) com uma solução de persulfato de potássio (140,0 mM) em água destilada. A solução foi mantida ao abrigo da luz à temperatura ambiente durante um período de 12-16h antes do uso. Posteriormente, a solução de ABTS^{•+} foi diluída com etanol (1:100 v/v, aproximadamente) resultando em uma absorbância de $0,70 \pm 0,05$ UA no comprimento de onda 734 nm.

As concentrações das amostras foi de 0,1 a 1,0 mg/mL, com adição de 450 μ L de ABTS^{•+}, as concentrações finais das soluções foram de 2,5 a 100,0 μ g/mL. As amostras foram sonicadas por 6 min e ao abrigo da luz. A leitura foi realizada em espectrofotômetro Elisa a 734 nm. O percentual da atividade antioxidante foi calculado através da seguinte equação:

$$\% AA = 100 \times \frac{(Abs_{controle} - Abs_{amostra})}{Abs_{controle}}$$

Onde $A_{controle}$ é a absorbância do controle, contendo apenas a solução contendo o radical ABTS^{•+}, e $A_{amostra}$ é a absorbância do radical na presença do padrão trolox. A eficiência antirradicalar foi estabelecida utilizando a análise de regressão linear no intervalo de confiança de 95% ($p < 0,05$) obtido pelo programa estatístico GraphPad Prism 5.0 (DEMO). Os resultados foram expressos através da concentração da amostra necessária para eliminar 50% dos radicais DPPH disponíveis, mais ou menos o erro padrão médio ($CE_{50} \pm E.P.M.$).

3.5. Ensaios microbiológicos preliminares dos extratos e fração metanólica (Xad-2) de *P.gounellei*

Os ensaios microbiológicos foram realizados no laboratório LABIAL, sob a supervisão do Prof Dr. Fábio Correa Sampaio.

Para a realização dos ensaios foi seguida a metodologia descrita por Andrews (2001) com algumas modificações e adaptações, realizadas pela equipe do Prof. Fábio.

3.5.1 Preparação dos meios de cultura

Todos os meios de cultura foram homogeneizados e autoclavados, após sua preparação.

3.5.2 BHI líquido (caldo)

Para o preparo do meio, BHI caldo, foram misturados 7,4 g de meio BHI (Broth Heart Infusion) e misturado com 200 mL de água deionizada.

3.5.3 Preparação da solução salina

Para o preparo da solução salina foram misturados 0,9 g de NaCl e dissolvidos em 100 mL em água deionizada e em seguida autoclavado.

3.5.4 Cultivo de bactérias e fungo

As cepas utilizadas pertencem a coleção do laboratório LABIAL: *Streptococcus mutans* ATCC 25175; *Staphylococcus aureus* ATCC 15656; *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853; *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Candida albicans* ATCC 1106.

Para o cultivo das bactérias foram utilizados tubos de vidros esterilizados e misturou-se 0,6 mL (600 µL) do inóculo bacteriano/fúngico com 7 mL (7000 µL) de meio BHI (para bactérias) com 7 mL (7000 µL) de meio agar sabourand líquido (para fungos), em seguida os tubos foram agitados e homogeneizados no vortéx, depois levados a estufa a 37 °C por 24 horas, para bactérias e 48 horas para *Candida albicans*. O cultivo de *S. mutans* foi realizado com microaerofilia (método da vela).

3.5.5 Preparo das soluções mãe (SM) dos extratos e fração metanólica (Xad-2) de *P. gounellei*

As soluções mãe foram preparadas separadamente. As amostras (extratos etanólicos e fração metanólica (Xad-2) de *P. gounellei*) foram pesadas, em balança analítica, dentro de tubos tipo Falcon, em seguida misturada na mesma proporção (1:1) com uma solução, preparada previamente e autoclavada, de uma mistura de DMSO 10% com tween 80 (5%), na proporção de 1:1, fazendo com que as suas concentrações, depois de misturadas com as amostras, caia de 2,5% e 5%, respectivamente para ambos os diluentes. Os tubos em seguida foram homogeneizados no vortéx, sonicados e levados a uma estufa a 37°C, quando necessário.

3.5.6 Preparo das SM 1, SM 2 e SM 3

Para a **SM 1** foram misturados 1,5 mL de caldo BHI com 1,5 mL da SM das amostras, descrita anteriormente, ambos na mesma proporção (1:1) (v/v), obtendo um volume final de 3 mL (3.000µL) e um extrato na concentração de 500 g/mL.

Para a **SM 2** foram misturados 2,5 mL de caldo BHI com 0,5 mL da SM das amostras, na proporção (1:5) (v/v), obtendo um volume final de 3 mL (3.000µL) e um extrato na concentração de 167 µg/mL.

Para a **SM 3** foram misturados 4,5 mL de caldo BHI com 0,5 mL da SM das amostras, na proporção (1:9) (v/v), obtendo um volume final de 5 mL (5.000µL) e um extrato na concentração de 100 µg/mL.

3.5.7 Preparo do Inóculo bacteriano/fúngico para a realização do CIM

Após 24h de cultivo em estufa a 37°C, foi retirado 3 mL de cada tubo e colocado em tubos tipo Falcon. Em seguida, os tubos foram centrifugados por 10 a 15 min. removeu-se o sobrenadante e acrescentou-se ao tubo 240 µL + 4,8 mL de solução salina. Homogeneizando a mistura, e levando à estufa por 1 hora, agitando no vortéx a cada 15 minutos.

Após este descanso, em estufa, os tubos foram centrifugados novamente por 10 a 15 minutos, descartou-se o sobrenadante e acrescentou-se 2,4 mL de solução salina e

em seguida homogeneizou-se novamente no vortéx. Depois, uma alíquota de cada amostra foi levada para realizar a leitura no espectrofotômetro, aparelho OPTIMA, ajustando-se até um absorbância de 0,135 no comprimento de onda 640 nm, correspondendo assim a uma quantidade de microorganismos de 10^8 UFC/mL, equivalente a 0,5 da escala de McFarland.

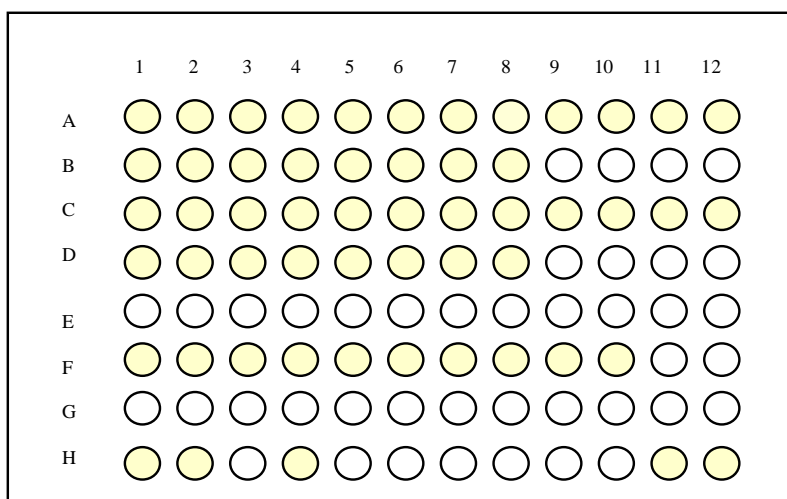
3.5.8 Preparação das microplacas

A preparação das microplacas foram realizadas em triplicata e todo o procedimento feito em capela de fluxo laminar e com vidrarias, ponteiros e meios de cultura previamente esterilizados. A capela para a realização do procedimento foi desinfetada com álcool 70° e os materiais utilizados, esterelizados com luz UV por 20 minutos.

As placas utilizadas foram de 96 poços em forma de U (**Figura 7, Pág. 66**), onde em cada poço foi obtido, ao término do experimento, um volume final de 100 µL. Também na mesma placa foi realizado o controle positivo com clorexidina e os controles negativos colocados na última linha horizontal.

As concentrações testadas foram de 400 µg/mL até 15 µg/mL (**Quadro 4, Pág. 66**), onde as quantidades de cada componente estão descritos no quadro seguinte:

Figura 7: Placa de 96 poços.



Quadro 4: Diluição para microplacas SM1: A1 até A7; SM2: A8 até A12 e SM3: B1 até B8.

Poços		Sol. Mãe	SM (µL)	Inóculo (µL)	Meio (µL)	Quantidade extrato/substância (µg)	Vol. final (mL)	Conc. final (µg/mL)*
A1	C1	1	80	20	-	40	0.1	400
A2	C2	1	70	20	10	35	0.1	350
A3	C3	1	60	20	20	30	0.1	300
A4	C4	1	50	20	30	25	0.1	250
A5	C5	1	40	20	40	20	0.1	200
A6	C6	1	30	20	50	15	0.1	150
A7	C7	1	20	20	60	10	0.1	100
A8	C8	2	55	20	25	9,2	0.1	91,85
A9	C9	2	50	20	30	8,4	0.1	83,5
A10	C10	2	45	20	35	7,5	0.1	75,15
A11	C11	2	40	20	40	6,7	0.1	66,8
A12	C12	2	35	20	45	5,6	0.1	58,45
B1	D1	3	50	20	30	5	0.1	50
B2	D2	3	45	20	35	4,5	0.1	45
B3	D3	3	40	20	40	4	0.1	40
B4	D4	3	35	20	45	3,5	0.1	35
B5	D5	3	30	20	50	3	0.1	30
B6	D6	3	25	20	55	2,5	0.1	25
B7	D7	3	20	20	60	2	0.1	20
B8	D8	3	15	20	65	1,5	0.1	15

Obs.: As concentrações nas SM (amostras) são:

SM1 (Solução Mãe 1): 1mL (1000 µL) com extrato na concentração de 500 µg/mL.

SM1 (Solução Mãe 2): 3 mL (3000 µL) com extrato na concentração de 167 µg/mL

SM1 (Solução Mãe 3): 5 mL (5000 µL) com extrato na concentração de 100 µg/mL

Após o preenchimento de todos os poços, as microplacas foram seladas com parafilme e incubadas a 37 °C por 24 horas ou 48 horas conforme o microrganismo.

3.5.9 Controle positivo da Clorexidina (CLX)

Foi colocado 59 µL de meio de cultivo em dez poços, em sequência na horizontal, esse controle é realizado na fileira F, em seguida, mais 59 µL de CLX foi adicionada nos mesmos poços, fazendo agora uma diluição seriada, e ao final do último poço desprezou-se 59 µL. Depois foi colocado 21 µL do meio de cultivo nos poços da horizontal até a última diluição realizada. E por fim, adicionou-se 20 µL do inóculo bacteriano/fúngico em todos os poços da horizontal, onde foi colocado a CLX, em seguida as placas foram incubadas a 37°C em estufa.

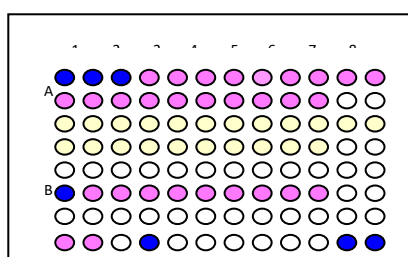
3.5.10 Leitura visual das microplacas com resazurina

Após o período de incubação, adiciona-se em cada orifício 35 µL de resazurina 0,01 %, preparada em solução aquosa (10 mg, diluída em 80 mL), misturando o conteúdo no poço, levando a um agitador.

A mudança de cor nos orifícios (de azul para rosa) (**Figura 08, Pág. 67**) é interpretada como crescimento do microrganismo, logo este mostra-se resistente às amostras testadas.

Para determinar se houve inibição ou morte do microrganismo, foi realizado o plaqueamento das concentrações, onde foram verificadas a coloração azul nos poços.

Figura 8: Placa de 96 poços com resazurina.



3.5.11 Plaqueamento

Para realizar o plaqueamento, retirou-se 100 µL de todos os poços que permaneceram com a coloração azul, ou seja, que apresentou atividade antimicrobiana, e em seguida, essas alíquotas foram plaqueadas em ágar (BHI) (bactérias)/ágar sabourand (fungos) e incubados por 24 ou 48h em estufa a 37°C, e em seguida realizado a leitura para verificar se há presença de bactérias/fungos viáveis, determinando assim se a concentração das amostras, é inibitória (houve crescimento), ou bactericida (não houve crescimento).

IV RESULTADOS E DISCUSSÃO

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Identificação estrutural das substâncias isoladas de *Pilosocereus gounellei*

A caracterização estrutural das substâncias isoladas de *Pilosocereus gounellei* foi realizada por classes de metabólitos secundários de acordo com a seguinte ordem: esteroides, flavonoides, substância porfirínica e alcaloides.

4.1.1 Caracterização estrutural de *Pg-2*

A substância codificada como *Pg-2* foi isolada da Fração A, do EEB dos cladódios de *P. gounellei*, após ser submetida a uma cromatografia em coluna com sílica gel 60 e eluída com Hex, CH₂Cl₂ e MeOH. *Pg-2* apresentou-se em forma de cristais incolores bem definidos.

No espectro de RMN ¹H (**Figuras 9-11, Págs. 73- 74**) foi possível observar um envelope de absorções entre δ_H 0,67 e δ_H 2,32, condizentes com hidrogênios metílicos, metilênicos e metínicos, comuns em substâncias esteroidais e/ou triterpênicas (KOJIMA *et al.*, 1990), levando a sugerir que *Pg-2* pode pertencer a uma dessas classes de metabólitos secundários. Pôde-se observar também a presença de um multipeto em δ_H 3,52, condizente com próton oximetínico, que pode ser atribuído à posição H-3 (KOJIMA *et al.*, 1990) de *Pg-2*, além de um dubleto em δ_H 5,35, referente a hidrogênios olefínicos, na posição H-6 de fitoesteróis (KOJIMA *et al.*, 1990). O perfil das figuras 9, 10 e 11 (**Pág 73-74**), a análise dos dados espectrais e comparações com modelo da literatura (Mo-2), permitiram definir que *Pg-2*, trata-se do β - sitosterol (**Tabela 1, Pág. 72**).

O espectro de RMN ¹³C (**Figuras 12-13, Págs 75-76**) mostrou sinais para 29 átomos de carbono, ratificando que *Pg-2* possui um núcleo esteroidal. A absorção em δ_C 71,96 corroborou a presença do carbono oximetínico (C-3) e as absorções em δ_C 121,88 e δ_C 140,91 (**Figura 12, Pág. 75**) foram atribuídos aos carbonos olefínicos monohidrogenados em C-6, e C-5 de núcleos esteroidais (KOJIMA *et al.*, 1990). Na figura 12, pág 75, também foi possível visualizar seis sinais condizentes com metilas do núcleo esteroidal em: δ_C 19,55 (C-19), δ_C 12,01 (C-18), δ_C 18,93 (C-21), δ_C 12,13 (C-29), δ_C 19,77 (C-26) e δ_C 19,18 (C-27).

A análise dos dados espectrais de RMN ^1H e ^{13}C atrelados a comparações de dados da literatura, além de comparação com padrões em CCDA, permitiu confirmar que **Pg-2** tratava-se do β -sitosterol, substância esta isolada pela primeira vez na espécie *Pilosocereus gounellei* e já isolada em outras espécies da família Cactaceae

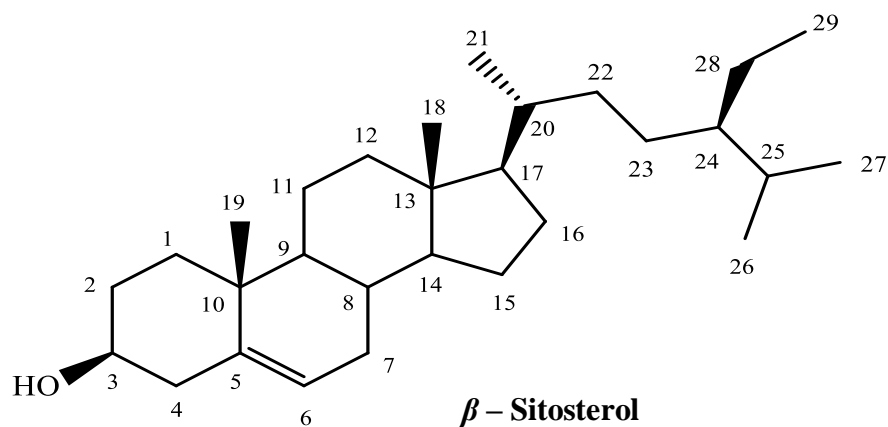
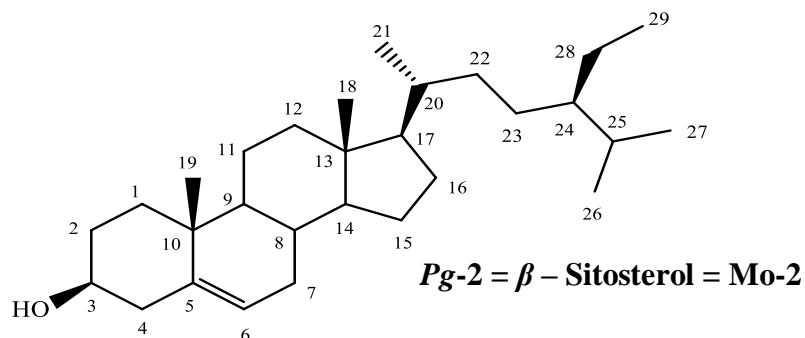


Tabela 1- Dados comparativos de RMN ^{13}C da substância *Pg-2* (δ , CDCl_3 , 50 MHz) com dados da literatura (*Mo-2*; δ , CDCl_3 , 100 MHz) (GOMES *et al.*, 2010).



	<i>Pg-2</i>		<i>Mo-2</i>	
	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	
1	37,40		37,20	
2	31,82		31,55	
3	71,96	3,52 (m)	71,68	3,47 (m)
4	42,46		42,20	
5	140,91	5,35 (d)	140,70	5,31 (d)
6	121,88		121,63	
7	32,06		31,82	
8	32,06		31,82	
9	50,30		50,06	
10	36,78		36,43	
11	21,23		21,02	
12	39,92		39,72	
13	42,29		42,25	
14	56,91		56,69	
15	24,45		24,25	
16	28,40		28,20	
17	56,20		55,99	
18	12,01	0,67 (s)	11,81	0,64 (s)
19	19,55	1,00 (s)	19,35	0,97 (s)
20	36,30	-	36,09	
21	18,93	-	18,73	
22	34,09	-	33,87	
23	26,21	-	25,99	
24	45,94	-	45,74	
25	29,31	-	29,06	
26	19,97	0,84 (d)	19,78	0,88 (d)
27	19,18	0,80 (d)	18,99	0,79 (d)
28	23,21	-	22,00	-
29	12,13	0,82 (t)	11,99	0,84 (t)

Figura 9 - Espectro de RMN ^1H (δ , CDCl_3 , 400 MHz) de Pg-2

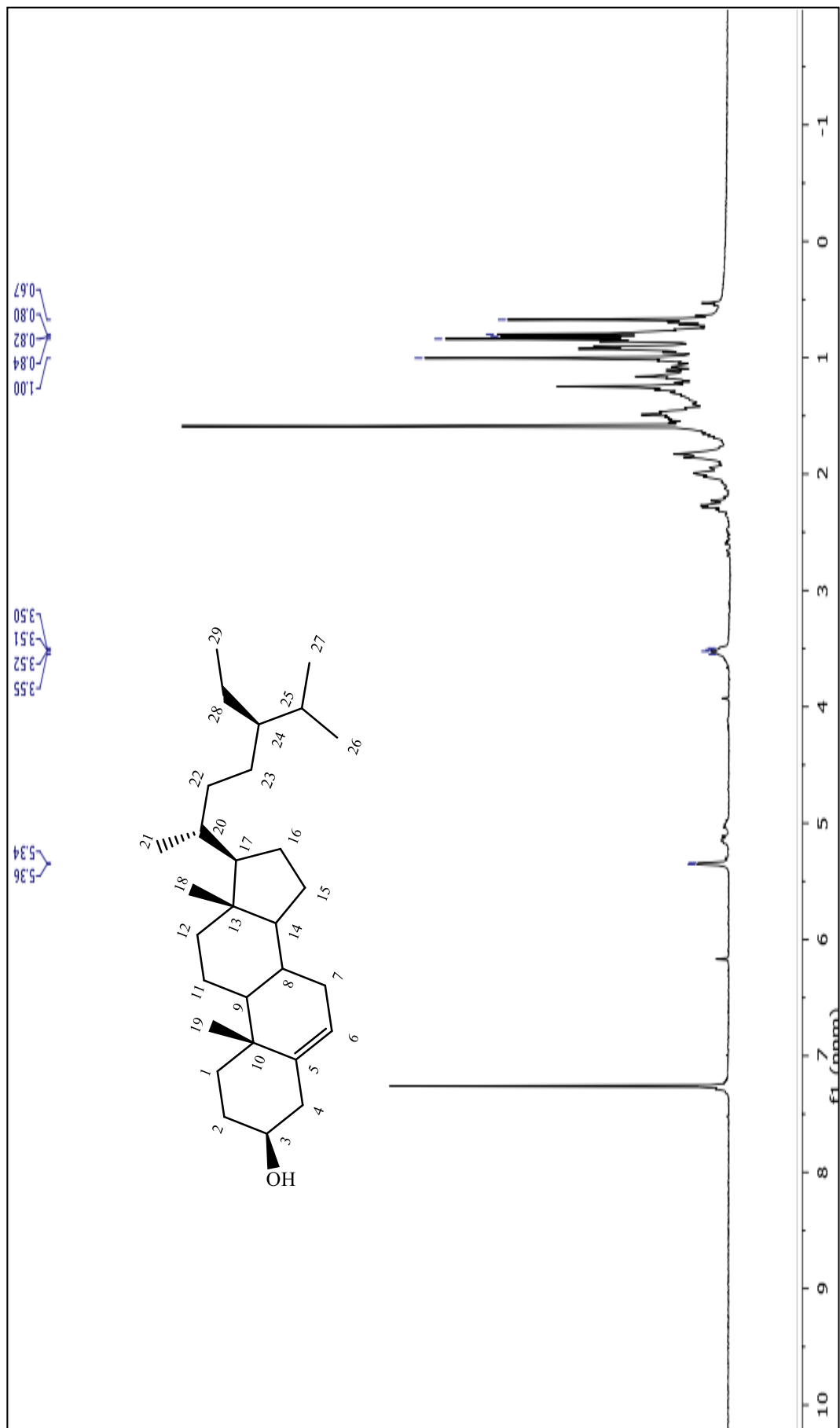


Figura 10- Expansão do espectro de RMN ^1H (δ , CDCl_3 , 400 MHz) de *Pg-2*

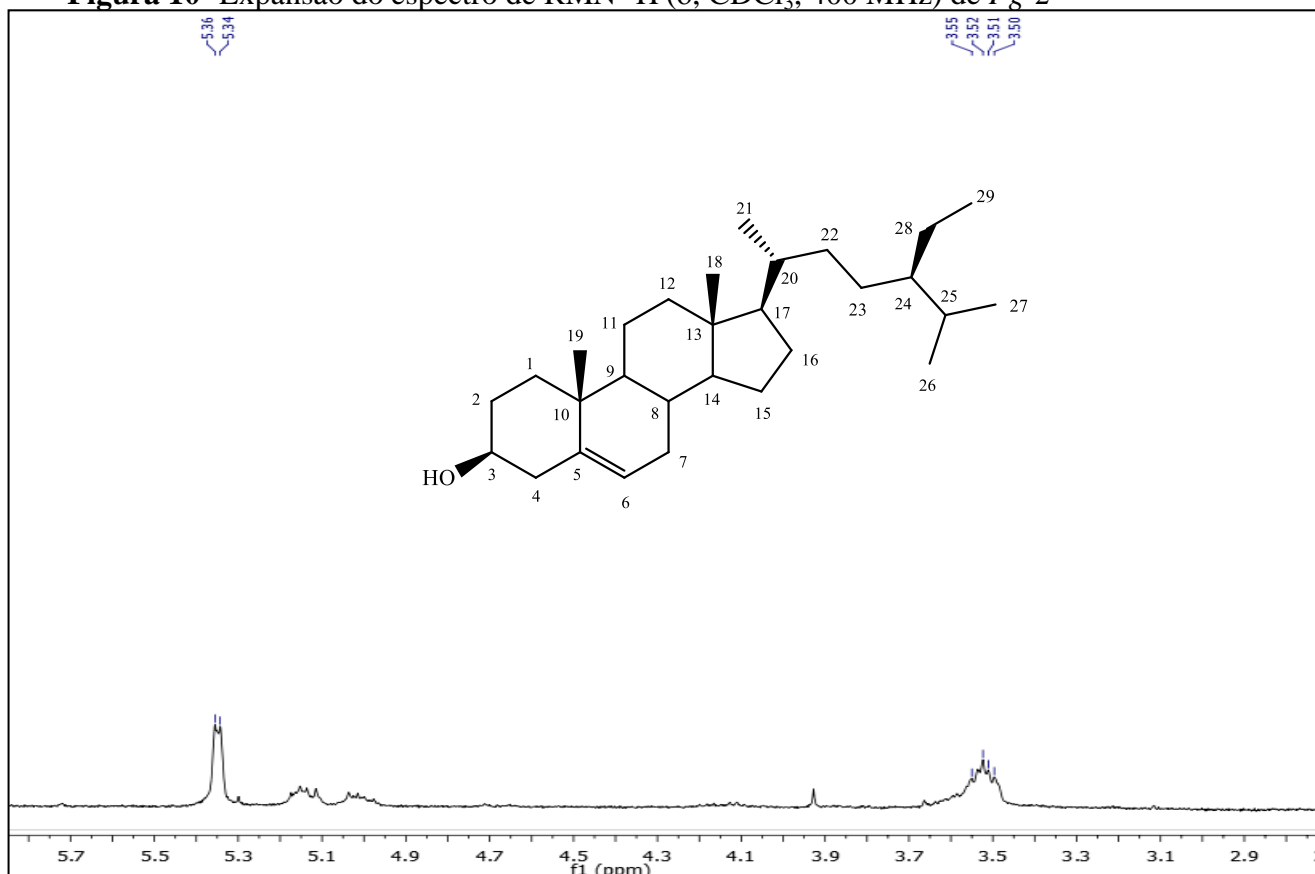


Figura 11- Expansão do espectro de RMN ^1H (δ , CDCl_3 , 400 MHz) de *Pg-2*

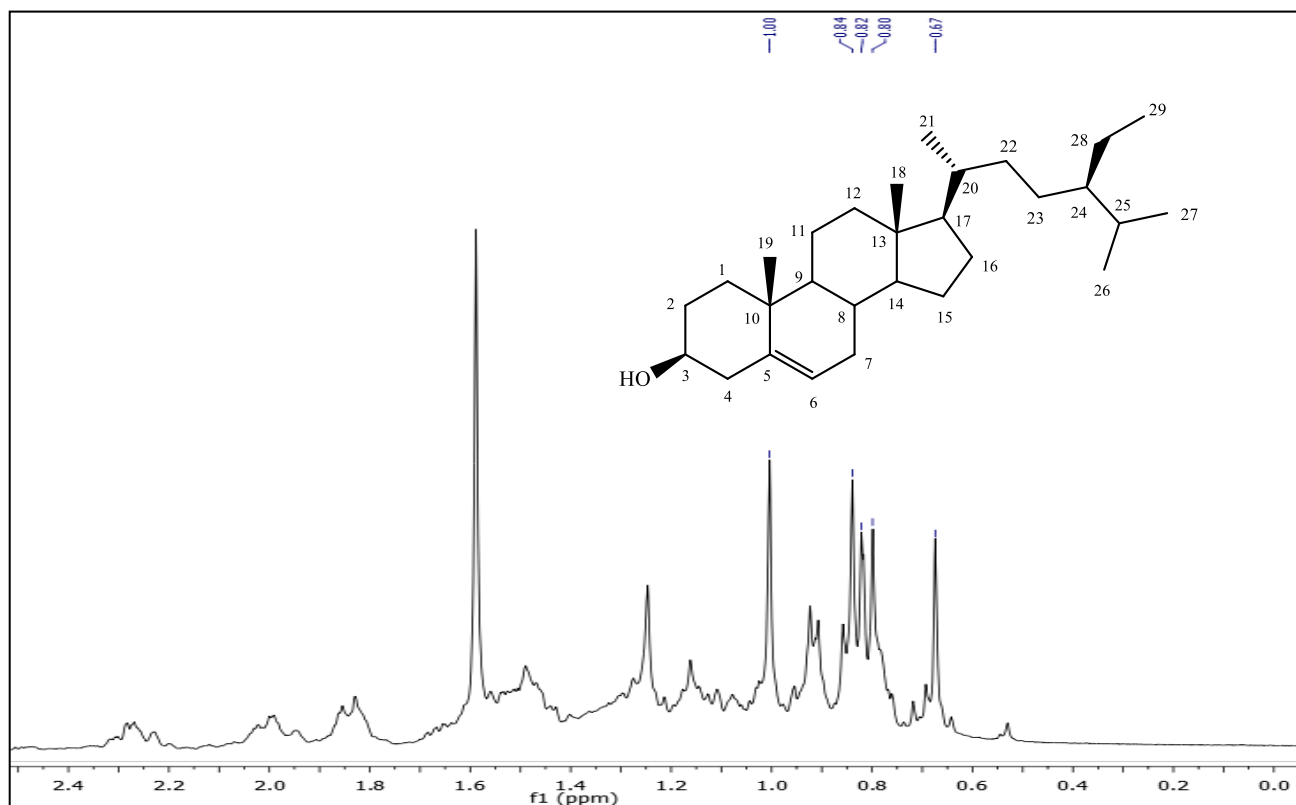


Figura 12 - Espectro de RMN ^{13}C , BB, (δ , CDCl_3 , 100 MHz) de Pg-2

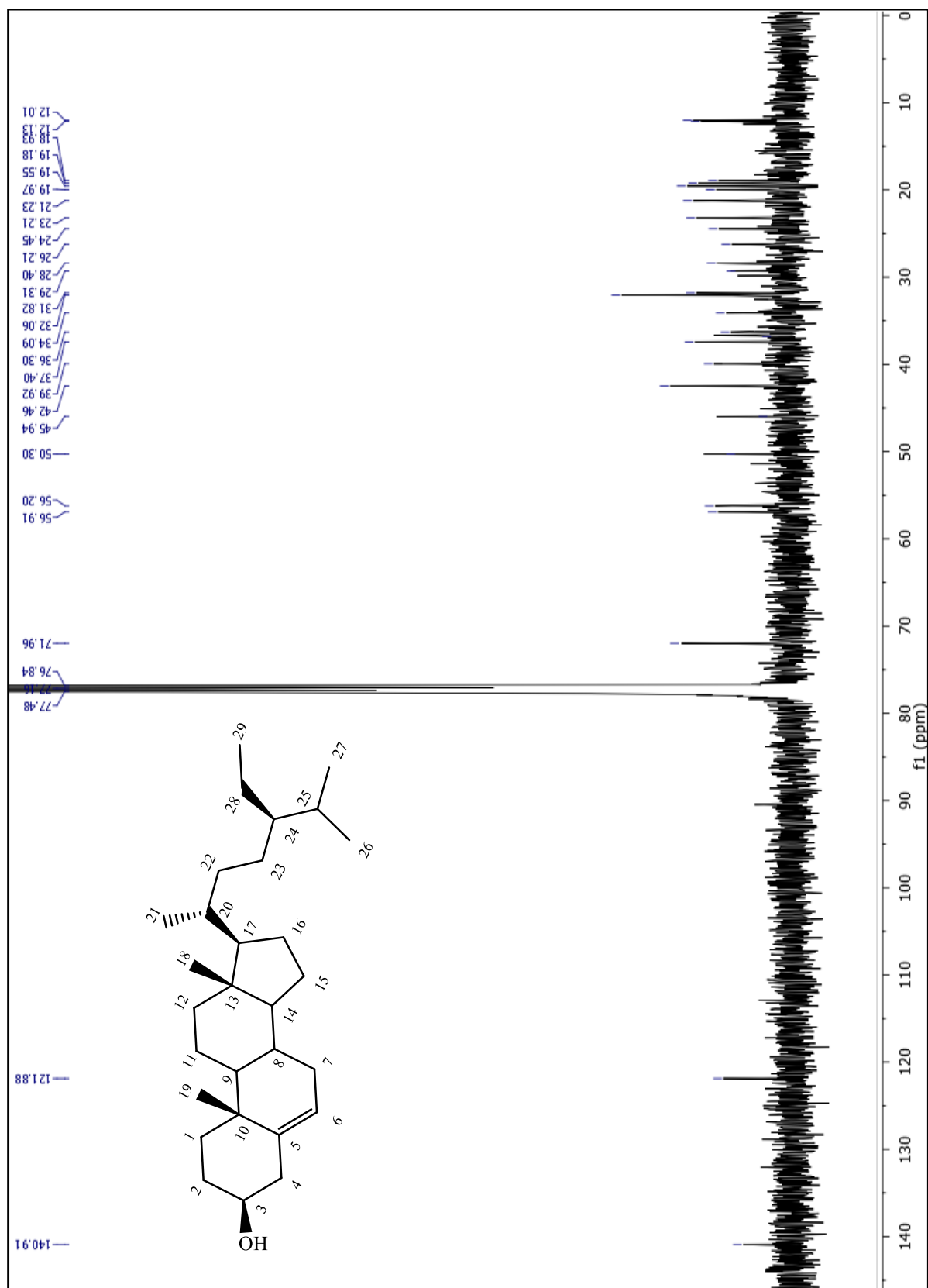
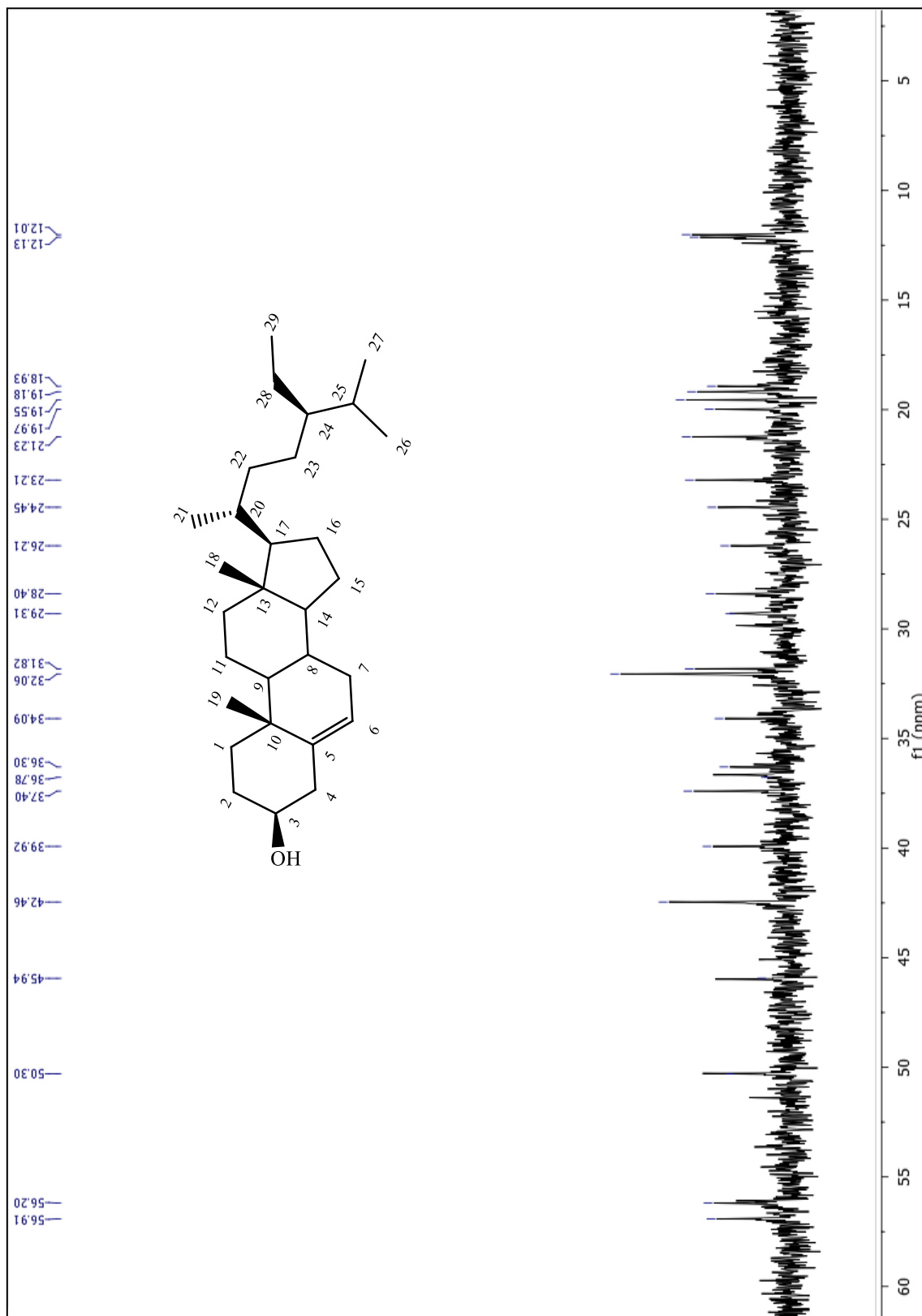


Figura 13- Expansão espectro de RMN ^{13}C , BB, (δ , CDCl_3 , 100 MHz) de *Pg-2*



4.1.2 Caracterização estrutural de *Pg-3*

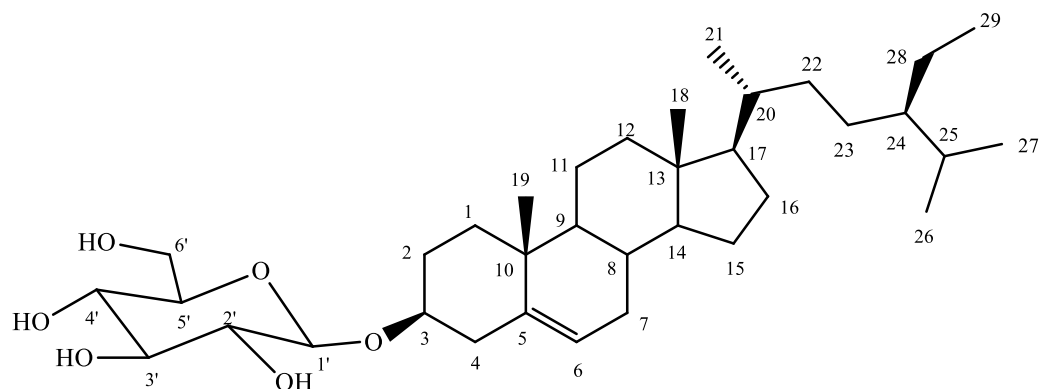
A substância codificada como *Pg-3* foi isolada da Fração A, do EEB dos cladódios de *P. gounellei*, após ser submetida a uma cromatografia em coluna com sílica gel 60 e eluída com Hex, CH₂Cl₂ e MeOH. *Pg-3* apresentou-se em forma de um pó branco amorfo.

