



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUTOS NATURAIS E
SINTÉTICOS BIOATIVOS



PgPNSB

**Estudo fitoquímico de *Pilocarpus spicatus* subsp. *aracatensis*
(Rutaceae) e avaliação da atividade moduladora da resistência
bacteriana de cumarinas isoladas dessa espécie**

NIKOLE DURAND TRIGUEIRO

JOÃO PESSOA - PB

2022

NIKOLE DURAND TRIGUEIRO

**Estudo fitoquímico de *Pilocarpus spicatus* subsp. *aracatensis*
(Rutaceae) e avaliação da atividade moduladora da resistência
bacteriana de cumarinas isoladas dessa espécie**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba, em cumprimento às exigências para obtenção do título de Mestre em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, área de concentração Farmacoquímica.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Josean Fachine Tavares

JOÃO PESSOA - PB

2022

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

T828e Trigueiro, Nikole Durand.

Estudo fitoquímico de *Pilocarpus spicatus* subsp. *aracatensis* (Rutaceae) e avaliação da atividade moduladora da resistência bacteriana de cumarinas isoladas dessa espécie / Nikole Durand Trigueiro. - João Pessoa, 2022.

136 f. : il.

Orientação: Josean Fachine Tavares.
Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCS.

1. Produtos naturais. 2. Rutaceae. 3. *Pilocarpus spicatus*. 4. Cumarinas. 5. Resistência bacteriana. I. Tavares, Josean Fachine. II. Título.

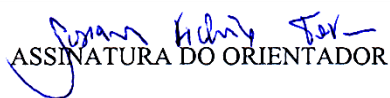
UFPB/BC

CDU 547.9(043)

NIKOLE DURAND TRIGUEIRO

**Estudo fitoquímico de *Pilocarpus spicatus* subsp. *aracatensis*
(Rutaceae) e avaliação da atividade moduladora da resistência
bacteriana de cumarinas isoladas dessa espécie**

BANCA EXAMINADORA


ASSINATURA DO ORIENTADOR

Prof. Dr. Josean Fechine Tavares

Doutor em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos
Universidade Federal da Paraíba-Campus I
(Orientador)



Prof. Dr. Jackson Roberto Guedes da Silva Almeida

Doutor em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos
Universidade Federal do Vale do São Francisco
(Examinador externo)



Prof. Dr. José Maria Barbosa Filho

Doutor em Química de Produtos Naturais
Universidade Federal da Paraíba-Campus I
(Examinador interno)

Dedico este trabalho a Deus digno de tudo.

À minha mãe e irmãs pelo amor encorajador.

À minha família.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por Sua graça capacitadora que me possibilitou chegar até aqui.

À minha mãe, pelo amor imensurável. Ao meu pai, pelo incentivo. Às minhas irmãs, pela alegria e motivação. Aos meus avós e tias, por todo apoio.

Ao meu orientador Prof. Dr. Josean Fachine Tavares, uma grande inspiração para mim na área acadêmica, pela paciência, ensinamentos e portas abertas.

Ao Prof. Dr. Marcelo Sobral da Silva, a quem muito admiro como pesquisador, pelos conhecimentos transmitidos.

Ao Prof. Dr. Vicente Carlos de Oliveira Costa, pela contribuição na minha jornada científica.

Ao Prof. Dr. Jackson Roberto Guedes da Silva Almeida e Prof. Dr. José Maria Barbosa Filho, pela disponibilidade e contribuição neste trabalho.

À Profa. Dra. Maria de Fátima Agra, pela identificação botânica da espécie estudada.

Ao Prof. Dr. José Pinto de Siqueira Júnior e a Damara Freitas Rodrigues, pela realização dos testes de atividade moduladora da resistência bacteriana.

A todos os professores, técnicos (em especial, Yuri, Marcelo e Evandro) e funcionários (em especial, Sr. Ivan e Júnior) que fazem parte desse programa de pós-graduação, por tornarem possível a realização deste trabalho.

Aos meus amigos de pesquisa e parceiros de bancada, pela troca de conhecimentos, cafezinhos e brincadeiras diárias que tornaram essa jornada mais leve.

Ao Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos (PgPNSB), pela minha formação.

À Universidade Federal da Paraíba (UFPB), pelo apoio estrutural.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro.

*"Without the love of research, mere knowledge
and intelligence cannot make a scientist."*

- Irène Joliot-Curie

RESUMO

As pesquisas na área de produtos naturais têm crescido nos últimos anos devido à grande procura da população por alternativas terapêuticas menos ofensivas e mais viáveis. A resistência bacteriana a drogas é um problema de saúde pública que pode ser contornado com a utilização de agentes modificadores da resistência obtidos de fontes naturais. A espécie *Pilocarpus spicatus* sbsp. *aracatensis* Kaastra conhecida popularmente como jaborandi-da-restinga, pertence à família Rutaceae e encontra-se distribuída no Nordeste do Brasil. Estudos anteriores relataram o potencial de *P. spicatus* como fonte de metabólitos biologicamente ativos. Com isso, o presente trabalho tem como objetivo a investigação fitoquímica dessa espécie e avaliação da atividade moduladora da resistência bacteriana contra *Staphylococcus aureus*. As partes aéreas de *P. spicatus* foram coletadas em Maturéia-PB. Uma exsicata (7428) foi depositada no Herbário Prof. Lauro Pires Xavier (UFPB). O material vegetal foi desidratado, triturado e submetido à maceração com EtOH 95%. A solução extrativa foi concentrada em evaporador rotativo para obtenção do extrato etanólico bruto (EEB). Uma parte do EEB (100 g) foi submetida à partição líquido-líquido utilizando os solventes hexano, clorofórmio e acetato de etila. A fase hexânica (4 g) foi submetida à cromatografia em coluna (CC) utilizando sílica gel, que resultou em 20 frações. A fração PAH03 foi submetida à nova CC para obtenção de xantoxilina. A fração PAH12 foi submetida à cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)- preparativa para obtenção de bergaptol, heraclenol, pabularinona e isosaxalina. PAH13 foi submetida à CLAE semi-preparativa, resultando no isolamento de 8-(3-etoxi-2-hidroxi-3-metilbutiloxi)-psoraleno e mais quantidade de isosaxalina. A fase clorofórmica (5,5 g) foi submetida à cromatografia em coluna (CC) utilizando sílica gel resultando em 25 frações que foram reunidas em 12. A fração PACF foi identificada como heraclenol. A fração PACE foi submetida à CLAE semi-preparativa, resultando no isolamento de escopoletina e isopimpinellina. A identificação estrutural dos constituintes químicos isolados foi realizada através da análise dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C , HMBC, HSQC, COSY e NOESY, bem como espectros de massas de alta resolução. Foi avaliado o efeito modulador da resistência a drogas de duas cumarinas isoladas (heraclenol e isoxalina) sobre norfloxacino e brometo de etídio utilizando uma cepa de efluxo de *S. aureus*. O heraclenol reduziu duas vezes a CIM do norfloxacino e a isosaxalina reduziu oito vezes. A redução da CIM do brometo de etídio demonstrou que estes compostos são inibidores putativos do sistema de efluxo em bactérias. Este trabalho contribuiu para a ampliação do conhecimento químico da espécie *P. spicatus*, demonstrando seu potencial como fonte de cumarinas.

Palavras-chave: Rutaceae. *Pilocarpus spicatus*. Cumarinas. RMN. Atividade moduladora da resistência bacteriana.

ABSTRACT

Research in the area of natural products has grown in recent years due to the great demand of the population for less offensive and more viable therapeutic alternatives. Bacterial drug resistance is a public health problem that can be solved with the use of resistance modifying agents obtained from natural sources. The species *Pilocarpus spicatus* sbsp. *aracatensis* Kaastra is known in folk medicine as jaborandi-da-restinga, belongs to the Rutaceae family and is distributed in Northeast Brazil. Previous studies have reported the potential of *P. spicatus* as a source of biologically active metabolites. The purpose of this work is the phytochemical investigation of this species and evaluation of the modulating activity of bacterial resistance against *Staphylococcus aureus*. The aerial parts of *P. spicatus* were collected in Maturéia-PB. One specimen (7428) was deposited at the Herbarium Prof. Lauro Pires Xavier (UFPB). The plant material was dehydrated, crushed and extracted with 95% EtOH. The extractive solution was concentrated in a rotary evaporator to obtain the crude ethanol extract (CEE). A portion of the CEE (100 g) was subjected to liquid-liquid partition using the solvents hexane, chloroform and ethyl acetate. The hexane phase (4 g) was subjected to column chromatography (CC) using silica gel which resulted in 20 fractions. The PAH03 fraction was subjected to a new CC to obtain xanthoxylin. The PAH12 fraction was subjected to preparative high performance liquid chromatography (HPLC) to obtain bergaptol, heraclenol, pabularinone and isosaxalin. PAH13 was subjected to semi-preparative HPLC, resulting in the isolation of more isosaxaline and 8-(3-ethoxy-2-hydroxy-3-methylbutyloxy)-psoralen. The chloroform phase (5.5 g) was subjected to column chromatography (CC) using silica gel resulting in 25 fractions which were grouped in 12. The PACF fraction was identified as heraclenol. The PACE fraction was subjected to semi-preparative HPLC, resulting in the isolation of scopoletin and isopimpineline. The structural identification of the isolated chemical constituents was performed through analysis of the ^1H and ^{13}C NMR, HMBC, HSQC, COSY and NOESY spectra, as well as high resolution mass spectra. The drug resistance modulating effect of two isolated coumarins (heraclenol and isoxalin) on norfloxacin and ethidium bromide against an efflux strain of *S. aureus* was evaluated. Heraclenol reduced the MIC of norfloxacin two-fold and isosaxalin reduced it eight-fold. The reduction of the MIC of ethidium bromide demonstrated that these compounds are putative inhibitors of the efflux system in bacteria. This work contributed to the expansion of chemical knowledge of the *P. spicatus* species, demonstrating its potential as a source of coumarins.

Keywords: Rutaceae. *Pilocarpus spicatus*. Coumarins. NMR. Modulating activity of bacterial resistance.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Distribuição geográfica mundial de Rutaceae A. Juss. representada pelas áreas em verde.....	26
Figura 2 – Distribuição geográfica mundial de <i>Pilocarpus</i> Vahl representada pelas áreas em verde.....	28
Figura 3 – Distribuição de <i>P. spicatus</i> no Brasil.....	31
Figura 4 – <i>Pilocarpus spicatus</i> sbsp. <i>aracatensis</i> Kaastra.....	32
Figura 5 – Cromatograma da fração PAH12.....	45
Figura 6 – Cromatograma da fração PAH13.....	47
Figura 7 – Cromatograma da fração PACE.....	51
Figura 8 – Estrutura química de Ps-1 (xantoxilina).....	57
Figura 9 – Espectro de HR-ESI-MS de Ps-1.....	58
Figura 10 – Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) de Ps-1.....	59
Figura 11 – Expansão do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) de Ps-1 na região de 5,85 – 6,06 ppm.....	59
Figura 12 – Expansão do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) de Ps-1 na região de 3,67 – 4,01 ppm.....	60
Figura 13 – Espectro de RMN de ^{13}C -BB (125 MHz, CDCl_3) de Ps-1.....	60
Figura 14 – Espectro de RMN de ^{13}C -DEPT 135 (125 MHz, CDCl_3) de Ps-1.....	61
Figura 15 – Expansão do espectro de RMN de ^{13}C -BB (125 MHz, CDCl_3) de Ps-1 na região de 154 – 174 ppm.....	61
Figura 16 – Estrutura química de Ps-2 (bergaptol).....	63
Figura 17 – Espectro de HR-ESI-MS de Ps-2.....	63
Figura 18 – Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) de Ps-2.....	64
Figura 19 – Expansão do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) de Ps-2 na região de 8,01 – 8,13 ppm.....	65
Figura 20 – Expansão do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) de Ps-2 na região de 6,30 – 7,50 ppm.....	65
Figura 21 – Expansão do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) de Ps-2 na região de 3,14 – 3,58 ppm.....	66
Figura 22 – Estrutura química de Ps-3 (heraclenol).....	68
Figura 23 – Espectro de HR-ESI-MS de Ps-3.....	69

Figura 24 – Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) de Ps-3.....	70
Figura 25 – Expansão do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) de Ps-3 na região de 7,32 – 7,76 ppm.....	70
Figura 26 – Expansão do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) de Ps-3 na região de 6,32 – 6,80 ppm.....	71
Figura 27 – Expansão do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) de Ps-3 na região de 3,85 – 4,75 ppm.....	71
Figura 28 – Espectro de RMN de ^{13}C -BB (125 MHz, CDCl_3) de Ps-3.....	72
Figura 29 – Expansão do espectro de RMN de ^{13}C -BB (125 MHz, CDCl_3) de Ps-3 na região de 70 – 78,5 ppm.....	72
Figura 30 – Estrutura química de Ps-4 (pabularinona).....	74
Figura 31 – Espectro de HR-ESI-MS de Ps-4.....	75
Figura 32 – Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) de Ps-4.....	76
Figura 33 – Expansão do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) de Ps-4 na região de 6,30 – 7,80 ppm.....	76
Figura 34 – Expansão do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) de Ps-4 na região de 2,92 – 3,16 ppm.....	77
Figura 35 – Espectro de RMN – COSY ^1H - ^1H (400 MHz, CDCl_3) de Ps-4.....	77
Figura 36 – Expansão do espectro de RMN-COSY ^1H - ^1H (400 MHz, CDCl_3) de Ps-4 na região de (6,20 – 7,90 ppm) x (6,10 – 7,90 ppm).....	78
Figura 37 – Expansão do espectro de RMN-COSY ^1H - ^1H (400 MHz, CDCl_3) de Ps-4 na região de (1,10 – 3,30 ppm) x (0,50 – 3,50 ppm).....	78
Figura 38 – Espectro de RMN-HSQC (400 e 100 MHz, CDCl_3) de Ps-4.....	79
Figura 39 – Expansão do espectro de RMN-HSQC (400 e 100 MHz, CDCl_3) de Ps-4 na região de (6,30 – 7,70 ppm) x (110,0 – 145,0 ppm).....	79
Figura 40 – Expansão do espectro de RMN-HSQC (400 e 100 MHz, CDCl_3) de Ps-4 na região de (1,10 – 5,40 ppm) x (15,0 – 75,0 ppm).....	80
Figura 41 – Espectro de RMN-HMBC (400 e 100 MHz, CDCl_3) de Ps-4.....	80
Figura 42 – Expansão do espectro de RMN-HMBC (400 e 100 MHz, CDCl_3) de Ps-4 na região de (1,20 – 5,40 ppm) x (130,0 – 210,0 ppm).....	81
Figura 43 – Expansão do espectro de RMN-HMBC (400 e 100 MHz, CDCl_3) de Ps-4 na região de (6,10 – 7,90 ppm) x (105,0 – 160,0 ppm).....	81
Figura 44 – Expansão do espectro de RMN-HMBC (400 e 100 MHz, CDCl_3) de Ps-4 na região de (1,00 – 3,20 ppm) x (12,0 – 44,0 ppm).....	82