No espectro de RMN ¹H de *Pg-3* (Figuras 14-15, Págs. 80-81) foi possível observar um envelope de absorções comuns a hidrogênios metílicos, metilênicos e metínicos de triterpenos e esteroides, semelhante à *Pg-2*; Observou-se também uma absorção em δ_H 5,65, referente a um hidrogênio olefínico da posição H-6, no entanto o sinal em δ_H 4,26 (H-3), correspondente ao hidrogênio oximetínico, apresentou-se menos protegido do que o H-3 de *Pg-2*, levando a sugerir que *Pg-3* possui uma unidade osídica ligada a este carbono. Esta sugestão foi fortalecida através das absorções entre δ_H 4,37 e δ_H 4,87 (Figura 15, Pág. 81), referentes a hidrogênios oximetínicos e oximetilênicos de unidade osídica, além de um dubleto em δ_H 5,36 ($J = 8,0$ Hz), característico de hidrogênio anomérico (H-1') de glicose ligada ao C-3 de esteroide (Tabela 2, Pág.79). A presença de dois duplo dubletos na região entre δ_H 5,52 e 5,37, referentes aos hidrogênios olefínicos, atribuídos às posições H-22 e H-23, característicos do estigmasterol levaram a sugerir que *Pg-3* tratava-se de uma mistura dos esteroides: sitosterol-3-*O*- β -D-glicopiranosídeo (*Pg-3 a*) e estigmasterol-3-*O*- β -D-glicopiranosídeo (*Pg-3 b*) (KOJIMA *et al.*, 1990).

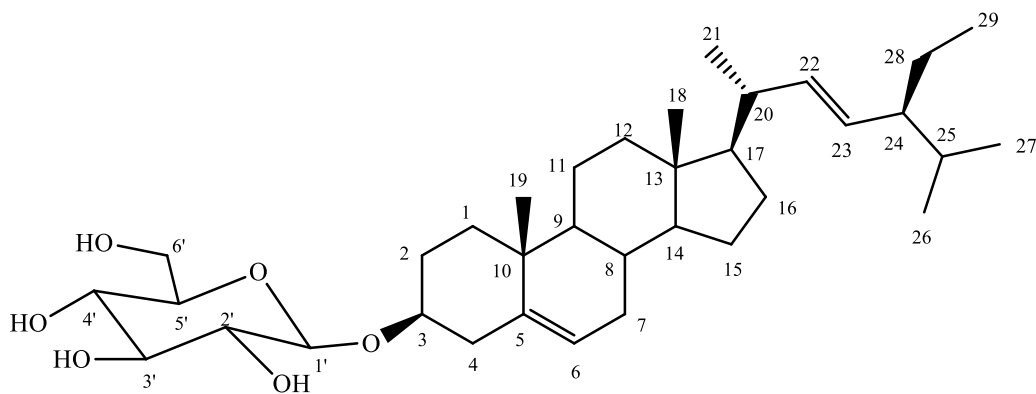
A proposta da mistura de esteroides glicosilados foi corroborada pelo espectro de RMN ¹³C (Figuras 16-17, Págs. 82-83) ao exibir sinais condizentes a dois núcleos esteroidais, além de seis sinais referentes à unidade osídica. As absorções em δ_C 138,90 e δ_C 129,40, de menor intensidade foram atribuídos aos carbonos olefínicos, monohidrogenados, C-22 e C-23, respectivamente, ratificando a presença do estigmasterol da molécula. A figura 16 (Pág. 82), ratificou a presença da unidade de glicose para a mistura de *Pg-3a* e *Pg-3b* ao exibir um sinal em δ_C 62,85 com intensidade para dois carbonos, que foram atribuídos aos carbonos oximetilênicos (C-6') e outros dois referentes aos carbonos anoméricos das duas unidades de glicose, em δ_C 102,58 (C-1').

As análises dos sinais dos espectros de RMN ¹H e ¹³C de *Pg-3* aliados a comparações com dados da literatura (Tabela 2, Pág.79), permitiram identificar *Pg-3 a*

como sitosterol-3-*O*- β -D-glicopiranosídeo e **Pg-3** como estigmasterol-3-*O*- β -D-glicopiranosídeo. Substâncias isoladas também como mistura, da espécie *Pilosocereus pachycladus* da família Cactaceae (FERNANDES *et al.*, 2013; MACIEL, *et al.*, 2016).



Sitosterol-3-*O*- β -D-glicopiranosídeo



Estigmasterol-3-*O*- β -D-glicopiranosídeo

Tabela 2: Dados comparativos da mistura *Pg-3a/ Pg-3b* (δ C₅D₅N, 200 e 50 MHz) com dados da literatura (δ C₅D₅N, 400 e 100 MHz), *Mo-3a e Mo-3b* (KOJIMA *et al.*, 1990).

<i>Pg-3 a</i>		<i>Pg-3b</i>		(Mo-3a) sitosterol-3-O-D- glicopiranosídeo		(Mo-3b) estigmasterol-3-O-β-D- glicopiranosídeo	
δ_H	δ_C	δ_H	δ_C	δ_H	δ_C	δ_H	δ_C
1			36,92		36,92		37,60
2			30,25		30,25		30,30
3	4,26 (m)	78,11	4,26 (m)	78,11	3,96 (m)	78,30	3,96 (m)
4		39,34		39,34		39,40	39,40
5	-	140,91	-	140,91		141,00	141,00
6	5,65 (d, J=3,0 Hz)	121,89	5,65 (d, J=3,0 Hz)	121,89	5,36 (m)	122,00	5,36 (m)
7		32,17		32,17		32,20	32,20
8		32,05		32,05		32,10	32,10
9		50,35		50,35		50,40	50,40
10	-	37,47	-	37,47		37,00	37,00
11		21,28		21,28		21,40	21,40
12		39,95		39,82		40,00	39,90
13	-	42,47	-	42,47		42,40	42,40
14		56,83		56,83		57,00	57,00
15		24,50		24,50		24,60	24,70
16		28,52		29,28		28,70	29,40
17		56,25		56,25		56,30	56,20
18		11,96		12,14		12,00	12,30
19		19,16		19,16		19,30	19,30
20		36,38		36,38		36,50	36,90
21		19,00		19,96		19,10	21,70
22		34,21	5,52 (dd, J= 15,2 e 9,0 Hz)	138,90		34,30	138,90
23		26,41	5,37 (dd, J= 15,2 e 9,0 Hz)	129,40		26,4	129,50
24		46,05		51,41		46,10	51,50
25		29,47		32,05		29,50	32,20
26		19,20		19,41		19,50	21,40
27		21,45		21,45		20,10	20,10
28		23,39		25,67		23,40	25,80
29		12,14		12,49		12,20	12,60
1'	5,36 (d, J=8,0 Hz)	102,58	5,36 (d, J=8,0 Hz)	102,58	5,06 (d, J=7,8 Hz)	102,60	5,06 (d, J=7,8 Hz)
2'	4,37 (t, J=8,0 Hz)	75,33	4,37 (t, J=8,0 Hz)	75,33	4,41 (t, J=7,7 Hz)	75,40	4,41 (t, J=7,7 Hz)
3'	4,59 (t, J=6,2 Hz)	78,60	4,59 (t, J=6,2 Hz)	78,60	4,45 (t, J=6,0 Hz)	78,70	4,45 (t, J=6,0 Hz)
4'	4,59 (t, J=6,2 Hz)	71,71	4,59 (t, J=6,2 Hz)	71,71	4,29 (t)	71,70	4,29 (t)
5'	4,29 (m)	78,45	4,29 (m)	78,45	4,06 (m)	78,50	4,06 (m)
6'	4,87(d, J=11,5 Hz) e 4,72(d, J=8,0 Hz)	62,85	4,87(d, J=11,5 Hz) e 4,72(d, J=8,0Hz)	62,85	4,58 (dd, J=12 e 2,4 Hz) e 4,41 (dd, J=12 e 5 Hz)	62,90	4,58 (dd, J=12 e 2,4 Hz) e 4,41 (dd, J=12 e 5 Hz)

Figura 14- Espectro de RMN ^1H (δ , $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 200 MHz) de *Pg-3a* e *Pg-3b*.

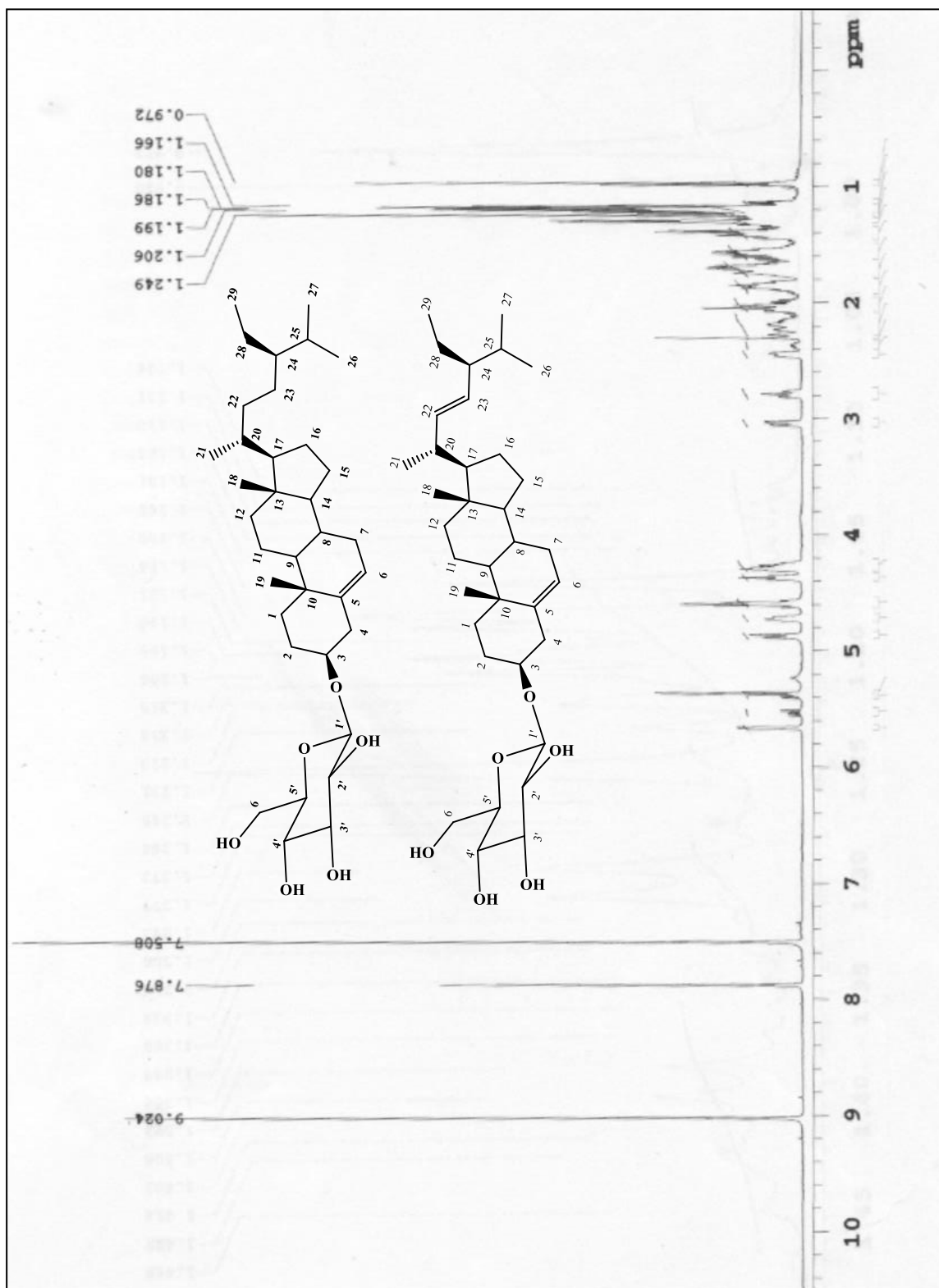


Figura 15 - Expansão do espectro de RMN ^1H (δ , $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 200 MHz) de Pg-3a e Pg-3b.

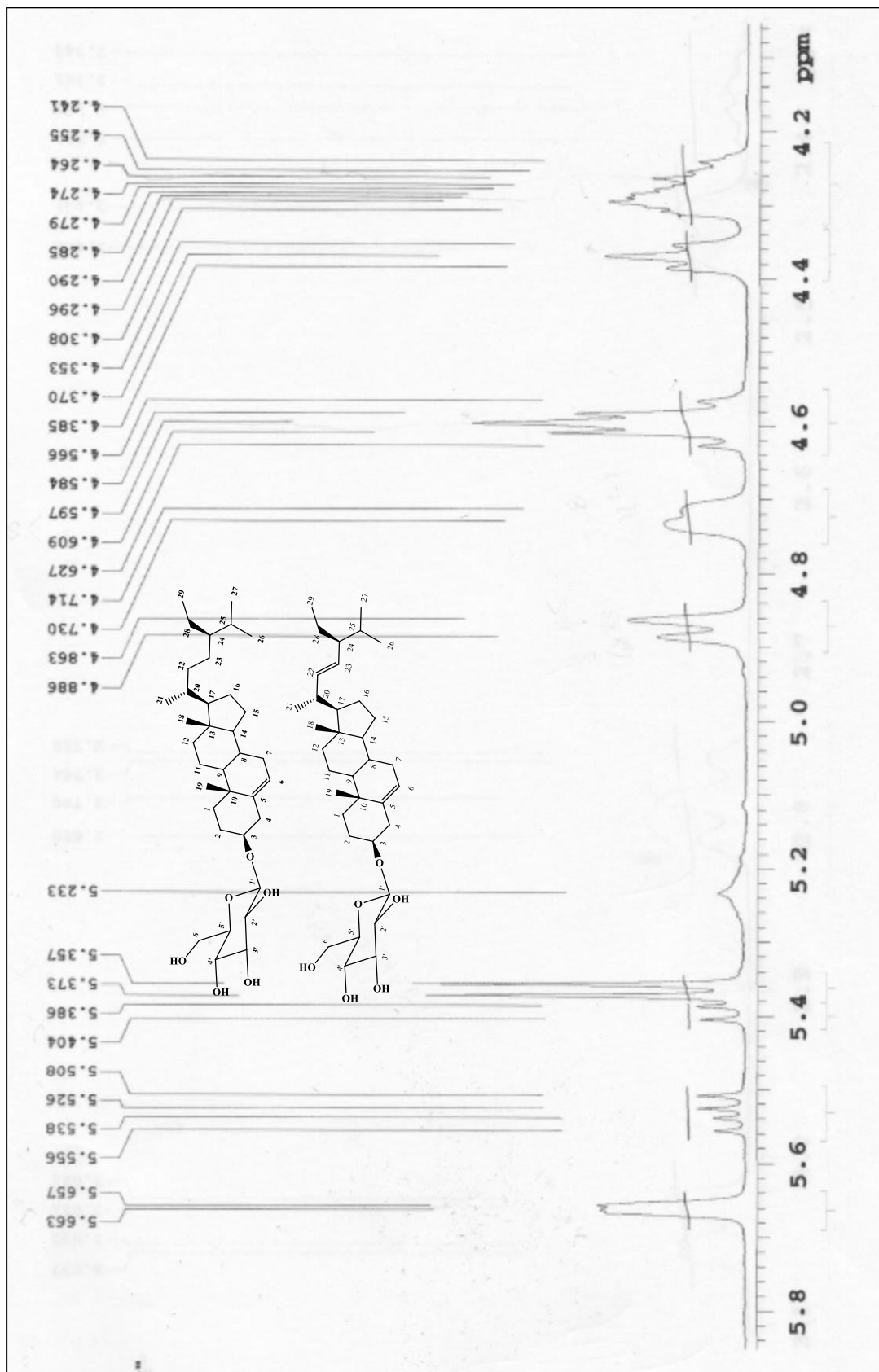


Figura 16- Espectro de RMN ^{13}C , APT, (δ , $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 50 MHz) de Pg-3a e Pg-3b.

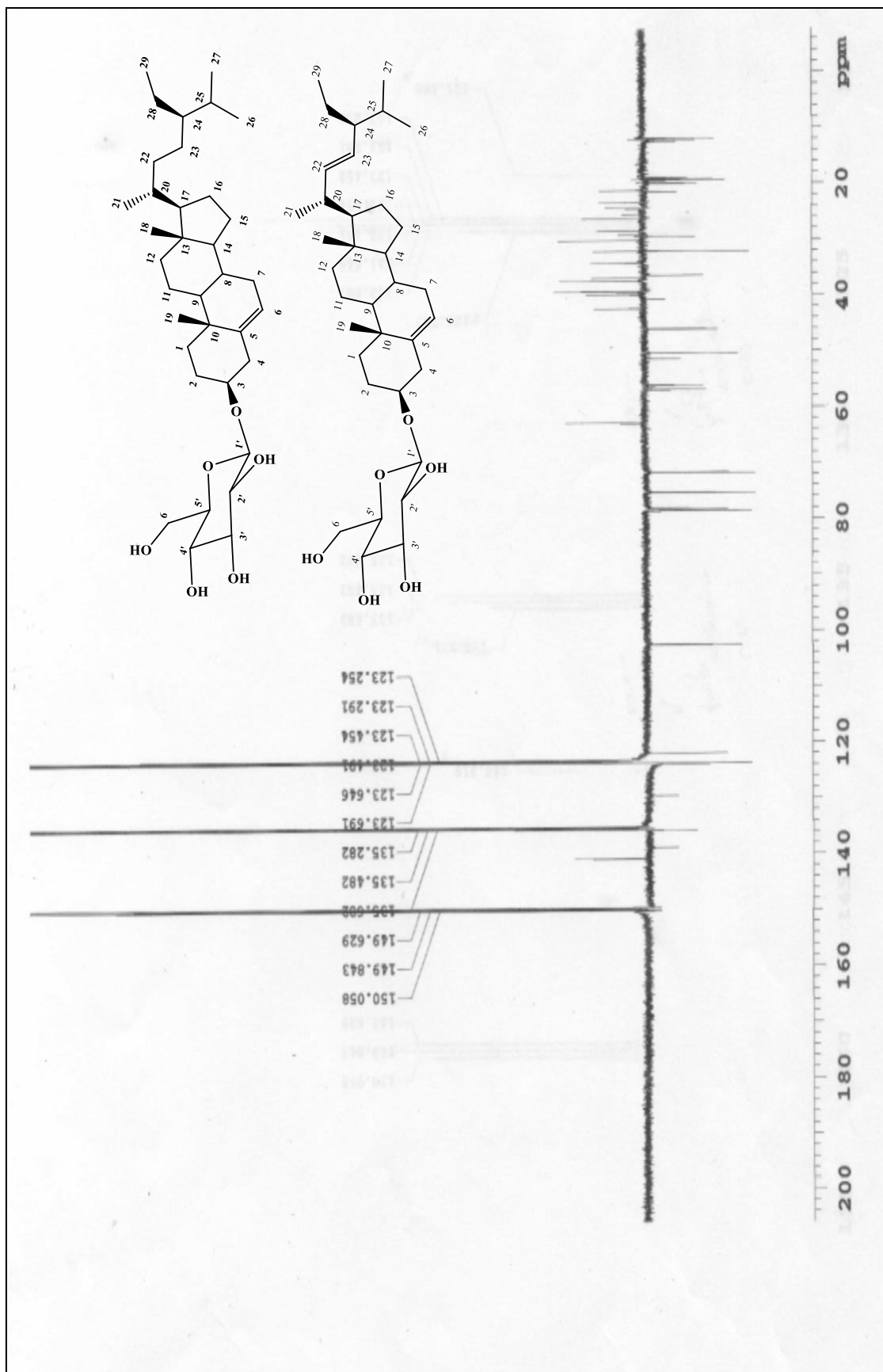
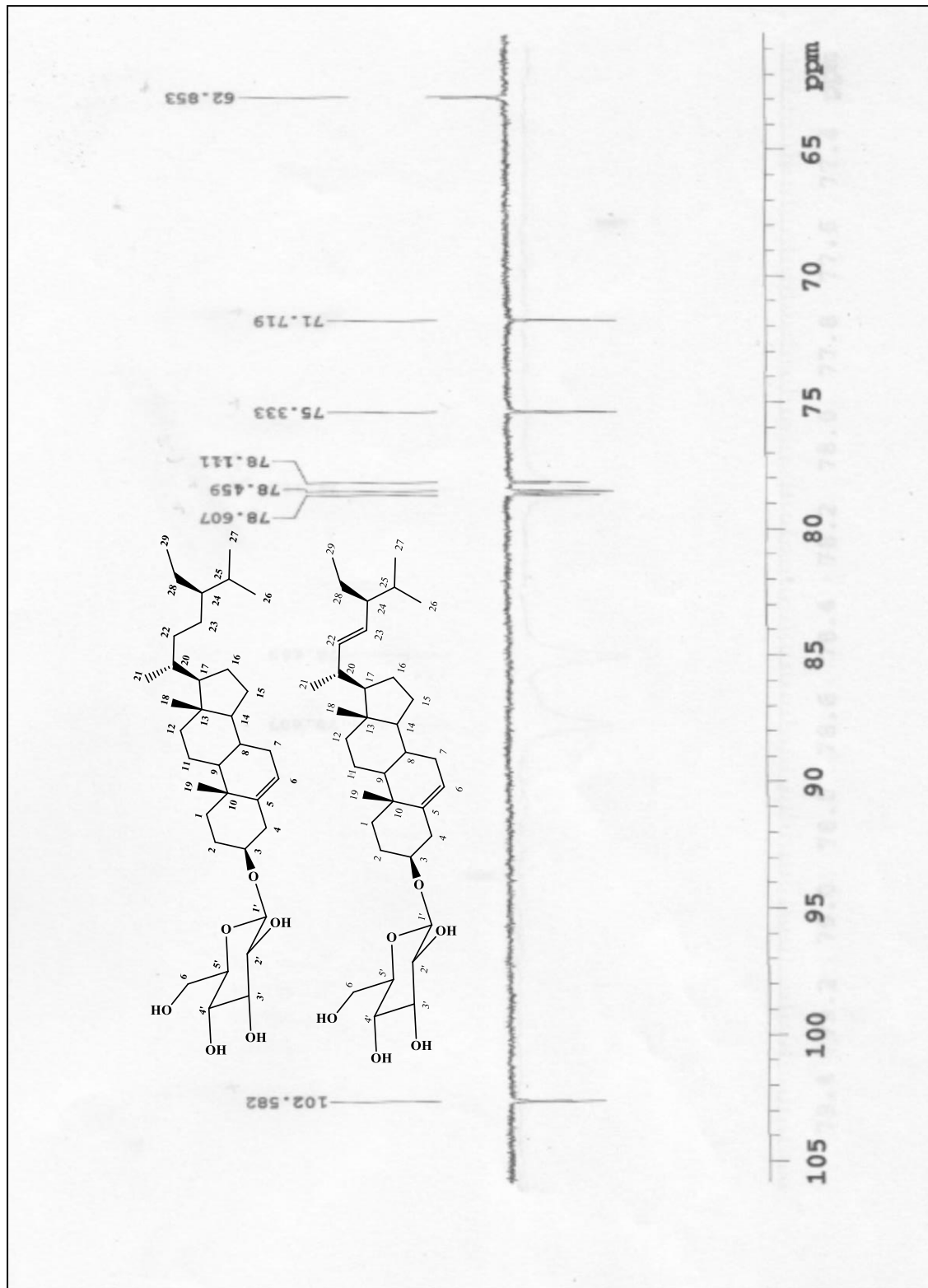


Figura 17 - Expansão do espectro de RMN ^{13}C (δ , $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 50 MHz) de *Pg-3a* e *Pg-3b*.



4.1.3 Caracterização estrutural de *Pg-7*

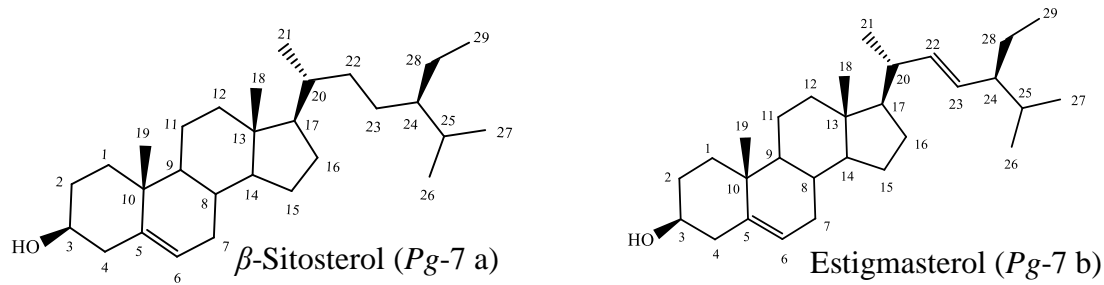
A substância codificada como *Pg-7* foi isolada a partir da fração Hex:CH₂Cl₂ (1:1) dos cladódios de *P. gounellei*, através de uma cromatografia em coluna com sílica gel 60 e eluída com Hex, AcOEt e MeOH, sozinhos ou em misturas binárias, originando a fração 13/15, que apresentou-se em forma de cristais brancos.

Ao verificar o perfil do espectro de RMN ¹H (**Figuras 18-19, Pág. 87-88**), de *Pg-7* foi possível perceber a semelhança que existia entre ela e a substância *Pg-3* (**Figura 14, Pág. 80**), o que induziu a pensar que *Pg-7* seria igual à *Pg-3*. Quando se fez uma análise comparativa, Figura 18 de *Pg-7* (**Pág. 87**) com a figura 14 (**pág. 80**), observou-se que não existiam absorções para a unidade osídica na região entre δ_H 4,2 e δ_H 5,3. A ausência destas absorções em *Pg-7* e a semelhança dos outros sinais e perfil dos espectros permitiram sugerir que *Pg-7* tratava-se de uma mistura do β -sitosterol (*Pg-7a*) e estigmasterol (*Pg-7 b*).

O espectro de RMN ¹³C (**Figuras 20-22, Págs. 89-90**), (**Tabelas 3-4, Págs. 85-86**) fortaleceu a proposta anterior ao exibir 45 sinais para 58 átomos de carbonos, uma vez que 13 sinais mostraram amplitude para dois átomos de carbonos.

A análise dos espectros de RMN ¹H e RMN ¹³C de *Pg-7*, além de comparações feitas com os dados de *Pg-3* possibilitou definir a substância em análise como uma mistura do β -sitosterol (*Pg-7a*) e estigmasterol (*Pg-7 b*), sendo descritas pela primeira vez na espécie *Pilosocerus gounellei* (MACIEL, *et al.*, 2016).

Tabela 3- Dados de RMN ^1H e RMN ^{13}C -APT (δ , CDCl_3 , 200 e 50 MHz, respectivamente) das substâncias *Pg-7 a/ Pg-7b*)



<i>Pg-7 a</i>			<i>Pg-7b</i>	
Carbonos	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}
C				
5	140,70	-	140,70	-
10	36,43	-	36,43	-
13	42,25	-	42,25	-
CH				
3	71,68	3,48 (m)	71,68	3,48 (m)
6	121,63	5,31 (d, $J=5,2$ Hz)	121,63	5,31 (d, $J=5,2$ Hz)
8	31,82	-	31,82	-
9	50,06	-	50,06	-
14	56,69	-	56,80	-
17	55,99	-	55,87	-
20	36,09	-	40,47	-
22	-	-	138,28	5,12 (dd, $J=15,2$ e 8,2 Hz)
23	-	-	129,20	4,97 (dd, $J=15,2$ e 8,2 Hz)
24	45,74	-	51,19	-
25	29,06	-	29,06	-
CH₂				
1	37,20	-	37,20	-
2	31,55	-	31,55	-
4	42,20	-	42,14	-
7	31,82	-	31,82	-
11	21,02	-	21,02	-
12	39,72	-	39,62	-
15	24,25	-	24,31	-
16	28,20	-	28,89	-
22	33,87	-	-	-
23	25,99	-	-	-
28	22,00	-	25,37	-
CH₃				
18	11,81	0,64 (s)	11,93	0,66 (s)
19	19,35	0,97 (s)	19,35	0,97 (s)
21	18,73	-	21,18	-
26	19,78	0,88 (d, $J=15,2$ Hz)	21,06	0,88 (d, $J=15,2$ Hz)
27	18,99	0,79 (d, $J=2,0$ Hz)	18,95	0,79 (d, $J=2,0$ Hz)
29	11,99	0,84 (t)	12,22	0,84 (t)

Tabela 4 - Dados comparativos de RMN¹³C da substância *Pg-7 a/Pg-7b* (δ , CDCl₃, 50 MHz) com modelos *Mo-7a* e *Mo-7b* (δ , C₅D₅N, 100 MHz), (KOJIMA et al., 1990)

Carbonos	<i>Pg-7 a</i>	<i>Mo-7a</i> (Sitosterol)	<i>Pg-7b</i>	<i>Mo-7b</i> (Estigmasterol)
C	δ_C	δ_C	δ_C	δ_C
5	140,70	140,70	140,70	140,70
10	36,43	36,50	36,43	36,50
13	42,25	42,30	42,25	42,30
CH				
3	71,68	71,80	71,68	71,80
6	121,63	121,70	121,63	121,70
8	31,82	31,90	31,82	31,90
9	50,06	50,10	50,06	50,10
14	56,69	56,80	56,80	56,80
17	55,99	56,00	55,87	55,90
20	36,09	36,10	40,47	40,50
22	-	-	138,28	138,30
23	-	-	129,20	129,20
24	45,74	45,80	51,19	51,20
25	29,06	29,10	29,06	*
CH ₂				
1	37,20	37,20	37,20	37,20
2	31,55	31,60	31,55	31,60
4	42,20	42,30	42,14	42,30
7	31,82	31,90	31,82	31,90
11	21,02	21,10	21,02	21,10
12	39,72	39,80	39,62	39,70
15	24,25	24,30	24,31	24,40
16	28,20	28,20	28,89	28,90
22	33,87	33,90	-	-
23	25,99	26,00	-	-
28	22,00	23,00	25,37	*
CH ₃				
18	11,81	11,90	11,93	12,00
19	19,35	19,40	19,35	19,40
21	18,73	18,80	21,18	21,20
26	19,78	19,80	21,06	*
27	18,99	19,00	18,95	*
29	11,99	12,00	12,22	*

* Ausência de dados na referência

Figura 18 - Espectro de RMN ^1H (δ , CDCl_3 , 200 MHz) de *Pg-7a* e *Pg-7b*

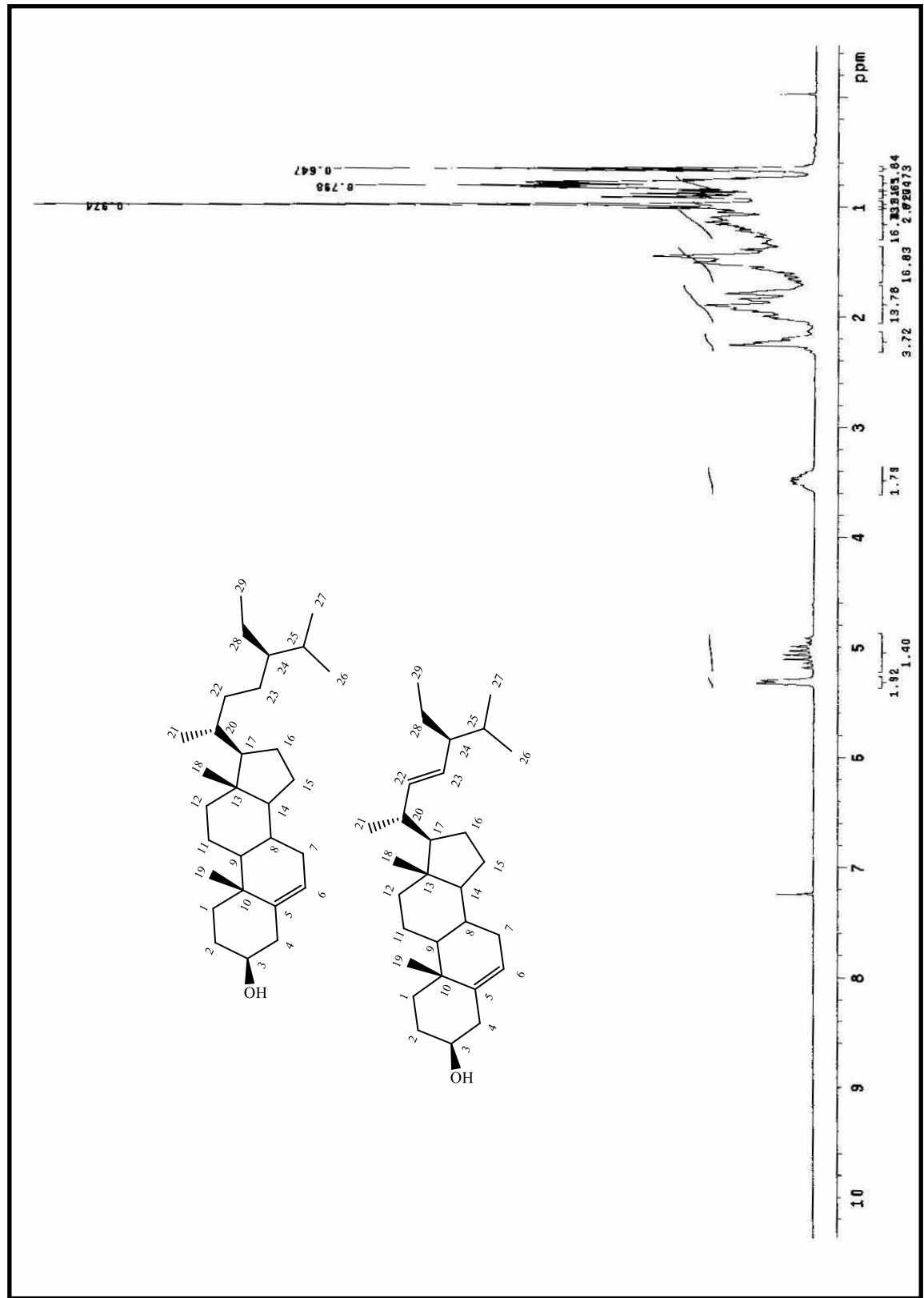


Figura 19- Expansão do espectro de RMN ^1H (δ , CDCl_3 , 200 MHz) de Pg-7a e Pg-7 b

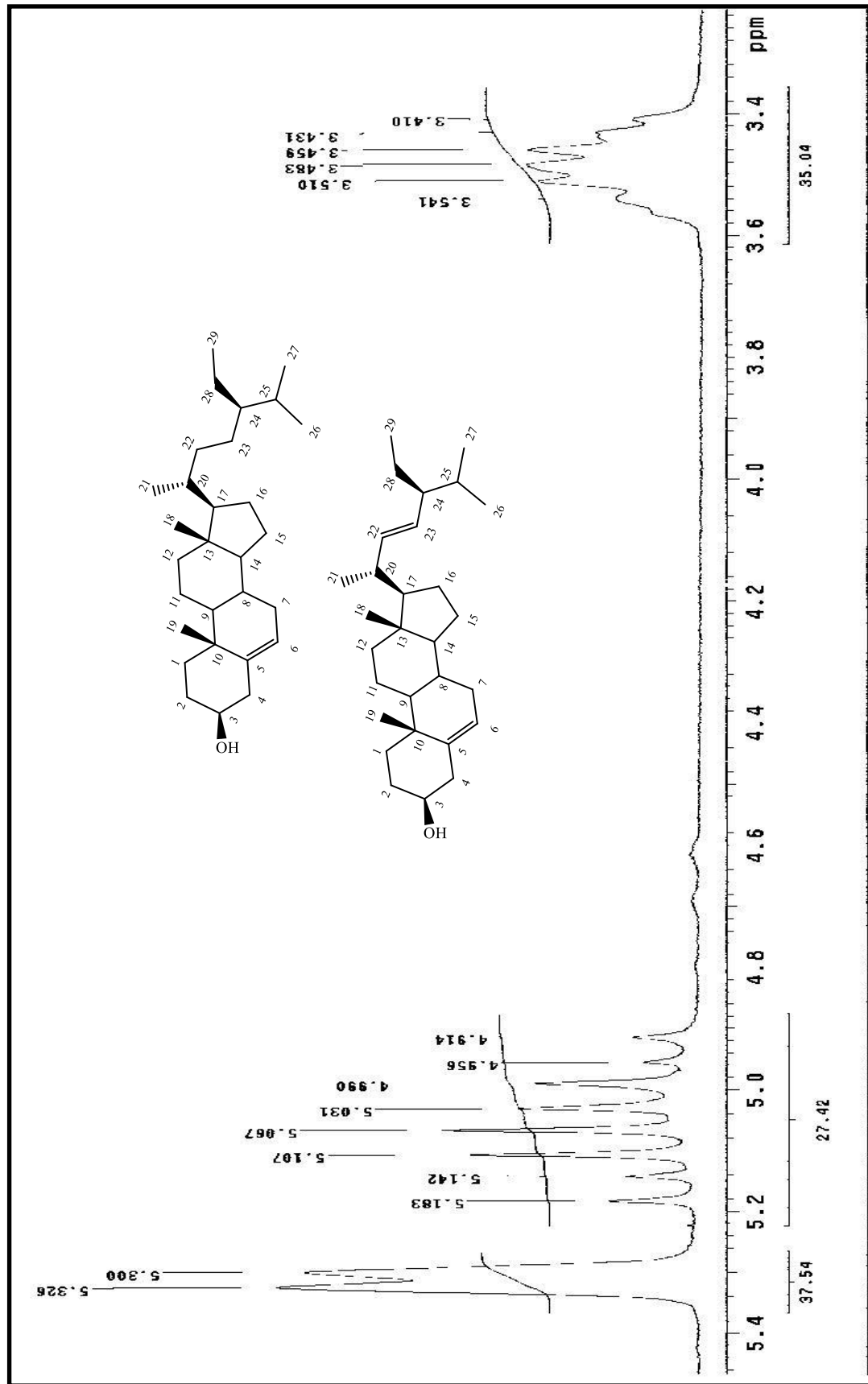


Figura 20- Espectro de RMN ^{13}C -APT (δ , CDCl_3 , 50 MHz) de Pg-7a e Pg-7b

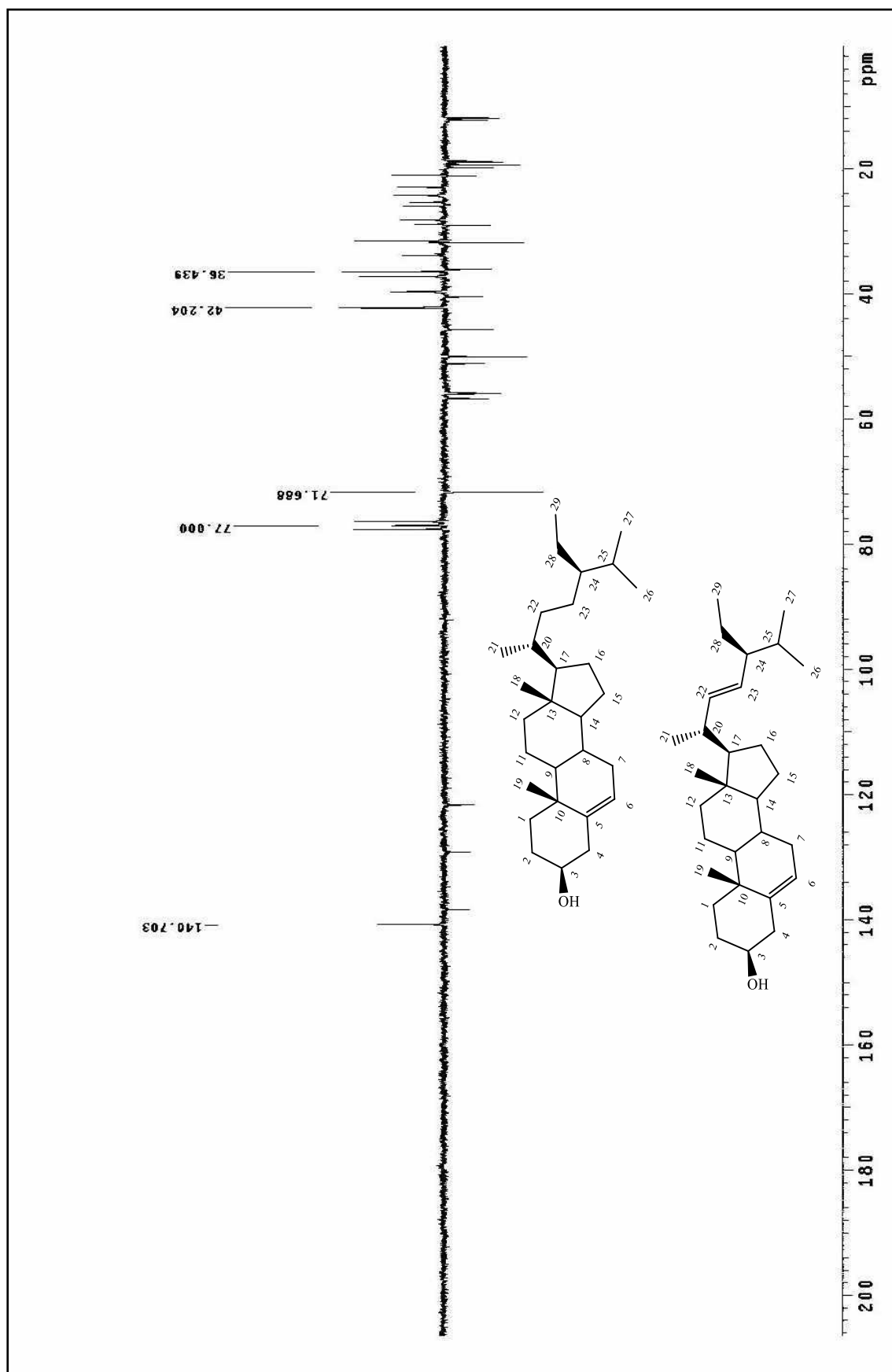


Figura 21- Expansão do espectro de RMN ^{13}C -APT (δ , CDCl_3 , 50 MHz) de *Pg-7-a* e *Pg-7-b*.

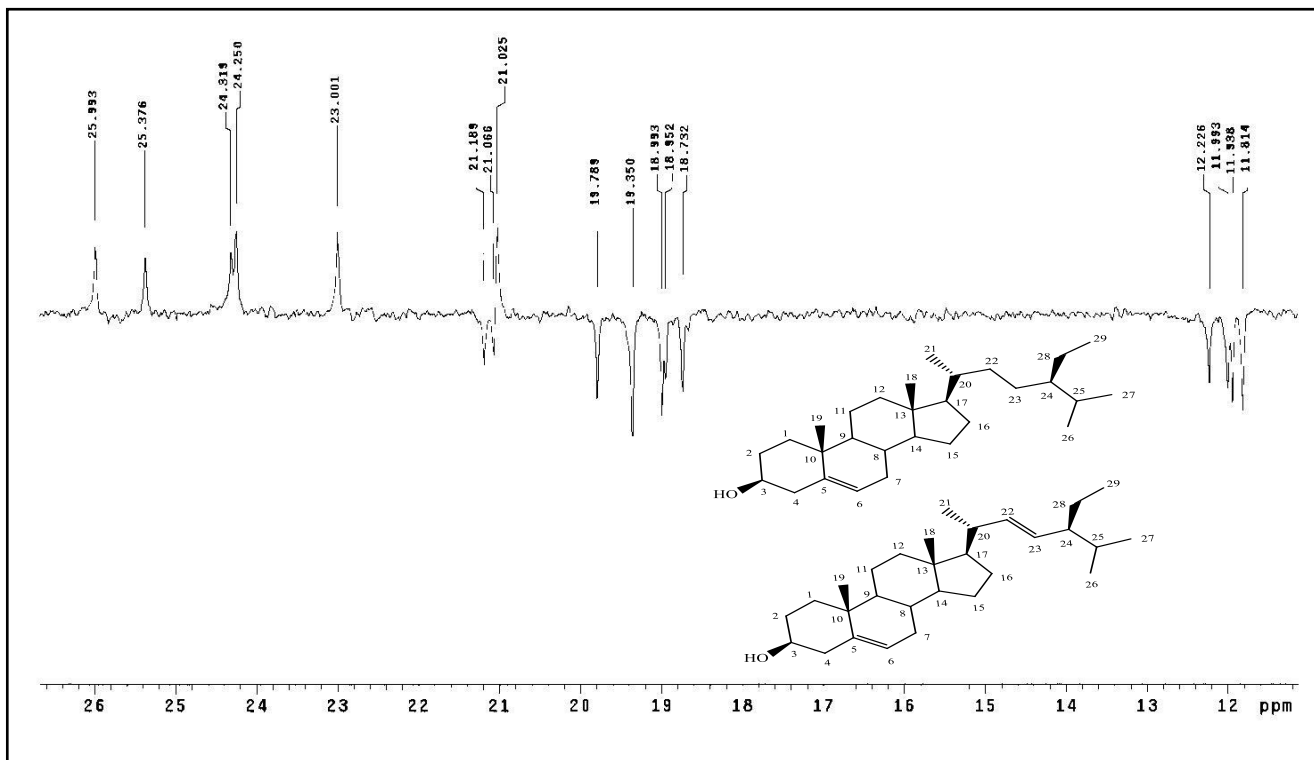
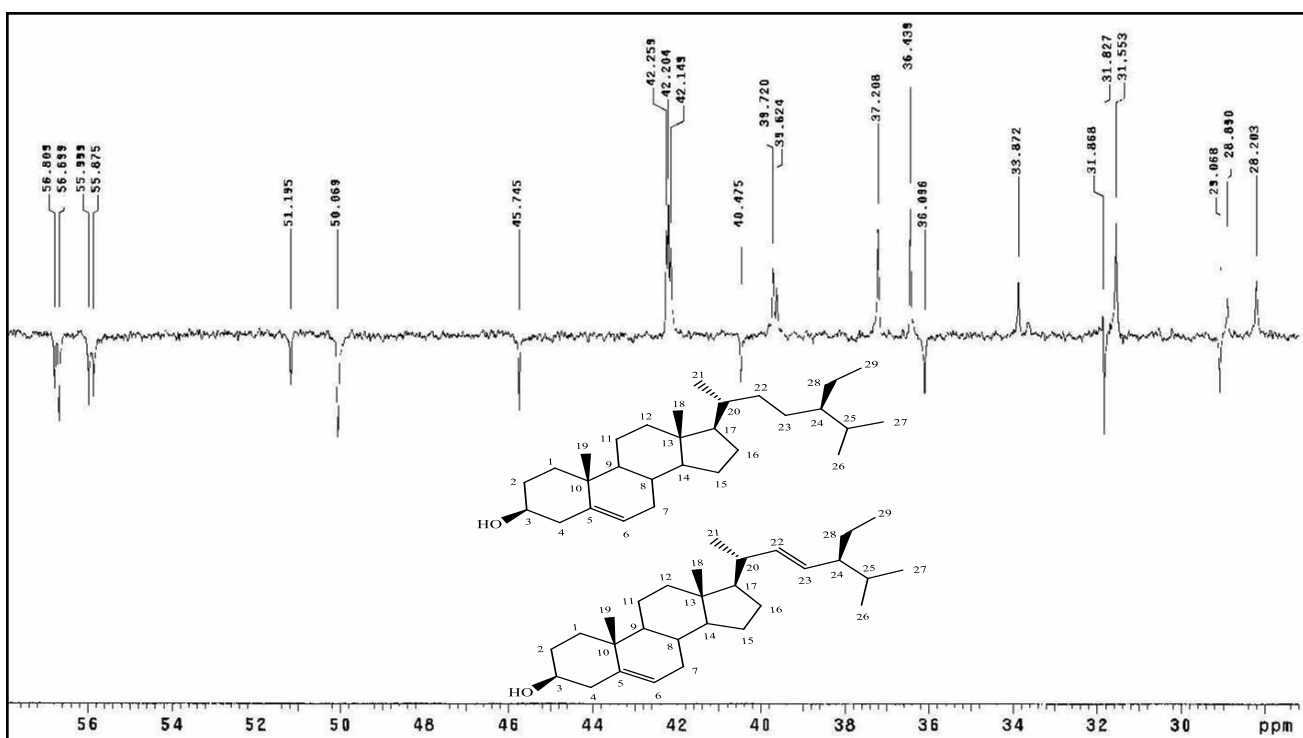


Figura 22- Expansão do espectro de RMN ^{13}C -APT (δ , CDCl_3 , 50 MHz) de *Pg-7-a* e *Pg-7-b*.



4.1.4 Caracterização estrutural de *Pg-1*

A substância codificada como *Pg-1* foi isolada da Fração A, do EEB dos cladódios de *P. gounellei*, após ser submetida a uma cromatografia em coluna, com sílica gel 60 e eluída com Hex, CH₂Cl₂ e MeOH, que levou ao isolamento de um sólido branco cristalino.

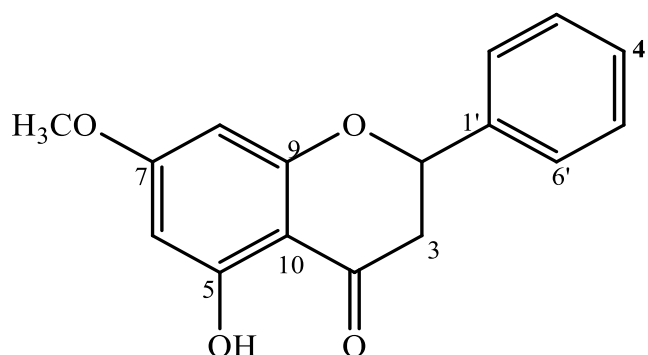
O espectro de RMN ¹H e suas expansões (**Figuras 23-25, Págs. 94-95**) mostrou absorções para hidrogênios aromáticos na região entre δ_H 6,05 e 7,44 ppm. Os dubletos em δ_H 6,06 (H-8) e δ_H 6,05 (H-6), ambos acoplado *meta* com constante de acoplamento de 2,5 Hz, são sinais característicos de núcleo flavonoídico com as posições C-5 e C-7 substituídas no anel. A presença de um multiplete ente δ_H 7,36- 7,44 (H2',H-3', H-4', H5' e H-6'), com integral para cinco hidrogênios, sugeriu a presença de um anel aromático monosubstituído, podendo ser atribuído ao anel B de flavonoides. A existência de absorções para hidrogênios ligados a carbonos *sp*³ em δ_H 3,07 (dd, *J*=17,0 e 13,0 Hz), δ_H 2,82 (dd, *J*= 13,0 e 3,0 Hz), que acoplou com um hidrogênio oximetínico em δ_H 5,41 (*J*=13,0 e 3,0 Hz), quando comparados com dados da literatura (**Tabela 5, Pág. 93**), foram atribuídos aos hidrogênios H-3b; H-3a e H-2 do anel C flavonoídico e permitiram propor que *Pg-1* poderia tratar-se de uma flavanona, por não possuir a dupla ligação entre C-2 e C-3, característica das flavonas (TELES *et al.*, 2015; MACIEL *et al.*, 2016).

O espectro de RMN ¹H também mostrou um sinal em δ_H 11,99, característico de hidroxila em ponte com carbonila, fortalecendo a proposta que *Pg-1* trata-se de um flavonoide, além de um singlete em δ_H 3,79 evidenciando a presença de uma metoxila na estrutura.

O espectro de RMN ¹³C (**Figura 26, Pág. 96**) evidenciou 13 sinais para 16 átomos de carbono. A estrutura de *Pg-1* possui 10 carbonos monohidrogenado, sendo as absorções em δ_C 126, 12 (C-2'/C-6') e δ_C 128,87 (C-3'/C-4' e C-5'), condizentes com 5 átomos de carbonos, fortalecendo a proposta de que a estrutura possui o anel aromático B monosubstituído, além da absorção em δ_C 79,24 (C-2), que ratifica a ideia de que o núcleo flavonoidico de *Pg-1* não possui dupla ligação entre os carbonos C-2 e C-3, sendo esta uma caraterística típica de núcleos de flavanonas; Os sinais em δ_C 94,28 (C-8) e δ_C 95,16 (C-6), inferiram que o anel A encontra-se bi substituído, fortalecendo a proposta do espectro de RMN ¹H. A absorção em δ_C 195,73 evidenciou a presença de

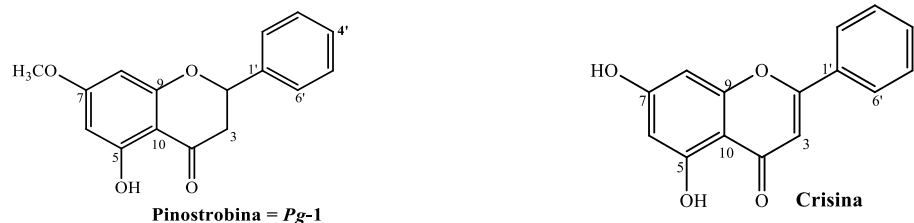
uma carbonila, comum na posição C-4 de flavonoides e o sinal em δ_C 55,69, a presença de uma metoxila presente na molécula.

A análise dos dados espectrais em conjunto com os dados da literatura (MURILLO, *et al.*, 2014) permitiram afirmar que **Pg-1** trata-se da 5-hidroxi,7-metoxiflavanona (pinostrobin) (**Tabela 5, Pág. 93**), substância esta, que possui ação protetora da mucosa gástrica, além de atividade antioxidante celular indireta, através da ativação dos mecanismos antioxidantes celulares (ABDELWAHAB *et al.*, 2011). Esta substância foi descrita pela primeira vez no gênero *Pilosocereus* (MACIEL, *et al.*, 2016).



Pinostrobin

Tabela 5-Dados comparativos de RMN ^1H e ^{13}C de *Pg-1* (δ , CDCl_3 , 500 e 125 MHz) com os modelos Mo-1 (δ , CDCl_3 , 400 e 100 MHz- Pinostrobrina) e Mo-1.1 (δ , DMSO-d_6 , 400 e 100 MHz- Crisina) (MURILLO, *et al.*, 2014).



C	<i>Pg-1</i>		Mo-1(Pinostrobrina)		Mo-1.1 (Crisina)	
	δC	δH	δC	δH	δC	δH
1	-	-	-	-	-	-
2	79,24	5,41 (1H, dd, $J=13,0$ e $3,0\text{Hz}$)	79,2	5,39 (1H, dd, $J=13,0$ e $3,0\text{Hz}$)	163,0	-
3	43,41	2,82 (1H, dd, $J=17,0$ e $3,0\text{Hz}$ - H3-a) 3,07(1H, dd, $J=17,0$ e $13,0\text{ Hz}$, H3-b)	43,4	2,80 (1H, dd, $J=17,2 - 3,1\text{Hz}$ - H3-a) 3,06(1H, dd, $J=17,2$ e $13,0\text{ Hz}$, H3-b)	105,1	6,94 (s)
4	195,73	-	195,7	-	181,7	-
5	162,79	-	164,2	-	161,4	-
6	95,16	6,05 (1H, d, $J=2,5\text{Hz}$)	95,6	6,06 (1H, d, $J=2,3\text{ Hz}$)	98,9	6,21 (d, $J=1,6\text{Hz}$)
7	168,00	-	168,1	-	164,3	-
8	94,28	6,06 (1H, d, $J=2,5\text{ Hz}$)	94,3	6,07 (1H, d, $J=2,3\text{Hz}$)	94,0	6,5 (d, $J=1,6\text{ Hz}$)
9	164,17	-	162,8	-	157,33	-
10	103,17	-	103,2	-	103,9	-
1'	138,39	-	138,7	-	130,6	-
2'/6'	126,12	-	126,2	-	126,3	8,04 (d, $J=7,2\text{ Hz}$)
3'/5'	-	-	-	-	129,0	-
3'/ 4'/5'	128,87	-	128,9	-	-	7,57 (m)
2'/3'/4'/5'/6'	-	7,36-7,44 m	-	7,36-7,48 m	-	-
OMe-3	55,69	3,79 (s)	55,7	3,79 (s)	-	-
OH	-	11,99	-	12,1	-	12,8 (s)

Figura 23 -Espectro de RMN ¹H (δ, 500 MHz, CDCl₃) de Pg-1

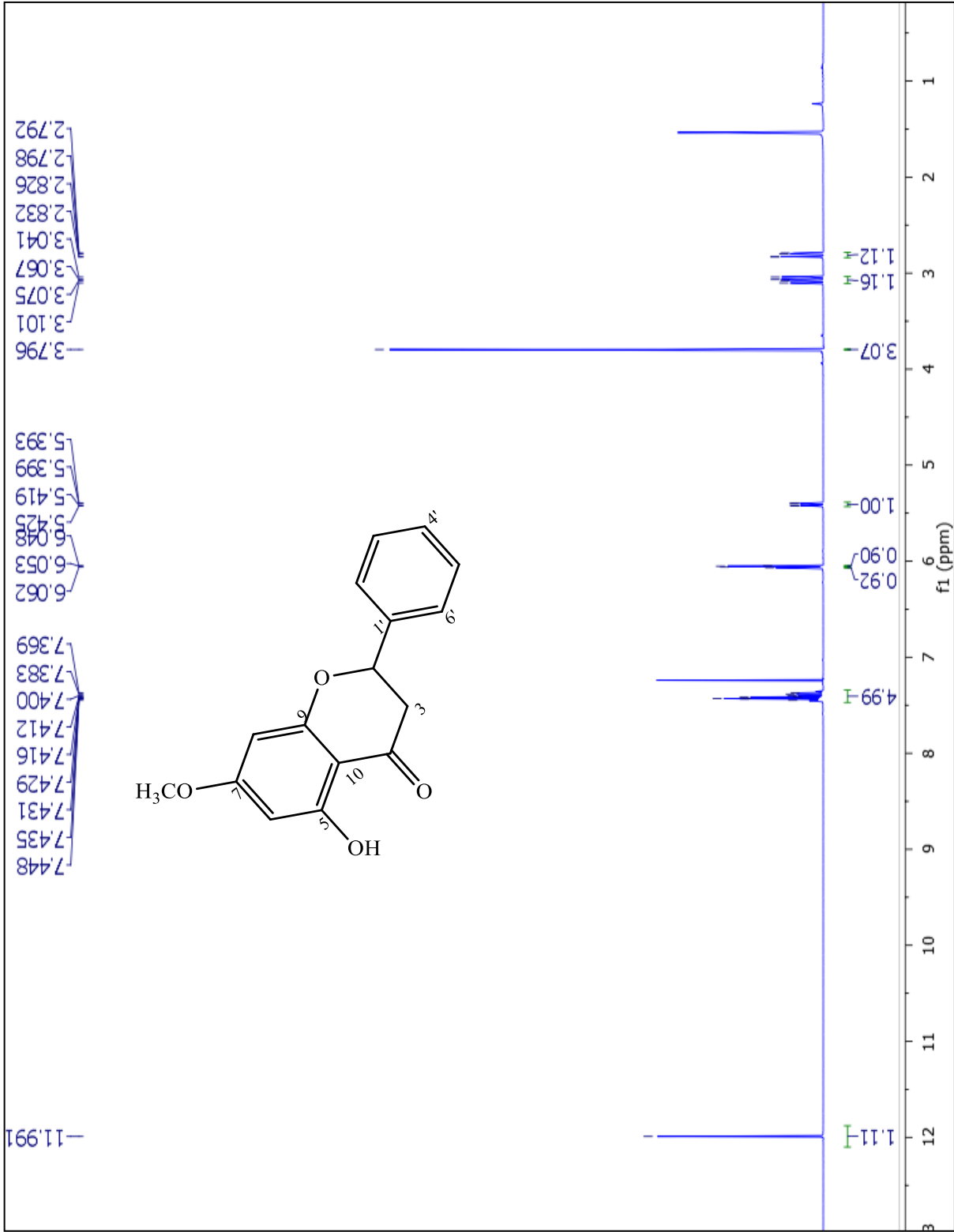


Figura 24- Expansão do espectro de RMN ^1H (δ , 500 MHz, CDCl_3) de *Pg-1*

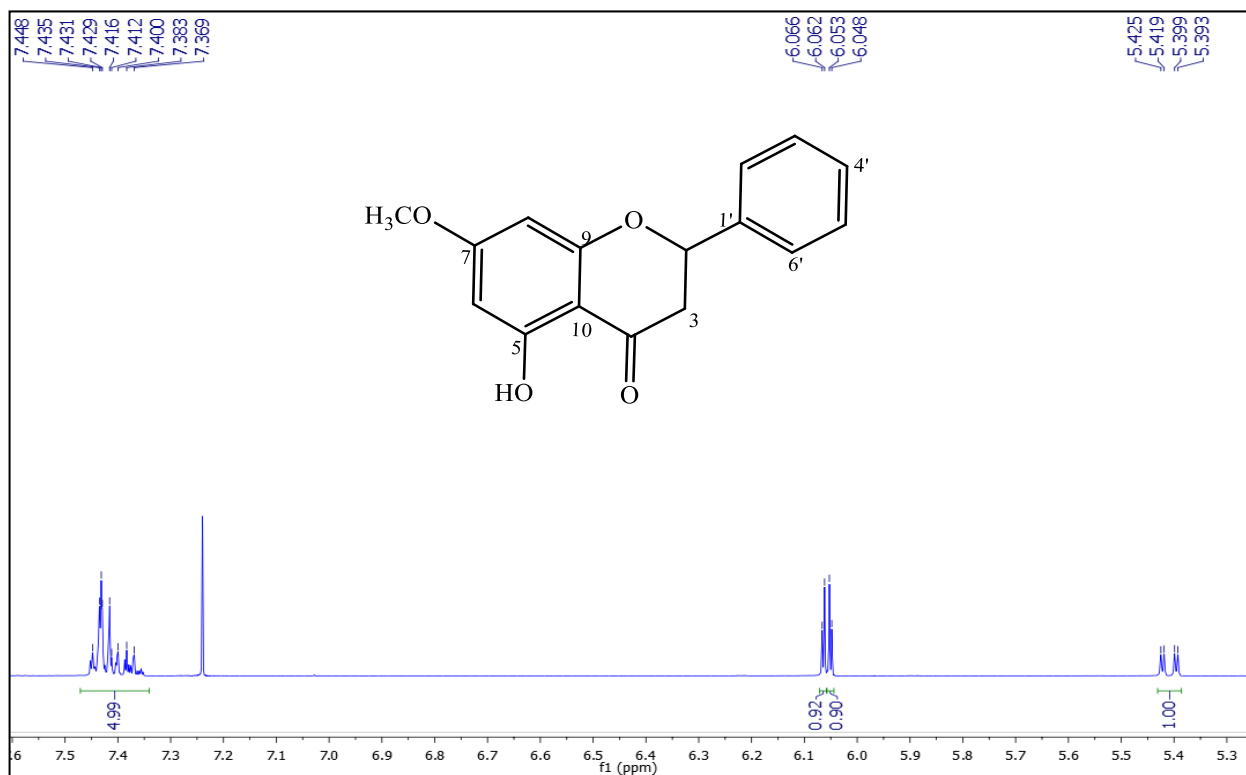


Figura 25- Expansão do espectro de RMN ^1H (δ , 500 MHz, CDCl_3) de *Pg-1*

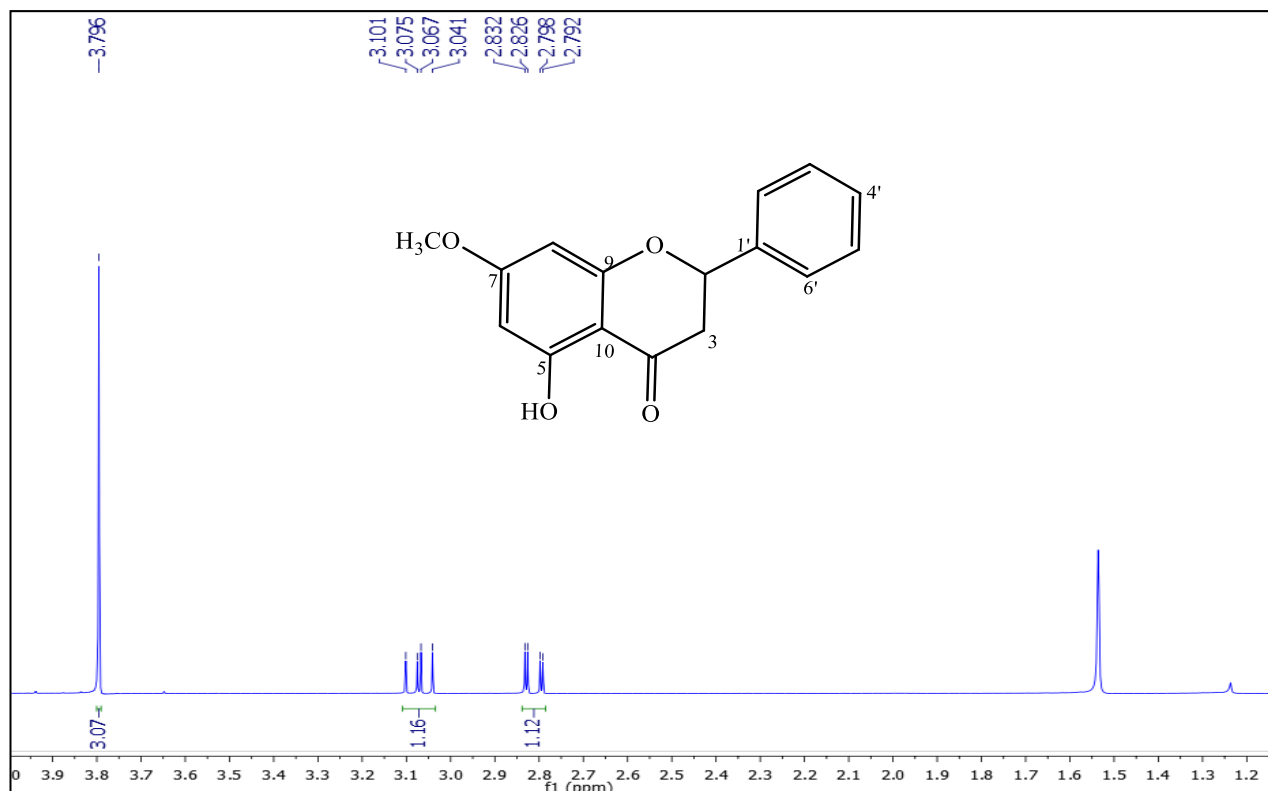
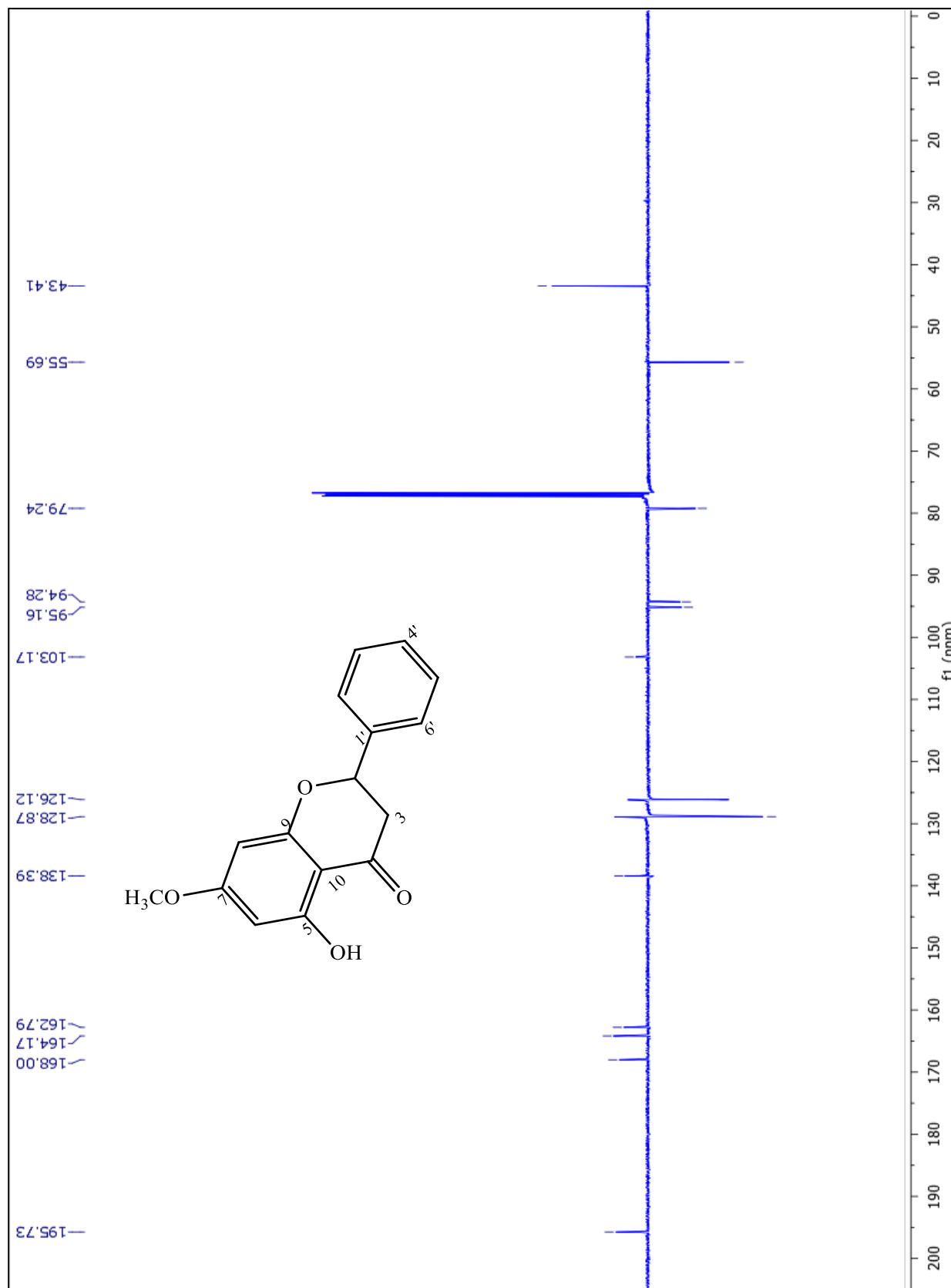


Figura 26- Espectro de RMN ^{13}C (δ , 125 MHz, CDCl_3) de Pg-1



4.1.5 Caracterização estrutural de *Pg-4*

A substância codificada como *Pg-4* foi isolada a partir da fração metanólica, do EEB dos cladódios de *P. gounellei*, após sucessivas cromatografias com Sephadex LH-20, eluídas com MeOH:CH₂Cl₂ (7:3) e apresentou-se em forma de um pó com coloração amarela.

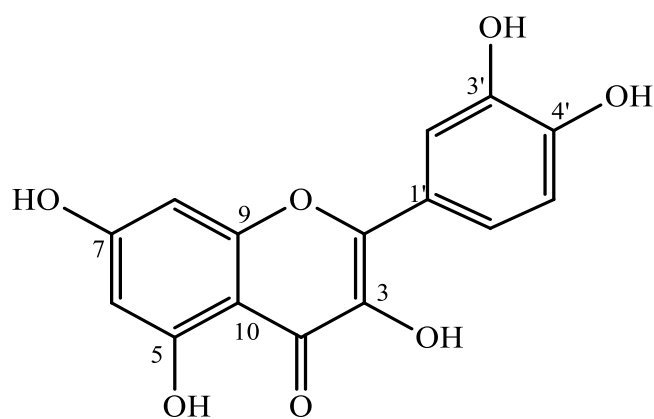
O espectro de RMN ¹H de *Pg-4* (**Figuras 27-28, Págs. 100-101**) mostrou absorções condizentes com hidrogênios aromáticos entre δ_H 6,17 e δ_H 7,72. As absorções em δ_H 6,37 (H-8) e em δ_H 6,17 (H-6), assim como em *Pg-1*, mostraram-se características de hidrogênios com acoplamento *meta*, em anel flavonoídico com substituição nas posições C-7 e C-5 do anel A de flavonoides, enquanto o conjunto de absorções em δ_H 7,62 (H-6') acoplado *orto* com $J= 8,5$ Hz com H-5' e *meta* com $J=2,0$ Hz com H-2', em δ_H 6,87 (H-5') acoplado *orto* com $J= 8,5$ Hz com H-6' e δ_H 7,72 (H-2') acoplado *meta* com $J=2,0$ Hz com H-6', evidenciou a presença de outro anel aromático na molécula, com um sistema ABX, podendo, quando comparado com dados da literatura (**Tabela 6, Pág. 99**), ser inferido como o anel B de um flavonoide.

Diferentemente, do modelo *Pg-1*, a molécula de *Pg-4*, não possui sinal para hidrogênio ligado a carbono sp^3 localizado nas posições C-2 e C-3 do modelo, o que significa que existe uma dupla ligação entre C-2 e C-3, ligação esta característica de flavonas. A ausência de um singlete para o hidrogênio da posição H-3, sugeriu que esta posição encontra-se substituída por uma hidroxila. Esta sugestão é fortalecida pela ausência de sinais para grupos metilas ou metoxilas. A compilação destes dados e comparações com a literatura possibilitou caracterizar o esqueleto de *Pg-4* como sendo um flavonol.

O espectro de RMN ¹³C, utilizando a técnica APT (**Figuras 29-30, Págs. 102-103**) evidenciou sinais para 15 átomos de carbono, confirmando a proposta de que *Pg-4* trata-se de um flavonoide. Os sinais em δ_C 116,23 (C-2'), δ_C 116,01 (C-5') e δ_C 121,68 (C-6'), confirmaram a presença de um anel ABX na molécula. Foi possível observar também sinais para sete sinais de carbonos ligados a oxigênio, condizentes com os sinais em : δ_C 148,01 (C-2), δ_C 137,23 (C-3), δ_C 162,50 (C-5), δ_C 165,62 (C-7), δ_C 158,24 (C-9), δ_C 146,21 (C-3') e δ_C 148,76 (C-4'); além de uma absorção em δ_C 177,36, referente à presença de uma carbonila na posição C-4.

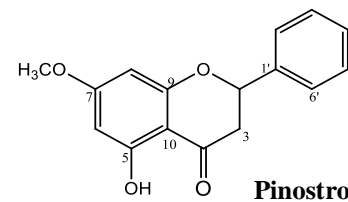
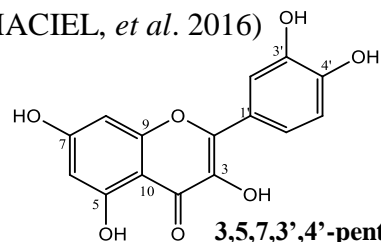
A análises dos dados espectrais de RMN ¹H e ¹³C, além de comparações com dados da literatura (GOMES *et al.*, 2011) (**Tabela 6, Pág.99**) e comparação com

padrões em CCDA utilizando o reagente NP, permitiram inferir que a substância **Pg-4** tratava-se da 3,5,7,3',4'-pentahidroxi-flavonol ou quercetina. Esta substância já foi isolada em outras espécies de Cactaceae, como na *Pilosocereus arrabidaei* e *Opuntia ficus-indica* (GONÇALVES *et al.*, 2015), porém inédita para a espécie *Pilosocereus gounellei* (MACIEL, *et al.*, 2016).