Figura 45 – Estrutura química de Ps-5 (isosaxalina).....	84
Figura 46 – Espectro de HR-ESI-MS de Ps-5.....	85
Figura 47 – Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) de Ps-5.....	85
Figura 48 – Expansão do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) de Ps-5 na região de 7,36 – 7,80 ppm.....	86
Figura 49 – Expansão do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) de Ps-5 na região de 6,34 – 6,86 ppm.....	86
Figura 50 – Expansão do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) de Ps-5 na região de 4,05 – 4,90 ppm.....	87
Figura 51 – Expansão do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) de Ps-5 na região de 1,49 – 1,83 ppm.....	87
Figura 52 – Espectro de RMN de ^{13}C – BB (125 MHz, CDCl_3) de Ps-5.....	88
Figura 53 – Expansão do espectro de RMN de ^{13}C – BB (125 MHz, CDCl_3) de Ps-5 na região de 102,0 – 162,0 ppm.....	88
Figura 54 – Expansão do espectro de RMN de ^{13}C – BB (125 MHz, CDCl_3) de Ps-5 na região de 24,0 – 78,0 ppm.....	89
Figura 55 – Espectro de RMN-COSY ^1H - ^1H (500 MHz, CDCl_3) de Ps-5.....	89
Figura 56 – Expansão do espectro de RMN-COSY ^1H - ^1H (500 MHz, CDCl_3) de Ps-5 na região de (6,20 – 7,90 ppm) x (6,00 – 8,20 ppm).....	90
Figura 57 – Expansão do espectro de RMN-COSY ^1H - ^1H (500 MHz, CDCl_3) de Ps-5 na região de (3,80 – 5,00 ppm) x (3,60 – 5,30 ppm).....	90
Figura 58 – Espectro de RMN-HSQC (500 e 125 MHz, CDCl_3) de Ps-5.....	91
Figura 59 – Espectro de RMN-HMBC (500 e 125 MHz, CDCl_3) de Ps-5.....	91
Figura 60 – Expansão do espectro de RMN-HMBC (500 e 125 MHz, CDCl_3) de Ps-5 na região de (4,50 – 8,00 ppm) x (105,0 – 165,0 ppm).....	92
Figura 61 – Expansão do espectro de RMN-HMBC (500 e 125 MHz, CDCl_3) de Ps-5 na região de (1,60 – 5,00 ppm) x (25,0 – 80,0 ppm).....	92
Figura 62 – Estrutura química de Ps-6 (8-(3-etoxi-2-hidroxi-3-metilbutiloxi)-psoraleno).....	94
Figura 63 – Espectro de HR-ESI-MS de Ps-6.....	96
Figura 64 – Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) de Ps-6.....	96
Figura 65 – Expansão do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) de Ps-6 na região de de 7,32 – 7,76 ppm.....	97

Figura 66 – Expansão do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) de Ps-6 na região de de 6,28 – 6,84 ppm.....	97
Figura 67 – Expansão do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) de Ps-6 na região de de 3,95– 4,75 ppm.....	98
Figura 68 – Expansão do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) de Ps-6 na região de de 3,40– 3,51 ppm.....	98
Figura 69 – Expansão do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) de Ps-6 na região de de 1,08– 1,30ppm.....	99
Figura 70 – Espectro de RMN de ^{13}C – BB (125 MHz, CDCl_3) de Ps-6.....	99
Figura 71 – Expansão do espectro de RMN de ^{13}C – BB (125 MHz, CDCl_3) de Ps-6 na região de de 74,6– 78,2 ppm.....	100
Figura 72 – Espectro de RMN de ^{13}C -DEPT 135 (125 MHz, CDCl_3) de Ps-6.....	100
Figura 73 – Espectro de RMN-COSY ^1H - ^1H (500 MHz, CDCl_3) de Ps-6.....	101
Figura 74 – Expansão do espectro de RMN-COSY ^1H - ^1H (500 MHz, CDCl_3) de Ps-6 na região de (6,20 – 8,00 ppm) x (5,80 – 8,20 ppm).....	101
Figura 75 – Expansão do espectro de RMN-COSY ^1H - ^1H (500 MHz, CDCl_3) de Ps-6 na região de (3,80 – 4,90 ppm) x (3,50 – 5,30 ppm).....	102
Figura 76 – Expansão do espectro de RMN-COSY ^1H - ^1H (500 MHz, CDCl_3) de Ps-6 na região de (0,80 – 4,00 ppm) x (0,5 – 4,00 ppm).....	102
Figura 77 – Espectro de RMN-NOESY ^1H - ^1H (500 MHz, CDCl_3) de Ps-6.....	103
Figura 78 – Expansão do espectro de RMN-NOESY ^1H - ^1H (500 MHz, CDCl_3) de Ps-6 na região de (1,00 – 4,60 ppm) x (1,00 – 4,80 ppm).....	103
Figura 79 – Espectro de RMN-HSQC (500 e 125 MHz, CDCl_3) de Ps-6.....	104
Figura 80 – Espectro de RMN-HMBC (500 e 125 MHz, CDCl_3) de Ps-6.....	104
Figura 81 – Expansão do espectro de RMN-HMBC (500 e 125 MHz, CDCl_3) de Ps-6 na região de (6,30 – 7,90 ppm) x (105,0 – 160,0 ppm).....	105
Figura 82 – Expansão do espectro de RMN-HMBC (500 e 125 MHz, CDCl_3) de Ps-6 na região de (1,00 – 1,75 ppm) x (15,0 – 80,0 ppm).....	105
Figura 83 – Estrutura química de Ps-7 (escopoletina).....	107
Figura 84 – Espectro de HR-ESI-MS de Ps-7.....	107
Figura 85 – Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CD_3OD) de Ps-7.....	108
Figura 86 – Expansão do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CD_3OD) de Ps-7 na região de 6,00 – 8,00 ppm.....	109

Figura 87 – Espectro de RMN de ^{13}C – BB (100 MHz, CD_3OD) de Ps-7.....	109
Figura 88 – Expansão do espectro de RMN de ^{13}C – BB (100 MHz, CD_3OD) de Ps-7 na região de de 104,0– 113,0 ppm.....	110
Figura 89 – Espectro de RMN-COSY ^1H - ^1H (400 MHz, CD_3OD) de Ps-7.....	110
Figura 90 – Expansão do espectro de RMN-COSY ^1H - ^1H (500 MHz, CD_3OD) de Ps-7 na região de (5,70 – 8,30 ppm) x (6,00 – 8,00 ppm).....	111
Figura 91 – Espectro de RMN-NOESY ^1H - ^1H (400 MHz, CD_3OD) de Ps-7...	111
Figura 92 – Expansão do espectro de RMN-NOESY ^1H - ^1H (400 MHz, CD_3OD) de Ps-7 na região de (3,00 – 7,50 ppm) x (3,60 – 7,40 ppm).....	112
Figura 93 – Espectro de RMN-HSQC (400 e 100 MHz, CD_3OD) de Ps-7.....	112
Figura 94 – Espectro de RMN-HMBC (400 e 100 MHz, CD_3OD) de Ps-7.....	113
Figura 95 – Expansão do espectro de RMN-HMBC (400 e 100 MHz, CD_3OD) de Ps-7 na região de (3,60 – 8,60 ppm) x (140,0 – 165,0 ppm).....	113
Figura 96 – Expansão do espectro de RMN-HMBC (400 e 100 MHz, CD_3OD) de Ps-7 na região de (5,70 – 8,20 ppm) x (102,0 – 116,0 ppm).....	114
Figura 97 – Estrutura química de Ps-8 (isopimpinellina).....	116
Figura 98 – Espectro de HR-ESI-MS de Ps-8.....	116
Figura 99 – Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) de Ps-8.....	117
Figura 100 – Expansão do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) de Ps-8 na região de 6,20 – 8,20 ppm.....	118
Figura 101 – Expansão do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) de Ps-8 na região de 4,10 – 4,20 ppm.....	118
Figura 102 – Espectro de RMN de ^{13}C – BB (100 MHz, CD_3OD) de Ps-8.....	119
Figura 103 – Expansão do espectro de RMN de ^{13}C – BB (100 MHz, CD_3OD) de Ps-8 na região de 102,0 – 162,0 ppm.....	119
Figura 104 – Expansão do espectro de RMN de ^{13}C – BB (100 MHz, CD_3OD) de Ps-8 na região de 53,0 – 70,0 ppm.....	120

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1 – Via biossintética resumida das cumarinas.....	36
Esquema 2 – Obtenção e fracionamento do extrato etanólico bruto (EEB) das partes aéreas de <i>Pilocarpus spicatus</i>	43
Esquema 3 – Processamento cromatográfico da fase hexânica de <i>Pilocarpus spicatus</i>	48
Esquema 4 – Processamento cromatográfico da fase clorofórmica de <i>Pilocarpus spicatus</i>	51

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Substâncias relatadas em espécies de <i>Pilocarpus</i>	30
Quadro 2 – Cumarinas isoladas de <i>Pilocarpus spicatus</i>	34
Quadro 3 – Processamento cromatográfico por CC da fase hexânica de <i>P. spicatus</i>	44
Quadro 4 – Método desenvolvido por CLAE para a fração PAH12.....	45
Quadro 5 – Método desenvolvido por CLAE para a fração PAH13.....	46
Quadro 6 – Processamento cromatográfico por CC da fase clorofórmica de <i>P. spicatus</i>	49
Quadro 7 – Reunião das frações após análise por CCDA.....	49
Quadro 8 – Método desenvolvido por CLAE para a fração PACE.....	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de Ps-1 comparados com dados da literatura para xantoxilina.....	58
Tabela 2 – Dados de RMN de ^1H de Ps-2 comparados com dados da literatura para bergaptol.....	64
Tabela 3 – Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de Ps-3 comparados com dados da literatura para heraclenol.....	69
Tabela 4 – Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de Ps-4 comparados com dados da literatura para o Pabularinona.....	75
Tabela 5 – Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de Ps-5 comparados com dados da literatura para isosaxalina.....	84
Tabela 6 – Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de Ps-6 comparados com dados da literatura para 8-(3-etoxi-2-hidroxi-3-metilbutiloxi)-psoraleno.....	95
Tabela 7 – Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de Ps-7 comparados com dados da literatura para a Escopoletina.....	108
Tabela 8 – Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de Ps-8 comparados com dados da literatura para Isopimpineline.....	117
Tabela 9 – Concentração Inibitória Mínima (CIM) de norfloxacino e brometo de etídio na ausência e na presença das cumarinas testadas contra a cepa SA1199-B de <i>Staphylococcus aureus</i>	121

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AcOEt	Acetato de etila
APT	<i>Attached Proton Test</i>
BB	<i>Broad band</i>
CC	Cromatografia em coluna
CCDA	Cromatografia em camada delgada analítica
CIM	Concentração inibitória mínima
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CLAE-DAD	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de arranjo de diodos
COSY	<i>Correlation Spectroscopy</i>
d	Dupleto
dd	Duplo dupleto
ddd	Duplo duplo dupleto
DEPT	<i>Distortionless Enhancement by Polarization Transfer</i>
dl	Dupleto largo
dq	Duplo quarteto
EEB	Extrato etanólico bruto
EM	Espectrometria de massas
ESI	<i>Electrospray Ionization</i>
ESI-MS	<i>Electrospray Ionization Mass Spectrometry</i>
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>
HR-ESI-MS	<i>High-resolution Electrospray Ionization Mass Spectrometry</i>
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Correlation</i>
Hz	Hertz
<i>J</i>	Constante de acoplamento
<i>m</i>	Multipeto
MHz	Mega-hertz
NOESY	<i>Nuclear Overhauser Spectroscopy</i>

PPgPNSB

Programa de Pós-Graduação em
Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos

ppm

Partes por milhão

q

Quadrupletto

R_fs

Fatores de retenção

RMN ¹³C

Ressonância magnética nuclear
de carbono 13

RMN ¹H

Ressonância magnética nuclear
de hidrogênio

s

Simpleto

sept.

Septeto

sl

Simpleto largo

t

Tripletto

T_R

Tempo de retenção

δ

Deslocamento químico em ppm

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	20
2. OBJETIVOS.....	24
2.1 Objetivo geral.....	24
2.1 Objetivos específicos.....	24
3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	26
3.1 Considerações sobre a família Rutaceae A. Juss.....	26
3.2 O gênero <i>Pilocarpus</i> Vahl.....	28
3.3 A espécie <i>Pilocarpus spicatus</i> subsp. <i>aracatensis</i> Kaastra.....	31
3.4 Cumarinas.....	35
3.5 Resistência bacteriana aos antimicrobianos e o uso de produtos naturais.....	37
4. PARTE EXPERIMENTAL.....	40
4.1 Estudo fitoquímico.....	40
4.1.1 Material e equipamentos utilizados.....	40
4.1.2 Coleta e identificação do material botânico.....	42
4.1.3 Obtenção e fracionamento do extrato etanólico bruto (EEB) das partes aéreas de <i>P. spicatus</i>	42
4.1.4 Processamento cromatográfico da fase hexânica.....	43
4.1.4.1 Processamento cromatográfico da fração PAH12 por CLAE.....	44
4.1.4.2 Processamento cromatográfico da fração PAH13 por CLAE.....	46
4.1.5 Processamento cromatográfico da fase clorofórmica.....	48
4.1.5.1 Processamento cromatográfico da subfração PACE por CLAE.....	50
4.1.6 Caracterização estrutural das substâncias isoladas.....	52
4.2 Avaliação da atividade moduladora da resistência a drogas em <i>Staphylococcus aureus</i>	53
4.2.1 Local da pesquisa.....	53
4.2.2 Microrganismos.....	53
4.2.3 Substâncias testadas.....	53
4.2.4 Avaliação da atividade moduladora da resistência a drogas.....	53
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	56
5.1 Identificação estrutural de Ps-1.....	56

5.2 Identificação estrutural de Ps-2.....	62
5.3 Identificação estrutural de Ps-3.....	66
5.4 Identificação estrutural de Ps-4.....	73
5.5 Identificação estrutural de Ps-5.....	82
5.6 Identificação estrutural de Ps-6.....	93
5.7 Identificação estrutural de Ps-7.....	106
5.8 Identificação estrutural de Ps-8.....	114
5.9 Avaliação da atividade moduladora da resistência a drogas em <i>Staphylococcus aureus</i>	120
6. CONCLUSÕES.....	124
REFERÊNCIAS.....	125

01 | INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

O uso de plantas medicinais nas práticas terapêuticas é tão antigo quanto o surgimento das primeiras civilizações humanas, tendo se difundido mundialmente através do conhecimento popular que foi construído através da observação de animais e experimentação na busca por ervas com finalidades curativas (HOFFMANN e ANJOS, 2018).

Os primeiros tratados médicos foram escritos no antigo Egito, Grécia e Roma e relatavam o uso de extratos de plantas, venenos obtidos de animais e minerais com fins paliativos ou curativos. Centenas de ervas e fórmulas eram descritas, e muitas destas são utilizadas até hoje como, por exemplo, mel, funcho, coentro, sene, alho e gengibre (MONTEIRO e BRANDELLI, 2017).