Quercetina

Tabela 6 -. Comparação dos dados de RMN ¹³C e de RMN ¹H da substância *Pg-4* (δ , CD₃OD, 500 e 125 MHz) com dados da literatura (Mo-4, GOMES *et al.*,2011) e (Mo- 4.1, MACIEL, *et al.* 2016)



<i>Pg-4</i>		Mo-4 (GOMES <i>et al.</i> , 2011)		Mo-4.1 (<i>Pg-1</i> = Pinostrobin)		
C	δ C	δ H	δ C	δ H	δ C	δ H
1	-	-	-	-	-	-
2	148,01	-	148,00	-	79,24	5,41 (1H, dd, <i>J</i> =13,0 e 3,0Hz)
3	137,23	-	137,20	-	43,41	2,82 (1H, dd, <i>J</i> =17,0 e 3,0Hz- H3-a) 3,07 (1H, dd, <i>J</i> =17,0 e 13,0 Hz, H3-b)
4	177,36	-	177,30	-	195,73	-
5	162,50	-	162,40	-	162,79	-
6	99,27	6,17 (1H, d, <i>J</i> = 2,0Hz)	99,20	6,17 (1H, d, <i>J</i> =2,0Hz)	95,16	6,05 (1H, d, <i>J</i> =2,5Hz)
7	165,62	-	165,50	-	168,00	-
8	94,43	6,37 (1H, d, <i>J</i> = 2,0Hz)	94,40	6,37 (1H, d, <i>J</i> =2,0Hz)	94,28	6,06 (1H, d, <i>J</i> =2,5 Hz)
9	158,24	-	158,20	-	164,17	-
10	104,51	-	104,50	-	103,17	-
1'	124,16	-	124,10	-	138,39	-
2'	116,23	7,72 (1H,d, <i>J</i> = 2,0Hz)	116,10	7,72 (1H, d, <i>J</i> =2,0Hz)	-	-
3'	146,21	-	146,20	-	-	-
4'	148,76	-	148,70	-	-	-
5'	116,01	6,87 (1H, d, <i>J</i> = 8,5Hz)	116,20	6,87 (1H, d, <i>J</i> =8,0Hz)	-	-
6'	121,68	7,62 (1H, dd, <i>J</i> = 8,5 e 2,0Hz)	121,60	7,61 (1H, dd, <i>J</i> = 8,0 e 2,0Hz)	-	-
2'/6'	-	-	-	-	126,12	-
3'/4'/5'	-	-	-	-	128,87	-
2'/3'/4'/5'/6'	-	-	-	-	-	7,36 – 7,44 (m)
OH	-	-	-	-	-	11,99

Figura 27 - Espectro de RMN ^1H (δ , 500 MHz, CD_3OD) de Pg-4

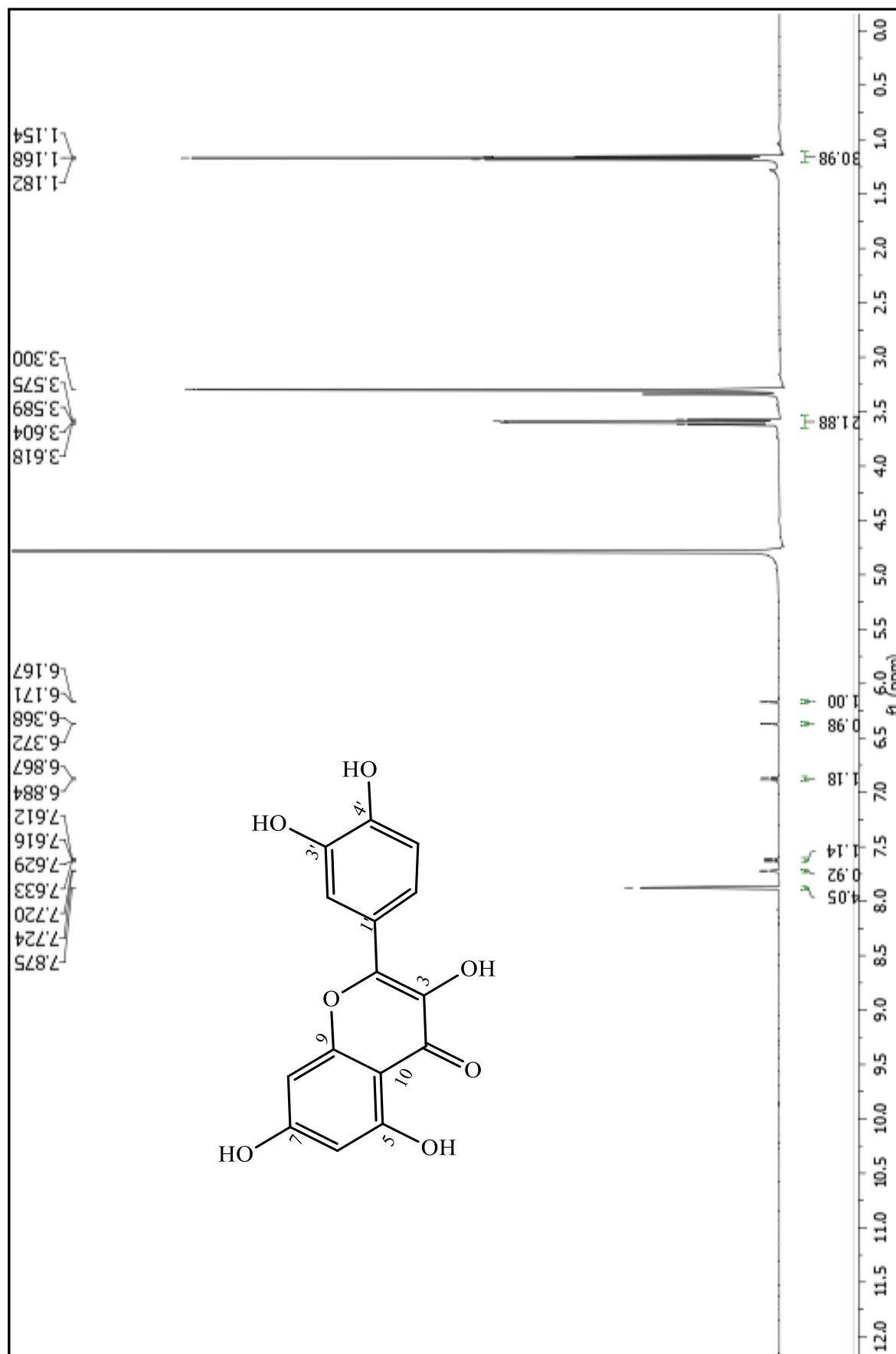


Figura 28- Expansão do espectro de RMN ^1H (δ , 500 MHz, CD_3OD) de Pg-4

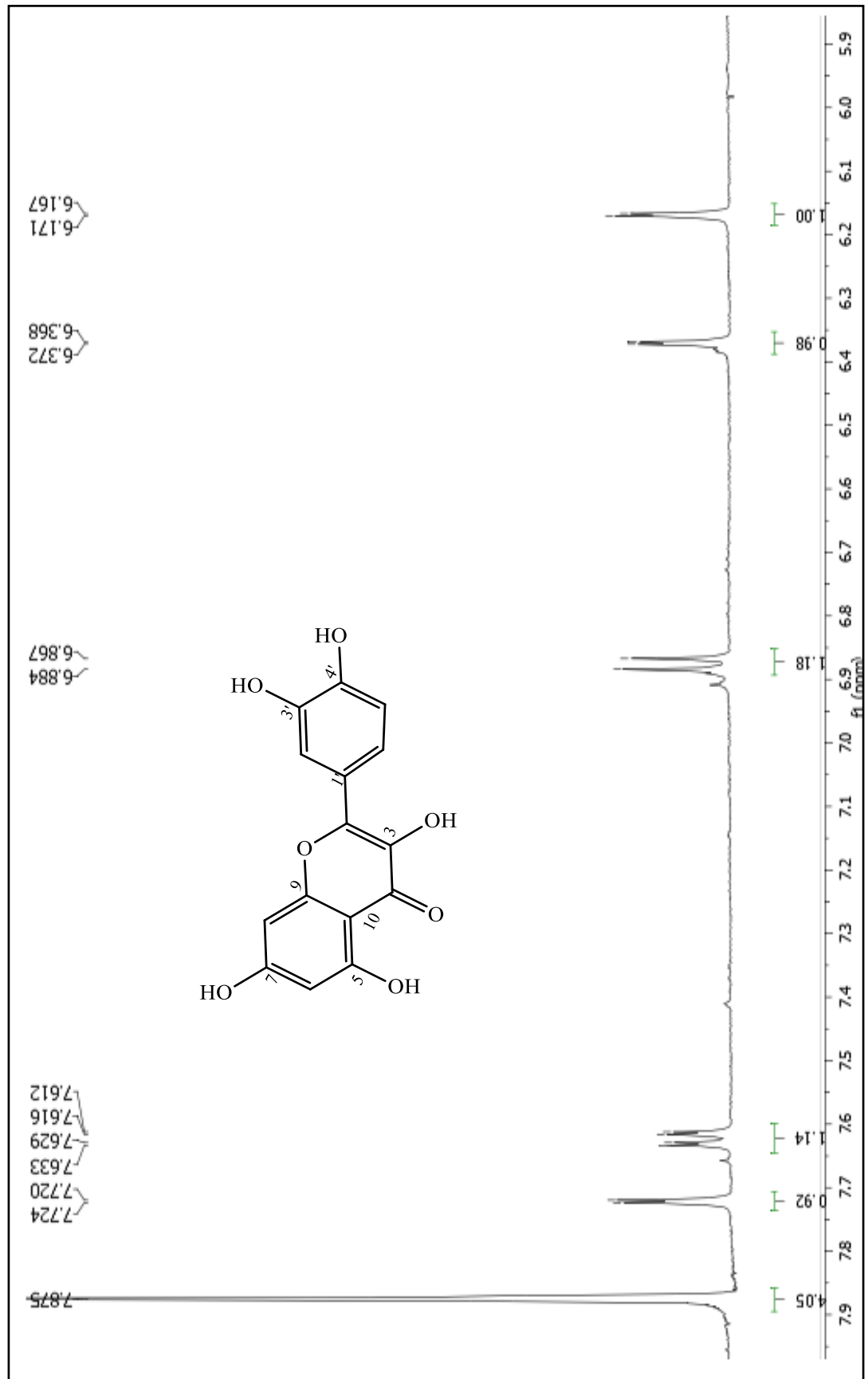


Figura 29 -Espectro de RMN ^{13}C , APT, (δ , 125 MHz, CD_3OD) de Pg-4

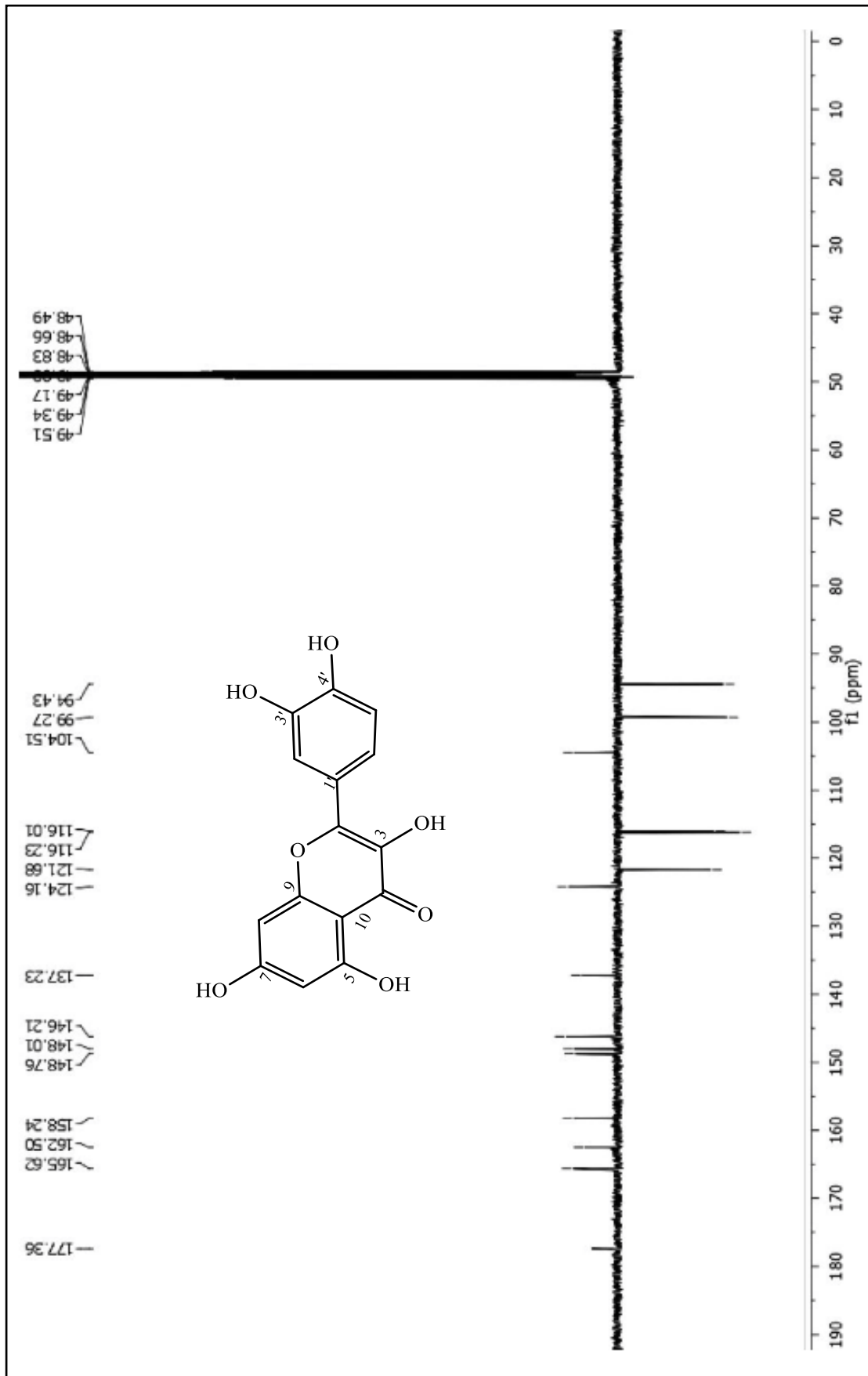
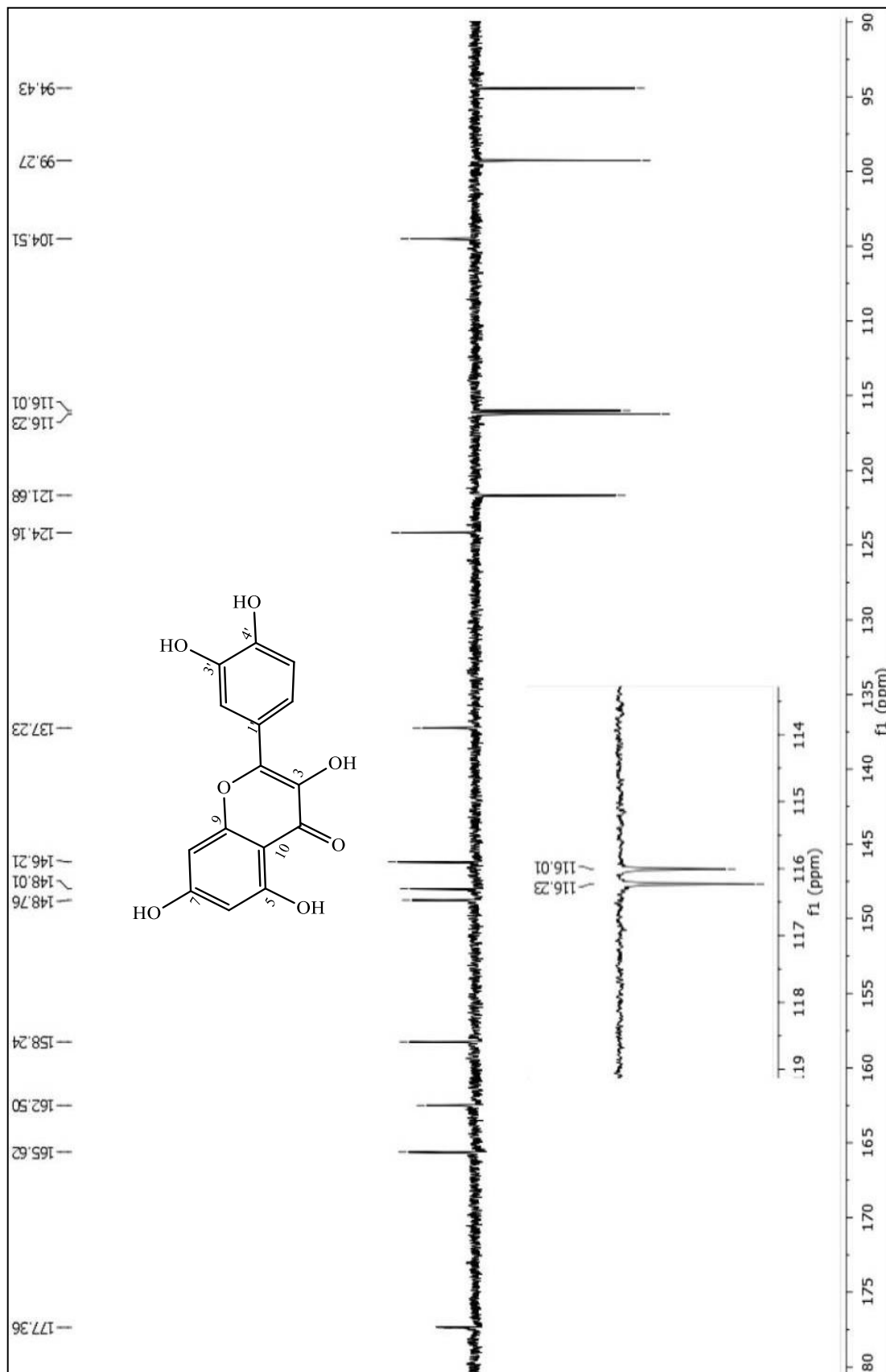


Figura 30- Expansão do espectro de RMN ^{13}C (δ , 125 MHz, CD_3OD) de Pg-4



4.1.6 Caracterização Estrutural de *Pg-5*

A substância codificada como *Pg-5* foi originada a partir da fração metanólica, do EEB dos cladódios de *P. gounellei*, após sucessivas cromatografias com Sephadex LH-20, eluídas com MeOH:CH₂Cl₂ (7:3), que levou ao isolamento de um pó com coloração amarela.

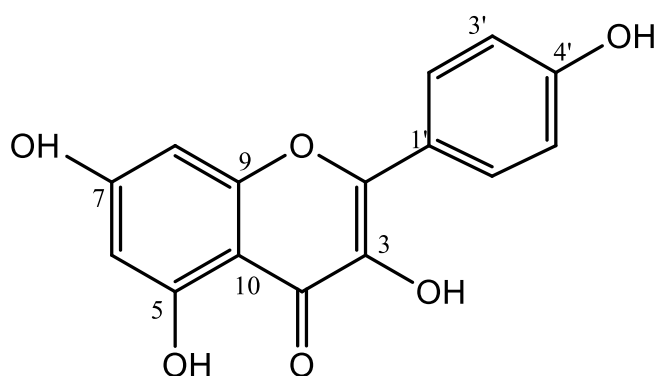
O espectro de RMN ¹H de *Pg-5* (**Figuras 31-32, Pág. 107**) também evidenciou sinais para hidrogênios aromáticos entre δ_H 6,18 e δ_H 8,08.

Na região de hidrogênios aromáticos foi possível visualizar as absorções de dois dubletos, um em δ_H 8,08 (H-2'/H-6') e outro em δ_H 6,90 (H-3'/H-5'), ambos com integrais para dois hidrogênios cada, acoplando *orto* com $J = 8,5$ e $9,0$ Hz respectivamente, entre si, característicos de sistema AA'BB', sendo possivelmente atribuído a um anel B de flavonoides. Estas absorções revelaram que o anel B de *Pg-5* é *para* substituído, enquanto que em *Pg-4* ele era trissubstituído e em *Pg-1*, não havia substituição. As absorções para dois dubletos em δ_H 6,18 (H-6) e em δ_H 6,39 (H-8), comuns em no anel A de esqueletos flavonoídicos com hidrogênios substituídos nas posições C-5 e C-7, revelaram que *Pg-5* possui este anel semelhante à *Pg-1* e *Pg-4*. A ausência de singletos atribuídos para os hidrogênios da posição C-2 e C-3 indicam que, assim como *Pg-4*, *Pg-5* possui uma dupla ligação entre C-2 e C-3. Como em *Pg-4*, a ausência de sinais condizentes a hidrogênios de grupos metoxilas ou metilas, leva a sugerir que na posição C-3 de *Pg-5* existe um substituinte hidroxila, semelhantemente a *Pg-4*. A análise do espectro de RMN ¹H de *Pg-5* e sua expansão (**Figuras 31-32, Pág. 107**), juntamente com comparações com os dados de *Pg-1* e *Pg-4*, além de dados da literatura, levaram a sugerir que *Pg-5* tratava-se do 3,5,7,4'- tetrahidroxiflavonol (**Tabela 7, Pág. 106**).

O espectro de RMN ¹³C de *Pg-5*, utilizando a técnica APT (**Figuras 33-34, Pág. 108**) corroborou a proposta do núcleo flavanoídico, com o sistema AA'BB', ao apresentar 13 sinais para 15 átomos de carbono, entre eles: uma carbonila em δ_C 177,40 condizente com carbonila de cetona conjugada na posição C-4, além de 8C não hidrogenados e quatro sinais para seis carbonos monohidrogenados. Este espectro também mostrou dois sinais em δ_C 130,69 (C-2'/C-6') e em δ_C 116,33 (C-3'/C-5'), condizentes a quatro átomos de carbonos monohidrogenados, confirmando a proposta do anel AA'BB', além de mais dois sinais para carbonos em δ_C 99,31 e δ_C 94,50, referentes aos carbonos C-6 e C-8 do anel A, substituído nas posições C-5 e C-7. A

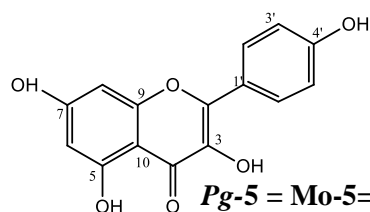
ausência de sinal para o carbono monohidrogenado referente à posição de C-3 fortalece a proposta de que **Pg-5**, assim como **Pg-4**, possui um núcleo flavonoídico do tipo flavonol.

A análise dos dados espectrais de RMN ^1H e ^{13}C , aliados a comparação com dados da literatura (PIZZOLATTI *et al.*, 2003) (**Tabela 7, Pág. 106**) e comparação com com padrões em CCDA utilizando o reagente NP, levaram a propor que **Pg-5** tratava-se do 3,5,7,4'-tetraidroxiflavonol (canferol). Esta substância já foi isolada em outras espécies da família Cactaceae, como *Pilosocereus arrabidae* e *Opuntia ficus-indica* (GONÇALVES *et al.*, 2015), todavia é inédita na espécie *P. gounellei* (MACIEL *et al.*, 2016)

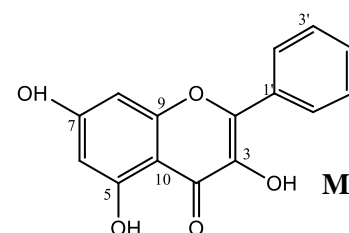


Canferol

Tabela 7- Comparação dos dados de RMN ^1H e ^{13}C da substância *Pg-5* (δ , CD_3OD , 500 e 125 MHz) com dados da literatura (*Mo-5*, PIZZOLATTI *et al.*, 2003) e (*Mo-5.1*, δ , $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$, 400 e 100 MHz- Galangina) (MURILLO, *et al.*, 2014).



***Pg-5* = *Mo-5* = 3,5,7,4'-tetraidroxiflavonol (canferol)**



***Mo-5.1* = Galangina**

<i>Pg-5</i>		<i>Mo-5</i> (Canferol, Pizzolatti <i>et al.</i> , 2003)		<i>Mo-5.1</i> (Galangina, Murillo <i>et al.</i> , 2014)		
C	δC	δH	δC	δH	δC	δH
1	-	-	-	-	-	-
2	148,10	-	147,05	-	146,1	-
3	137,13	-	136,68	-	138,0	-
4	177,40	-	176,62	-	177,0	-
5	162,54	-	162,31	-	162,4	-
6	99,31	6,18 (1H, d, $J=2,0\text{Hz}$)	99,19	6,27 (d, $J=1,9\text{ Hz}$)	99,3	6,29 (d, $J=2,0\text{ Hz}$)
7	165,65	-	165,08	-	165,2	-
8	94,50	6,39 (1H, d, $J=2,0\text{Hz}$)	94,54	6,52 (d, $J=1,9\text{Hz}$)	94,6	6,57 (d, $J=2,0\text{Hz}$)
9	158,30	-	157,83	-	158,0	-
10	103,80	-	104,16	-	104,3	-
1'	123,76	-	123,36	-	132,1	-
2'/6'	130,69	8,08 (2H, d, $J=9,0\text{Hz}$)	130,49	8,12 (2H, d, $J=8,8\text{Hz}$)	129,2	8,26 (2H, d, $J=8,3\text{ Hz}$)
3'/5'	116,33	6,90 (2H, d, $J=8,5\text{Hz}$)	116,35	6,99 (2H, d, $J=8,8\text{Hz}$)	128,5	-
4'	160,58	-	160,02	-	-	-
3'/4'/5'						7,49 – 7,52 (m)
OH	-	-	-	-	-	12,1 (s)

Figura 31- Espectro de RMN ^1H (δ , 500 MHz, CD_3OD) de *Pg-5*

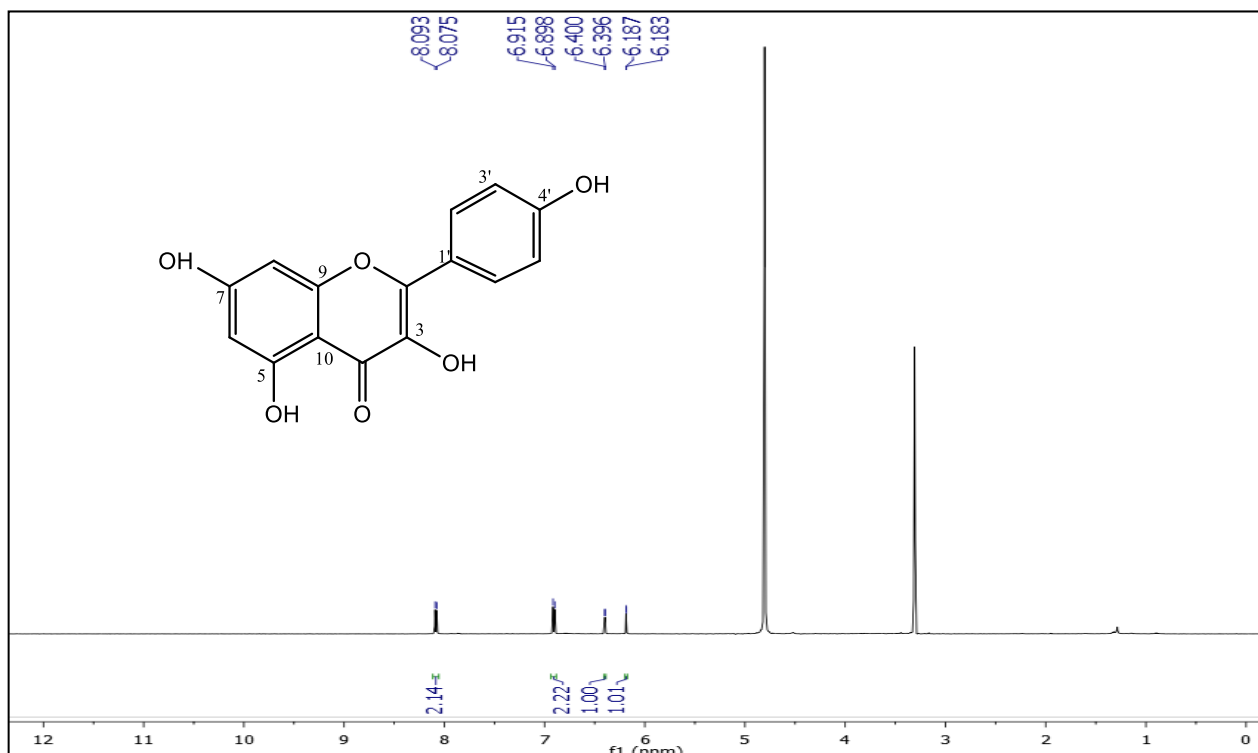


Figura 32- Expansão do espectro de RMN ^1H (δ , 500 MHz, CD_3OD) de *Pg-5*

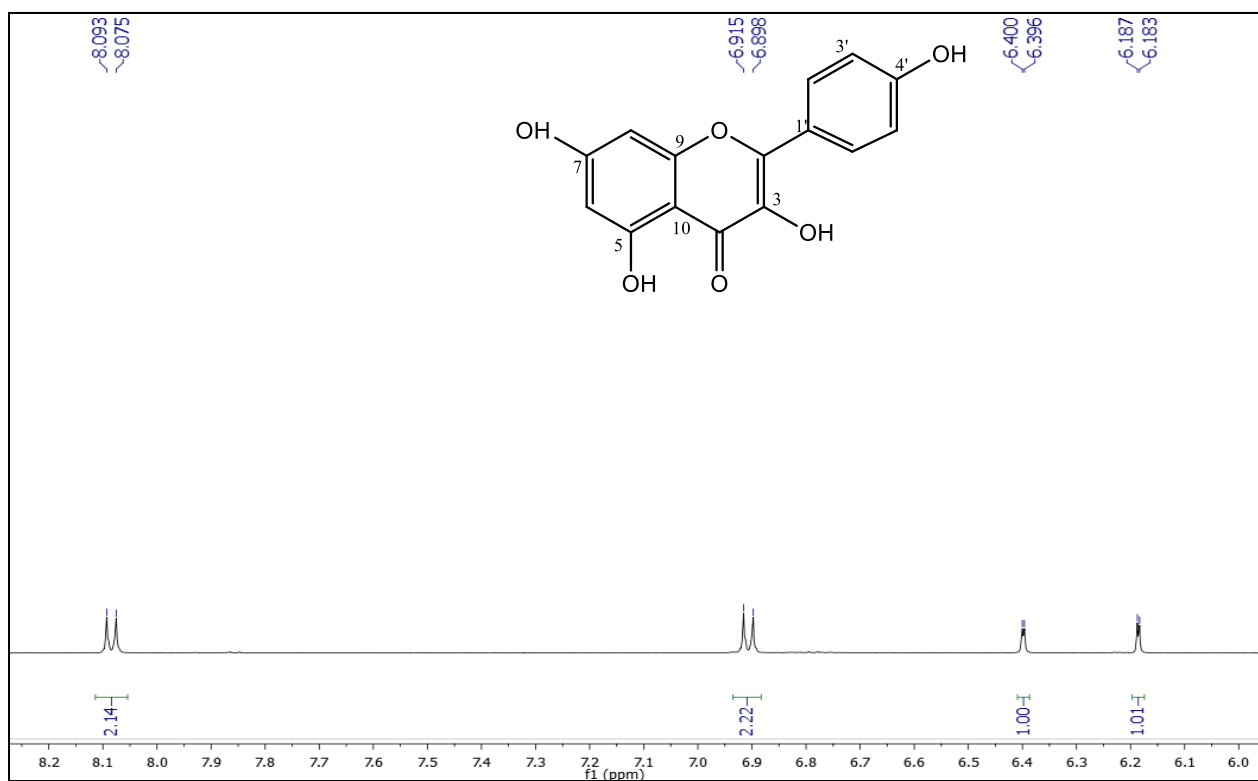


Figura 33 - Espectro de RMN ^{13}C , APT, (δ , 125 MHz, CD_3OD) de *Pg-5*

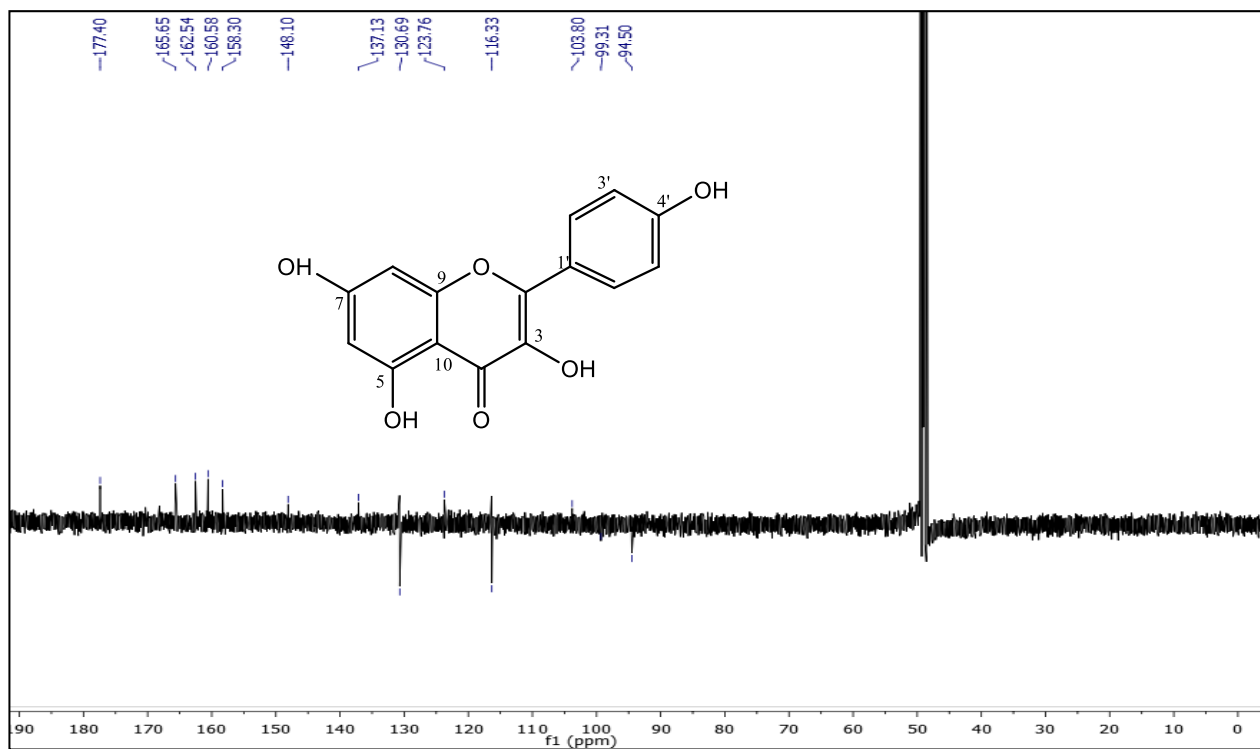
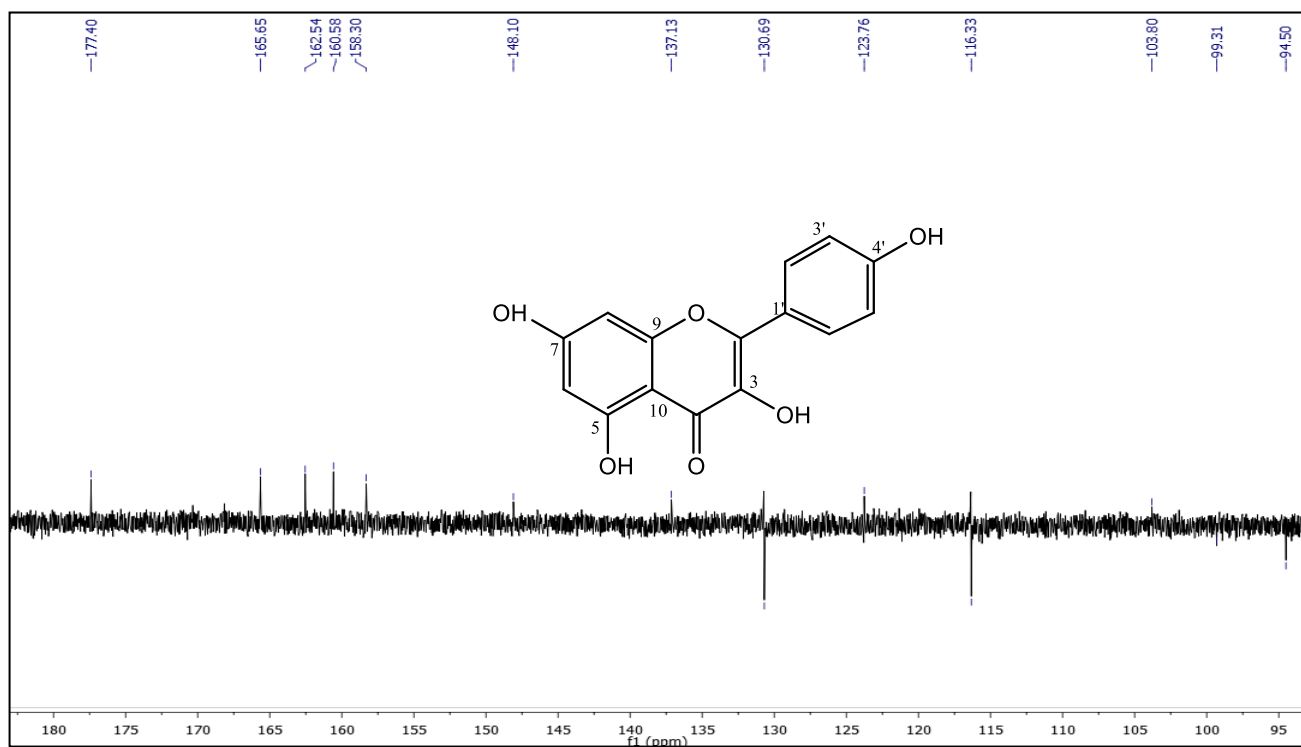


Figura 34- Expansão do espectro de RMN ^{13}C , APT, (δ , 125 MHz, CD_3OD) de *Pg-5*



4.1.7 Caracterização estrutural de *Pg-6*

A substância codificada com *Pg-6* foi isolada dos cladódios de *P. gounellei*, a partir da fração hexânica do Xad, que foi submetida a uma filtração rápida em sílica gel 60 eluída com Hex., CH₂Cl₂ e MeOH. A fração hexânica, originada desta filtração, foi cromatografada em sílica flash originando a subfração 28/33, que foi posteriormente purificada através de uma cromatografia em camada delgada preparativa, eluída com Hex:EtOAc (80:20), cuja faixa 2 mostrou-se pura levando ao isolamento do composto *Pg-6* que apresentou-se como um sólido verde amorfo.