A partir do século XIX, o avanço da ciência permitiu separar, analisar e identificar os princípios ativos das plantas, resultando no isolamento das primeiras substâncias químicas naturais, contribuindo para o progresso da fitoterapia. Todavia, com o surgimento da medicina moderna e dos fármacos sintéticos essa prática tornou-se desvalorizada por certo tempo, sendo substituída pelo uso dos medicamentos industrializados (MONTEIRO e BRANDELLI, 2017).

No entanto, a utilização de recursos naturais como fonte medicinal tem crescido nos últimos anos devido à grande procura da população por novas alternativas terapêuticas de fácil acesso, baixo custo e com menos efeitos colaterais, uma vez que quando manuseadas e utilizadas adequadamente, as plantas medicinais são menos ofensivas do que os medicamentos sintéticos (REIS, 2018; VIANA e RAMOS, 2019).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), cerca de 80% das pessoas dos países em desenvolvimento no mundo recorrem à medicina tradicional para suprir as suas necessidades básicas de saúde como forma terapêutica complementar, alternativa ou não convencional (WHO, 2010). Da mesma forma no Brasil, 82% da população utilizam plantas medicinais ou seus derivados nos cuidados à saúde através do conhecimento popular ou por orientação das diretrizes do Sistema Único de Saúde (SUS) (BRASIL, 2012; SOUSA, SANTOS e ROCHA, 2019).

Entretanto, muitas espécies de plantas medicinais ainda não foram investigadas, e apesar de exercerem um papel benéfico à saúde humana, seu uso indiscriminado pode trazer sérios riscos ao organismo devido à presença de substâncias químicas de toxicidade desconhecida, contrapondo os dizeres populares que afirmam “se é natural não faz mal”. Sendo assim, o conhecimento aprofundado das drogas vegetais torna-se indispensável para garantir à população seu uso seguro e eficaz (BRASIL, 2020; MOURA *et al.*, 2020; GLOWKA, MARQUES e MOURA, 2021).

As plantas sintetizam uma grande quantidade de compostos orgânicos como produtos de seu metabolismo, classificados como metabólitos primários e secundários. Os produtos do metabolismo primário exercem funções vitais do vegetal como a fotossíntese, sendo estes os carboidratos, lipídios, aminoácidos, ácidos nucleicos e clorofila. Já os metabólitos secundários são formados em resposta ao estresse ambiental, atuando como agentes de polinização, de competição e de defesa contra fitopatógenos. Estes são responsáveis por fornecer características inerentes a cada espécie vegetal como pigmentos e aromas, além de promoverem efeitos medicinais para os seres humanos (VIZZOTTO, KROLOW e WEBER, 2010; SILVA, BIZERRA e FERNANDES, 2018).

Por se tratar de um importante fornecedor de substâncias farmacologicamente ativas, o reino vegetal tem sido objeto de pesquisa de muitos trabalhos na área de produtos naturais, fato evidenciado pelo número crescente de publicações (MONTEIRO e BRANDELLI, 2017).

Diante da busca aumentada por tais substâncias, esta área de pesquisa assume um papel importante na descoberta de novos fármacos através do desenvolvimento de técnicas de isolamento e identificação dos fitoconstituintes, seguido por avaliação de suas atividades biológicas, resultando em um conhecimento mais detalhado das plantas. Esses compostos podem ser utilizados na sua forma natural ou servir de protótipos para a síntese de novos fármacos (RODRIGUES, 2018).

Além disso, os produtos naturais agregam grande valor econômico e ambiental, possuindo diversas aplicações industriais, por exemplo, como pigmentos e antioxidantes de alimentos (MATIUCCI *et al.*, 2021), preservantes de madeira comercial (VIVIAN *et al.*, 2020), coagulantes no tratamento de água

ou de efluentes têxteis (LIMA JÚNIOR e ABREU, 2018; SILVA, JUNIOR e LOBATO, 2020), biopesticidas (ARAÚJO *et al.*, 2019), cosméticos (CARRULO, 2020) e medicamentos (SECA, 2020).

Detentor de uma grande reserva biológica ainda pouco estudada, o Brasil representa um alvo valioso para a ciência de produtos naturais. Destacando-se entre os cinco países com maior biodiversidade do planeta, possui a flora mais rica do mundo, com mais de 46.000 espécies de plantas distribuídas nos biomas Amazônia, Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica, Pampa e Pantanal (BRASIL, 2022a). Tal riqueza ocupa lugar importantíssimo na economia nacional sendo responsável por cerca de 50 % do PIB brasileiro, tornando fundamental o incentivo a pesquisas que levem a um melhor aproveitamento dessa biodiversidade (BRASIL, 2022b).

Levando em consideração a grande utilização de plantas medicinais ainda não estudadas do ponto de vista químico e biológico, e que a espécie *Pilocarpus spicatus*, objeto desse trabalho, pertence a uma família rica em compostos biologicamente ativos, evidencia-se a importância de um estudo aprofundado dessa planta através do isolamento e identificação de moléculas orgânicas em conjunto com testes biológicos posteriores, a fim de contribuir para a valorização e quimiotaxonomia do gênero *Pilocarpus*.

02 | OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Ampliar o conhecimento fitoquímico do gênero *Pilocarpus* através do isolamento e identificação de constituintes químicos presentes em *Pilocarpus spicatus* subsp. *aracatensis* Kaastra, e contribuir com o conhecimento farmacológico dessa espécie.

2.2 Objetivos específicos

- Separar e isolar os metabólitos secundários presentes no extrato etanólico bruto das partes aéreas de *Pilocarpus spicatus* através de métodos cromatográficos clássicos e modernos;
- Desenvolver métodos analíticos em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para isolamento e purificação dos compostos presentes nas frações oriundas do extrato etanólico bruto;
- Identificar e/ou elucidar as estruturas químicas dos constituintes de *P. spicatus* através de métodos espectroscópicos de ressonância magnética nuclear unidimensional de ^1H e ^{13}C , e bidimensional (HMBC, HSQC, COSY e NOESY), além de espectrometria de massas de alta resolução;
- Avaliar a atividade moduladora da resistência bacteriana de substâncias isoladas frente a uma cepa de efluxo de *Staphylococcus aureus*.

03 | FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

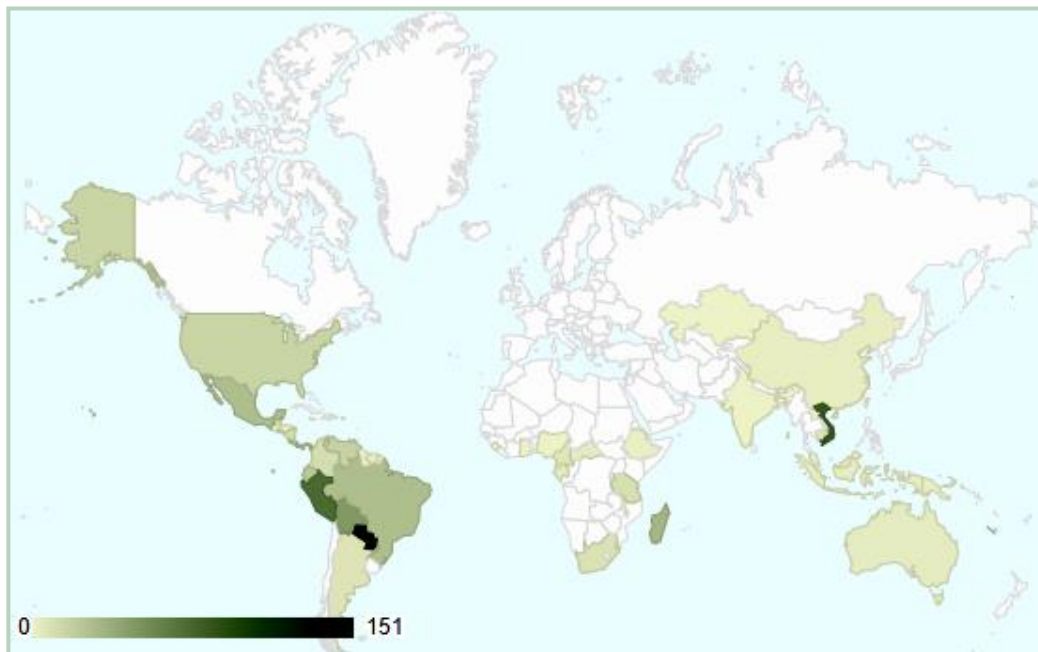
3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 Considerações sobre a família Rutaceae A. Juss.

A família Rutaceae pertence à ordem Sapindales (APG IV, 2016) e compreende 160 gêneros com cerca de 1800 espécies, distribuídas, principalmente, nas regiões tropicais e subtropicais do mundo todo, com centros de diversidade na Australásia, América Tropical e Sul da África (Figura 1) (KUBITZKI *et al.*, 2011; COLE e GROPPPO, 2020). No Brasil, há ocorrência de 50 gêneros e 238 espécies, sendo 106 endêmicas que podem ser encontradas em todos os biomas brasileiros com maior representatividade nos domínios fitogeográficos da Amazônia e Mata Atlântica (PIRANI e GROPPPO, 2020).

O estudo taxonômico de Rutaceae realizado por Morton e Telmer (2014), reclassifica sua divisão em quatro subfamílias monofiléticas: Aurantioideae, Cnoroideae, Rutoideae e Amyridoideae.

Figura 1 – Distribuição geográfica mundial de Rutaceae A. Juss. representada pelas áreas em verde.



Fonte: Tropicos.org. Missouri Botanical Garden. Acesso em: 13 Jan 2022.
Disponível em: <<https://tropicos.org/name/42000265>>

As espécies dessa família são encontradas na forma de pequenas árvores, arbustos ou ervas e possuem como característica marcante a presença de pontos translúcidos, referentes a glândulas multicelulares produtoras de óleos essenciais aromáticos. Tais cavidades são encontradas em todas as partes da planta, exceto nas raízes (PIRANI, 2002).

Rutaceae é uma família quimicamente versátil, pois suas espécies são fontes de diferentes classes de metabólitos secundários como óleos voláteis (PAW *et al.*, 2020), cumarinas (WONGTHET *et al.*, 2018), flavonoides (JATAV *et al.*, 2018), alcaloides (OMBITO, CHI e WANSI, 2020) e limonoides (SARTOR *et al.*, 2019).

Diversas atividades biológicas são atribuídas a esses compostos, como antioxidante (SOUZA *et al.*, 2020), anti-inflamatória (OMUJAL *et al.*, 2020), inseticida (PUTRI *et al.*, 2020), neuroprotetora (MOHAMED *et al.*, 2019), citotóxica (TAHSIN *et al.*, 2017), antimicrobiana, antifúngica, antiprotozoário e antiviral (SARAIVA FILHO *et al.*, 2020).

As rutáceas merecem destaque por sua importância na economia, medicina e meio ambiente. As espécies do gênero *Citrus* produzem frutos mundialmente consumidos como alimentos. São estes a laranja, o limão e a tangerina. Suas cascas apresentam aroma intenso de onde se extraem óleos essenciais para comercialização, empregados na indústria farmacêutica e de cosméticos como aromatizantes e saborizantes, além de possuírem propriedades medicinais (OTHMAN *et al.*, 2016; PAW *et al.*, 2020).

A espécie *Pilocarpus microphyllus* é uma valiosa fonte do alcaloide pilocarpina, constituinte de colírios utilizados no tratamento de glaucoma, colocando o Brasil na posição de principal exportador deste princípio ativo para a indústria farmacêutica internacional (LIMA *et al.*, 2017; OLIMAT, 2020).

Espécies do gênero *Ruta* (FREITAS e LIMA, 2021), *Zanthoxylum* (SARAIVA FILHO *et al.*, 2020), *Clausena* (WONGTHET *et al.*, 2018), *Murraya* (LU *et al.*, 2021), entre outros são bastante conhecidas e largamente utilizadas na medicina popular para tratamento de diversas enfermidades.

3.2 O gênero *Pilocarpus* Vahl

Pertencente à tribo Galpinae, subtribo Pilocarpinae, *Pilocarpus* é um gênero neotropical, distribuído do México ao norte da Argentina, cujas espécies habitam principalmente o interior de matas úmidas e estacionais, sobretudo nas porções norte-nordeste da América do Sul e oriental do Brasil (Figura 2). O gênero conta com 17 espécies das quais 15 ocorrem no Brasil, sendo 11 endêmicas (PIRANI e DEVECCHI, 2018; PIRANI e GROppo, 2020).

Figura 2 – Distribuição geográfica mundial de *Pilocarpus* Vahl representada pelas áreas em verde.



Fonte: Tropicos.org. Missouri Botanical Garden. Acesso em: 13 Jan 2022.
Disponível em: < <https://tropicos.org/name/40008825> >

As espécies de *Pilocarpus* possuem largo emprego medicinal, sendo conhecidas popularmente como "jaborandis". Estas se apresentam na forma de arbustos com folhas alternas, simples, folioladas ou pinadas, e são diferenciadas de outros gêneros de Rutaceae com ocorrência brasileira pelas inflorescências racemiformes com flores (4)5-meras portando disco completamente adnato ao ovário e frutos do tipo folículo (PIRANI, 2002; COLE E GROppo, 2020).

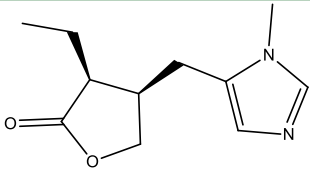
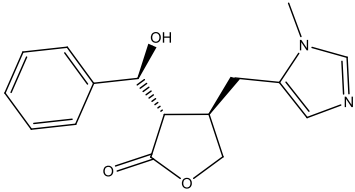
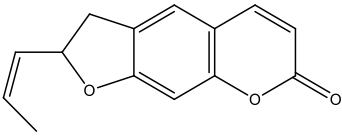
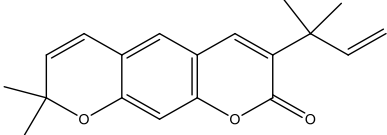
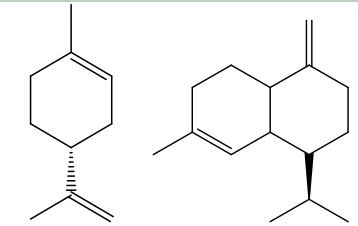
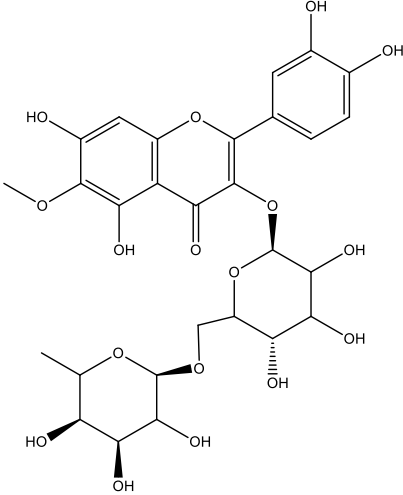
A literatura relata diversas atividades farmacológicas de *Pilocarpus*, sendo mais estudadas suas atividades citotóxica e antimicrobiana, onde as espécies *Pilocarpus jaborandi* e *P. microphyllus* se sobressaíram em número de

trabalhos desenvolvidos, provavelmente pelo seu grande histórico de uso tradicional (BITTENCOURT *et al.*, 2020).

Por ser fonte de pilocarpina, o jaborandi reduz a pressão intraocular e estimula as secreções salivares, lacrimais, gástricas e sudoríparas, sendo utilizado no tratamento de glaucoma e xerostomia, como agente digestivo e transpirante, além de constituir a formulação de shampoos para controle da queda de cabelo e da seborreia. Outro uso dessas plantas é no tratamento de doenças de pele como vitiligo e psoríase, propriedade esta atribuída às cumarinas ali presentes (SANTOS e MORENO, 2004; CÁPOLI, 2019).

Diferentes metabólitos secundários foram encontrados em *Pilocarpus*. Em sua maioria, alcaloides (LIMA *et al.*, 2017) seguido por cumarinas (CARMO *et al.*, 2018), óleos voláteis (NOGUEIRA *et al.*, 2020) e flavonoides (BERTRAND, FABRE e MOULIS, 2001). Algumas substâncias representantes dessas classes estão apresentadas no Quadro 1.

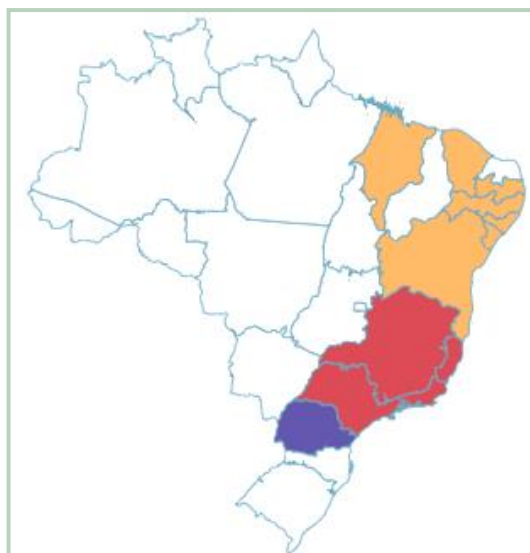
Quadro 1 – Substâncias relatadas em espécies de *Pilocarpus*.

Substância	Classe	Espécie	Referência
 Pilocarpina	Alcaloide	<i>Pilocarpus microphyllus</i>	Lima <i>et al.</i> , 2017
 Epiisopiloturina			
 Jaborandina	Cumarina	<i>Pilocarpus pennatifolius</i>	Carmo <i>et al.</i> , 2018
 Dimetilalil xantiletina			
 Limoneno γ-Muuroleno	Óleo essencial	<i>Pilocarpus spicatus</i>	Nogueira <i>et al.</i> , 2020
 Patuletina-3-O-β-rutinosídeo	Flavonoide	<i>Pilocarpus trachylophus</i>	Bertrand, Fabre e Moulis, 2001

3.3 A espécie *Pilocarpus spicatus* subsp. *aracatensis* Kaastra

A espécie *Pilocarpus spicatus* A. St.-Hil., conhecida popularmente como jaborandi-da-restinga, arengueiro, pimentinha ou catinga-de-porco consiste em um arbusto ou árvore de pequeno porte endêmico do Brasil. Se distribui entre os estados do Rio de Janeiro ao Ceará (Figura 3), ocorrendo nos tipos de vegetação da Restinga, Mata Atlântica, florestas ombrófilas e florestas estacionais semidecíduais (PIRANI e GROppo, 2020).

Figura 3 – Distribuição de *P. spicatus* no Brasil.



Fonte: Rutaceae in Flora do Brasil 2020. Jardim Botânico do Rio de Janeiro.
Acesso em: 15 Jan. 2022. Disponível em:
<<http://reflora.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB899>>

Morfologicamente se caracteriza por folhas simples, alternas, subopostas ou subverticiladas agrupadas nas extremidades dos ramos, com tricomas unicelulares espalhados na face abaxial; flores amarelo-esverdeadas com pedicelos 0-4(-5) mm, 4-meras, actinomorfas; pétalas (4-)5, ovadas, creme-esverdeadas; ovário (4-)5-locular, com disco nectarífero inteiramente adnato; semente elipsoide, marrom ou vinho-escuro; fruto esquizocarpo, conchiforme. Floração predominante de março a junho e frutificação de abril a julho (PIRANI, 2002; FARIA, SOMNER e ROSA, 2007).

A subespécie *Pilocarpus spicatus* subsp. *aracatensis* Kaastra é encontrada nos estados do Ceará, Paraíba, Pernambuco e Bahia (Figura 4). Distingue-se

das outras subespécies pelas flores pediceladas (pedicelos 4-5 mm de comprimento) geralmente menores que as demais e pelos mais curtos (KAASTRA, 1977; PIRANI e GROPPPO, 2020).

Figura 4 – *Pilocarpus spicatus* sbsp. *aracatensis* Kaastra.



Imagem: Josean Fechine Tavares, 2011.

Estudos fitoquímicos com *P. spicatus* relataram o isolamento de triterpenos do tipo damarano (ANDRADE-NETO *et al.*, 1994) e tirucalano (MADEIRO *et al.*, 2016a), lignanas (SILVA *et al.*, 2014), alcaloides (PETIT e POLONOWSKY, 1897) e cumarinas (MADEIRO *et al.*, 2016b). Além disso, o limoneno foi identificado como o constituinte majoritário do óleo essencial das folhas, representando cerca de 40% de sua composição (ANDRADE-NETO *et al.*, 2002; NOGUEIRA *et al.*, 2020).

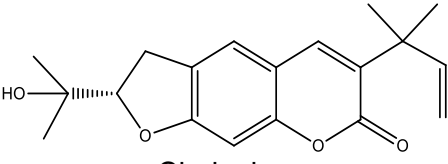
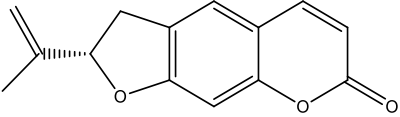
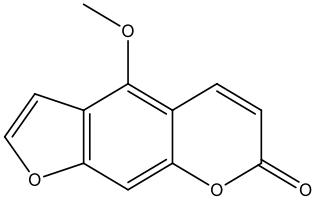
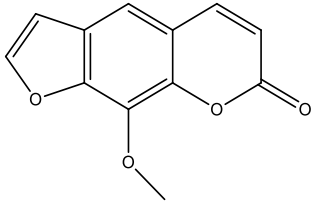
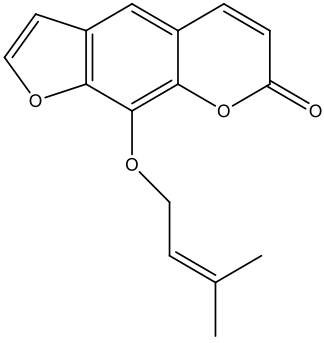
Esta espécie também foi investigada farmacologicamente. Os extratos brutos elaborados com diferentes solventes orgânicos das folhas, caules e raízes de *P. spicatus* apresentaram alta atividade contra a forma tripomastigota de *Trypanosoma cruzi*, causador da doença de Chagas (MAFEZOLI *et al.*, 2000; SILVA *et al.*, 2014). Os extratos clorofórmico e acetato de etila das folhas ou partes aéreas apresentaram atividade imunomoduladora contra linfócitos ativados por mitógeno (COSTA *et al.*, 2010).

Estudos realizados com o óleo essencial obtido das folhas de *P. spicatus* relataram boa atividade contra as bactérias *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* (SANTOS *et al.*, 1997; OLIVEIRA *et al.*, 2010). Este também demonstrou atividade inseticida contra as pragas agrícolas *Dysdercus peruvianus*, *Oncopeltus fasciatus* (APOLINÁRIO *et al.*, 2020) e contra o vetor da doença de Chagas *Rhodnius prolixus* (MELLO *et al.*, 2007; FEDER *et al.*, 2019), além de atividade acaricida contra o carrapato bovino *Rhipicephalus microplus* (NOGUEIRA *et al.*, 2020). As atividades edematogênica (SILVA e RAO, 1992) e anticolinesterásica (OLIVEIRA *et al.*, 2010) também foram relatadas.

As cumarinas isoladas de *P. spicatus* estão apresentadas no Quadro 2. Os trabalhos que levaram ao isolamento destas também investigaram suas atividades farmacológicas. Pavão e colaboradores (2002) isolaram a cumarina chalepina a partir da fração acetato de etila do extrato hexânico bruto dos caules de *P. spicatus*, e descreveram sua atuação como inibidor da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase glicossomal (gGAPDH) de *T. cruzi* (PAVÃO *et al.*, 2002). A partir do extrato hexânico das raízes foi isolada a cumarina isoangenomalina, por Silva e colaboradores (2014), mas esta não foi testada quanto à sua atividade por esses autores (SILVA *et al.*, 2014).

Em 2016, Madeiro isolou bergapteno, xantotoxina e imperatorina a partir da fase hexânica do extrato etanólico bruto das partes aéreas de *P. spicatus*, as quais foram avaliadas quanto à sua atividade antibacteriana e moduladora da resistência a drogas frente a cepas de *S. aureus* resistentes. Como resultado foi visto que as cumarinas não apresentaram atividade antibacteriana relevante. Entretanto, imperatorina apresentou boa atividade moduladora, reduzindo a concentração inibitória mínima (CIM) dos antibióticos tetraciclina (2 vezes), eritromicina e norfloxacino (4 vezes). Nesse mesmo trabalho, dois marcadores dessa espécie foram quantificados, sendo encontrada uma concentração de 5,0 µg/mL para xantotoxina e 2,22 µg/mL para imperatorina em uma solução a 1 mg/mL do extrato bruto (MADEIRO, 2016b).

Quadro 2 – Cumarinas isoladas de *Pilocarpus spicatus*.

Substância	Parte da planta	Atividade farmacológica	Referência
 Chalepina	Caules	Inibidor da enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase glicossomal (gGAPDH) de <i>T. cruzi</i>	Pavão <i>et al.</i> , 2002
 Isoangenomalina	Raízes	-	Silva <i>et al.</i> , 2014
 Bergapteno	Partes aéreas	-	Madeiro, 2016b
 Xantotoxina		-	
 Imperatorina		Atividade moduladora da resistência bacteriana em cepas de <i>S. aureus</i> , reduzindo a CIM dos antibióticos tetraciclina (2x), eritromicina (4x) e norfloxacino (4x)	

Diante das evidências químicas e farmacológicas da espécie *Pilocarpus spicatus*, é notório que esta planta se trata de um alvo promissor para estudos mais aprofundados a fim de explorar ainda mais seus metabólitos secundários e as atividades que estes promovem.

3.4 Cumarinas

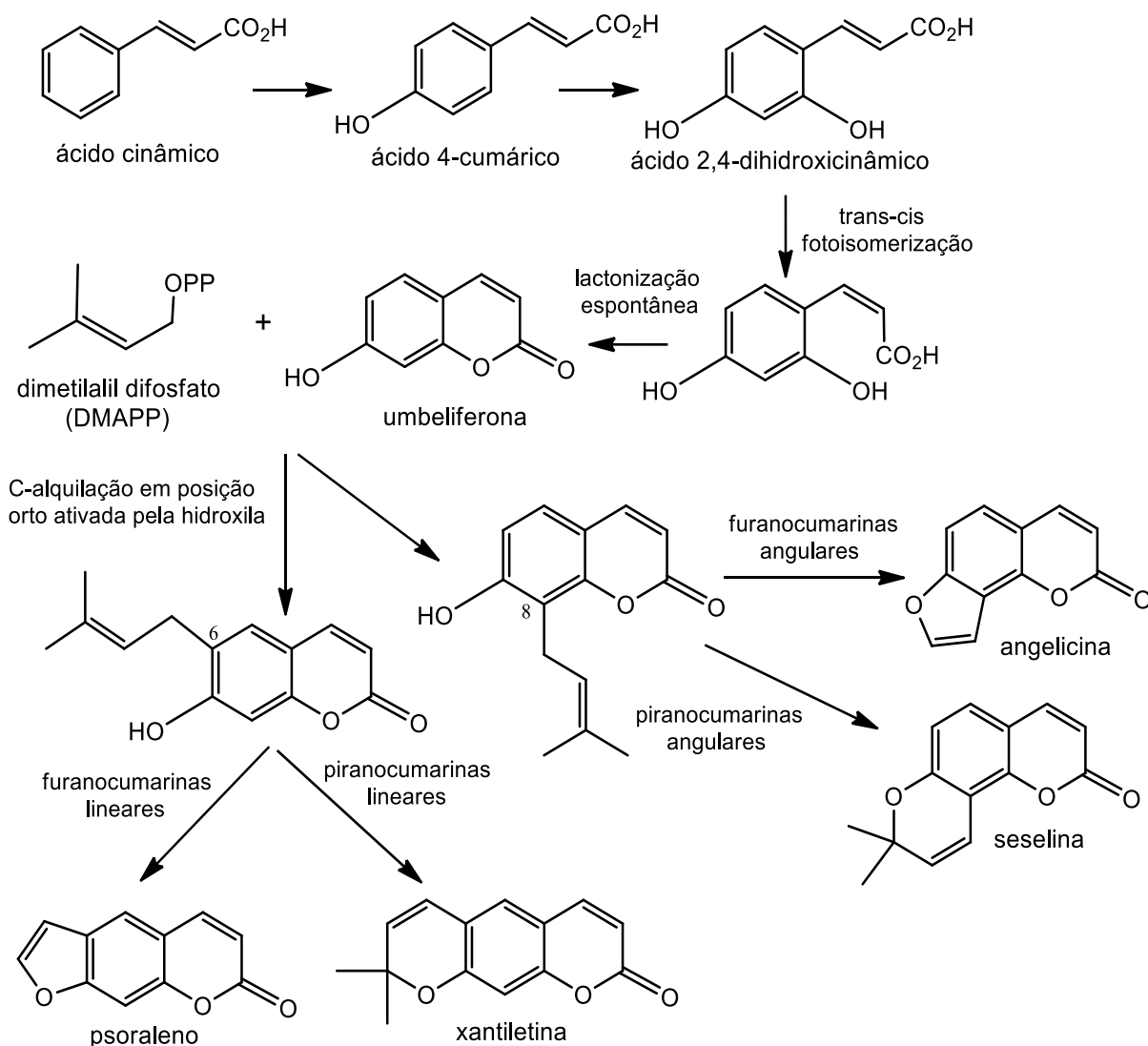
As cumarinas são lactonas derivadas do ácido *o*-hidroxicinâmico (2H-1-benzopiran-2-ona) amplamente encontradas no reino vegetal, como também em fungos e bactérias. Estas podem ser produzidas em diferentes partes da planta como folhas, flores, caules e raízes. As principais famílias de angiospermas conhecidas como fontes dessa classe de metabólitos são Apiaceae, Rutaceae e Asteraceae (SIMÕES *et al.*, 2007; SARKER e NAHAR, 2017).

As cumarinas são biossintetizadas pela via do ácido chiquímico, sendo derivadas do metabolismo da fenilalanina tendo como precursor o ácido *p*-hidroxicinâmico (ácido *p*-cumárico) que sofre *orto*-hidroxilação seguida por fotoisomerização da ligação dupla (*E*→*Z*). Por fim, o isômero *Z* sofre lactonização espontânea gerando a 7-hidroxicumarina (umbeliferona) (Esquema 1). Esta pode sofrer hidroxilação, gerando as di e tri-hidroxicumarinas e seus éteres (SIMÕES *et al.*, 2007).