Através do espectro de RMN ¹H de *Pg-6* (**Figuras 35-38, Págs. 113 -116**) foi possível visualizar absorções de singletos característicos de núcleo porfirínico em δ_H 9,38 (H-5), δ_H 9,53 (H-10) e δ_H 8,58 (H-20) (BRITO-FILHO *et al.*, 2014). Esta sugestão foi fortalecida ao observarmos sinais para quatro metilas de anéis pirrólicos em δ_H 3,82 (Me-12¹) anel III; δ_H 3,40 (Me-2¹) anel I; δ_H 3,21, do anel II (Me-7¹) e δ_H 1,81 (Me-18¹) do anel IV. O sinal em δ 3,21(Me-7¹) permitiu propor que *Pg-6* trata-se da feofitina a (**Tabela 8, Pág. 111**), uma vez que se *Pg-6* fosse a feofitina b observa-se-ia um sinal para hidrogênio de aldeído em torno de δ_H 11,50 (BRITO-FILHO *et al.*, 2014).

Neste espectro de RMN ¹H *Pg-6* também foi possível visualizar sinais para hidrogênios vinílicos em δ_H 7,98 (dd, $J=17,78$ Hz e 11,51 Hz) referente ao próton *Ha* - 3¹ que acopla *trans* com em δ_H 6,28 (dd, $J=17,78$ Hz) e *cis* com *Hb* - 3² em δ_H 6,17 (dd, $J=11,51$ Hz e 1,0 Hz). Este, por sua vez, acopla geminado com *Hc* - 3² ($J=1,0$ Hz). Foram ainda observados sinais para três hidrogênios olefínicos em δ_H 9,38, δ 9,53 e δ 8,58 condizentes com os hidrogênios H-5, H-10 e H-20 respectivamente, do núcleo porfirínico das feofitinas, além disso, o espectro mostrou também, um singleto em δ_H 3,88 (H-13⁴), condizente com a uma metoxila.

A análise dos espectros de RMN ¹³C-APT (**Figuras 39-41, Págs. 117-119**) revelou picos para 55 átomos de carbono, onde pôde-se definir 19 não hidrogenados, 11 metínicos, entre os quais um vinílico em δ_C 129,04 (C-3¹), 14 metilênicos, com destaque também para um carbono vinílico terminal em δ_C 122,98 (C-3²) e 10 metílicos, destacando o sinal em δ_C 52,86 (C-13⁴), típico de CH₃ de metoxila de éster alifático, que fortalece as sugestões do RMN ¹H para a existência desse grupo em *Pg-6*.

A sugestão de que *Pg-6* trata-se da feofitina a foi fortalecida pela presença de um envelope de absorções de 17 sinais condizentes com carbonos metínicos,

metilêncios e metínicos do radical fitilila, além de outros sianis em δ_C 61,46 atribuído ao carbono oximetilênico ($\text{CH}_2\text{-P}_1$) e dois referentes aos carbonos olefínicos (CH-P_2) em δ_C 117,79 e (CH-P_3) em δ_C 142,19 (Tabela 9, Pág. 112), que ratificaram que **Pg-6** trata-se da feofitina a.

A análise dos dados espectrais de RMN ^1H e ^{13}C em conjunto com comparações com dados da literatura (Tabelas 8-9, Págs. 111-112), levou a afirma que **Pg-6** trata-se da feofitina a, substância inédita na espécie *Pilosocereus gounellei* (MACIEL, et al., 2016).

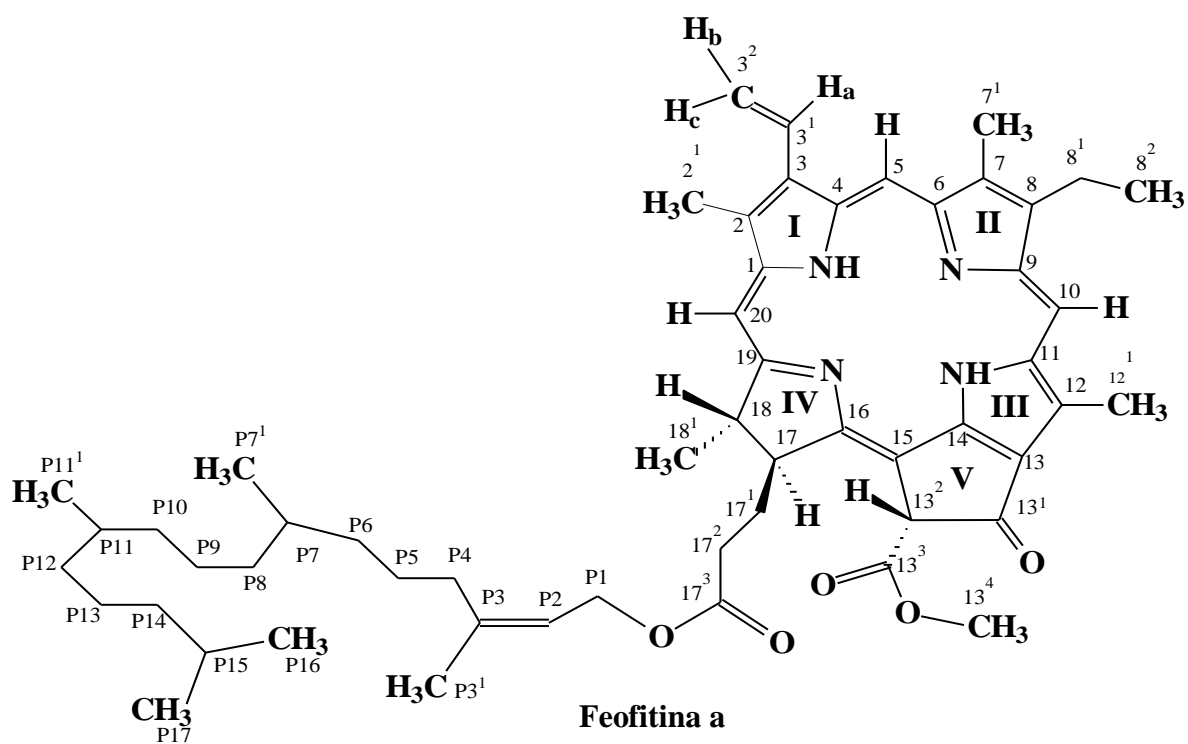


Tabela 8- Dados comparativos de RMN ^1H e ^{13}C de *Pg-6* (δ , CDCl_3 , 500 e 125 MHz, respectivamente) com os modelos *Mo-6* (δ , CDCl_3 , 500 e 125 MHz; TOMAZ *et al.*, 2008) e *Mo-6.1* (δ , CDCl_3 , 200 e 50 MHz; SILVA *et al.*, 2006)

C	Mo-6		Mo-6.1		Pg-6	
	δ C	δ H	δ C	δ H	δ C	δ H
1	142,34	–	141,98	–	142,78	–
2	131,10	–	131,78	–	132,09	–
2 ¹	12,26	3,39 (s)	12,06	3,37 (s)	12,07	3,40 (s)
3	136,82	–	136,16	–	136,69	–
3 ¹	129,19	7,95 (dd, $J=17,85$ Hz, 11,48 Hz)	128,91	7,93 (dd, $J=17,8$ e 11,6 Hz)	129,04	7,98 (dd- $J=17,81$ Hz e 11,51 Hz)
3 ²	123,11	6,27 (trans) (d, $J=17,95$ Hz) e 6,18 (cis) (d, $J=11,10$ Hz)	122,72	6,14 (dd, $J=11,6$ e 1,6 Hz) (Cis) e 6,24 (dd, $J=17,8$ e 1,6 Hz) (Trans)	122,98	6,28 (trans) (dd- $J=17,78$ Hz) e 6,17(Cis) (dd- $J=11,51$ Hz e 1,0(Hz))
4	136,51	–	136,40	–	136,44	–
5	97,66	9,35 (s)	97,39	9,30 (s)	97,52	9,38 (s)
6	155,55	–	155,55	–	155,55	–
7	136,14	–	136,05	–	135,89	–
7 ¹	11,35	3,19 (s)	11,11	3,16 (s)	11,20	3,21 (s)
8	145,25	–	145,09	–	145,04	–
8 ¹	19,60	3,63 (m)	19,32	3,64 (m)	19,47	3,68 (s, 2H)
8 ²	17,52	1,66 (m)	17,37	1,65 (t, $J=7,60$ Hz)	16,28	1,69 (t) $J=7,55$ Hz
9	150,92	–	150,86	–	150,05	–
10	104,59	9,51 (s)	104,32	9,45 (s)	104,44	9,53 (s)
11	138,14	–	137,83	–	138,00	–
12	129,03	–	128,80	–	129,14	–
12 ¹	12,32	3,69 (s)	12,06	3,65 (s)	12,09	3,82 (s)
13	129,14	–	128,80	–	129,14	–
13 ¹	189,81	–	189,66	–	189,51	–
13 ²	64,90	6,30 (s)	64,66	6,25 (s)	64,75	6,27 (s)
13 ³	169,77	–	172,95	–	169,49	–
13 ⁴	53,07	3,91 (s)	52,88	3,87 (s)	52,86	3,88 (s)
14	149,59	–	149,59	–	150,02	–
15	105,10	–	105,10	–	105,63	–
16	161,19	–	161,19	–	161,30	–
17	51,42	4,15 (m)	51,05	4,19 (m)	51,30	4,16 (m)
17 ¹	29,89	–	29,76	–	29,68	–
17 ²	31,42	–	31,16	–	31,24	–
17 ³	173,18	–	172,19	–	173,83	–
18	50,36	4,34 (m)	50,05	4,44 (m)	50,19	4,47 (m)
18 ¹	23,28	1,84 (d)	23,94	1,79 (d, $J=7,40$ Hz)	23,08	1,81 (d)
19	172,63	–	169,60	–	172,89	–
20	93,72	8,60 (s)	93,06	8,53 (s)	93,59	8,58(s)

Tabela 9- Dados comparativos de RMN ^{13}C da cadeia fitila de *Pg-6* (δ , CDCl_3 , 50 MHz) com os modelos *Mo-6* (δ , CDCl_3 , 125 MHz; TOMAZ, 2008) e *Mo-4* (δ , CDCl_3 , 75 MHz; MELOS *et al.*, 2007).

CADEIA DE FITOL – <i>Pg-6</i>			
	Mo - 6	Mo – 6.1	<i>Pg-6</i>
C	δ C	δ C	δ C
P 1	61,69	59,40	61,46
P 2	117,93	123,10	117,79
P 3	143,02	140,10	142,19
P 4	39,98	39,80	39,78
P 5	25,17	25,10	24,98
P 6	37,57	36,60	37,37
P 7	32,93	32,70	32,60
P 8	37,50	37,20	37,31
P 9	24,60	24,50	24,86
P 10	36,82	37,30	37,25
P 11	32,79	32,60	32,74
P 12	37,44	37,30	36,63
P 13	24,95	24,70	24,74
P 14	39,53	39,30	39,34
P 15	28,14	27,90	27,94
P 16	22,89	22,70	22,68
P 17	22,80	22,60	22,59
P 11¹	19,84	19,70	19,70
P 7¹	19,90	19,70	19,63
P 3¹	16,48	16,10	17,30

Figura 35 - Espectro de RMN ^1H (δ , CDCl_3 , 500 MHz) de Pg-6

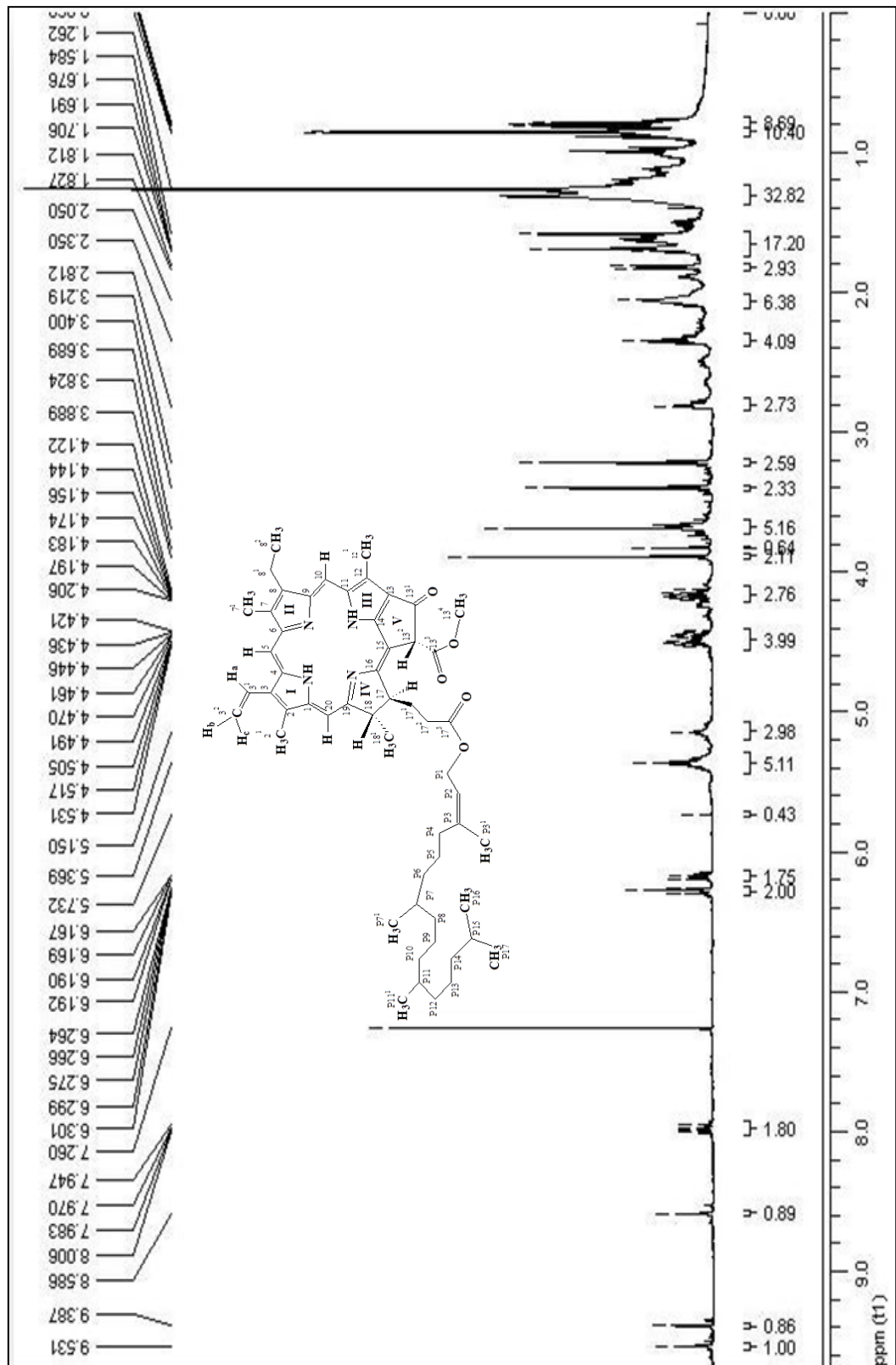


Figura 36- Expansão do espectro de RMN ^1H (δ , CDCl_3 , 500 MHz) de *Pg-6*

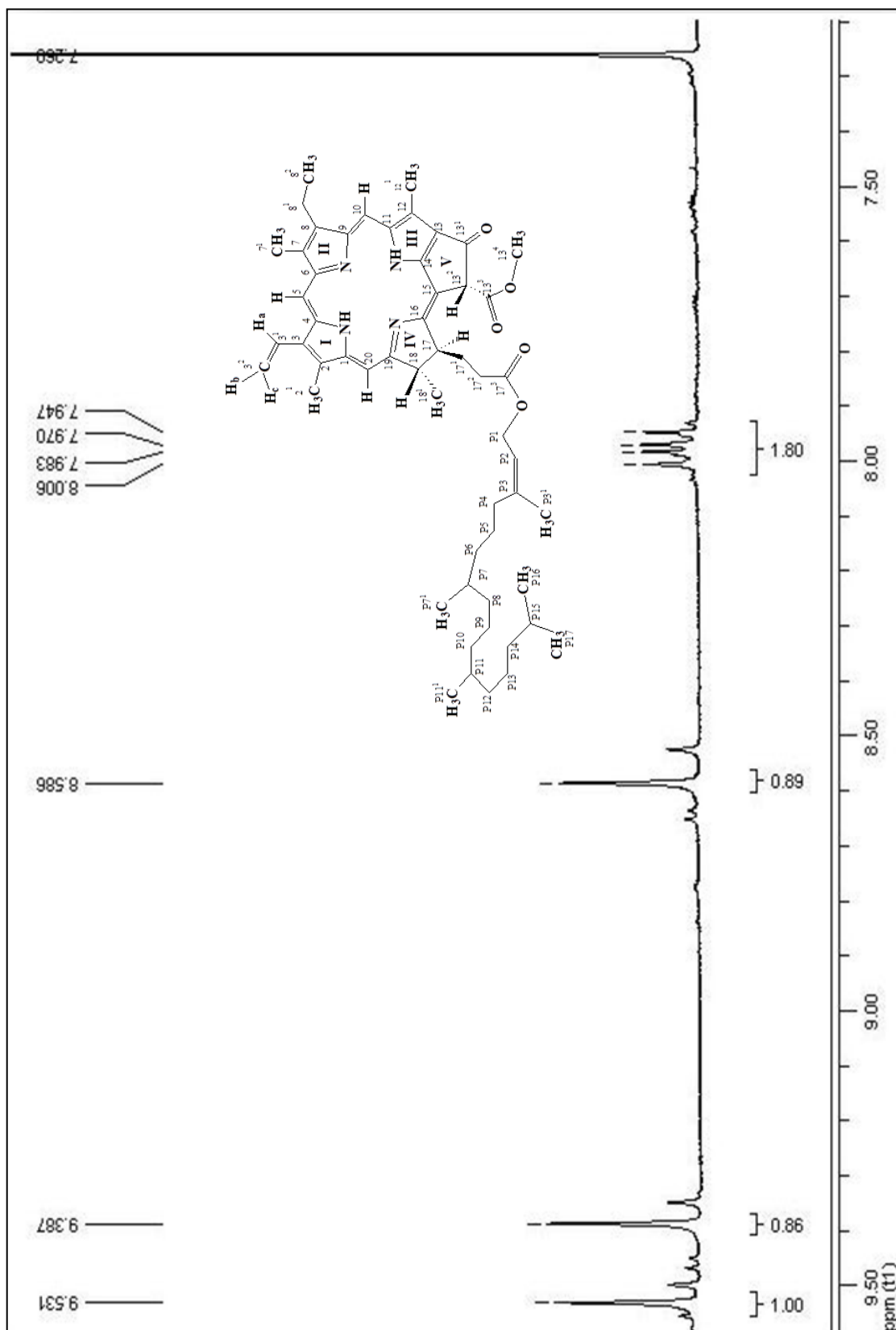


Figura 37- Expansão do espectro de RMN ^1H (δ , CDCl_3 , 500 MHz) de Pg-6

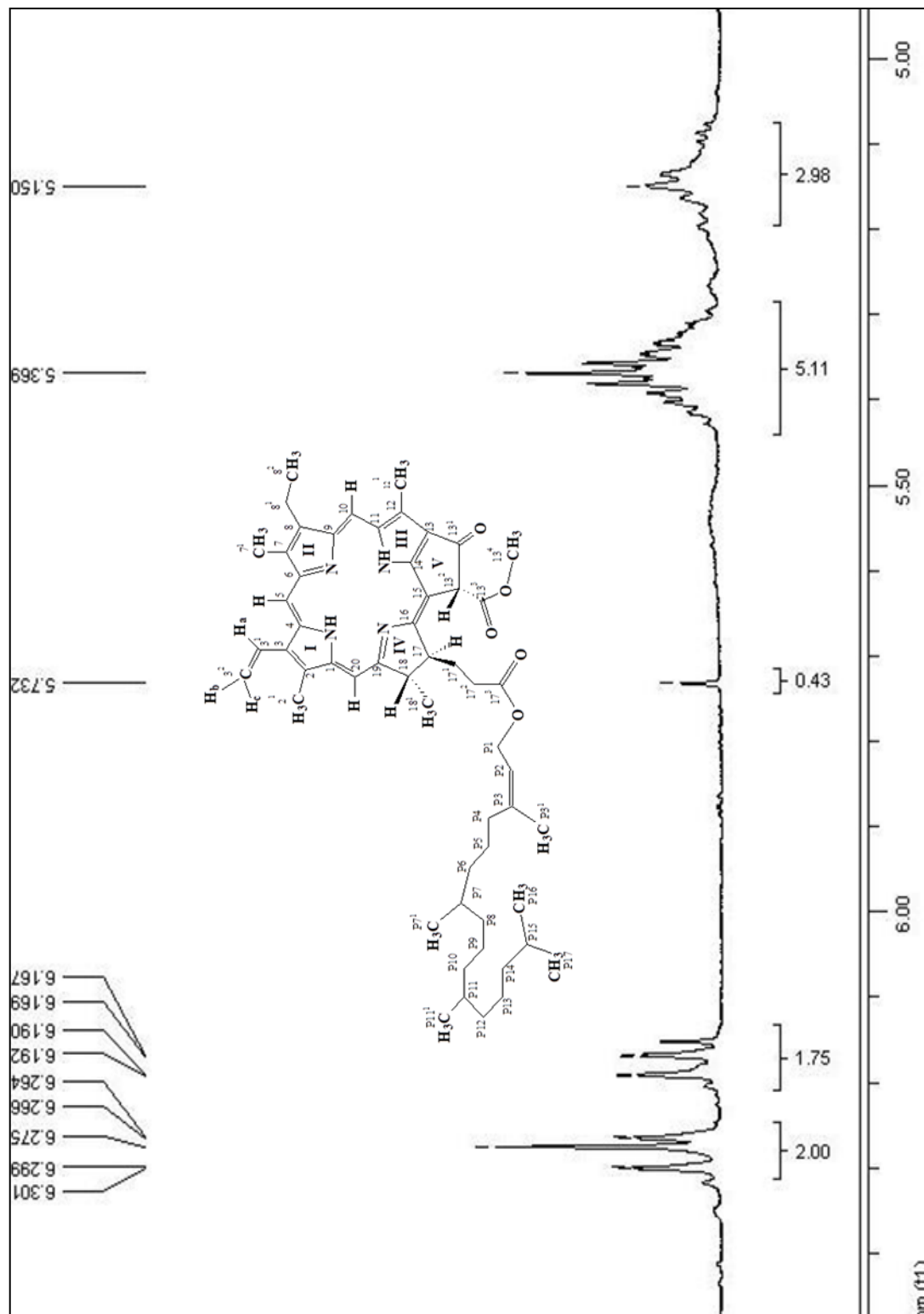


Figura 38- Expansão do espectro de RMN ^1H (δ , CDCl_3 , 500 MHz) de Pg-6

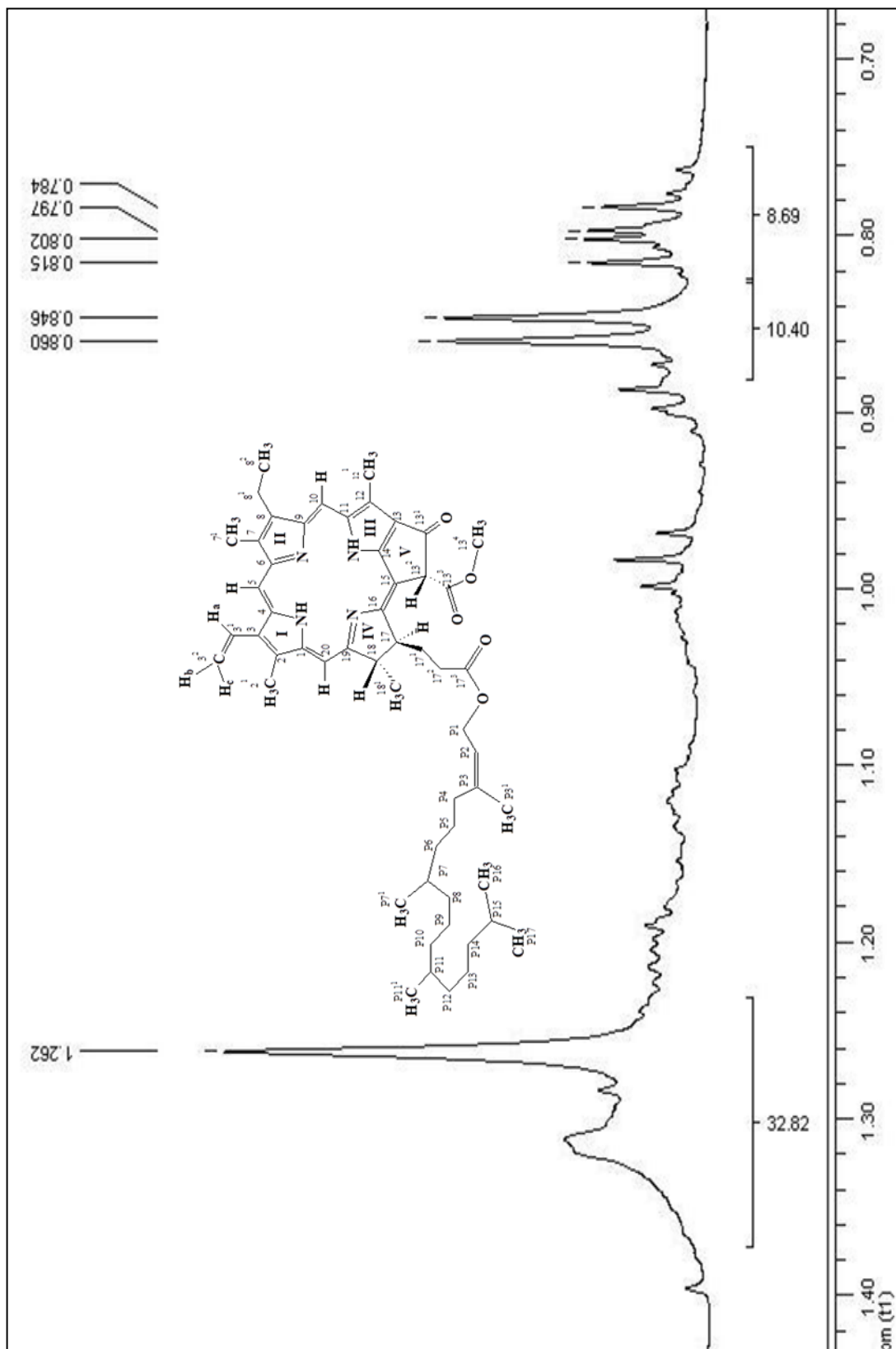


Figura 39- Espectro de RMN ^{13}C , APT, (δ , CDCl_3 , 125 MHz) de Pg-6

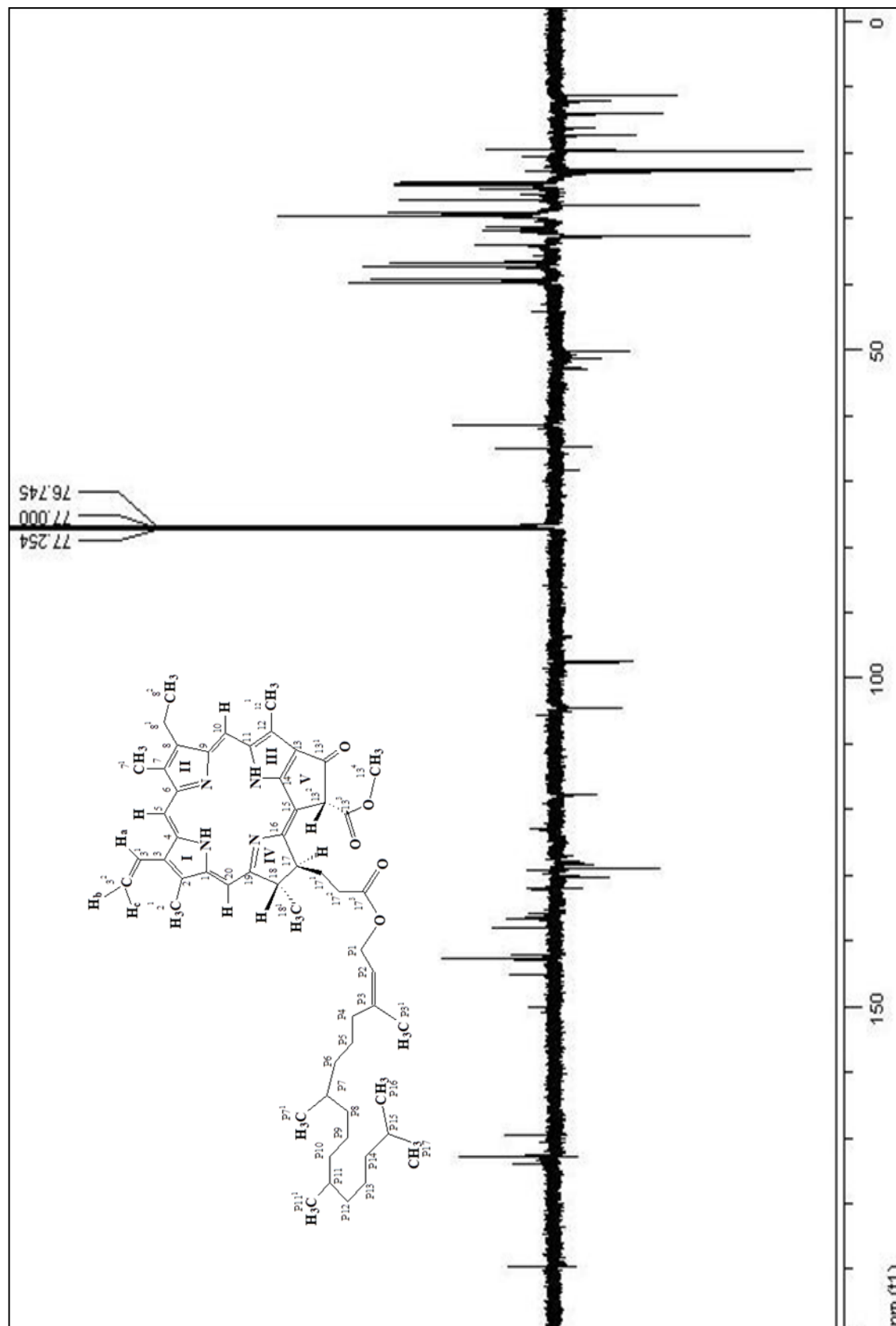


Figura 40- Expansão do espectro de RMN ^{13}C , APT, (δ , CDCl_3 , 125 MHz) de Pg-6

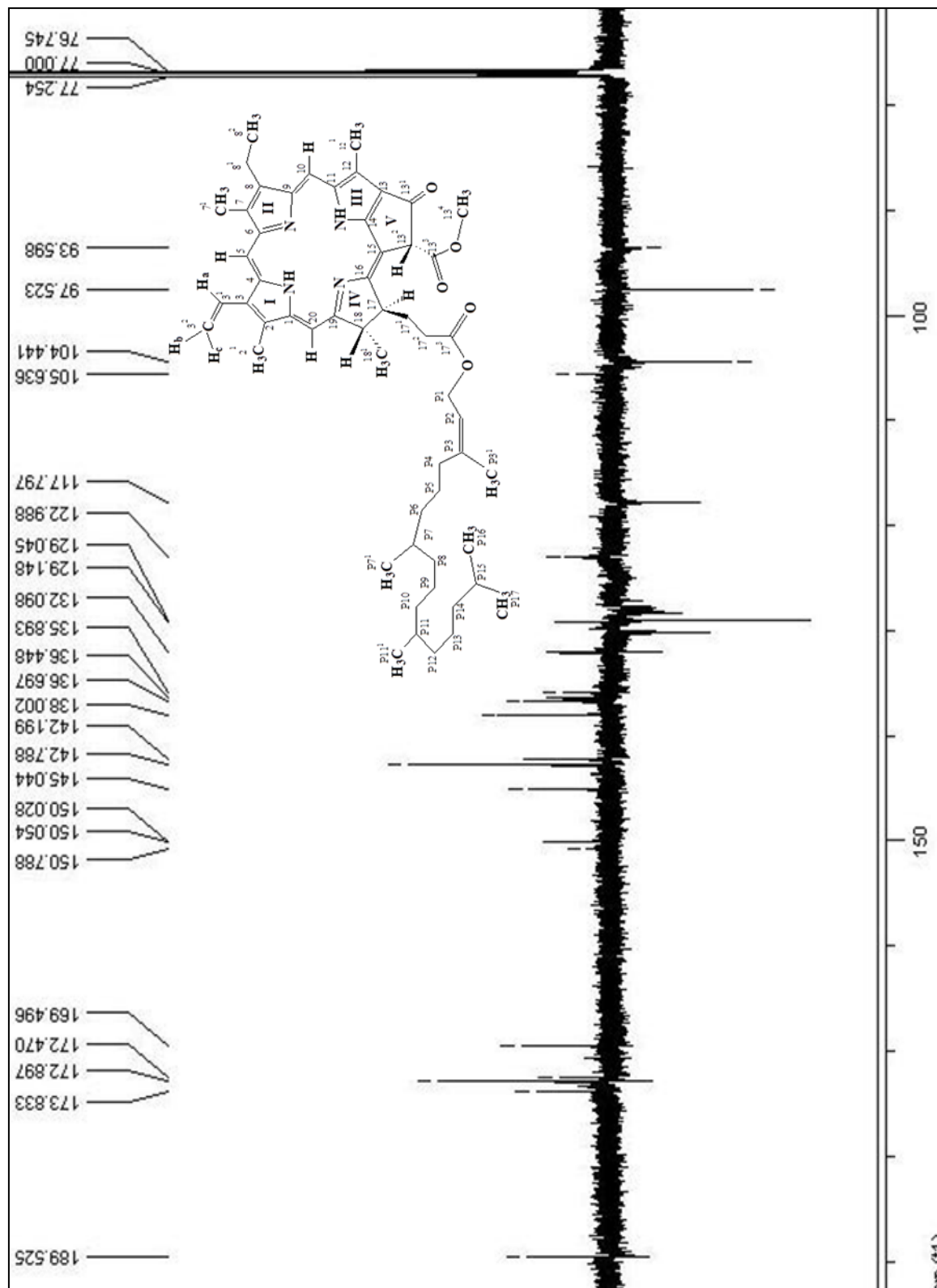
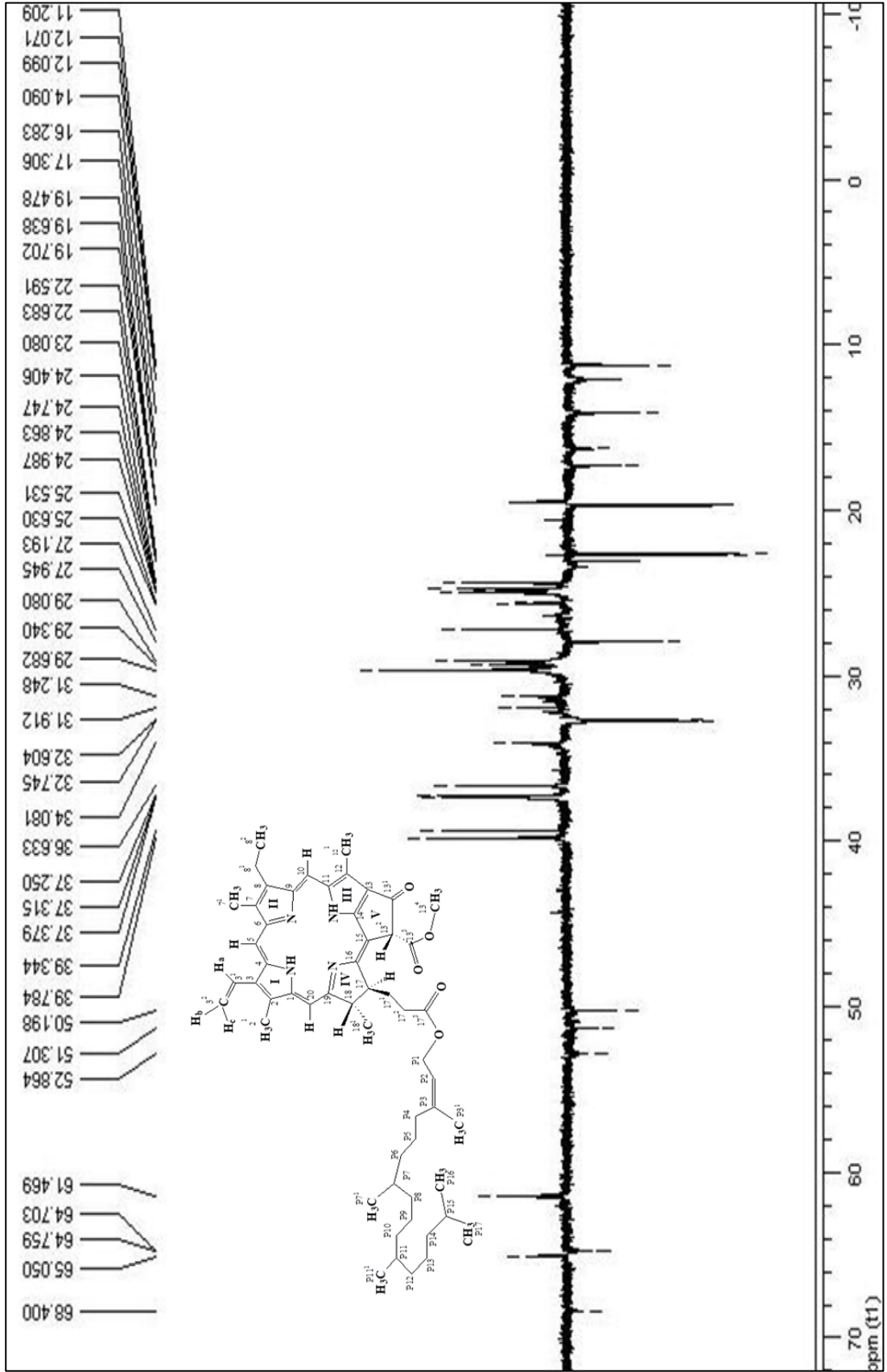


Figura 41- Expansão do espectro de RMN ^{13}C , APT (δ , CDCl_3 , 125 MHz) de Pg-6



4.1.8 Caracterização estrutural de *Pg-8*

A substância codificada como *Pg-8* foi isolada da fração clorofórmica ácida das raízes de *P. gounellei*, após ser submetida a uma cromatografia em sílica gel 60, eluída com Hex, AcOEt e MeOH, sozinhos ou em misturas binárias, originando a fração 88/144, que foi posteriormente submetida a uma cromatografia em CLAE-DAD, com uma coluna semi-preparativa Luna C-18 (250 x 21,20 mm x 5 μ m, Phenomenex) por 15 min, adotando como fase móvel MeOH/H₂O-Milli-Q, em gradiente e concentração crescente de MeOH de 50 a 100%. O pico em 7,5 min foi coletado e concentrado em N₂, originando *Pg-8* (8,00 mg).