O anel benzênico da 7-hidroxicumarina pode sofrer incorporação de carbonos extras derivados de uma unidade isoprênica, formando estruturas mais complexas. A hidroxila ativa as posições *orto*, possibilitando a alquilação pelo dimetilalil difosfato (oriundo da via do mevalonato), resultando na prenilação das posições C-6 ou C-8, seguido por ciclização, formando um anel furano (cinco membros) ou um anel pirano (seis membros). Quando o grupo prenil é inserido em C-6 originam-se as furano e piranocumarinas lineares. Já a prenilação em C-8 dá origem aos homólogos angulares (Esquema 1) (DEWICK, 2002).

Outros esqueletos cumarínicos podem ser formados a partir da via mista do acetato com chiquimato (4-fenilcumarinas) ou apenas pela via do acetato (4-*n*-propilcumarinas) (SIMÕES *et al.*, 2007). Algumas famílias de plantas produzem cumarinas com um ou mais radical prenil ou prenil modificado inseridos em sua estrutura, e tais grupos são derivados da via do mevalonato. As cumarinas preniladas ocorrem comumente nas famílias Apiaceae e Rutaceae (SARKER e NAHAR, 2017).

Esquema 1 – Via biossintética resumida das cumarinas (Adaptado: Simões *et al.*, 2007).



As cumarinas são conhecidas por sua ação anti-agregante plaquetária, representadas pelos derivados da 4-hidroxycumarina (varfarina e dicumarol) amplamente utilizados como anticoagulante oral. Possuem aroma intenso, sendo empregadas na indústria como fragrância de produtos de limpeza e cosméticos. Devido à sua alta capacidade de absorção da luz ultravioleta (UV), as cumarinas são bastante reativas, fato pelo qual apresentam fototoxicidade e podem até causar câncer de pele. Por outro lado, a aplicação adequada aliada à exposição controlada à radiação UV possibilita seu emprego no tratamento de doenças de pele como psoríase, vitiligo, hanseníase e dermatomicoses (SIMÕES *et al.*, 2007).

As propriedades biológicas das cumarinas estão relacionadas a seus padrões de substituição que podem ocorrer em qualquer uma das seis posições do núcleo cumarínico básico, conferindo a essa classe de compostos diversas atividades como antitumoral, anti-inflamatória, anticoagulante, antioxidante, analgésica e antimicrobiana (WU *et al.*, 2009).

3.5 Resistência bacteriana aos antimicrobianos e o uso de produtos naturais

As infecções bacterianas constituem um problema de saúde pública há muitos anos. Embora a descoberta dos antibióticos tenha revolucionado a medicina, impedindo a morte de indivíduos causada por doenças infecciosas ao longo do tempo, a disseminação progressiva de microrganismos resistentes a tais substâncias consiste em um grande desafio para os microbiologistas (FREITAS *et al.*, 2020).

Atualmente, o desenvolvimento de mecanismos de resistência está presente em quase todas as espécies de bactérias. Tal fenômeno ocorre por mutações intrínsecas ao microrganismo, como alterações no código genético durante o processo reprodutivo levando a alterações nos sistemas bioquímicos que impedem a ação das drogas, ou ocorre por transferência de genes responsáveis por tais mecanismos que ao serem importados por transdução, conferem resistência à bactéria (TAVARES, 2000).

Dentre os microrganismos que sofreram modificações na sensibilidade a antibióticos destaca-se o *Staphylococcus aureus*, uma bactéria Gram-positiva patogênica adquirida em hospital que causa preocupação pelos profissionais de saúde por sua capacidade de adquirir resistência a todos os antibióticos úteis comumente usados na clínica (GIBBONS, 2004).

As opções terapêuticas para tratar infecções causadas por *S. aureus* são bastante limitadas, principalmente em cepas resistentes à metilina. As fluoroquinolonas eram consideradas promissoras para tratar cepas multirresistentes, porém com a generalização da resistência estas também perderam a sua eficácia. Entre os mecanismos conhecidos pelos quais *S. aureus* pode desenvolver esse tipo de resistência, está o efluxo de fluoroquinolonas

hidrofílicas da célula, mediado pela bomba NorA presente na membrana citoplasmática da bactéria (KAATZ e SEO, 1995).

Uma alternativa prática para minimizar os efeitos resultantes do desenvolvimento desses mecanismos, é a utilização de agentes modificadores ou moduladores da resistência, que consistem em compostos capazes de potencializar a atividade de um antibiótico contra uma cepa resistente. Quando combinados com um antibiótico já conhecido, tais agentes podem atuar como substratos para as proteínas de membrana responsáveis pelo efluxo de antibióticos da célula, inibindo o mecanismo de resistência, restaurando o nível intracelular adequado do fármaco e, portanto, sua eficácia. Além disso, eles podem controlar o surgimento de novas mutações (GIBBONS, 2004; FALCÃO-SILVA *et al.*, 2009).

Diante dessa problemática, a busca por novas substâncias com propriedades antimicrobianas vem crescendo ao longo dos anos, destacando-se os produtos naturais devido à grande diversidade de compostos estruturalmente distintos presentes nas plantas. Diferentes classes de metabólitos secundários foram citadas por Gibbons (2004) como antibacterianos sendo eles mono, sesqui, di e triterpenos, fenilpropanoides, cumarinas, lignanas, estilbenos, flavonoides, alcaloides, policetídeos, xantonas, produtos contendo enxofre, entre outros (GIBBONS, 2004).

A atividade antibacteriana das cumarinas é bastante relatada tanto para bactérias Gram-positivas, como para Gram-negativas (TADA *et al.*, 2002). Seu esqueleto básico compõe uma classe de antibióticos aminocumarínicos produzidos por espécies de *Streptomyces* (novobiocina, clorobiocina e coumermicina) que atuam inibindo a DNA girase bacteriana. Foi observado em estudos de relação estrutura-atividade que o caráter lipofílico da cumarina é determinante para a alta atividade antibacteriana (WU *et al.*, 2009).

04 | PARTE EXPERIMENTAL

4 PARTE EXPERIMENTAL

4.1 Estudo fitoquímico

4.1.1 Material e equipamentos utilizados

As etapas envolvidas na separação cromatográfica dos constituintes químicos de *Pilocarpus spicatus*, incluindo o fracionamento, análise, isolamento e purificação desses compostos, foram realizadas por métodos clássicos como cromatografia em coluna (CC) por diferença de polaridade, cromatografia em camada delgada analítica (CCDA) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

As etapas de fracionamento foram realizadas por CC utilizando como fase estacionária sílica gel artigo 7734 (Merck®) com partículas de 0,060-0,200 mm de diâmetro e 70-230 mesh, e como suporte colunas cilíndricas de vidro com dimensões variadas de acordo com a quantidade de amostra a elas aplicadas.

O monitoramento do processo de separação foi realizado por CCDA utilizando cromatofolhas de alumínio-sílica gel 60 PF₂₅₄ (Merck®) de 0,25 mm de espessura, as quais foram reveladas por exposição à lâmpada de irradiação ultravioleta (UV) sob dois comprimentos de onda (254 e 366 nm) por meio de aparelho modelo BOIT-LUB01 (Boitton®) e por exposição a uma câmara saturada com vapores de iodo. As frações foram reunidas de acordo com a semelhança entre seus fatores de retenção (R_fs) observados por esta técnica.

Como fase móvel da CC e CCDA, foram utilizados solventes grau P.A. (hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol) puros ou em misturas binárias com ordem crescente de polaridade.

As etapas de isolamento e purificação dos compostos foram realizadas por CLAE. Para desenvolvimento de método foi utilizado um cromatógrafo analítico Proeminence (Shimadzu®) equipado com módulo de bombeamento de solvente binário LC-20AT, injetor automático SIL-20A, sistema de degaseificação DGU-20A, detector SPD-M20A com arranjo de diodos e CBM-20A. Como fase estacionária foi utilizada uma coluna de fase reversa C-18 modelo 100-5-C18 (Kromasil®) com 250 mm x 4,6 mm de d. i. e 5 µm de tamanho, conectada a uma pré-coluna C-18. Para a realização das análises, empregou-se um fluxo de 0,6

mL/min e volume de injeção de 10 μ L, com amostras preparadas na concentração de 1 mg/mL.

A CLAE em escala semi-preparativa foi realizada em um cromatógrafo (Shimadzu[®]) equipado com módulo de bombeamento de solvente binário LC-6AD, injetor manual e detector UV-VIS-SPD-M10A. A coluna utilizada foi de fase reversa (ACE[®]) com 250 mm x 10 mm de d. i. e 5 μ m de tamanho. Para a CLAE em escala preparativa utilizou-se cromatógrafo Proeminence (Shimadzu[®]) equipado com módulo de bombeamento de solvente binário LC-6AD, injetor manual Rheodyne, detector SPD-M10A com arranjo de diodos e controlador de sistema SCL-10A. Neste aparelho utilizou-se uma coluna de fase reversa C-18 modelo YMC-Actus Triart C18 (YMC[®]) com 250 mm x 21,2 mm de d.i. e 5 μ m de tamanho.

Como fase móvel da CLAE nas três escalas empregadas foi utilizado água ultrapura obtida por sistema de purificação Milli-Q (Millipore[®]) e metanol grau CLAE (Tedia Brasil[®]), o qual também foi empregado no preparo da amostra. Os solventes foram submetidos à cavitação ultrassônica em lavadora ultrassônica modelo Q13L/37 (Eco-sonics[®]) antes de entrarem no sistema de CLAE.

Os espectros de ressonância magnética nuclear de ¹H e ¹³C uni e bidimensionais foram registrados em espectrômetros Avance NEO 500 MHz (Bruker[®]), operando a 500 MHz para RMN de ¹H e 125 MHz para RMN de ¹³C, e BRUKER ASCEND 400 MHz (Bruker[®]), operando a 400 MHz (¹H) e 100 MHz (¹³C), ambos localizados no Laboratório Multiusuário de Caracterização e Análise (LMCA) da UFPB. Os espectros foram registrados em solventes deuterados: CDCl₃, CD₃OD e DMSO-*d*₆ (Cambridge Isotope Laboratories[®]).

Para obtenção dos espectros de massas de alta resolução (HRIES-MS) foi utilizado um espectrômetro micrOTOF II (Bruker[®]), localizado no LMCA-UFPB, operando com voltagem do capilar 3,5 kV, IES no modo positivo, offset da placa final 500 V, nebulizador 8,0 psi, gás seco (N₂) com fluxo de 5,0 L/h e temperatura a 200 °C. Os espectros (*m/z* 50-1000) foram registrados a cada 2 s.

4.1.2 Coleta e identificação do material botânico

O material vegetal (partes aéreas) da espécie *Pilocarpus spicatus* subsp. *aracatensis* Kaastra foi coletado no município de Maturéia (7° 11' 10" S e 37° 25' 53" W), estado da Paraíba (PB), Brasil em julho de 2019. Para esse estudo, foi realizado o cadastrado de acesso no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen) sob número A259516.

A espécie coletada foi identificada pela Prof^a. Dra. Maria de Fátima Agra e uma exsicata (7428) encontra-se depositada no Herbário Prof. Lauro Pires Xavier (JPB) do Centro de Ciências Exatas e da Natureza-UFPB.

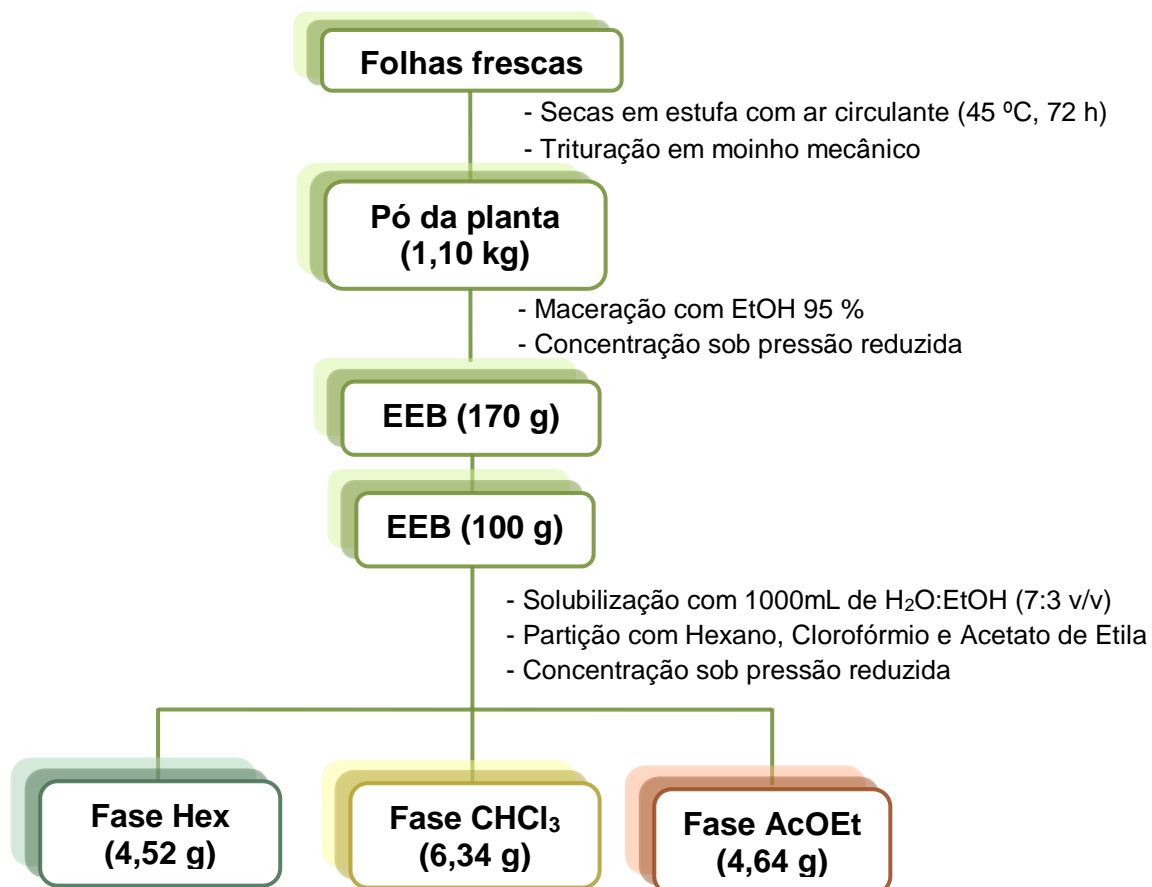
4.1.3 Obtenção e fracionamento do extrato etanólico bruto (EEB) das partes aéreas de *P. spicatus*

O material vegetal foi desidratado em estufa com ar circulante à temperatura de 45 °C durante 72 horas, e em seguida, triturado em moinho mecânico, obtendo-se 1,10 Kg do pó da planta. Este foi submetido à maceração exaustiva utilizando EtOH 95% em um extrator de aço inoxidável por 72 h. O processo de extração foi repetido quatro vezes, obtendo-se a solução extrativa, a qual foi filtrada e concentrada sob pressão reduzida em evaporador rotativo a uma temperatura de 40 °C para eliminação do solvente, obtendo-se 170 g do extrato etanólico bruto (EEB).

Uma parte do EEB (100 g) foi submetida à partição líquido-líquido, sendo este processo realizado duas vezes utilizando metade do material em cada uma delas a fim de garantir uma melhor eficiência da separação e evitar a formação de emulsão. Solubilizou-se o EEB (2 x 50 g) em uma solução H₂O:EtOH (2x 1000 mL) na proporção 7:3 (v/v) com auxílio de grau e pistilo, obtendo-se uma solução hidroalcoólica que foi filtrada e transferida para uma ampola de separação. Em seguida, foi realizada a partição adicionando-se os solventes em ordem crescente de polaridade (hexano, clorofórmio e acetato de etila), obtendo-se as soluções extrativas referentes a cada fase. Estas foram tratadas com sulfato de sódio anidro (Na₂SO₄) para remoção do excesso de água, e em seguida, foram filtradas e concentradas sob pressão reduzida em evaporador rotativo a uma

temperatura de 40 °C, resultando nas respectivas fases: hexânica (4,52 g), clorofórmica (6,34 g) e acetato de etila (4,64 g). Todo esse processo encontra-se resumido no Esquema 2.

Esquema 2 – Obtenção e fracionamento do extrato etanólico bruto (EEB) das partes aéreas de *Pilocarpus spicatus*.



4.1.4 Processamento cromatográfico da fase hexânica

A fase hexânica (4,0 g) foi submetida à CC utilizando como fase estacionária sílica gel e como fase móvel hexano, acetato de etila e metanol, puros ou em misturas binárias, com sistemas de eluição em ordem crescente de polaridade (Quadro 3), resultando em 20 frações (PAH01-PAH20) coletadas em volume de 300 mL cada.

Estas foram concentradas e analisadas através de CCDA por revelação na luz UV, e por RMN de ¹H, possibilitando a seleção de 5 frações (PAH05;

PAH11; PAH12, PAH13 e PAH14) que se apresentaram mais limpas para serem submetidas à CLAE em sistema analítico para desenvolvimento de método. Após análise dos cromatogramas, as frações PAH12 e PAH13 foram escolhidas para serem trabalhadas em escalas preparativa e semi-preparativa, por apresentarem os melhores perfis cromatográficos, com o objetivo de separar e isolar os constituintes químicos nelas contidos.

Quadro 3 – Processamento cromatográfico por CC da fase hexânica de *P. spicatus*.

Sistema de eluição	Frações obtidas
Hexano	PAH01
Hexano: AcOEt (95:5)	PAH02
Hexano: AcOEt (90:10)	PAH03
Hexano: AcOEt (88:12)	PAH04
Hexano: AcOEt (80:20)	PAH05 – PAH07
Hexano: AcOEt (75:25)	PAH08 – PAH11
Hexano: AcOEt (70:30)	PAH12 – PAH13
Hexano: AcOEt (60:40)	PAH14 – PAH15
Hexano: AcOEt (50:50)	PAH16
Hexano: AcOEt (40:60)	PAH17
Hexano: AcOEt (20:80)	PAH18
AcOEt	PAH19
MeOH	PAH20

A fração PAH03 (660 mg) foi submetida à purificação em uma nova CC nas mesmas condições descritas anteriormente, e após análise por RMN de ^1H e ^{13}C foi codificada como **Ps-1** (300,0 mg).

4.1.4.1 Processamento cromatográfico da fração PAH12 por CLAE

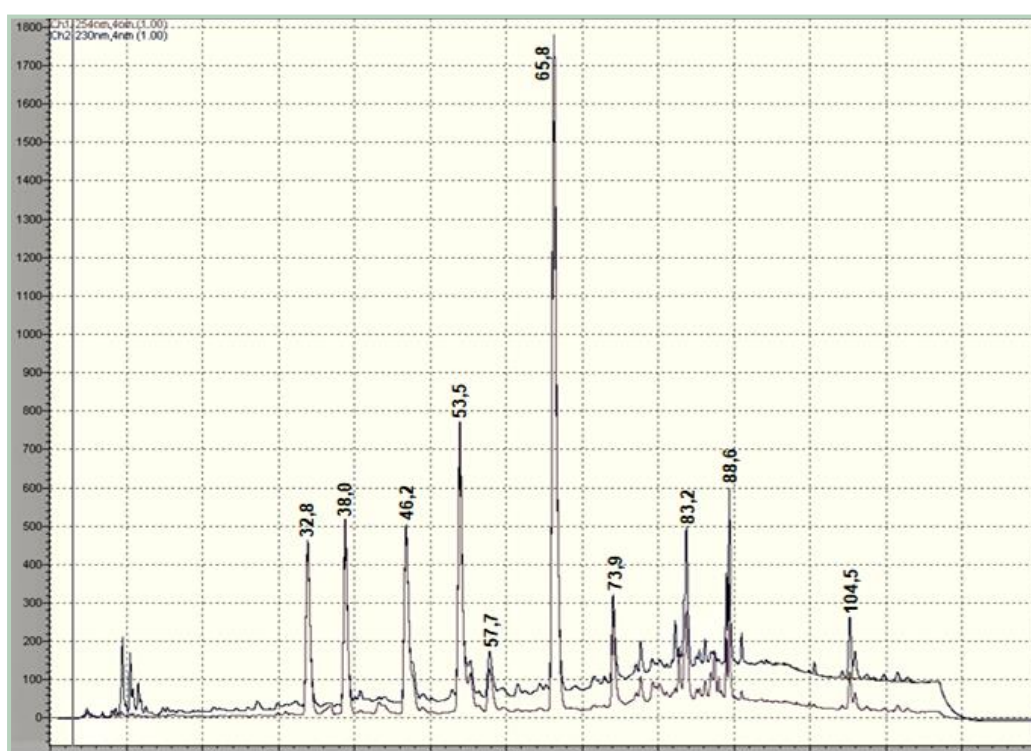
A fração PAH12 foi inicialmente submetida à CLAE em escala analítica para desenvolvimento de um método cromatográfico eficiente para separação dos constituintes químicos presentes nela. A amostra foi preparada em metanol na concentração de 1 mg/mL e filtrada (filtro de Nylon com poro de 0,45 μm). O método que se apresentou mais eficaz utilizou um sistema gradiente de água (solvente A) e metanol (solvente B), onde a concentração de B variou de 40-100% em um tempo de 90 min (Quadro 4), com fluxo da fase móvel de 0,6 mL/min, volume de injeção de 10 μL e comprimentos de onda utilizados para

detecção de 230 e 254 nm. No cromatograma foram observados 10 picos principais (Figura 5).

Quadro 4 – Método desenvolvido por CLAE para a fração PAH12.

Tempo de corrida (min)	Concentração de B (%)
0,01	40
60	70
70	80
90	100
110	100
115	40
130	40

Figura 5 – Cromatograma da fração PAH12.



Em seguida, a fração foi submetida à CLAE em escala preparativa. Para isso, 70 mg da amostra foi solubilizada em 1 mL de metanol, centrifugada (12.000 rpm; 20°C; 5 min) e filtrada (filtro de Nylon com poro de 0,45 µm). O sistema de eluição gradiente, tempo de corrida, e comprimentos de onda de detecção foram mantidos, modificando-se apenas o fluxo de fase móvel e o volume de injeção que passaram a ser de 8 mL/min e 100 µL, respectivamente.

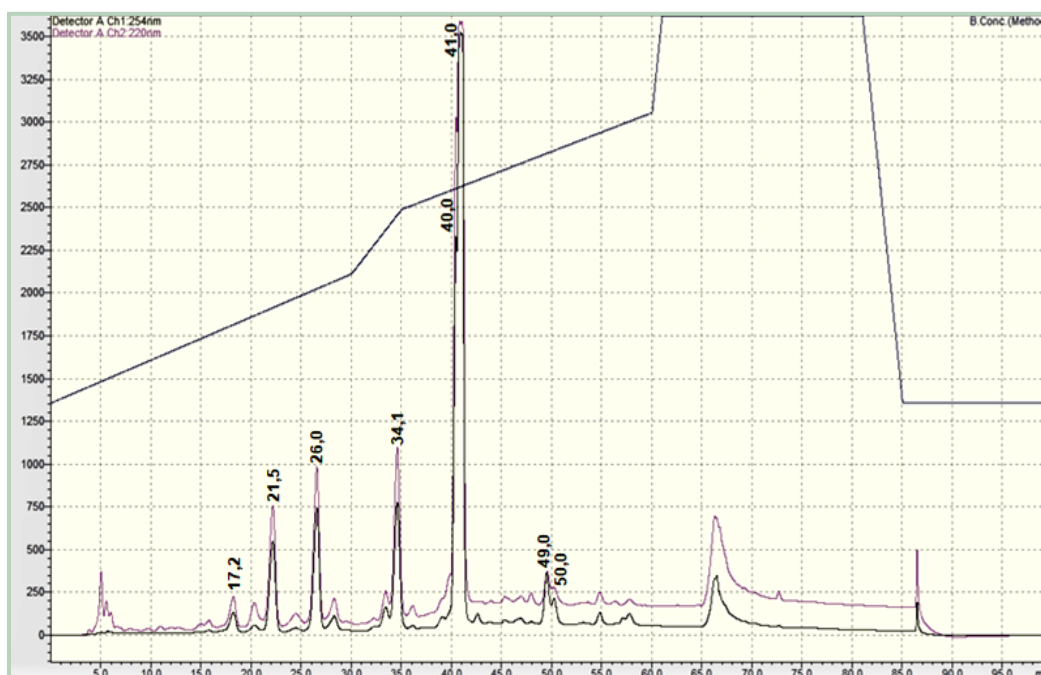
Foram coletadas 10 frações que foram concentradas sob pressão reduzida em evaporador rotativo a uma temperatura de 40 °C. Esse procedimento resultou no isolamento de **Ps-2** (T_R = 32,8 min, 1,6 mg), **Ps-3** (T_R = 38,0 min, 2,0 mg), **Ps-4** (T_R = 53,5 min, 4,0 mg) e **Ps-5** (T_R = 65,8 min, 6,1 mg).

4.1.4.2 Processamento cromatográfico da fração PAH13 por CLAE

A fração PAH13 foi preparada na concentração de 1 mg/mL, filtrada e submetida à CLAE em escala analítica. O método desenvolvido utilizou um sistema gradiente de água (solvente A) e metanol (solvente B), onde a concentração de B variou de 40-100% em um tempo de 65 min (Quadro 5), com fluxo da fase móvel de 0,6 mL/min, volume de injeção de 10 µL e comprimentos de onda utilizados para detecção de 230 e 254 nm. No cromatograma foram observados 7 picos principais (Figura 6).

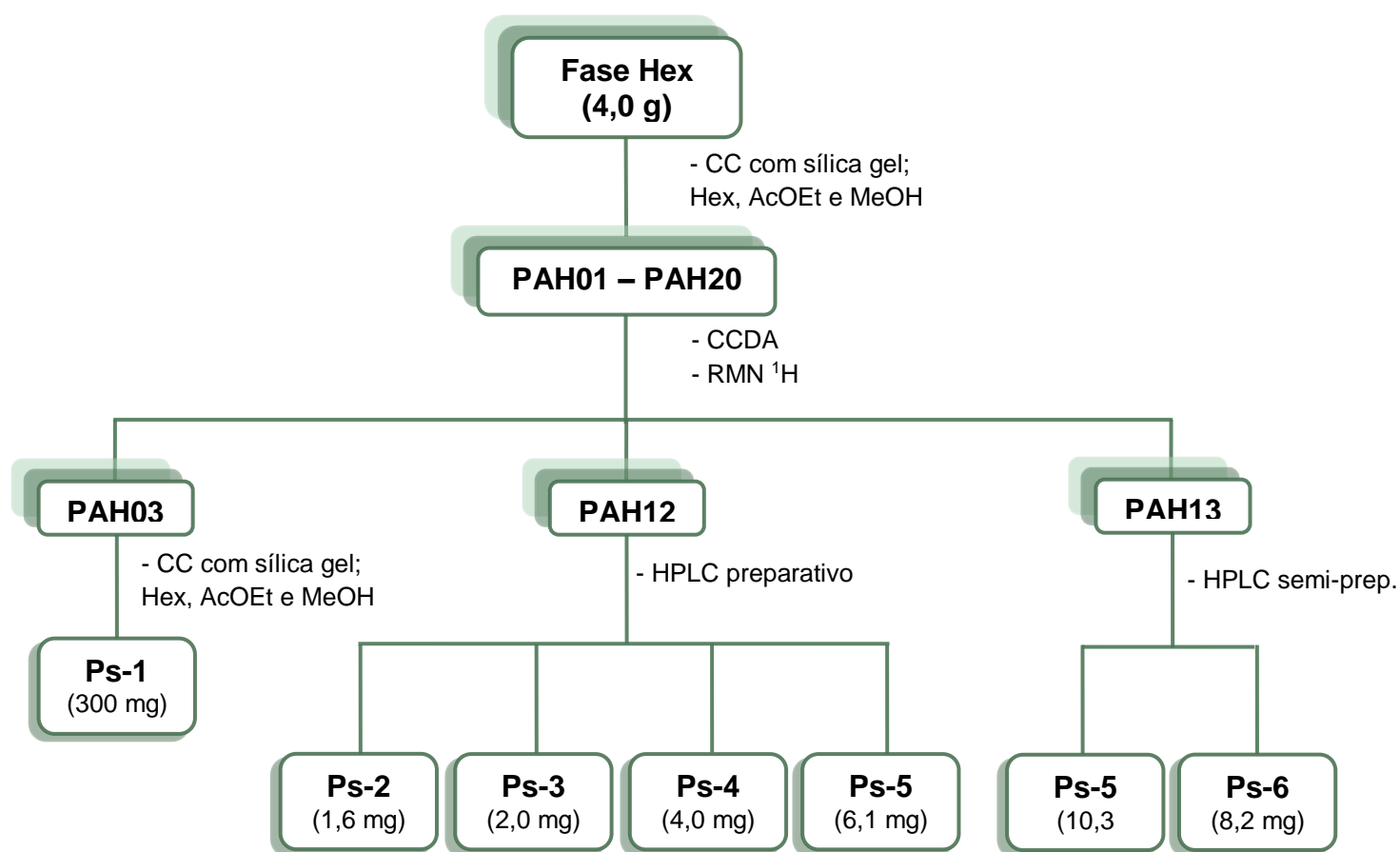
Quadro 5 – Método desenvolvido por CLAE para a fração PAH13.

Tempo de corrida (min)	Concentração de B (%)
0,01	40
30	60
35	70
60	85
65	100
85	100
90	40
105	40

Figura 6 – Cromatograma da fração PAH13.