O espectro de RMN ¹H de *Pg-8* (**Figuras 42-43, Pág. 125**) apresentou dois dubletos, um em δ_H 7,11(H-2'/H-6') e outro em δ_H 6,75 (H-3'/H-5') com integral para dois hidrogênios cada um, sugerindo a presença de um anel aromático *para*-substituído. Foi possível observar a presença de dois dubletos um em δ_H 6,79 (H-5), acoplado orto com H-6 e outro em δ_H 7,10 (H-2), acoplado meta também com H-6 e um duplo dubleto em δ_H 6,98 (H-6) acoplado orto e meta com H-5 e H-2 respectivamente, indicando a presença de um sistema aromático AMX. A presença de um grupo metoxila, em um dos anéis aromáticos, foi mostrada pela absorção em δ_H 3,79 (3H). A presença das unidades coumaroil e tiramina foram sugeridas pela presença de um par de dubletos δ_H 6,52 (H-8) e δ_H 7,31 (H-7), ambos acoplado trans com $J = 16$ Hz, característicos de hidrogênios olefínicos e pela presença de um interessante tripleto em δ_H 8,00, referente ao hidrogênio ligado ao N (GRECA *et al.*, 2006), dois duplos dubletos em δ_H 3,29 (H-8a') e 3,25 (H-8b') referentes ao carbono metilênico vizinho ao N e um tripleto em δ_H 4,27 (H-7'), atribuído a um hidrogênio de carbono oximetínico (EFDI *et al.*, 2007).

O espectro de RMN ¹H mostrou também dois sinais relevantes: um quarteto em δ_H 3,27 (H-1'') e um tripleto em δ_H 1,07 (H-2''), que foram atribuídos a um grupo etoxi, ligado ao carbono oximetínico, no qual também se encontrava ligado o próton δ_H 4,27 (H-7') (EFDI *et al.*, 2007).

O espectro de RMN ¹³C (**Figura 44, Pág. 126**) apresentou sinais para 20 átomos de carbono, sustentando as informações obtidas do espectro de RMN ¹H acerca da presença dos grupos coumaroil e tiramina propostos para *Pg-8*. A porção coumaroil foi definida pelos sinais em δ_C 165,87 (carbonila de amida α,β -insaturada) e dois sinais em δ_C 139,46 (C-7) e δ_C 119,01 (C-8), carbonos α,β -insaturados. Já a porção tiramina foi

confirmada pela presença dos sinais em: 45,61 (CH₂, C-8') e pelo sinal em δ_C 79,64 (CH, C-7'), referente ao carbono oximetínico, indicando a posição em que o radical etoxi estava ligado (GRECA *et al.*, 2006).

A presença do grupo etoxi de **Pg-8** foi reforçada pelos sinais em δ_C 63,51 (CH₂, C-1'') e δ_C 15,42 (CH₃, C-2''). O espectro de RMN ¹³C também confirmou a presença de dois anéis aromáticos com sinais em δ_C 128,07 (C-2'/6'), δ_C 115,34 (C-3'/5') referentes ao sistema AA'BB' e sinais em δ_C 110,90 (C-2), δ_C 115,83 (C-5) e δ_C 121,82 (C-6) referentes sistema AMX, mostrando um grupo metoxi em δ_C 55,75 (H₃CO–C-3) (EFDI *et al.*, 2007; CAVALCANTE *et al.*, 2010).

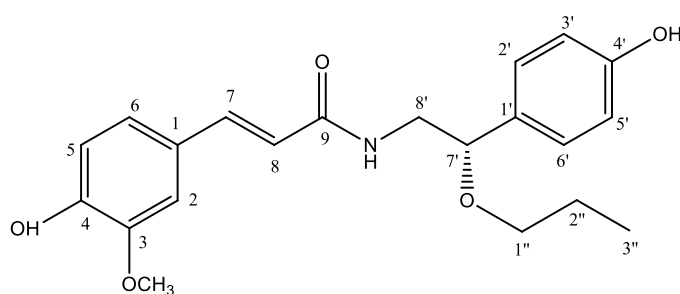
A ausência de correlação do hidrogênio δ_H 8,00 (t, N–H) com qualquer carbono no espectro bidimensional HMQC (**Figura 45, Pág. 127**) e as correlações, a duas ligações, observadas com o carbono δ_C 165,8 (²J) no espectro bidimensional HMBC demonstraram que o composto trata-se de uma alcalamida derivada da *trans*-feruloiltiramina (GRECA *et al.*, 2006; CAVALCANTE *et al.*, 2010).

O espectro HMBC (**Figura 46, Pág. 128**) exibiu correlação a três ligações que confirmaram a presença do grupo coumaroil, são elas: H-7 com C-2, C-6 e C-9; H-8 com C-1; H-5 com C-3 e C-1. Outras correlações do espectro sugeriram a presença do grupo etoxi e também da porção *trans*-feruloiltiramina: H-1'' com C-7' e H-8' com C-9 e C-1'. Estes dados permitiram identificar o composto **Pg-8** como 7'-etoxi-*trans*-feruloiltiramina, citada pela primeira vez na literatura.

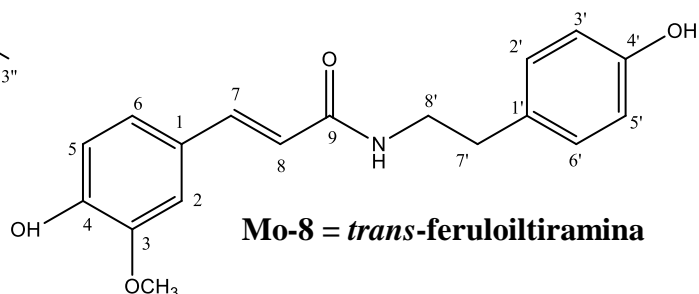
O espectro bidimensional homonuclear COSY (**Figura 47, Pág. 129**) ratificou a proposta estrutural para **Pg-8** mostrando correlações entre os hidrogênios (N–H) δ_H 8,00 (t) com H-8'; H-8' e H-7'; H-1'' e H-2'' (**Tabela 10-11, Págs. 123-124**).

A rotação óptica de **Pg-8** foi definida através de ensaio com $[\alpha]_D^{25^\circ} = -10^\circ$ (0,01; MeOH). A fórmula molecular estabelecida para o composto **Pg-8** foi C₂₀H₂₃NO₅, o fragmento de massa correspondente a perda do etanol pôde ser observada no ESI [M - H]⁻ como 310,17 (**Figura 49, Pág.131**). A compilação dos dados espectrais uni e bidimensionais, EM, $[\alpha]_D^{25^\circ}$ e comparações com modelos da literatura, permitiram definir **Pg-8** como sendo 7'-etoxi-*trans*-feruloiltiramina, substância esta sem relato anterior, se tratando portanto de uma nova molécula chamada marianneína “in memoriam” (MACIEL *et al.*, 2016).

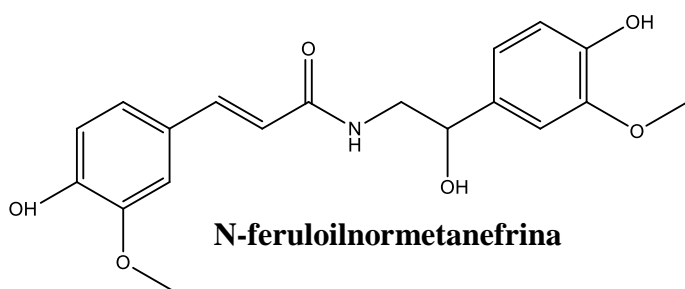
A hipótese de que **Pg-8** poderia se tratar de um artefato de técnica foi descartada com base em estudos anteriores que descreveram o isolamento da *trans*-feruloiltiramina e os seus derivados, através de diferentes métodos de extração (GRECA *et al.*, 2006; LIANG *et al.*, 2014). Liang e colaboradores avaliaram a extração de oito substâncias nitrogenadas de *Portulaca oleracea* utilizando irradiação de micro-ondas e diferentes solventes tais como diclorometano, acetato de etila, metanol, etanol, etanol a 70%, etanol 30% e água. As oito substâncias isoladas, incluindo N-feruloilnormetanefrina e N-*trans*-feruloiltiramina, que foram extraídos com os solventes testados no estudo de *P. gounellei*, demonstraram que esses solventes não promoveram a formação de radicais ou artefatos de técnicas (LIANG *et al.*, 2014).



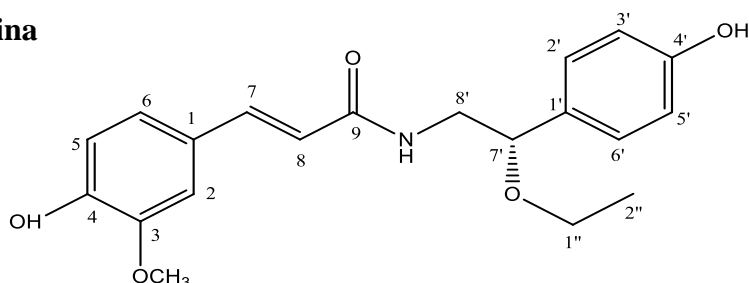
Mo-8.1 = 7'-propóxi-*trans*-feruloiltiramina



Mo-8 = *trans*-feruloiltiramina



N-feruloilnormetanefrina



7'-etoxi-*trans*-feruloiltiramina = marianneína

Tabela 10 - Dados comparativos de RMN ^1H e ^{13}C de Pg-8 (δ , DMSO- d_6 , 400 e 100 MHz) com os modelos Mo-8 (δ , CDOD $_3$, 500 e 125 MHz) (GRECA *et al.*, 2006) e Mo-8.1 (δ , CDCl $_3$, 200 e 50 MHz) (CAVALCANTE *et al.*, 2010).

		Pg-8		Mo-8		Mo-8.1	
C	δC	δH	δC	δH	δC	δH	
1	126,62	-	128,8	7,15 (d, $J=2,5\text{Hz}$)	126,82	-	
2	110,90	7,1 (sL)	112,2	-	109,70	6,9 (sL)	
3	148,03	-	150,3	-	147,69	-	
4	148,46	-	149,8	-	147,20	-	
5	115,83	6,79 (d, $J=8,0\text{Hz}$)	117,0	6,81 (d, $J=9,5\text{ Hz}$)	114,91	6,74(d, $J=8,4\text{Hz}$)	
6	121,82	6,98 (d, $J=8,0\text{ Hz}$)	123,8	7,05 (dd, $J=9,5\text{ e }2,5\text{ Hz}$)	121,89	6,93 (dL)	
7	139,46	7,31 (d, $J=16,0\text{Hz}$)	142,7	7,46 (d, $J=19,5\text{ Hz}$)	140,89	7,37 (d, $J=15,8\text{Hz}$)	
8	119,01	6,52 (d, $J=16,0\text{ Hz}$)	119,2	6,49 (d, $J=19,5\text{ Hz}$)	117,47	6,16 (d, $J=15,8\text{ Hz}$)	
9	165,87	-	169,7	-	167,04	-	
1'	130,78	-	132,7	-	129,68	-	
2'/6'	128,07	7,11 (d, $J=8,0\text{ Hz}$)	129,6	7,19 (d, $J=10,5\text{ Hz}$)	129,53	6,96 (d, $J=8,4\text{Hz}$)	
3'/5'	115,34	6,75 (d, $J=8,0\text{ Hz}$)	116,8	6,82 (d, $J=10,5\text{ Hz}$)	115,17	6,68 (d, $J=8,4\text{Hz}$)	
4'	157,08	-	158,8	-	155,17	-	
7'	79,64	4,27 (t, $J=4,0\text{Hz}$)	81,5	4,37 (dd, $J=8,2\text{ e }5,3\text{ Hz}$)	34,41	2,67 (t, $J=6,90\text{Hz}$)	
8'	45,61	3,29 (dd, $J=13,9\text{ e }5,9\text{ Hz}$) e 3,25 (dd, $J=13,0\text{ e }5,9\text{ Hz}$)	47,7	3,51 (dd, $J=14,0\text{ e }5,3\text{ Hz}$) e 3,44 (dd, $J=14,0\text{ e }8,2\text{ Hz}$)	40,89	3,46 (t, $J=6,90\text{Hz}$)	
1''	63,51	3,27 (q, $J=6,0\text{Hz}$)	72,1	3,28 (Obscurecido)	-	-	
2''	15,42	1,07(t, $J=6,9\text{ Hz}$)	24,5	1,58 (ses, $J=7,6\text{ Hz}$)	-	-	
3''	-	-	11,5	0,92 (t, $J=7,6\text{ Hz}$)	-	-	
OMe-3	55,75	3,79 (s)	56,9	3,91 (s)	55,56	3,79 (s)	
NH	-	8,0 (t, $J=4\text{ Hz}$)	-	-	-	-	

Tabela 11- Dados espectrais de RMN ^{13}C (100 MHz) e RMN ^1H (400 MHz), HMQC e HMBC (DMSO-*d*₆, δ) de Pg-8 (7'-etoxi- *trans*-feruloiltiramina)

Posição	HMQC		HMBC	
	δC	δH (J em Hz)	3J (H \rightarrow C)	2J (H \rightarrow C)
1	126,62 C	-		
2	110,9 C-H	7,11, d (1,2)	4, 6,7	3
3	148,03 C	-		
4	148,46 C	-		
5	115,83 C-H	6,79, dd (8,0 e 0,72)	1,3	4, 6
6	121,82 C-H	6,98, dd (8,0 e 1,2)	2, 4, 7	5
7	139,46 C-H	7,31, d (16,0)	2, 6, 9	1, 8
8	119,01 C-H	6,52, d (16,0)	1	9
9	165,87 C	-		
1'	130,78 C	-		
2'/6'	128,07 C-H	7,12, dd (8,0 e 1,2)	2', 6', 4', 7'	3',5'
3'/5'	115,34 C-H	6,75, dd (8,0 e 1,2)	1', 3',5'	4'
4'	157,08 C	-		
7'	79,64 C-H	4,27, t (5,0)	1'',2',6'	8'
8'	45,61 C-H ₂	3,29, dd (13,0 e 5,9) 3,25, dd (13,0 e 5,9)	1',9	7'
1''	63,51 C-H ₂	3,27, q (6,9)		2''
2''	15,42 C-H ₃	1,07, t (6,9)	7'	1''
OMe-3	55,75 C-H ₃	3,79, s	3	
N-H	-	8,0, t (5,0)		9

Figura 42- Espectro de RMN ^1H (δ , DMSO- d_6 , 400 MHz) de Pg-8

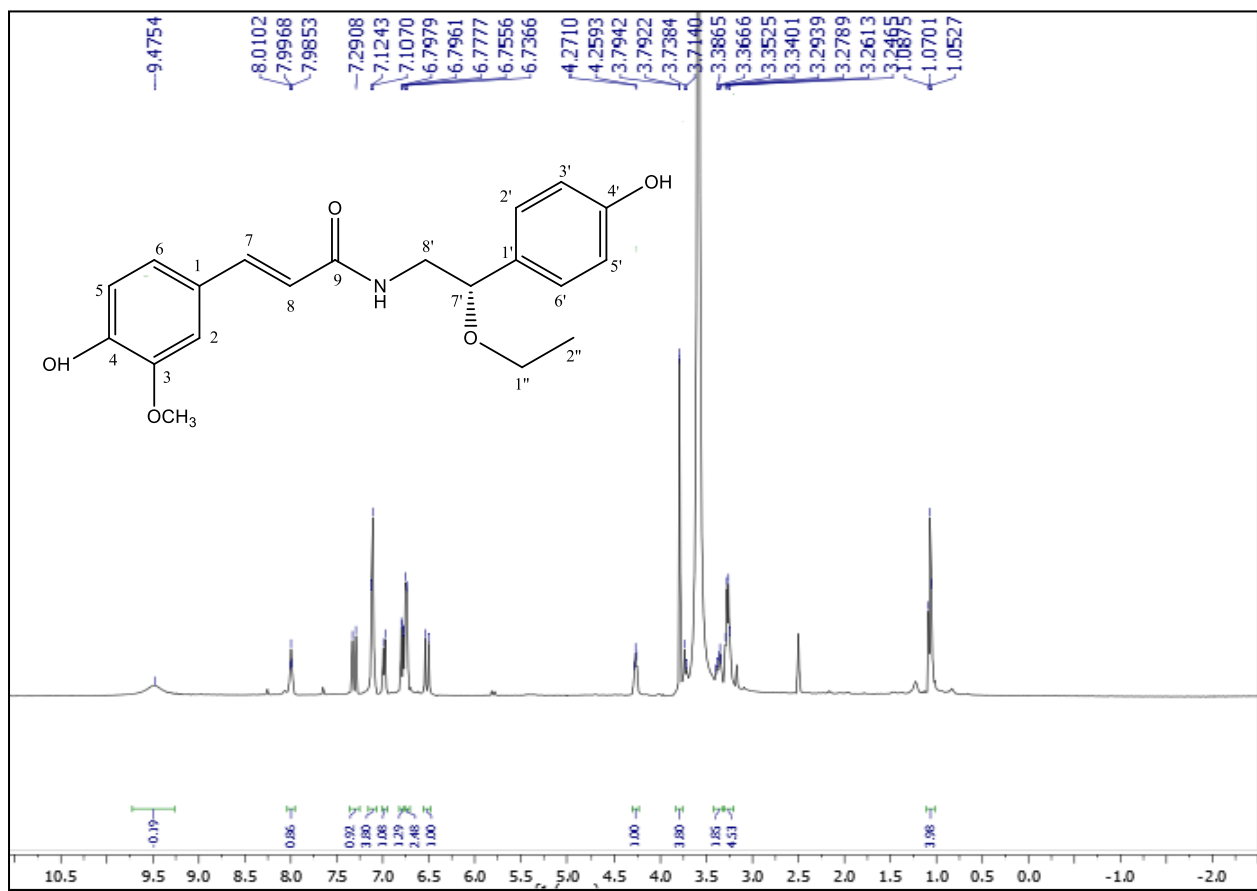


Figura 43- Expansão do espectro de RMN ^1H (δ , DMSO- d_6 , 400 MHz) de Pg-8

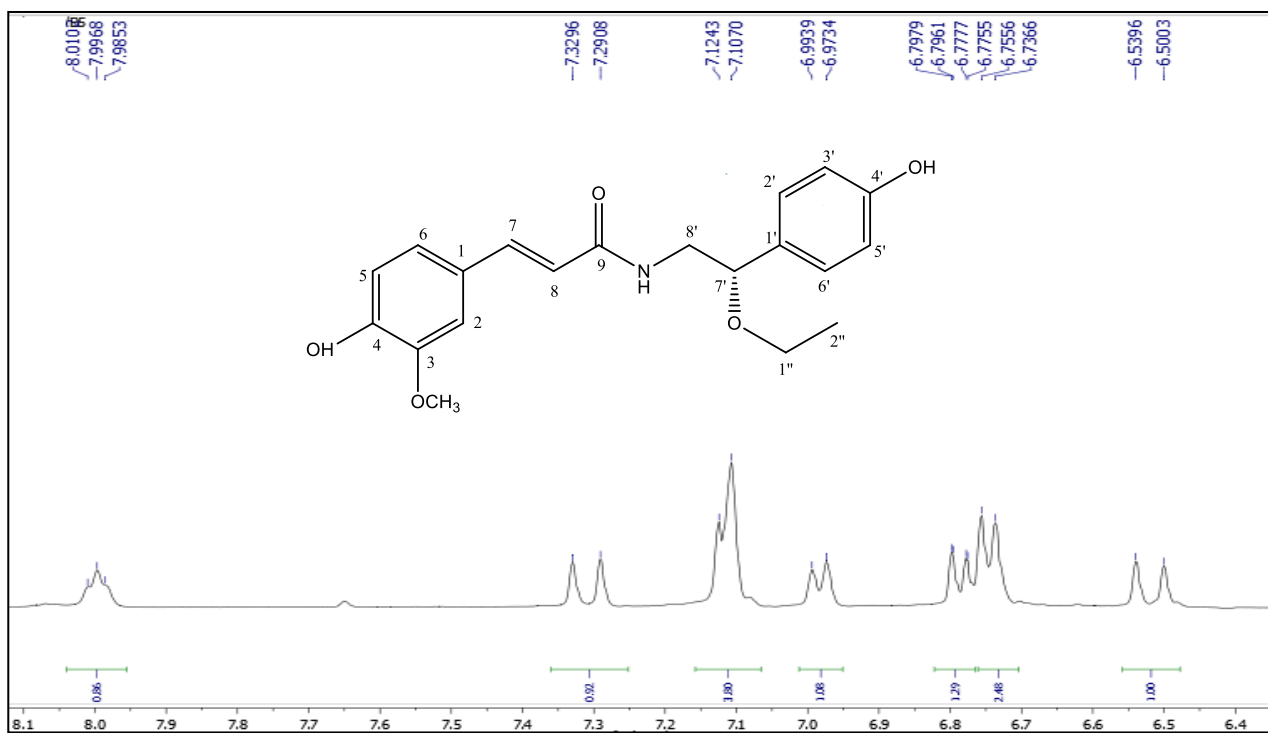


Figura 44- Espectro de RMN ^{13}C , BB (δ , DMSO- d_6 , 100 MHz) de Pg-8

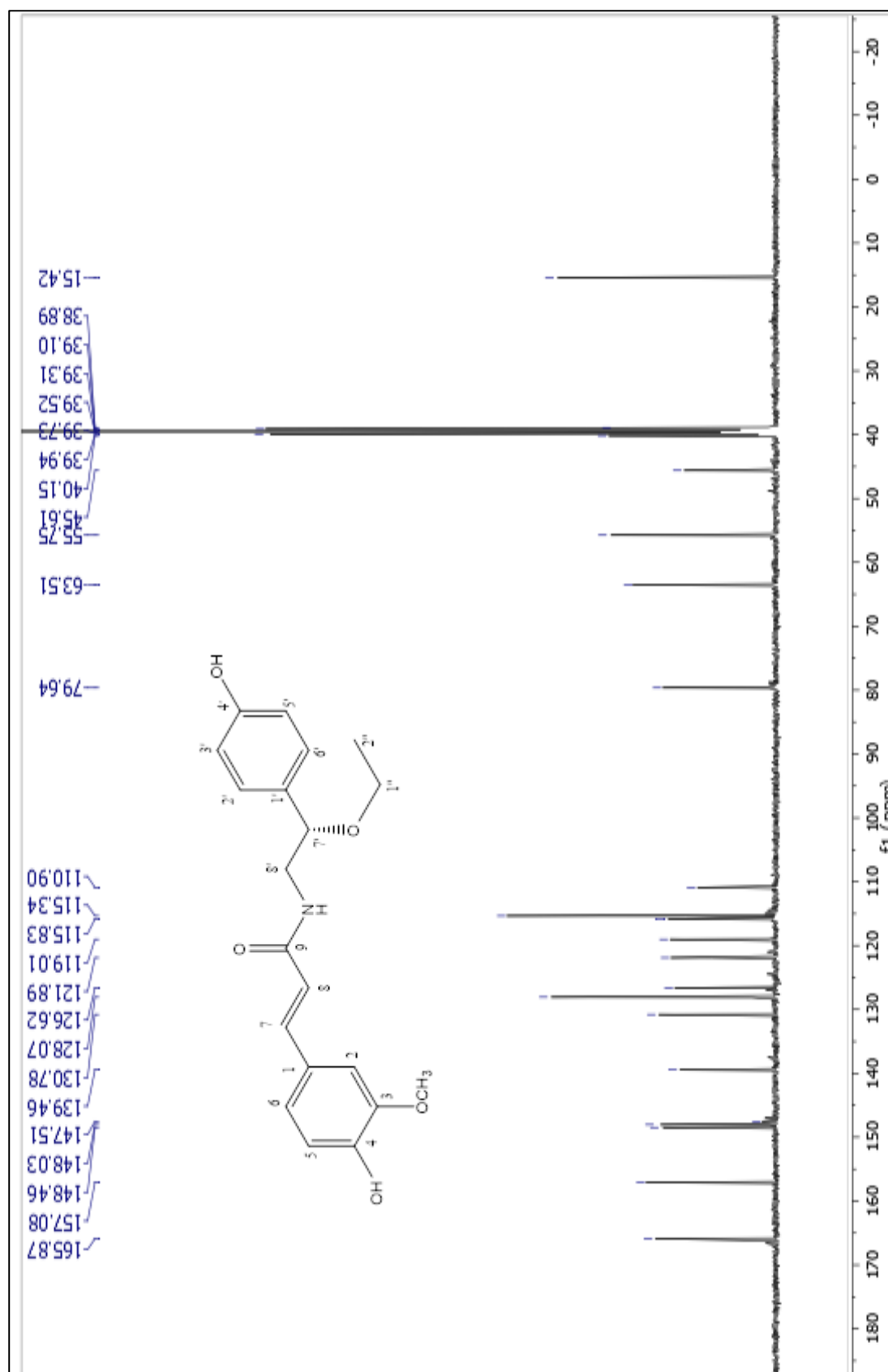


Figura 45- Espectro de HMQC (δ , DMSO- *d*₆, 400 e 100 MHz) de Pg-8

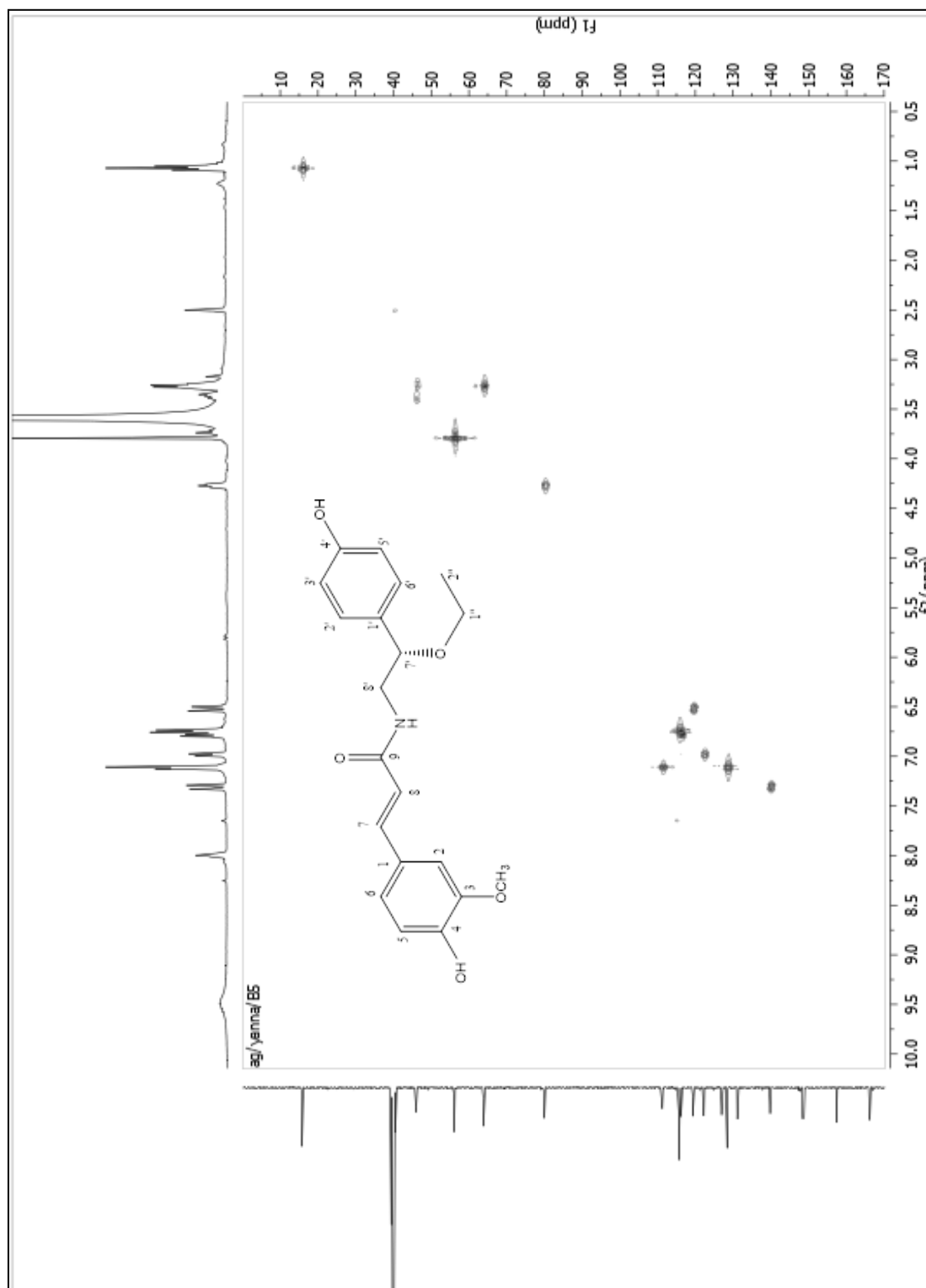


Figura 46- Espectro de HMBC (δ , DMSO-*d*₆, 400 e 100 MHz) de *Pg-8*

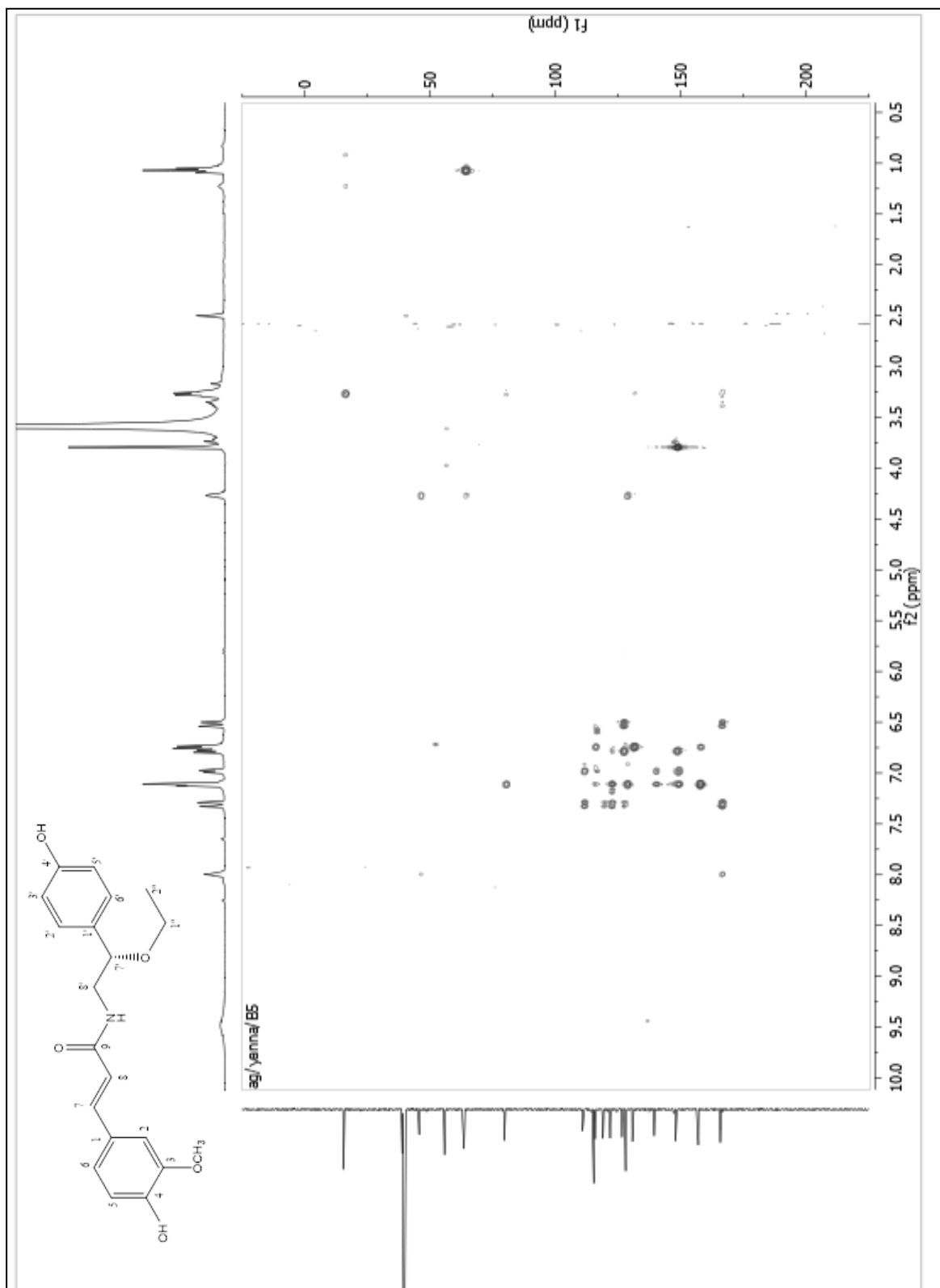


Figura 47- Espectro de COSY (δ , DMSO-*d*₆, 400 MHz) de *Pg-8*

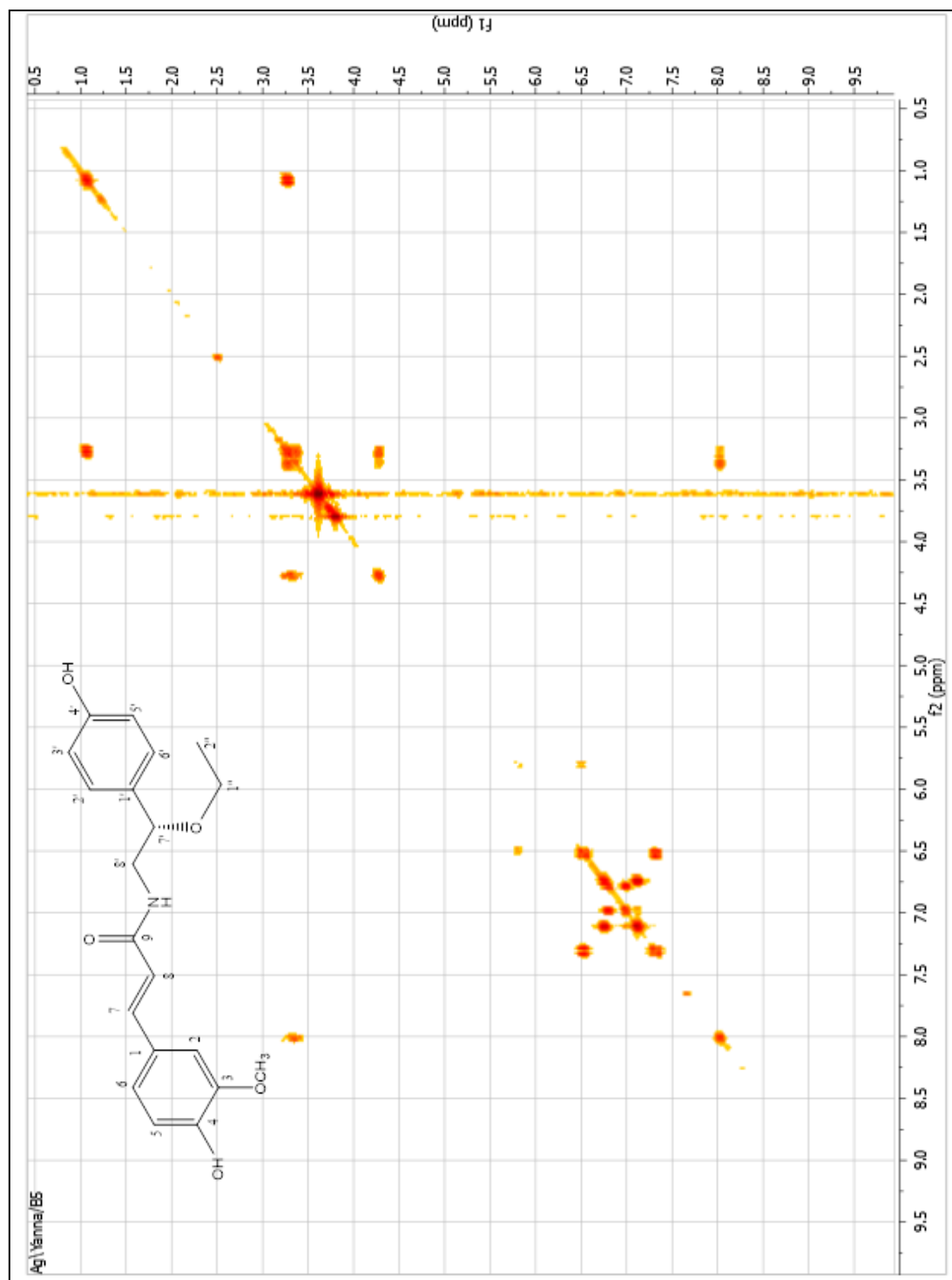


FIGURA 48 – Composto 7' etoxi *trans*-feruloiltiramina (*Pg*-8) correlações de RMN HMBC (3J and 2J) e COSY

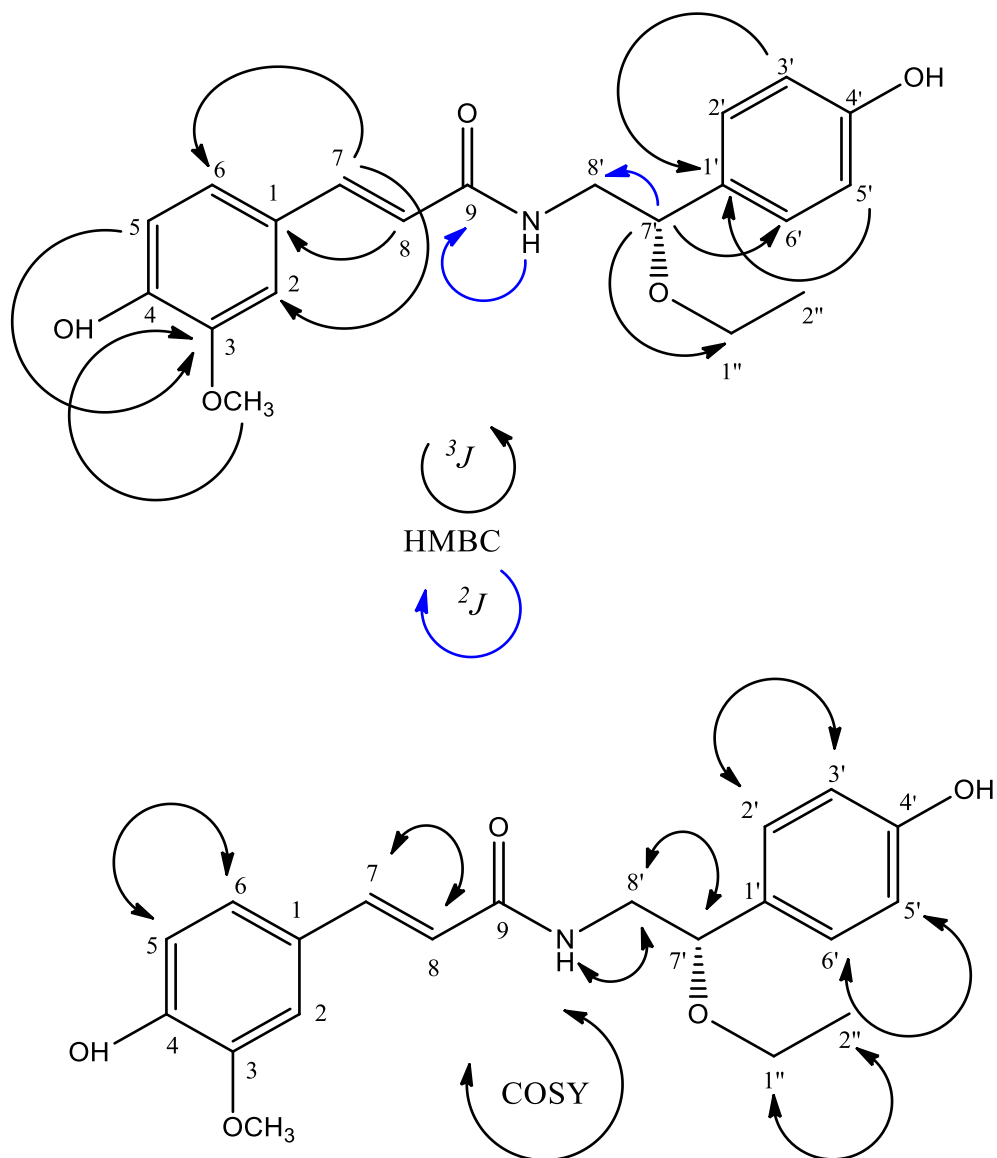
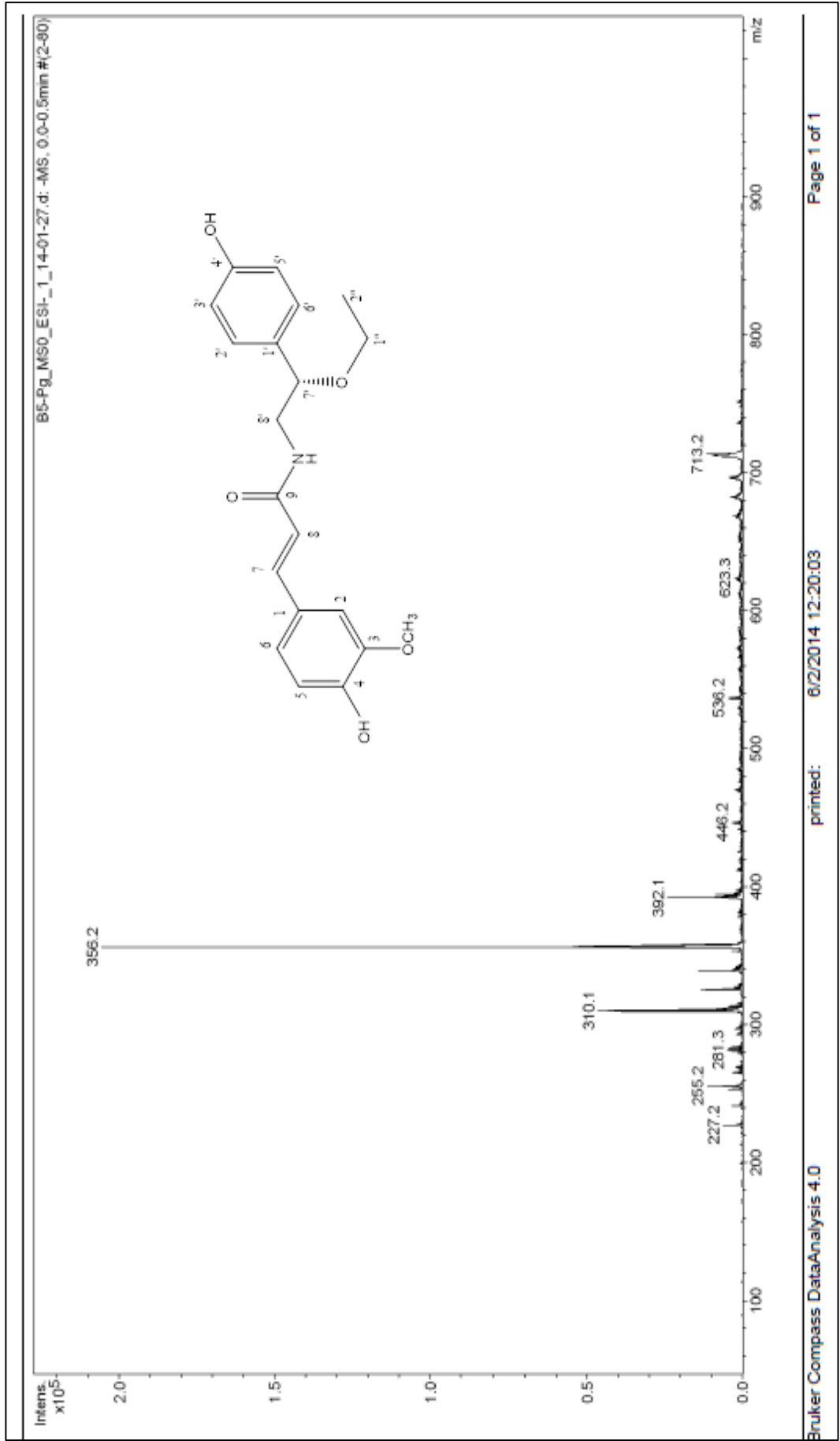


Figura 49- Espectro de massas ESI [M - H]⁻ de Pg-8.



4.1.9 Caracterização Estrutural de *Pg-9*

A substância codificada como *Pg-9* foi isolada a partir do EEB das raízes de *P.gounellei*, onde 20g deste extrato foram solubilizados em água, originando um sobrenadante e 5g de um precipitado insolúvel. 2,5g do precipitado foram submetidos a uma filtração em Sephadex-LH-20, com MeOH e CHCl₃, gerando a fração 06/10, que mostrou-se pura após cromatografia em CCDA, como um sólido pálido amorfo.

O espectro de RMN ¹H de *Pg-9* (**Figuras 50-52, Págs. 135-136**) apresentou-se semelhante ao de *Pg-8*. Foi possível observar neste espectro a presença de dois dubletos em δ_H 7,0 (H-2'/H6') e outro em δ_H 6,68 (H3'/H5'), ambos com integral para dois prótons cada, sugerindo a presença de anel aromático *para* substituído, com sistema AA'BB' na molécula. As absorções em δ_H 6,78 (H-5) acoplado *orto* com H-6 ($J=8,0\text{Hz}$) e δ_H 6,98 acoplado com H-5 mais o sinal em δ_H 7,11 (H-2), levou a sugerir a presença de um outro anel aromático trissubstituído com um sistema AMX, semelhante a *Pg-8*.

As absorções em δ_H 7,30 (H-7) e δ_H 6,43 (H-8) com constante de acoplamento próximo a 16Hz, sugeriram a presença de um sistema *trans*, característicos de prótons olefínicos, caracterizando a porção coumaroil da molécula. Já a porção tiramina foi evidenciada pela presença de um interessante tripleto em δ_H 8,01, que foi atribuído ao próton ligado diretamente ao nitrogênio e pela presença de um tripleto em δ_H 2,64 (H-7') e um multipletto em δ_H 3,33 (H-8') condizentes com os prótons metilênicos da estrutura da tiramina. Além disso, o espectro de RMN ¹H evidenciou também a presença de uma metoxila em δ_H 3,79, também descrita em *Pg-8*.

O espectro de RMN ¹³C (**Figura 53, Pág. 133**) exibiu 16 sinais, para 18 átomos de carbonos para *Pg-9*, fortalecendo a proposta do espectro de RMN ¹H quanto à presença dos grupos coumaroil e tiramina. A presença dos anéis aromáticos foi fortalecida pelas absorções em δ_C 130,02 (C-2'/C-6') e δ_C 115,67 (C-3'/ C-5'), condizentes a dois carbonos cada uma, caracterizando o anel *para*-substituído do anel AA'BB', da porção tiramina, além dos sinais para carbonos monohidrogenados em δ_C 116,18 (C-5), δ_C 122,09 (C-6) e δ_C 111,12 (C-2) do sistema AMX da porção coumaroil. Neste espectro também foi possível observar um sinal em δ_C 165,92 (C-9) de carbonila α,β -insaturada de amida e dois sinais em δ_C 119,53 (C-8) e δ_C 139,56 (C-7) de carbonos α,β -insaturados. Já a porção tiramina, além de ter sido confirmada pelo sistema

AA'BB', também foi ratificada pela presença dos carbonos metilênicos em δ_C 34,27 (C-7') e δ_C 41,27 (C-8').

Mediante as análises dos dados espectrais de RMN ^1H e ^{13}C , em conjunto com a análise de dados da literatura (**Tabela 12, Pág. 134**), foi possível inferir que **Pg-9** trata-se da *trans*-feruloiltiramina, substância isolada previamente de outras espécies vegetais (CAVALCANTE, *et al.*, 2010) e citada pela primeira vez na família cactaceae. A *trans*-feruloiltiramina possui ação contra ervas daninhas, melhora a germinação de sementes (CAVALCANTE, *et al.*, 2010) e também possui atividade anti-inflamatória por inibição da enzima COX (PARK *et al.*, 2009).

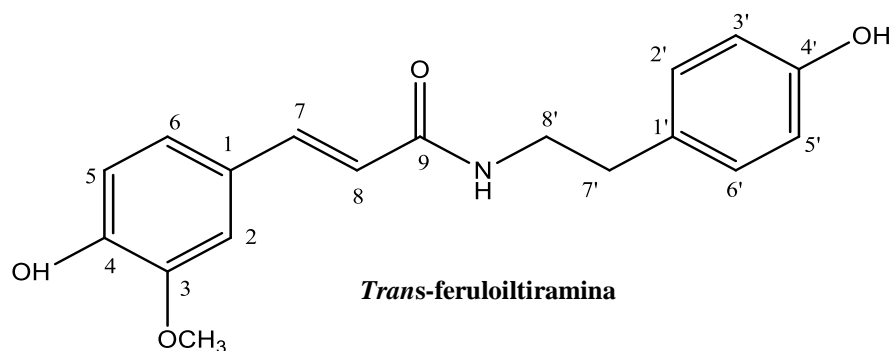
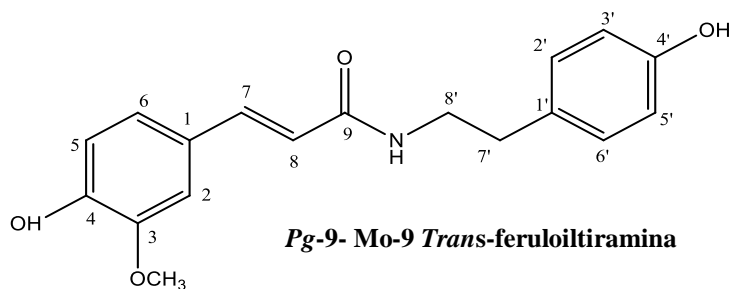


Tabela 12- Dados espectrais comparativos de RMN ^1H e ^{13}C de *Pg-9* (δ , $\text{DMSO-}d_6$, 400 e 100 MHz) com o modelo *Mo-8* (δ , CDCl_3 , 200 e 50 MHz) (CAVALCANTE *et al.*, 2010) e *Mo-8.1* (δ , $\text{DMSO-}d_6$, 400 e 100 MHz, MACIEL *et al.*, 2016).



C	<i>Pg-9</i>		<i>Mo-9</i> (Cavalcante <i>et al.</i> , 2016)		<i>Pg-8 = Mo-8.1</i> (Maciel <i>et al.</i> , 2016)	
	δC	δH	δC	δH	δC	δH
1	126,93	-	126,82	-	126,62	-
2	111,12	7,11 (1H,sL)	109,70	6,9 (1H,brs)	110,90	7,1 (sL)
3	148,37	-	147,69	-	148,03	-
4	148,75	-	147,20	-	148,46	-
5	116,18	6,78 (1H,d, $J=8,0\text{Hz}$)	114,91	6,74(1Hd, $J=8,4\text{Hz}$)	115,83	6,79 (d, $J=8,0\text{Hz}$)
6	122,09	6,98 (1H,d, $J=8,0\text{ Hz}$)	121,89	6,93 (1H,brd, $J=8,4\text{Hz}$)	121,82	6,98 (d, $J=8,0\text{ Hz}$)
7	139,56	7,30(1H,d, $J=16,0\text{Hz}$)	140,89	7,37 (1Hd, $J=15,8\text{Hz}$)	139,46	7,31 (d, $J=16,0\text{Hz}$)
8	119,53	6,43 (1H,d, $J=16,0\text{ Hz}$)	117,47	6,16 (1H,d, $J=15,8\text{ Hz}$)	119,01	6,52 (d, $J=16,0\text{ Hz}$)
9	165,92	-	167,04	-	165,87	-
1'	128,19	-	129,68	-	130,78	-
2'/6'	130,02	7,00 (2H,d, $J=8,0\text{ Hz}$)	129,53	6,96 (2H,d, $J=8,4\text{Hz}$)	128,07	7,11 (d, $J=8,0\text{ Hz}$)
3'/5'	115,67	6,68 (2H,d, $J=8,0\text{ Hz}$)	115,17	6,68 (2H,d, $J=8,4\text{Hz}$)	115,34	6,75 (d, $J=8,0\text{ Hz}$)
4'	156,18	-	155,17	-	157,08	-
7'	34,27	2,64 (2H,t, $J=4,0\text{Hz}$)	34,41	2,67 (1H,t, $J=6,90\text{Hz}$)	79,64	4,27 (t, $J=4,0\text{Hz}$)
8'	41,27	3,33 (m)	40,89	3,46 (1H,t, $J=6,90\text{Hz}$)	45,61	3,33-3,25 (m)
1''	-	-	-	-	63,51	3,27 (q, $J=6,0\text{Hz}$)
2''	-	-	-	-	15,42	1,07(t, $J=6,9\text{ Hz}$)
3''	-	-	-	-	-	-
OMe-3	56,07	3,79 (s)	55,56	3,79 (s)	55,56	3,79 (s)
NH	-	8,0 (t, $J=4\text{ Hz}$)	-	-	-	8,0 (t, $J=4\text{ Hz}$)

Figura 50- Espectro de RMN ^1H (δ , DMSO- d_6 , 400 MHz) de Pg-9

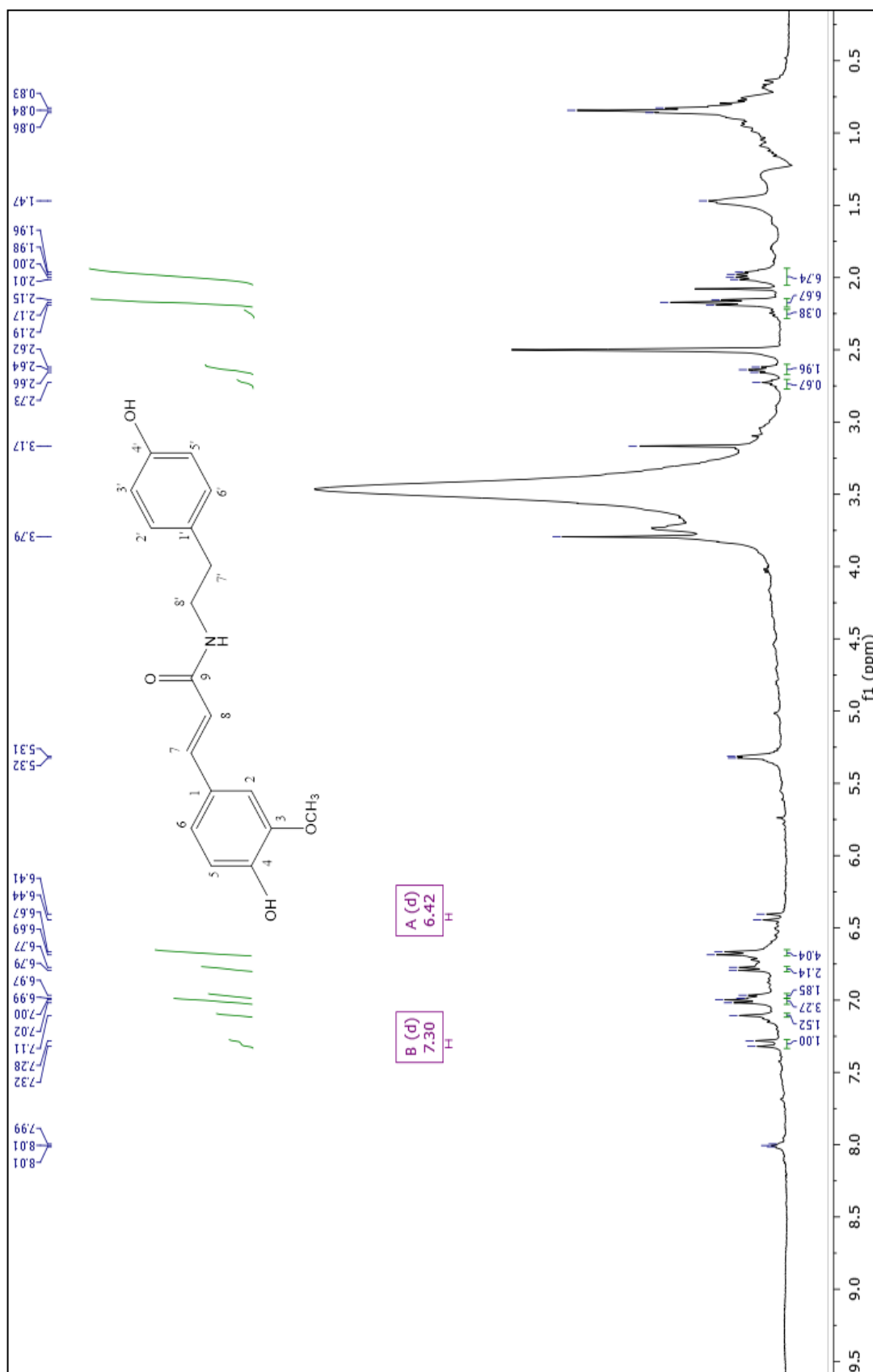


Figura 51- Expansão do espectro de RMN ^1H (δ , DMSO- d_6 , 400 MHz) de Pg-9

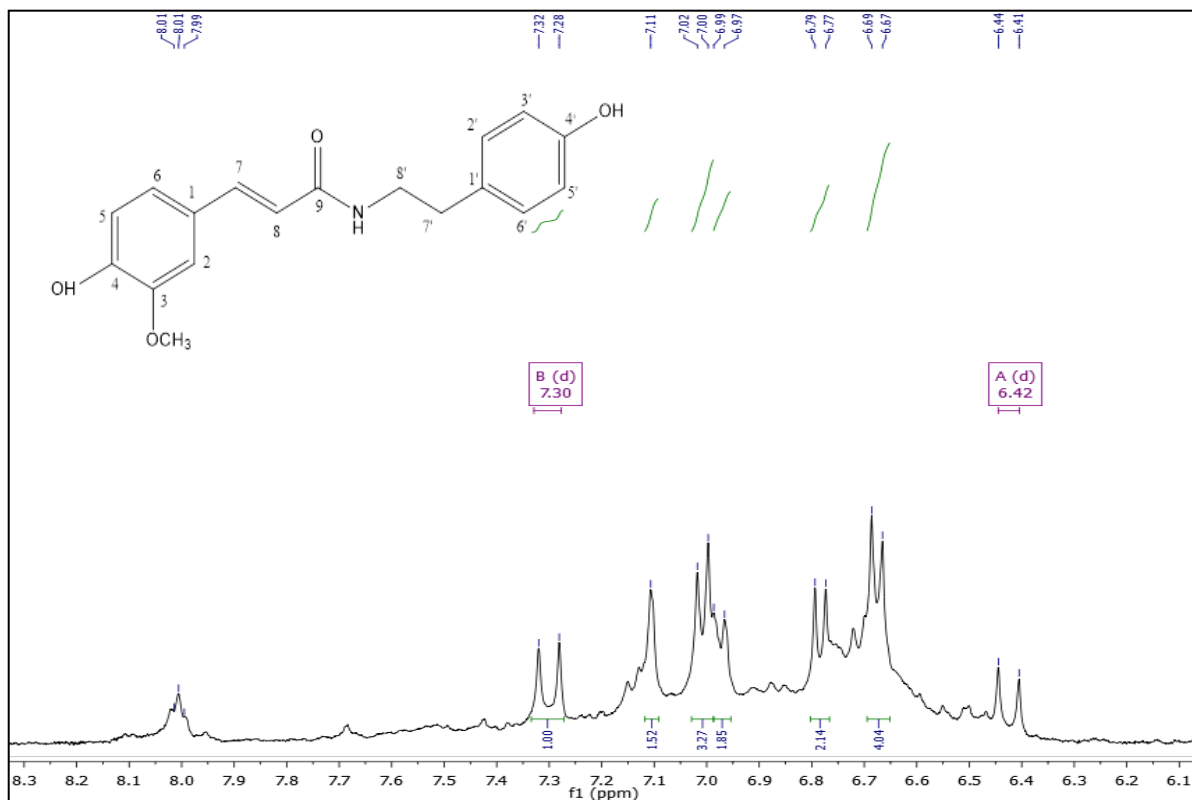


Figura 52- Expansão do espectro de RMN ^1H (δ , DMSO- d_6 , 400 MHz) de Pg-9

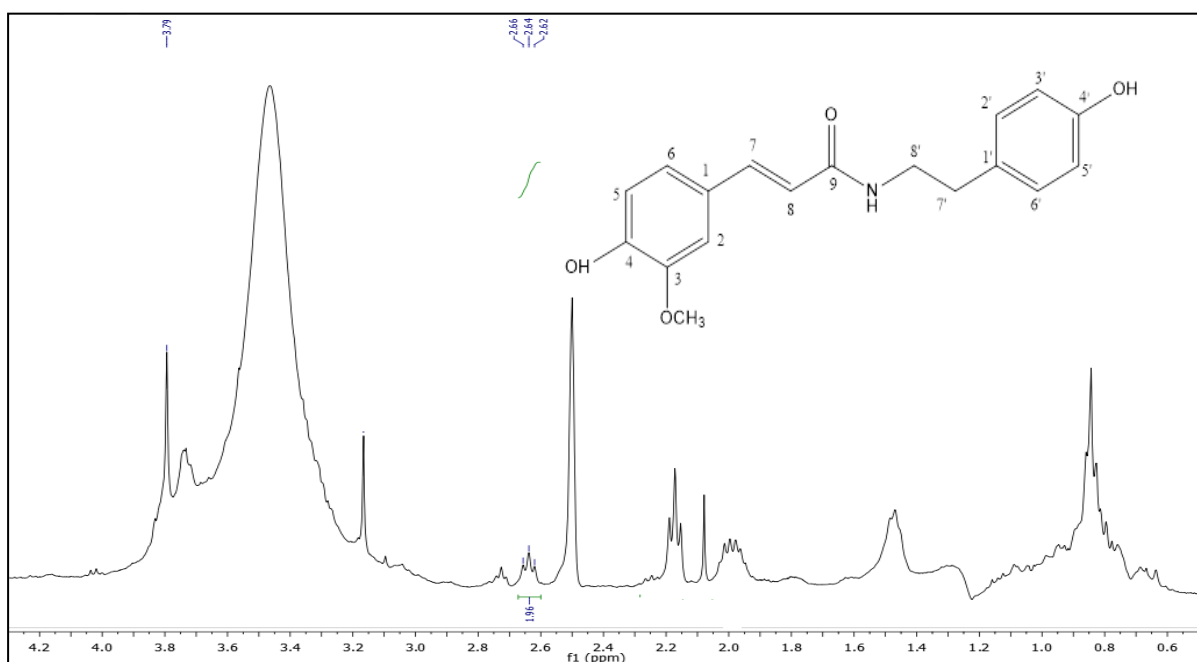
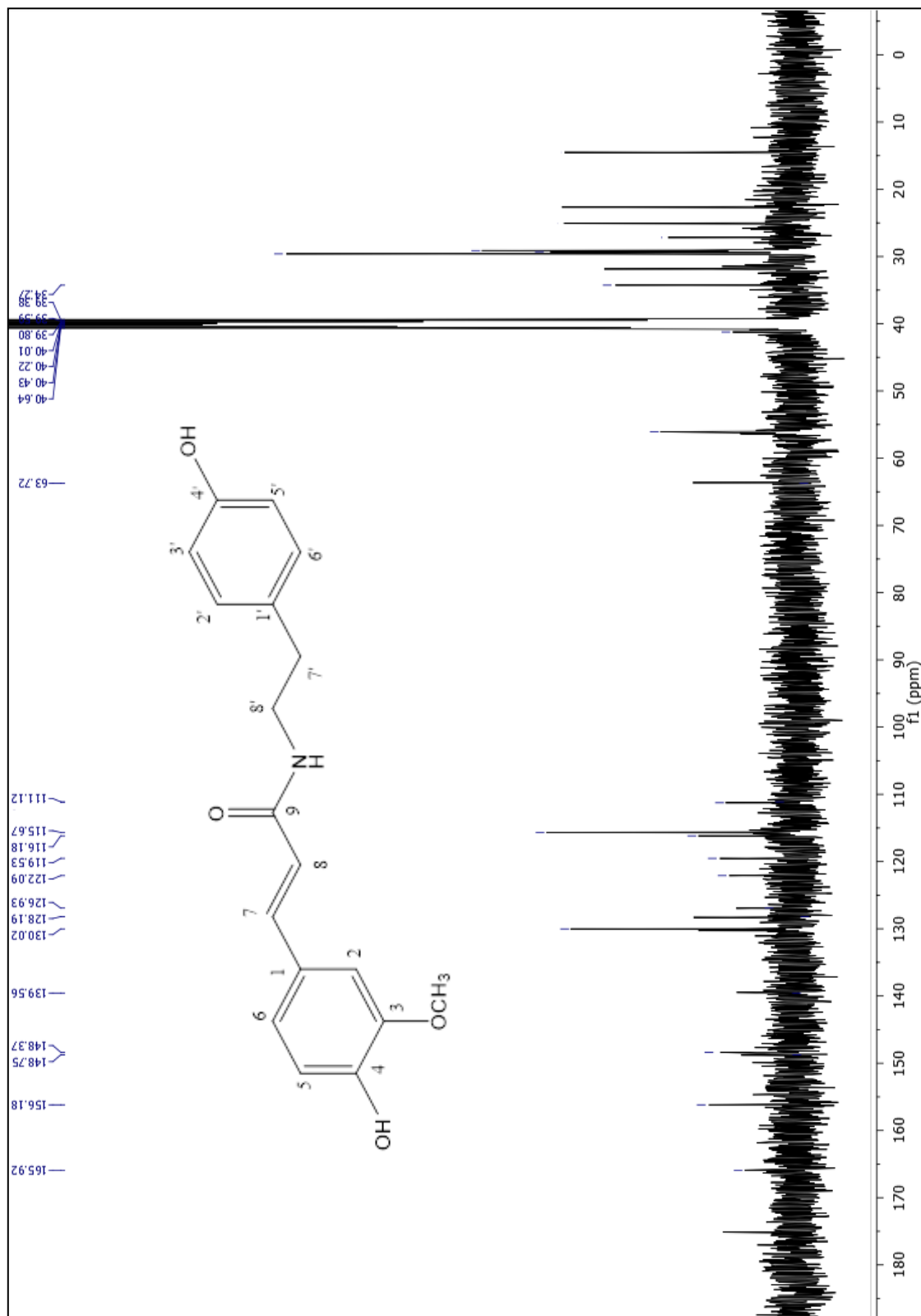


Figura 53- Espectro de RMN ^{13}C , BB (δ , DMSO-*d*₆, 100 MHz) de *Pg-9*



4.2 Desenvolvimento e validação da metodologia analítica

4.2.1 Desenvolvimento do método analítico para quantificação do β -sitosterol

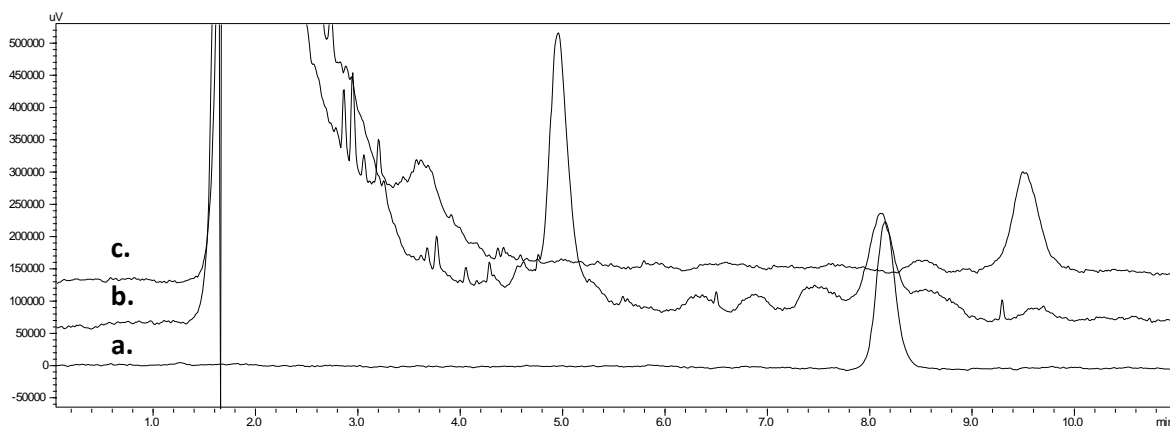
O perfil cromatográfico obtido, utilizando como fase móvel metanol 100% foi melhor, quando comparado com a fase móvel proposta inicialmente, MeOH:H₂O (95:5 v/v). Para esta fase, o tempo de retenção do β -sitosterol foi de 9,6 minutos, enquanto que utilizando 100% de MeOH, o tempo de retenção foi reduzido para 8,1 minutos, sem perda de resolução do pico (**Figura 54, Pág.139**).

Para o ajuste dos parâmetros do detector de ELSD, levou-se em consideração a composição de fase móvel e da amostra. Para a análise ocorrer é necessário o aquecimento da fase móvel no tubo onde ocorre nebulização e posterior evaporação do solvente. A temperatura do tubo foi escolhida com cautela, pois temperaturas baixas podem levar a formação de partículas maiores e mais uniformes, porém pode ocorrer evaporação incompleta da fase móvel levando a formação de ruído no cromatograma (GONÇALEZ *et al.*, 2011; URANO *et al.*, 2012). Por outro lado, temperaturas muito elevadas podem degradar a amostra além de diminuir a sensibilidade do detector por sublimar o analito. Quando ocorre a evaporação do solvente, o analito é transportado pelo gás até a cela óptica para posterior detecção da amostra (GONÇALEZ *et al.*, 2011; URANO *et al.*, 2012). Após alguns testes verificou-se que a temperatura do *drift tube* se mostrou ideal a 70 °C e o fluxo do gás N₂, 2 mL/min, gerando cromatogramas de boa resolução e detecção.

4.2.2 Seletividade

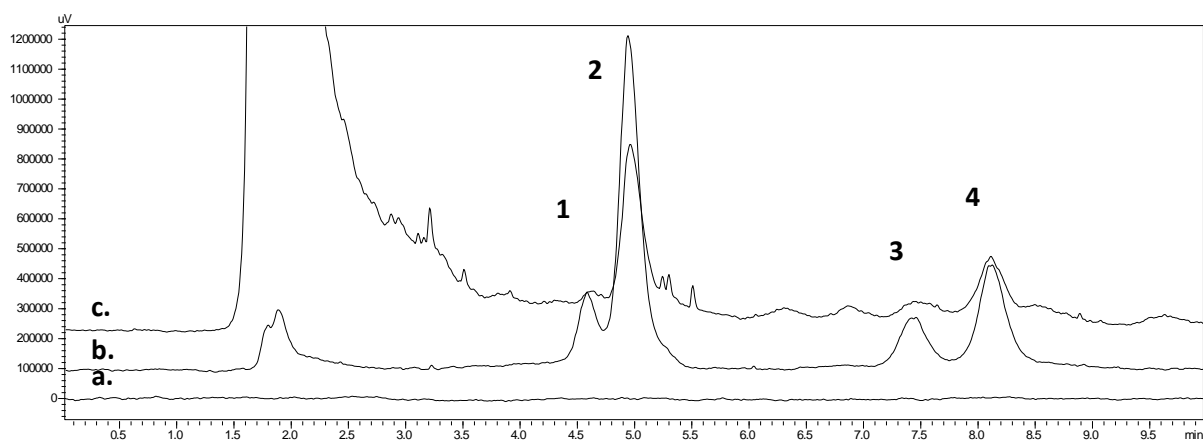
As análises dos cromatogramas do padrão e amostra revelaram que não há interferentes no mesmo tempo de retenção do analito. A utilização de diferentes fases móveis também confirma a ausência de interferentes. A presença do estigmasterol, que apresenta estrutura semelhante ao β -sitosterol, apresentou um tempo de retenção distinto (7,5 min), mostrando que o método é seletivo para esses compostos (**Figura 55, Pág.139**).

Figura 54. Cromatogramas do padrão β -sitosterol e desenvolvimento da metodologia analítica para o extrato dos cladódios de *P. gounellei*.



a. Padrão β -sitosterol submetido a cromatografia com MeOH (100%); **b.** Desenvolvimento do método utilizando MeOH (100%) com amostra –Extrato dos cladódios de *P. gounellei*; **c.** Desenvolvimento do método utilizando MeOH:H₂O (95:5 v/v) com amostra –Extrato dos cladódios de *P. gounellei*.

Figura 55. Cromatogramas que demonstram a seletividade do método para a análise do padrão β -sitosterol.



a. Solução diluente (MeOH) **b.** Mistura dos padrões de Estigmasterol glicosilado (1), β - sitosterol glicosilado (2) estigmasterol (3) e β - sitosterol (4) **c.** Amostra –Extrato dos cladódios de *P. gounellei*.

4.2.3 Linearidade e limites de detecção e quantificação

A curva de calibração do método foi obtida através de análises em triplicata de soluções do padrão do β -sitosterol com concentrações entre 15,6 – 125,0 $\mu\text{g/mL}$. Os dados característicos do parâmetro linearidade, bem como os limites de detecção e quantificação calculados, encontram-se na **Tabela 13 (Pág.140)**.

A equação da regressão linear ($y = 77037,259x - 1139407,284$) e o coeficiente de correlação (r^2) de 0,994 demonstrou uma boa relação linear, em que as áreas obtidas são diretamente proporcionais às concentrações do β -sitosterol (**Figura 56, Pág 140**).

Figura 56. Curva de calibração do padrão β -sitosterol utilizada no ensaio de linearidade.