Ao transpor o método para a escala semi-preparativa, 65 mg da amostra foi solubilizado em 1,625 mL de metanol, centrifugado (12.000 rpm; 20°C; 5 min) e filtrado (filtro de Nylon com poro de 0,45 µm). As condições do gradiente de eluição, tempo de corrida e leitura do detector foram mantidas, alterando-se apenas o fluxo de fase móvel e o volume de injeção para 3,0 mL/min e 100 µL, respectivamente. Foram coletadas 7 frações, que foram concentradas sob pressão reduzida em evaporador rotativo a uma temperatura de 40 °C. Esse procedimento resultou no isolamento de **Ps-6** ($T_R = 40,0$ min, 8,2 mg) e mais quantidade de **Ps-5** ($T_R = 41,0$ min, 10,3 mg). Todas as etapas envolvidas no isolamento dos constituintes químicos da fase hexânica encontram-se resumidas no Esquema 3.

Esquema 3 – Processamento cromatográfico da fase hexânica de *Pilocarpus spicatus*.



4.1.5 Processamento cromatográfico da fase clorofórmica

A fase clorofórmica (5,5 g) foi submetida à CC utilizando como fase estacionária sílica gel e como fase móvel hexano, acetato de etila e metanol, puros ou em misturas binárias obedecendo a uma ordem crescente de polaridade (Quadro 6). Essa coluna resultou na coleta de 25 frações (PAC01-PAC25) de 300-600 mL cada, as quais foram concentradas sob pressão reduzida em evaporador rotativo a 40 °C. Após análise por CCDA e revelação na luz UV, as frações foram reunidas de acordo com a semelhança entre seus fatores de retenção (R_fs) resultando em 12 subfrações (PACA-PACL) renomeadas como demonstrado no Quadro 7.

Quadro 6 – Processamento cromatográfico por CC da fase clorofórmica de *P. spicatus*.

Sistema de eluição	Frações obtidas
Hexano: AcOEt (100:0)-(90:10)	PAC01
Hexano: AcOEt (80:20)	PAC02 – PAC03
Hexano: AcOEt (70:30)	PAC04 – PAC05
Hexano: AcOEt (60:40)	PAC06 – PAC09
Hexano: AcOEt (50:50)	PAC10 – PAC11
Hexano: AcOEt (40:60)	PAC12 – PAC13
Hexano: AcOEt (30:70)	PAC14
Hexano: AcOEt (20:80)	PAC15 – PAC17
Hexano: AcOEt (10:90)	PAC18 – PAC19
AcOEt	PAC20
AcOEt: MeOH (90:10) – (80:10)	PAC21
AcOEt: MeOH (70:30)	PAC22
AcOEt: MeOH (50:50)	PAC23
MeOH	PAC24 – PAC25

Quadro 7 – Reunião das frações após análise por CCDA.

Frações reunidas	Subfração
PAC01 – PAC03	PACA
PAC04	PACB
PAC05 – PAC06	PACC
PAC07 – PAC09	PACD
PAC10 – PAC13	PACE
PAC14 – PAC15	PACF
PAC16 – PAC20	PACG
PAC21	PACH
PAC22	PACI
PAC23	PACJ
PAC24	PACK
PAC25	PACL

O espectro de RMN de ^1H da subfração PACF (240 mg) mostrou que esta se apresentava pura e se tratava de **Ps-3**.

Através das análises de CCDA e RMN de ^1H , cinco subfrações (PACB; PACD; PACE; PACG e PACH) foram selecionadas para serem submetidas à CLAE em sistema analítico para desenvolvimento de método. Analisando os cromatogramas, foi observado que a subfração PACE apresentou o melhor perfil cromatográfico e, portanto, foi escolhida para ser trabalhada em escala semi-preparativa, objetivando separar e isolar seus constituintes químicos.

4.1.5.1 Processamento cromatográfico da subfração PACE por CLAE

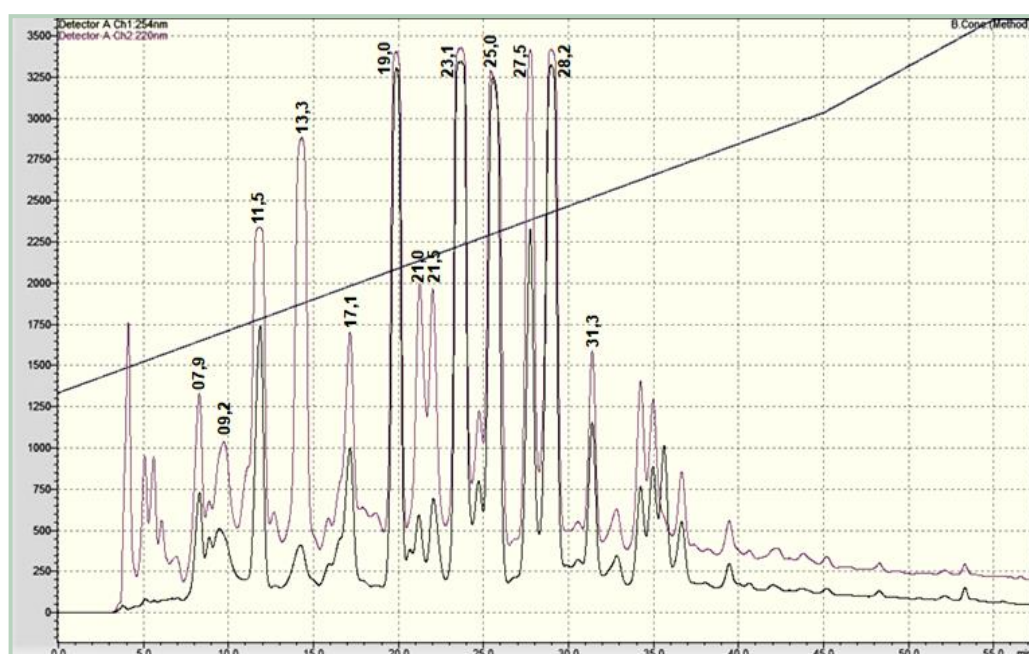
A fração PACE foi preparada em metanol na concentração de 1 mg/mL e filtrada (filtro de Nylon com poro de 0,45 µm). Em seguida, esta foi submetida à CLAE em escala analítica, onde foi desenvolvido um método cromatográfico eficiente para separação dos constituintes químicos presentes nela, o qual utilizou um sistema gradiente de água (solvente A) e metanol (solvente B), com variação da concentração de B de 40-100% em um tempo de 55 min (Quadro 8), com fluxo da fase móvel de 0,6 mL/min, volume de injeção de 10 µL e comprimentos de onda utilizados para detecção de 220 e 254 nm. No cromatograma foram observados 13 picos principais (Figura 10).

Quadro 8 – Método desenvolvido por CLAE para a fração PACE.

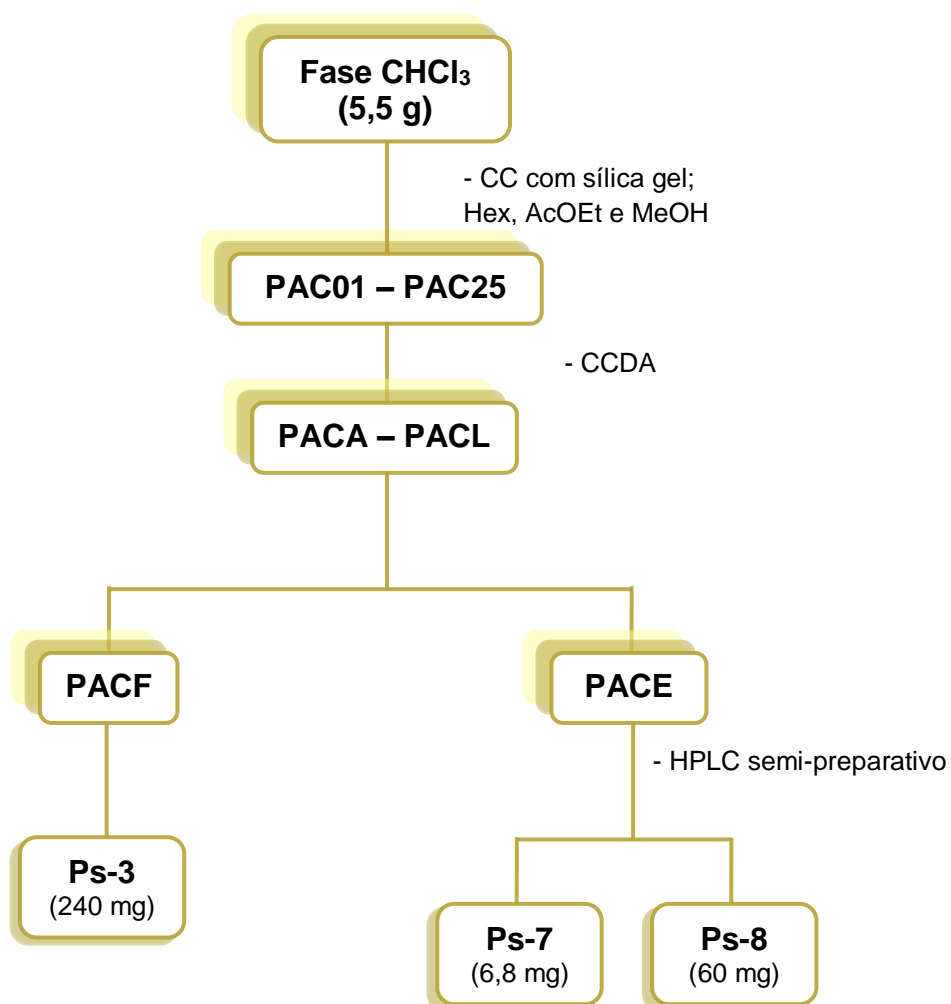
Tempo de corrida (min)	Concentração de B (%)
0,01	40
45	85
55	100
70	100
75	40
90	40

Em seguida, o método foi transposto para a escala semi-preparativa, onde 200 mg da amostra foi solubilizado em 4,0 mL de metanol, centrifugado (12.000 rpm; 20°C; 5 min) e filtrado (filtro de Nylon com poro de 0,45 µm). O sistema de eluição gradiente, tempo de corrida, e comprimentos de onda de detecção foram mantidos, alterando-se apenas o fluxo de fase móvel para 3,0 mL/min e o volume de injeção para 100 µL. Foram coletadas 13 frações, as quais foram concentradas sob pressão reduzida em evaporador rotativo a 40 °C. Esse procedimento resultou no isolamento de **Ps-7** (T_R = 11,5 min, 6,8 mg) e **Ps-8** (T_R = 27,5 min, 60,0 mg). Todas as etapas envolvidas no isolamento dos constituintes químicos da fase clorofórmica encontram-se resumidas no Esquema 4.

Figura 7 – Cromatograma da fração PACE.



Esquema 4 – Processamento cromatográfico da fase clorofórmica de *Pilocarpus spicatus*.



4.1.6 Caracterização estrutural das substâncias isoladas

A identificação estrutural dos constituintes químicos isolados foi realizada através da análise dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C , utilizando técnicas unidimensionais e bidimensionais como: HMBC (do inglês, *Heteronuclear Multiple Bond Correlation*), HSQC (*Heteronuclear Single Quantum Correlation*), COSY (*Correlation Spectroscopy*) e NOESY (*Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy*).

As amostras foram preparadas nos solventes deuterados clorofórmio (CDCl_3), metanol (CD_3OD) e dimetil sulfóxido ($\text{DMSO}-d_6$).

Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em partes por milhão (ppm) e as constantes de acoplamento (J) em Hz. Foram utilizados os sinais característicos de cada solvente como padrões internos, sendo estes: δ_{H} 7,24 ppm e δ_{C} 77,0 ppm (CDCl_3); δ_{H} 3,30 ppm e δ_{C} 49,0 ppm (CD_3OD); δ_{H} 2,50 ppm e δ_{C} 39,50 ppm ($\text{DMSO}-d_6$).

As multiplicidades no espectro de RMN ^1H foram indicadas segundo as convenções: s (simpleto), sl (simpleto largo), d (duplete), dd (duplo duplete), ddd (duplo duplo duplete), dq (duplo quarteto), t (triplete), q (quadruplete), sept. (septeto) e m (multiplete).

Os espectros de RMN de ^{13}C obtidos pela técnica APT (do inglês, *Attached Proton Test*) tiveram como convenção a seguinte distribuição dos sinais em ambas as fases do espectro: os sinais de carbonos não hidrogenados (C) e metilênicos (CH_2) acima da linha base e sinais de carbonos metínicos (CH) e metílicos (CH_3) abaixo da linha base.

Os espectros de massas das substâncias foram feitos a partir da diluição das amostras em metanol grau HPLC. As amostras foram analisadas utilizando a técnica de ionização por eletrospray (ESI) no modo positivo.

4.2 Avaliação da atividade moduladora da resistência a drogas em *Staphylococcus aureus*

4.2.1 Local da pesquisa

O estudo para avaliação da atividade moduladora da resistência bacteriana a drogas foi realizado no Laboratório de Genética de Microrganismos (LGM) do Departamento de Biologia Molecular (DBM) localizado no Centro de Ciências Exatas e da Natureza (CCEN) da UFPB.

4.2.2 Microrganismos

Para avaliar a atividade moduladora da resistência a drogas foi utilizada a linhagem de *Staphylococcus aureus* SA1199-B fornecida pelo Dr. Simon Gibbons (University of London), a qual superexpressa o gene *norA* que codifica a proteína de efluxo *norA* responsável pelo efluxo de fluoroquinolonas hidrofílicas, como norfloxacino e compostos de outra natureza, como o corante brometo de etídio (KAATZ e SEO, 1995; GIBBONS, 2004).

A linhagem foi mantida em agar nutriente (*Blood Agar Base*, HiMedia®) inclinado. Antes dos testes, as células foram inoculadas em caldo nutriente (*Brain Heart Infusion*, HiMedia®) para crescimento por 18-24 h a 37 °C.

4.2.3 Substâncias testadas

As cumarinas isoladas, heraclenol (**Ps-3**) e isosaxalina (**Ps-5**), foram individualmente solubilizadas em DMSO:H₂O (4:1) antes de serem submetidas aos testes.

4.2.4 Avaliação da atividade moduladora da resistência a drogas

Para avaliação da atividade das cumarinas isoladas como agentes inibidores da bomba de efluxo de cepas de *S. aureus* resistentes a antibióticos sintéticos, foi necessário determinar a concentração inibitória mínima (CIM) do antibiótico ou biocida testado na presença e na ausência das substâncias avaliadas.

Para esse teste, foram utilizados o antibiótico sintético norfloxacino e o brometo de etídio (Sigma-Aldrich®). A CIM destes foram determinadas em caldo nutritivo (BHI) através da técnica de microdiluição, usando uma suspensão de $ca 10^5$ UFC/mL com concentrações do antibiótico e do brometo de etídio variando de 512 a 8 µg/mL (diluição seriada 1/2). Quando na presença das cumarinas, a concentração destas foi de 1/4 de sua CIM para evitar interferência direta na atividade antibacteriana.

A CIM de cada antibiótico ou biocida foi definida como a menor concentração deste capaz de inibir completamente o crescimento bacteriano após 24h de incubação a 37 °C, através da visualização da presença/ausência de crescimento bacteriano com o uso da solução de resazurina 0,01% (Sigma-Aldrich®), um indicador de crescimento bacteriano. O crescimento bacteriano é indicado pela mudança de coloração de azul para rosa resultante da reação de redução da resazurina em resorufina. Dessa forma, na ausência de crescimento permanece a coloração azul (O'BRIEN *et al.*, 2000).