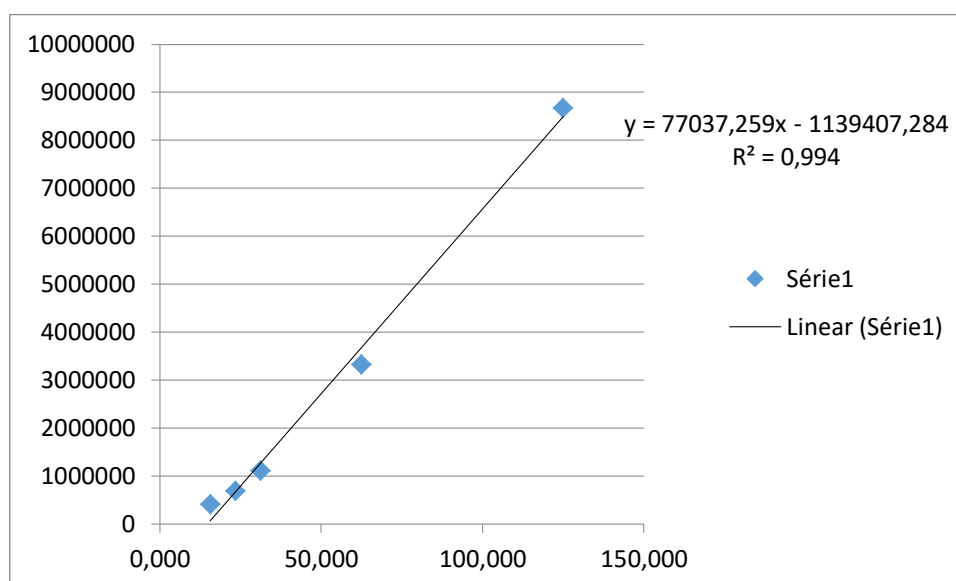


Tabela 13. Dados do parâmetro linearidade para padrão β -sitosterol.

Padrão	Coefficiente de regressão linear (r^2)	Equação da curva de calibração $y = ax + b$	Limite de Detecção ($\mu\text{g/mL}$)	Limite de Quantificação ($\mu\text{g/mL}$)
β -sitosterol	0,994	$y = 77037,259x - 1139407,284$	0,135	0,406

4.2.4 Precisão

A precisão intra-dia (repetibilidade) avaliou a concordância dos resultados em um curto período de tempo por um mesmo analista, enquanto a precisão intermediária (inter-dia) avaliou a proximidade dos resultados obtidos em dias diferentes com analista diferente. A precisão trata-se de um parâmetro que é avaliado através da determinação do desvio padrão relativo (DPR) das análises (BRASIL, 2003; ICH, 2005). A precisão intra-dia apresentou valores de DPR entre 0,82 - 4,46% enquanto a precisão intermediária apresentou DPR entre 1,74 - 2,48% (Tabela 14, Pág. 141). Assim o método foi considerado preciso, uma vez que os valores de DPR encontram-se dentro do limite especificado, ou seja, inferior a 5%.

Tabela 14. Dados da Precisão intra-dia e inter-dia do β -sitosterol presente no extrato dos cladódios de *P. gounellei*.

Precisão intra-dia (n=3)			Precisão inter-dia (n=3)		
Concnetração teórica do EECPg (mg/mL)	Concentração experimental do β -sitosterol do EECPg (μ g/mL)	DPR %	Concentração teórica do EECPg (mg/mL)	Concentração experimental do EECPg (μ g/mL)	DPR %
0,80	0,323	4,46	0,80	0,324	1,74
10,00	0,361	0,49	10,00	0,402	2,48
12,00	0,457	0,82	12,00	0,459	2,28

4.2.5 Exatidão

Extratos vegetais são considerados matérias-primas complexas por possuírem diversos constituintes químicos diferentes em sua matriz. Desta forma, uma das maneiras de avaliar a exatidão do método é através da aplicação da metodologia analítica proposta, na análise da substância padrão de referência (BRASIL, 2003; ICH, 2005; TELES, 2015). A exatidão do método foi calculada a partir da injeção de soluções de três concentrações diferentes do padrão β -sitosterol (0,23; 0,31e 0,63 μ g/mL), sendo sua concentração experimental calculada pela equação da reta, obtida pela curva de calibração (TELES, 2015). A recuperação do analito ficou entre 97,14- 101,37 % (Tabela 15, Pág. 142), que encontra-se dentro dos parâmetros preconizados pela RE

899, cujo variação permitida é de 15% para os valores nominais de concentração (BRASIL, 2003; ICH, 2005).

Tabela 15. Dados da exatidão do β -sitosterol presente no extrato dos cladódios de *P. gounellei*.

Padrão	Exatidão (n=3)		
	Concentração teórica do β -sitosterol ($\mu\text{g/mL}$)	Concentração experimental do β -sitosterol ($\mu\text{g/mL}$)	Recuperação (%)
β -sitosterol	0,234	0,229	97,14
	0,312	0,304	98,26
	0,625	0,626	101,37

4.4.6 Robustez

O método mostrou-se robusto às mudanças de temperatura e troca de coluna cromatográfica, não comprometendo a análise do β -sitosterol. No entanto, o método não foi robusto para as alterações de fluxo da fase móvel, diminuindo a resolução do pico do analito.

O método analítico desenvolvido encontra-se validado, mostrando-se seguro, prático e rápido, podendo ser aplicado na análise do β -sitosterol em extrato etanólico dos cladódios de *P. gounellei*. A amostra analisada (EECPg) apresentou $0,38 \pm 0,023$ mg de β -sitosterol por grama de extrato. Este resultado está sendo descrito pela primeira vez na literatura, contribuindo para o controle de qualidade dessa matéria-prima vegetal, utilizando o β -sitosterol como marcador químico.

4.3 Avaliação da atividade antioxidante

4.3.1 Teor de Fenólicos, flavonas e flavonóis totais e atividade antioxidante dos extratos e fração metanólica de *P. gounellei*

O valor de fenólicos, flavonas e flavonóis totais e atividade antioxidante (DPPH e ABTS) dos extratos etanólicos dos cladódios, raízes, flores e frutos e fração metanólica (Xad-2) estão descritos na **Tabela 16 (Pág. 145)**.

O ensaio antioxidante ABTS mostrou que o extrato dos frutos possui a maior atividade antioxidante, ($CE_{50} = 10,4 \pm 0,24$), enquanto o extrato das flores, apresentou a menor atividade ($CE_{50} = 76,9 \pm 0,61$) quando comparados ao controle e demais amostras. O extrato dos cladódios evidenciou uma atividade ligeiramente mais elevada ($CE_{50} = 62,4 \pm 0,44$) que o extrato das flores. A atividade sequestradora de radicais livres do extrato das raízes mostrou uma atividade ($CE_{50} = 41,6 \pm 1,06$) similar a fração metanólica (Xad-2) dos cladódios. Desta forma, pode-se classificar a atividade antioxidante dos extratos e fração metanólica da seguinte forma: *Pg* frutos > fração MeOH = *Pg* raízes > *Pg* cladódios > *Pg* flores (**Tabela 16, Pág. 145**).

O ensaio de atividade antioxidante com DPPH, mostrou que o extrato dos frutos possui a melhor atividade antioxidante ($CE_{50} = 11,3 \pm 0,12$), seguido do extrato das raízes ($CE_{50} = 102,1 \pm 1,49$). A fração metanólica ($CE_{50} = 130,1 \pm 3,02$) apresentou atividade semelhante ao extrato dos cladódios ($CE_{50} = 136,0 \pm 3,48$) e menor do que a atividade do extrato das flores ($CE_{50} = 194,3 \pm 2,33$) (**Tabela 16, Pág. 141**).

Uma correlação foi demonstrada entre a atividade antioxidante e o teor de fenólicos nas amostras analisadas. O extrato dos frutos apresentou uma maior quantidade de compostos fenólicos ($127,9 \pm 1,67$ mg EAG / g) e também a maior atividade antioxidante nos teste de DPPH ($CE_{50} = 11,3 \pm 0,12$) e ABTS ($CE_{50} = 10,4 \pm 0,24$). O extrato das flores evidenciou menor atividade antioxidante nos ensaios de DPPH ($CE_{50} = 194,3 \pm 2,33$) e ABTS ($CE = 76,9 \pm 0,61$) e também um menor conteúdo de fenólicos totais ($43,5 \pm 2,16$ mg GAE / g) (**Tabela 16, Pág.145**). Analisando as demais amostras, não foi possível observar essa mesma correlação entre o teor de fenólicos e os ensaios DPPH e ABTS.

Entre todas as amostras testadas, apenas o extrato dos frutos demonstrou atividade antioxidante suficientemente forte para ser um candidato promissor a um

produto nutracêutico. De acordo com o índice de atividade antioxidante (IAA) (**Tabela 17, Pág. 145**), todos os extratos e a fração metanólica de *P. gounellei* mostrou um índice inferior a 0,5, apresentando assim pobre atividade antioxidante. Em contrapartida, o extrato dos frutos apresentou um valor de AAI de 2,01, o que é considerado como muito forte e desta forma, possuidor de excelente atividade antioxidante.

Muitos estudos têm relatado a relação entre os de resultados do ensaio de teor de fenólicos totais e atividade anti-oxidante; nosso estudo confirma estas conclusões. As correlações entre o conteúdo fenólico total e as atividades anti-radicais de DPPH (1 / EC₅₀), e a atividade anti-radicalar de ABTS^{•+} (1 / EC₅₀) estão apresentadas na **Figura 57 (Pág. 146)**. Os coeficientes de correlação de Pearson (r) foram aproximadamente 0,943 para o ensaio DPPH e 0,944 para o ensaio ABTS. Este resultado sugere que 94% da capacidade antioxidante dos extratos e fração metanólica de *P. gounellei* é devida à contribuição de compostos fenólicos. É interessante notar que não houve correlação inversa entre o conteúdo fenólico total e a atividade antioxidante por DPPH e ABTS com o método de flavonas e flavonois totais, pelo menos quando comparado com o extrato de maior atividade antioxidante, extrato dos frutos. Portanto, é possível que a atividade antioxidante seja atribuída a outros compostos fenólicos que não apenas flavonois e ou flavonas (MACIEL *et al.*, 2016).

Tabela 16 - Teor de fenólicos, flavonas e flavonois totais e atividade sequestradora de radicais livres DPPH e ABTS

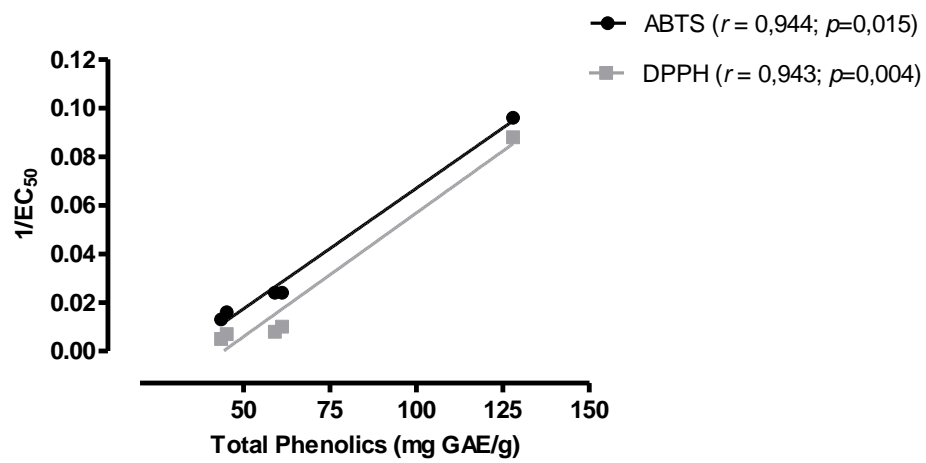
Amostras	Teor de fenólicos totais (mg EAG/g ± EPM) ^a	Teor de Flavonas e flavonois totais (mg EQ/g ± SEM) ^b	Atividade sequestradora de radicais livres (CE ₅₀) ^c	
			DPPH (µg/mL±SEM)	ABTS ^{•+} (µg/mL ± SEM)
<i>Pg</i> Cladódios	45,1 ± 2,50	12,625 ± 1,08	136,0 ± 3,48	62,4 ± 0,44
<i>Pg</i> Fr. metanólica	59,0 ± 2,39	13,667 ± 0,833	130,1 ± 3,02	40,9 ± 0,69
<i>Pg</i> Raízes	61,1 ± 1,03	4,920 ± 0,550	102,1 ± 1,49	41,6 ± 1,06
<i>Pg</i> Flores	43,5 ± 2,16	8,460 ± 0,550	194,3 ± 2,33	76,9 ± 0,61
<i>Pg</i> Frutos	127,9 ± 1,67	2,417±0,417	11,3 ± 0,12	10,4 ± 0,24
Ác. ascórbico	-	-	3,6 ± 0,6	-
Trolox	-	-	-	5,0 ± 0,25

Onde: todos os valores são ± E.P.M (n = 3); ^a EQ = Equivalente de quercetina por grama de amostra; ^b EAG = Equivalente de ácido gálico por grama de amostra; ^c valor definidos como a concentração de amostra que sequestra 50% do íon DPPH ou ABTS^{•+}.

Tabela 17 – Índice de atividade antioxidante (IAA) dos extratos e fração metanólica de *P. gounellei*

Amostra	IAA %	Atividade antioxidante
Cladódios	≥ 0,5	Pobre
Raiz	≥ 0,5	Pobre
Flores	≥ 0,5	Pobre
Fr. MeOH	≥ 0,5	Pobre
Frutos	2,01	Muito forte

Figura 57- Gráfico de correlação entre teor de fenólicos totais e a atividade anti-oxidante DPPH e ABTS^{•+} dos extratos e fração metanólica de *P. gounellei*



4.4 Avaliação da atividade antimicrobiana

4.4.1 Avaliação preliminar da atividade antimicrobiana dos extratos etanólicos e fração metanólica (Xad-2) de *P. gounellei*.

A análise preliminar da atividade antimicrobiana dos extratos dos cladódios, raízes, flores, frutos e fração metanólica (Xad-2) de *P. gounellei* foi realizada através de uma triagem com as cepas: *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas auruginosa*, *Candida albicans* e *Escherichia coli*.

Nascimento e colaboradores (2011), relata que *P. gounellei* possui frutos com pH inferior a 4,5 o que os classificam como frutos ácidos, esta característica seria responsável por tornar os frutos menos susceptíveis ao desenvolvimento microbiano. No entanto, após a realização dos testes microbiológicos, pela técnica de microdiluição em placa de 96 poços, foi possível observar crescimento microbiano das cepas *S. mutans*, *S. aureus*, *P. auruginosa*, e *C. albicans* em todas as amostras analisadas.

Os extratos dos cladódios, raízes e flores apresentaram atividade antimicrobiana frente a *E. coli* com uma Concentração Inibitória Mínima (CIM) de 400 µg/mL (**Tabela 17, Pág. 148**). Este resultado foi também descrito em outras espécies da família Cactaceae, tais como: *Opuntia ficus-indica*, *Nopalea cochenillifera* e *Cereus jamacaru* (KIM, 2012; DAVET, 2008; NECCHI, 2012). A *E. coli* trata-se de uma bactéria gram-negativa presente na microbiota intestinal e é predominantemente responsável por infecções urinárias sintomáticas agudas (DALBOSCO, 2003), estas infecções são caracterizadas pela invasão e multiplicação desta bactéria, da uretra até os rins (THOMPSON, 2003).

A medicina popular relata que o macerado das raízes de *P. gounellei* é utilizado para combater infecções do trato urinário (ROQUE *et al.*, 2010), o que pode ser ratificado mediante a análise dos resultados encontrados com a avaliação da atividade antimicrobiana preliminar das amostras testadas.

Tabela 18: Concentração Inibitória Mínima (CIM) da atividade antimicrobiana preliminar dos extratos e fração metanólica (Xad-2) de *P.gounellei* .

Micro-organismo	EEB- Cladódios	EEB Fração Metanólica	EEB Raiz	EEB Flor	EEB Fruto
<i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175	-	-	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 15656	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	400 µg/mL	-	400 µg/mL	400 µg/mL	
<i>Candida albicans</i> ATCC 1106		-	-	-	-

V-CONCLUSÕES

5- CONCLUSÕES

O estudo fitoquímico de *P. gounellei* levou ao isolamento de nove substâncias, sendo: três esteroides (β - sitosterol, a mistura do β - sitosterol com o estigmasterol e a mistura do β - sitosterol e estigmasterol glicosilados); três flavonoides (pinostrobina, quercetina e canferol); um composto porfirínico (feofitina a), além de duas alcanidas, a *trans*-feruloiltiramina e a 7'-etoxy *trans*- feruloil tiramina (*Marianneína*), descrita pela primeira vez na literatura.

A avaliação dos teores dos compostos fenólicos forneceu informações quanto aos conteúdos totais de compostos fenólicos, flavonas e flavonois totais, presentes nos extratos e fração metanólica (Xad-2) *P. gounellei*. A avaliação da atividade antioxidante revelou que os frutos possui o maior potencial antioxidante, quando comparado às demais amostras, sendo desta forma, uma ótima opção para um futuro produto nutracêutico.

O ensaio antimicrobiano revelou que os extratos das raízes, cladódios e flores, apresentaram uma discreta atividade antimicrobiana frente à *Escherichia coli*, com Concentração inibitória Mínima (CIM) de 400 μ g/mL.

Em relação ao desenvolvimento e validação da metodologia para a análise e quantificação do β -sitosterol no EEB dos cladódios de *P. gounellei*, o método se mostrou validado por atender todos os pré-requisitos da RE 899 (2003), ou seja, o método apresentou linearidade, precisão e exatidão, dentro do preconizado e também se mostrou robusto a possíveis pequenas alterações no método.

A partir do método validado foi possível verificar a presença de $0,38 \pm 0,023$ mg de β -sitosterol por grama de extrato dos cladódios. Este resultado está sendo descrito pela primeira vez na literatura, contribuindo desta forma, para o controle de qualidade da espécie *P. gounellei*.

Uma parcela dos resultados obtidos com este trabalho foi passada para a população, que não tem acesso aos conhecimentos científicos, através da elaboração e distribuição de uma cartilha “Plantas medicinais: seus riscos e benefícios” e também através de ministrações de palestras acerca de fitoterapia e plantas medicinais.

REFERÊNCIAS

ABDELWAHAB, S I; MOHAN, S.; ABDULLA, M.A.; SUKARI, M.A., ABDUL, A.B.; TAHA, M.M.E.; SYAM, S.; AHMAD, S.; LEE, K.H. The methanolic extract of *Boesenbergia rotunda* (L.) Mansf. and its major compound pinostrobin induces anti-ulcerogenic property in vivo: Possible involvement of indirect antioxidant action. **Journal of Ethnopharmacology** 137 (2011) 963– 970.

AGRA, M.F; SILVA, K. N; BASÍLIO, I. J. L. D; FREITAS, P.F; BARBOSA-FILHO, J.M. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v.18, p. 472-508. 2008.

ALIGIANIS N., KALPOUTZAKIS E., MITAKU S., CHINOU I.B. (2001). Composition and antimicrobial activity of the essential oil of two *Origanum* species.

ALMEIDA, C.A.; FIGUEIRÊDO, R.M.F.; QUEIROZ, A.J.M. & OLIVEIRA, F.M.N. Características físicas e químicas da polpa de xiquexique. **Rev. Ciên. Agron.**, Fortaleza, v.38, n.4, p.440-443, 2007.

ANDREWS, J.M. Determination of minimum inhibitory concentrations **Journal of Antimicrobial Chemotherapy** (2001) 48, *Suppl. S1*, 5–16.

ARAÚJO, E. L., CASTRO, C. C., & ALBUQUERQUE, U. P.. Dynamics of Brazilian Caatinga. A review concerning plants environment and people. **Funcional Ecosystems and communities**, 1, 15–28 (2007).

ARAÚJO, K.D.; DANTAS, R.T.; ANDRADE A.P.; PARENTE, H.N; SILVA, EE.. Uso de espécies da caatinga na alimentação de rebanhos no município de São João do Cariri – PB. **RA'E GA**, 20: 157-171; 2010.

ARGENTA S. C.; ARGENTA L. C.; GIACOMELLI S. R.; CEZAROTTO V. PLANTAS MEDICINAIS: CULTURA POPULAR VERSUS CIÊNCIA. **Vivências**. Vol.7, p.12: p.51-60, Maio/2011.

ATOUI, A. K.; MANSOURI, A.; BOSKOU, G.; KEFALAS, P.; Tea and herbal infusions: their antioxidant activity and phenolic profile. *Food Chem.* 2005, 89, 27.

BARBERA, G.; INGLESE, P.; BARRIOS, E. Agroecología, cultivos y usos del nopal. Estudio FAO producción y protección vegetal. **Roma: FAO**, 1999. 85p.

BARBOSA, H. P. **Tabela de composição de alimentos do Estado da Paraíba: setor agropecuário**. 2. ed. João Pessoa: UFPB, 1998. 221p.

BARBOSA, H. P. **Tabela de composição de alimentos do Estado da Paraíba: setor agropecuário**. 2. ed. João Pessoa: UFPB, 1998. 221p.

BARREIRO E. J.; BOLZANI, V.S.; Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. **Quim. Nova**, Vol. 32, No. 3, 679-688, 2009.

BARTHLOTT, W; HUNT. DR. **Cactaceae**. In: The families and genera of vascular plants, v. II flowering plants – Dicotyledons. KUBIZTKI, K; ROHWER, JG; BITTRICH, V. Berlin: Springer-Verlag, p. 161-197. 1993.

BRANDÃO, H.N.; DAVID, J. P.; COUTO, R.D.; NASCIMENTO, J.A.P.; DAVID, J.M. Química E Farmacologia De Quimioterápicos Antineoplásicos Derivados De Plantas. **Quim. Nova**, Vol. 33, No. 6, 1359-1369, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Validação. Resolução nº 899, 29 de maio de 2003. **Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos**, Brasília, DF, 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Instrução Normativa Nº 4, DE 18 DE JUNHO DE 2014. **Guia de orientação para registro de Medicamento Fitoterápico e registro e notificação de Produto Tradicional Fitoterápico**, Brasília, DF, 2014.

BRITO FILHO, S.G., FERNANDES, M.G., CHAVES, O.S., CHAVES, M.C.O., ARARUNA, F.B., EIRAS, C., LEITE, J.R.S.A., AGRA, M.F., BRAZ-FILHO, R., SOUZA, M.F.V. Chemical constituents isolated from *turnera subulata* Sm. and electrochemical characterization of phaeophytin b. **Química Nova**, v.37, n. 4, p.603-609, 2014.

CAVALCANTE, J.M.S.; NOGUEIRA, T.B.S.S.; TOMAZ, A.C.A.; SILVA, D.A.; AGRA, M.F.; SOUZA, M.F.V.; CARVALHO, P.R.C.; RAMOS, S.R.; NASCIMENTO, S.C.; Gonçalves-Silva, T. Steroidal and phenolic compounds from *Sidastrum paniculatum* Fryxell and evaluation of cytotoxic and anti-inflammatory activities. **Quim. Nova** 2010, 33, 846–849.

CAVALCANTI, N.B. & RESENDE, G.M. Efeito de diferentes substratos no desenvolvimento de Mandacaru (*Cereus jamacaru* P. DC.), Facheiro (*Pilosocereus pachycladus* RITTER), Xique-xique (*Pilosocereus gounellei* (A. WEBWR EX K.SCHUM.) BLY. EX ROWL.) e Coroa-de-frade (*Melocactus bahiensis* BRITTON & ROSE). **Caatinga**, v.20, n.1, 2007.

DEWICK, P. M. Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach. **John Wiley & Sons Ltd.**, New York; 2002.

DNA Variation to elucidate cactus phylogeny. **Bradleya** 1995, 13:1–12.

DUARTE, M.C.T. Atividade Antimicrobiana de Plantas Medicinais e Aromáticas Utilizadas no Brasil. **Construindo a história dos produtos naturais**. V.7, 2006.

EFDI, M.; OHGUCHI, Y.A.; AKAO, Y.; NOZAWA, Y.; KORESTSU, M.; ISHIHARA, H.M. N-TransFeruloyltyramine as a Melanin Biosynthesis Inhibitor. *Biol. Pharm. Bull.* **2007**, 30, 1972–1974.

EFFERTH, T.; KOCH, E. Complex Interactions between Phytochemicals. The Multi-Target Therapeutic Concept of Phytotherapy. **Current Drug Targets**. 2011; 12 (1): 122-132.

EUSSEN, S.; KLUNGEL, O.; GARSSEN, J.; VERHAGEN, H.; KRANEN, H.V.; LOVEREN, H.V.; ROMPELBERG, C. Support of drug therapy using functional foods and dietary supplements: focus on statin therapy. **Brit. J. Nutr.** 103. 1260-1277, 2010.

FERNANDES, M. G.. Estudo fitoquímico com fins farmacológicos de duas espécies do gênero *Pilosocereus*: *Pilosocereus gounellei* (F. A. C. Weber) e *Pilosocereus pachycladus* S. RITTER (Cactaceae) [Tese]. Universidade Federal da Paraíba, pp. 202, 2013.

FLORES ORTIZ, C.M.; DAVILA, P.; PORTILLA, L.B.H. Alkaloids from *Neobuxbaumia* species (Cactaceae) **Biochemical Systematics and Ecology** 31 (2003) 581–585.

GOMES, R.A.; OLIVEIRA, A.M.; MACIEL, J.K.S.; SOUZA, M.F.V. Feofitinas e compostos fenólicos de *Sidastrum micranthum* (MALCAVEAE). 33^a **Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**: A química construindo um futuro melhor, 2010.

GONÇALVES, A.S.M.; PEIXE, R.G.; SATO, A.; MUZITANO, M.F.; de Souza, R. O. M. A.; de BARROS MACHADO, T.; AMARAL, A.C.F.; MOURA, M.R.L.; SIMAS, N.K.; LEAL, I.C.R. *Pilosocereus arrabidaei* (Byles & Rowley) of the Grumari Sandbank, RJ, Brazil: Physical, chemical characterizations and antioxidant activities correlated to detection of flavonoids. **Food Res. Int.** 70, 110–117; 2015.

GRECA, M.D.; PREVITERA, L.; PURCARO, R.; ZARRELLI, A. Cinnamic acid amides and lignanamides from *Aptenia cordifolia*. **Tetrahedron**. 2006, 62, 2877–2882.
GULCIN, I.; SAT, I.G.; BEYDEMIR, S.; ELMASTAS, M.; KUFREVIOGLU, O.I. Comparison of antioxidant activity of clove (*Eugenia caryophyllata* Thunb) buds and lavender (*Lavandula stoechas* L.). **Food Chem.** 2004, 87, 393–400.

GUPTA, P.; BALWANI, S.; KUMAR, S.; AGGARWAL, N.; ROSSI, M.; PAUMIER, S.; CARUSO, F.; BOVICELLI, P.; SASO, L.; DEPASS, A. L.; PRASAD, A.K.;

PARMAR, V.S.; GHOSH, B. 2010. β -sitosterol among other secondary metabolites of *Piper galeatum* shows inhibition of TNF α -induced cell adhesion molecule expression on human endothelial cells. **Biochimie**. 92. 1213-1221.

HILL, R.G; RANG, H.P. Drug Discovery & Development: Tecnology in Transition. 2 ed. London: **Churchill Livingstone Elsevier**; 2013. 345 p.

HOLLIS, H.; SCHEINVAR, L. El interesante mundo de las cactáceas. México: **Fondo de Cultura Econômica**, 1995. 235p. *J. Agric. Food Chem.* 49: 4168-4170.

KAZAMA, C.C; UCHIDA, D.T.; CANZI, K.N.; SOUZA, P; CRESTANI, S.; JUNIOR, A.G. & JUNIOR, A.L. Involvement of arginine-vasopressin in the diuretic and hypotensive effects of *Pereskia grandifolia* Haw. (*Cactaceae*). **Journal of Ethnopharmacology** 144, 86–93, 2012.

KOJIMA, H.; SATO, N.; HATANO, A.; OGURA, H. Sterol glucosides from *Prunellavulgaris*. **Phytochemistry** 1990, 29, 2351–2355.

LIANG, X; TIAN, J.; LI, L.; GAO, J.; ZHANG, Q.; GAO, P.; SONG, S. RAPID Determination of eight bioactive alkaloids in *Portulacaoleracea* L. by the optimal microwave extraction combined with positive–negative on version multiple reaction monitor(+/-MRM) technology. **Talanta**, 120(2014)167–172.

LIMA, A.C. Estrutura taxonômica de *Cactaceae* Juss no Estado da Paraíba Nordeste do Brasil [**Monografia**] Universidade Estadual de Campina Grande. p.65; 2012.

LUCENA, C.M.; COSTA, G.M.; SOUSA, R.F.; CARVALHO, T.K.N.; MARREIROS, N.A.; ALVES, C.A.B.; PEREIRA, D.D.; LUCENA, R.F.P. Conhecimento local sobre cactáceas em comunidades rurais na mesorregião do sertão da Paraíba (Nordeste, Brasil). **Biotemas**, 25, 281–291; 2012.

LUCENA, C.M.; LUCENA, R.F.P.; Costa, G.M.; CARVALHO, T.K.N.; COSTA, G.G.S.; ALVES, R.R.N.; PEREIRA, D.D.; RIBEIRO, J.E.S.; alves, C.A.B.; QUIRINO, C.G.M.; et al. Use and knowledge of *Cactaceae* in Northeastern Brazil. **J. Ethnobiol. Ethnomed.** 2013, 9, 62.

LUNDSTROM, J. The Alkaloids: **Chemistry and Pharmacology**, 21, 255. 1983
MACIEL, J.K.S.; FERNANDES, M.G.F.; BRITO- FILHO, S.G.; FERNANDES, P.D.; FÉLIX, L.P. SOUZA, M.F.V. 2013. First chemical constituents from *Pilosocerus gounellei* (FAC Weber) *Cactaceae*; **Molecules** **2016**, 21, 11; doi:10.3390/molecules21010011.

MACIEL, M.A.M.; PINTO, A. C.; VEIGA JR, V.V.; GRYNBERG, N. F; ECHVARRIA, A. Plantas medicinais: A necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**. v. 25, n.3, p.429-438, 2002.

MACIEL, J.K.S.; FERNANDES, M.G.F.; BRITO- FILHO, S.G.; FERNANDES, P.D.; FÉLIX, L.P. SOUZA, M.F.V. 2013. First chemical constituents from *Pilosocereus gounellei* (FAC Weber) Cactaceae; *Molecules* 2016, 21, 11; doi:10.3390/molecules21010011.

MARTINS, L. S. T. Germinação de sementes de *Pilosocereus arrabidaei* (Lem.) Byl. & Row (Cactaceae) de Arraial do Cabo, Rio de Janeiro – **Dissertação (Mestrado)** – Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro/Escola Nacional de Botânica Tropical Rio de Janeiro, 2007.

MATIAS, W. N. Estudos térmicos e validação de metodologia analítica para a padronização de extratos vegetais de *Herissantia crispa* L Brizicky - Malvaceae. **Tese** (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) UFPB, João Pessoa. 2009.

MEIADO, M.V.; LIMA NETO, M.C.; FIGUEIREDO, K.V.; RITO, K.F.; OLIVEIRA, A.M.; LEAL, I. A polpa dos frutos de espécies do gênero *Pilosocereus* Byles & G.D. Rowley (Cactaceae) possui ação alelopática? **XII Congresso Brasileiro de Fisiologia Vegetal “Desafio para produção de alimentos e bioenergia”**. Fortaleza –CE. 7 a 12 de Setembro de 2009.

MORTON, J. F. Mucilaginous plants and their uses in medicine. **Journal of Ethnopharmacology**. v.29, n.3, p.245-66, 1990.

MURILLO, M.C.A.; SUAREZ, L.E.C.; SALAMANCA, J.A.C. Actividad insecticida sobre *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) de los compuestos aislados de la parte aérea de *Piper septuplinervium* (Miq.) C. DC. Y las inflorescencias de *Piper subtomentosum* Trel. & Yunck. (Piperaceae). **Quim. Nova** 2014, 37, 442–446.

MYERS, N.; MILTTERMEIER, R. A.; MILTTERMEIER, C. G.; da FONSECA, G. A. B; KENTS, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, 403, n. 24, feb., p. 853-858,(2000).Anderson EF. 2001. The Cactus Family. Portland: Timber Press.

NASCIEMNTO, U.T.; MOURA, N.P.; VASCONCELOS, M.A.S.; MACIEL, I.S.M.; ALBUQUERQUE, U.P. Chemical characterization of native wild plants of dry seasonal forest of the semi-arid region of northeastern Brazil. **Food Res. Int.** 2011, 44, 2112–2119.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M.; Natural Products as Sources of New Drugs over the Period 1981–2002, *J. Nat. Prod.* 2003, 66, 1022.

PARK, E.H.; KAHNG, J.H.; LEE, S.H.; SHIN, K. H. An anti-inflammatory principle from cactos. **Fitoterapia**, 72. 288-290, 2001.

PARK, J. B. Isolation and Characterization of N-Feruloyltyramine as the P-selectine Expression Suppressor from Garlic (*Allium sativum*). **J. Agric. Food Chem.** 2009.

PEREIRA, S.S.T.C. Medicamentos fitoterápicos e drogas vegetais industrializados e oficializados pelo Ministério da Saúde no Brasil: regulamentação sanitária, abrangência e qualidade dos estudos pré-clínicos e clínicos. **Tese apresentada à Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca para obtenção do Título de Doutor em Ciências na área de Saúde Pública.** Rio de Janeiro 22 de julho de 2013.

PIZZOLATTI M.G.; SZPOGANICZ, B.; SOUZA, E.; CUNHA Jr, A. Flavonóides glicosilados das folhas e flores da *Bauhinia forficata* (Leguminosae). **Quim Nova** 26: 466; 2003.

QUEIROZ, L. P., RAPINI, A., & GIULIETTI, A.M. (Eds.) Rumo ao amplo conhecimento da biodiversidade do semi-árido Brasileiro. **Brasília: Ministério da Ciência e Tecnologia.** 2006.

ROCHA, E.A.; MACHADO, I.C. & ZAPPI, D.C.Z.. Floral biology of *Pilosocereus tuberculatus* (Werderm.) Byles & Rowley: a bat pollinated cactus endemic from the “Caatinga” in northeastern Brazil. **Bradleya** 25, pp. 125-128, 2007.

ROQUE, A.A.; ROCHA, R.M. & LOIOLA, M.I.B.. Uso e diversidade de plantas medicinais da Caatinga na comunidade rural de Laginhas, município de Caicó, Rio Grande do Norte (nordeste do Brasil). **Rev. Bras. Pl. Med.**, Botucatu, v.12, n.1, p.31-42, 2010.

SCHENKEL, R. P.; GOSMANN, G.; PETROVICK, P. R. Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento de medicamentos. In: Schmitt, F.P.; Da silva, P.R. editores. **Farmacognosia da planta medicamento.** Porto Alegre: Editora da Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2010. p. 371- 400.

SILVA, D. A.; SILVA, T. M. S.; LINS, A. C. S.; COSTA, D. A.; CAVALCANTE, J. M. S.; MATIAS, W. N.; SOUZA, M. F. V. Constituintes químicos e atividade antioxidante de *Sida galheirensis* Ulbr. (Malvaceae). **Química Nova**, v. 29, n. 6, p. 1250-1254, 2006.

SILVA, V.A. Diversidade de uso das cactáceas no nordeste do Brasil: uma revisão. **Gaia Scientia.** Edição Especial Cactaceae. Vol. 9(2): 137-154; 2015.

SMITH, T.A. Phenethylamine and related compounds in plants *Phytochemistry* 1977.

SNEADER, W. Drug Discovery: a history. Chichester: **John Wiley & Sons Ltd.**, p.468. 2005.

SOUSA, C. M. M.; SILVA, H. R.; VIEIRA-JR, G. M.; AYRES, M. C. C.; COSTA, C. L. S.; ARAÚJO, D. S.; CAVALCANTE, L.C.D.; BARROS, E. D. S.; ARAÚJO, P. B. M.; BRANDÃO, M. S; CHAVES, M. H. Fenóis Totais E Atividade Antioxidante De Cinco Plantas Mediciniais **Quim. Nova**, Vol. 30, No. 2, 351-355, 2007.

SOUZA VC, LORENZI M: Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II. Novo Odessa, SP: Instituto **Plantarum**; 2005:640p.

STARHA, R. Alkaloids from the Cactus Genus *Gymnocalycium* (Cactaceae)-II. **Biochem. Syst. Ecol.**, 25,363–364, 1997.

TAYLOR, N.P.; ZAPPI D.C. Cacti of Eastern Brazil. Kew: **Royal Botanic Gardens**.2004.

TELES, Y.C.F. 2015. Estudo fitoquímico de *Wissadula periplocifolia* (L.) C. Presl (Malvaceae) e desenvolvimento de metodologia analítica para quantificação do seu marcador químico. João Pessoa. 365 p. Tese de doutorado. Universidade Federal da Paraíba.

TOMAZ, A. C. A.; NOGUEIRA, R. B. S. S.; PINTO, D. S.; AGRA, M. F.; SOUZA, M. F. V.; CUNHA, E. V. L. Chemical constituents from *Richardia grandiflora* (Cham. & Schlttdl) Rubiaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 8, n. 1, p. 47-52, 2008.

URANO, R.P.M.; RODRIGUES, F.T.; BERLINCK, R.G.S. Utilização de detecção por espalhamento de luz evaporativo para a análise de produtos naturais. **Quim. Nova**. 35. 1198-1208., 2012.

VALENTINI SR, SOMMER WA, Matioli G. Validação de métodos analíticos. **Arq Mudi**. 2007;11(2):26-31.

VALKO, M.; IZAKOVIC, M.; MAZUR, M.; RHODES, C. J.; TELSER, J.; Mol. Cell. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. **Biochem**. 2004.

WALLACE RS: Molecular systematic study of the cactaceae: using chloroplast.

YUNES,R. A.; CECHINEL FILHO, V. Breve análise histórica da Química de Plantas Mediciniais: Sua importância na atual concepção de fármaco segundo os paradigmas Ocidental e Oriental: In: R. A. Yunes, J. B. Calixto, **Plantas Mediciniais sob a ótica da Química Medicinal Moderna**. Chapecó-SC, Argus, 2001, 523 p.

ZAPPI, D.; TAYLOR, N. Plano Nacional de Conservação das Cactáceas. Brasília: **Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade**, pp. 112; 2011.

ZAPPI, D.; TAYLOR, N.; SANTOS, M.R.; LAROCCA, J. *Cactaceae* in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://www.floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB70>>. Acesso em: 01 Fev. 2016.

ZAPPI, D.C. *Pilosocereus* (Cactaceae) Vol.3 Milborne Port:Royal Botanic gardens, Kew, 1994,160p.