05 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Identificação estrutural de Ps-1

A substância codificada como **Ps-1** foi obtida como um cristal incolor, pesando 300,0 mg. O espectro de massas de alta resolução obtido por ESI-MS no modo positivo (Figura 9), mostrou o pico da molécula protonada em m/z 197,0812 $[M+H]^+$ compatível com a fórmula molecular $C_{10}H_{12}O_4$ (calc. 196,2020).

O espectro de RMN de 1H , obtido a 500 MHz em $CDCl_3$ (Figura 10) apresentou um par de dupletos em δ_H 6,03 (1H, d, $J = 2,4$ Hz) e δ_H 5,89 (1H, d, $J = 2,4$ Hz) característicos de hidrogênios aromáticos acoplado entre si em posição meta (Figura 11). Essa informação juntamente com a ausência de outros sinais nessa região sugeriu a presença de um anel aromático tetrasubstituído.

Este espectro também mostrou um sinal em δ_H 13,99 (1H, s) característico de hidroxila quelada, bem como um sinal em δ_H 2,58 (3H, s) que foi atribuído à metila de acetofenona sofrendo desproteção por efeito anisotrópico da carbonila. Para possibilitar a formação de ponte de hidrogênio entre a hidroxila e a cetona aromática, tais grupos deveriam estar em posição orto entre si. Além disso, também foi observado dois sinais em δ_H 3,79 (3H,s) e em δ_H 3,82 (3H,s) referentes a duas metoxilas (Figura 12) inseridas em C-4 e C-6, respectivamente, completando as quatro substituições do anel aromático.

O espectro de RMN de ^{13}C -BB (125 MHz, $CDCl_3$) (Figura 13) apresentou nove sinais que foram atribuídos a dez carbonos, sendo estes cinco para carbonos não hidrogenados, dos quais três são oxigenados e um é carbonílico, dois para carbonos metínicos do tipo sp^2 e três para carbonos metílicos.

O sinal mais para a esquerda do espectro em δ_C 203,1 (Figura 13) foi atribuído à carbonila de cetona, que retira densidade eletrônica por efeito indutivo do átomo de oxigênio eletronegativo e por efeito da hibridização do tipo sp^2 , causando desproteção desse carbono, uma vez que os elétrons são responsáveis pela blindagem do núcleo atômico contra o campo magnético aplicado (PAVIA *et al.*, 2015). A presença de duas metoxilas na estrutura foi confirmada pelo sinal intenso em δ_C 55,5.

Os sinais para carbonos metínicos aromáticos observados no experimento de DEPT-135 (Figura 14), em δ_C 90,7 e δ_C 93,5 foram atribuídos, respectivamente, a C-5 e C-3, ambos sofrendo efeito de proteção por possuírem

dois grupos doadores de elétrons em posições orto a eles. Contudo, o sinal mais protegido foi atribuído a C-5 que se encontra orto a duas $-\text{OCH}_3$, que doam densidade eletrônica mais fortemente do que a $-\text{OH}$. O sinal em δ_c 106,0 foi atribuído ao carbono não hydrogenado C-1, que apesar de estar orto a dois grupos doadores sofre efeito mais acentuado de desproteção por estar diretamente ligado ao grupo carbonila retirador de elétrons (PAVIA *et al.*, 2015). A metila em δ_c 32,9 também se encontra desblindada pelo mesmo motivo.

Os sinais em δ_c 162,9, δ_c 166,0 e δ_c 167,5 (Figura 15) desprotegidos por estarem ligados a um átomo de oxigênio eletronegativo foram atribuídos, respectivamente a C-2, C-4 e C-6. Todos os dados de RMN de ^1H e ^{13}C estão compilados na Tabela 1.

Após comparação dos dados obtidos com os dados da literatura foi possível identificar **Ps-1** como 2-hidroxi-4,6-dimetoxiacetofenona ou xantoxilina (Figura 8) (SUN, 2015), relatada pela primeira vez no gênero *Pilocarpus*, mas já encontrada em outros gêneros da família Rutaceae, como *Phebalium* (RASHID, GRAY e WATERMAN, 1992), *Zanthoxylum* (JANG *et al.*, 2020), *Acradenia* (QUADER *et al.*, 1991), *Euodia* (VALENCIENNES, SMADJA e CONAN, 1999) e *Geijera* (SADGROVE, GONÇALVES-MARTINS e JONES, 2014).

Estudos reportados para xantoxilina demonstraram sua atividade antiespasmódica (CALIXTO *et al.*, 1990), antinociceptiva, antiedematogênica (CECHINEL-FILHO *et al.*, 1996), antifúngica (SIMONSEN *et al.*, 2004), inseticida (CHERMENSKAYA *et al.*, 2012) e melanogênica (MOLEEPHAN *et al.*, 2012).

Figura 8 – Estrutura química de Ps-1 (xantoxilina).

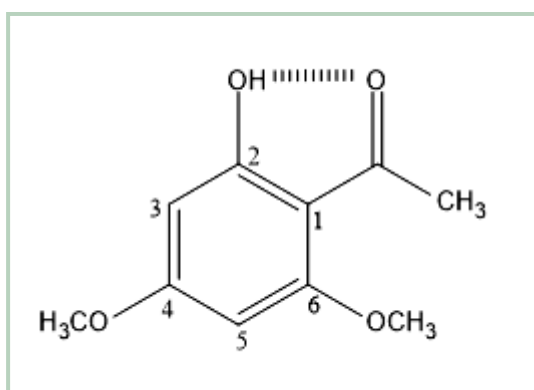


Tabela 1 – Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de Ps-1 comparados com dados da literatura para a xantoxilina^d.

Posição	Ps-1 ^a		Xantoxilina ^{b,d}	
	δ_{C}	$\delta_{\text{H}}^{\text{c}}$	δ_{C}	$\delta_{\text{H}}^{\text{c}}$
1	106,0	-	106,1	-
2	162,9	-	162,8	-
3	93,5	5,89 (d; 2,4)	93,6	5,91 (d; 2,6)
4	166,0	-	167,4	-
5	90,7	6,03 (d; 2,4)	90,8	6,04 (d; 2,7)
6	167,5	-	166,0	-
1-COCH ₃	203,1	-	203,2	-
1-COCH ₃	32,9	2,58 (s)	32,7	2,61 (s)
4-OCH ₃	55,5	3,79 (s)	55,4	3,82 (s)
6-OCH ₃	55,5	3,82 (s)	55,4	4,03 (s)
2-OH	-	13,99 (s)	-	14,08 (s)

^a500 e 125 MHz, CDCl₃; ^b400 e 100 MHz, CDCl₃; ^cEm parêntesis: multiplicidade e *J* em Hz; ^dSun, 2015.

Figura 9 – Espectro de HR-ESI-MS de Ps-1.

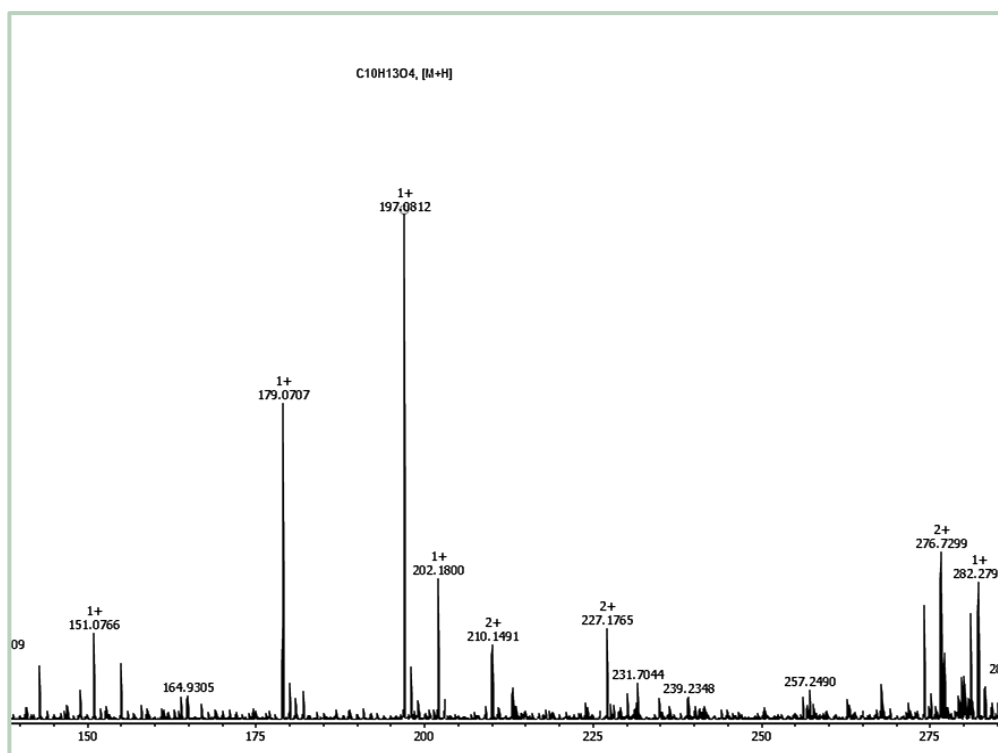


Figura 10 – Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) de Ps-1.

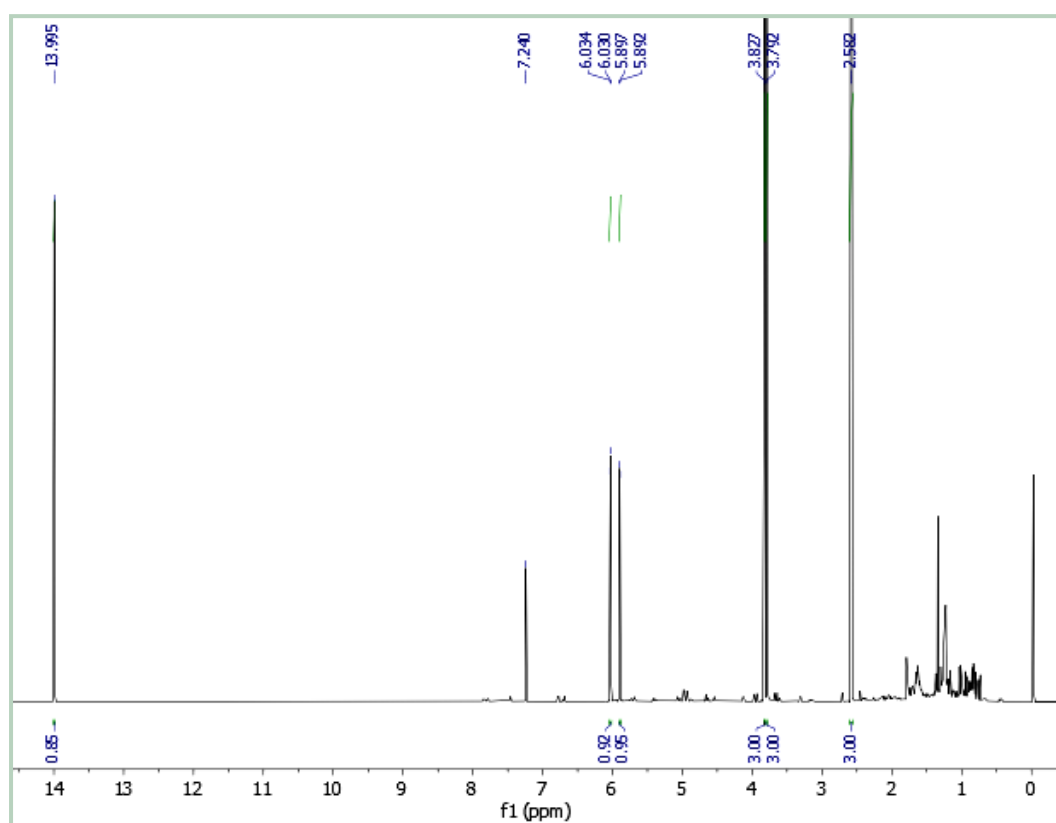


Figura 11 – Expansão do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) de Ps-1 na região de 5,85 – 6,06 ppm.

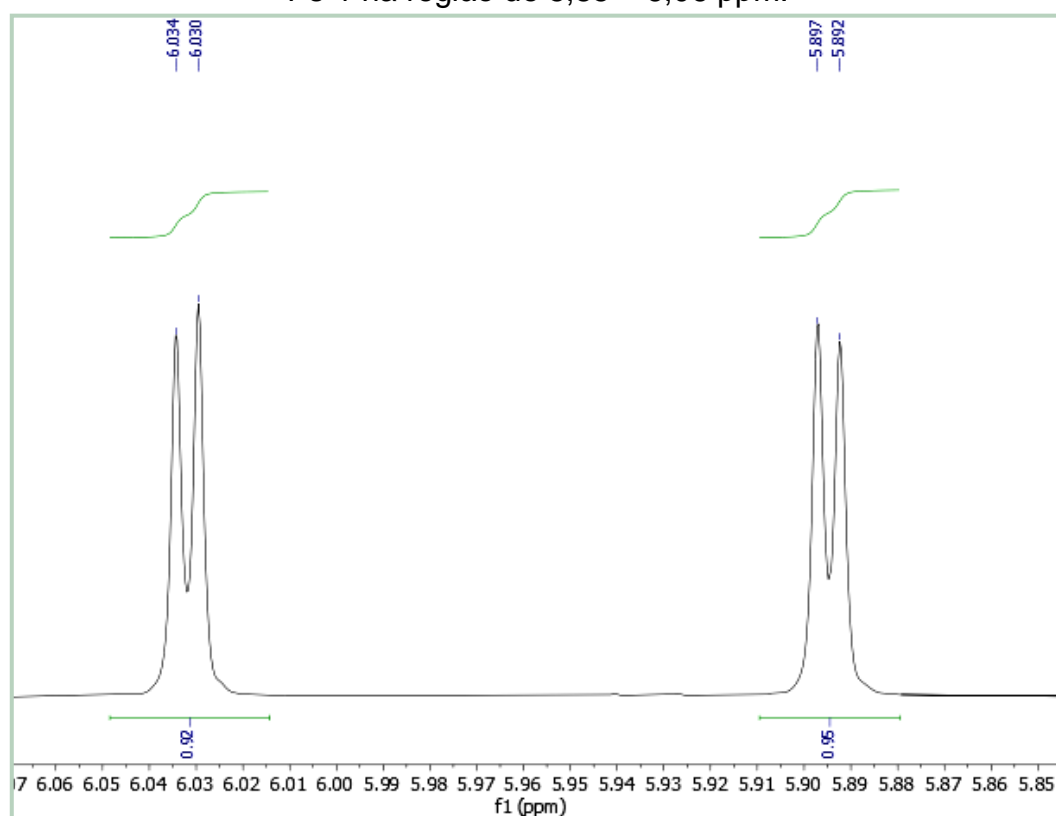


Figura 12 – Expansão do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) de Ps-1 na região de 3,67 – 4,01 ppm.

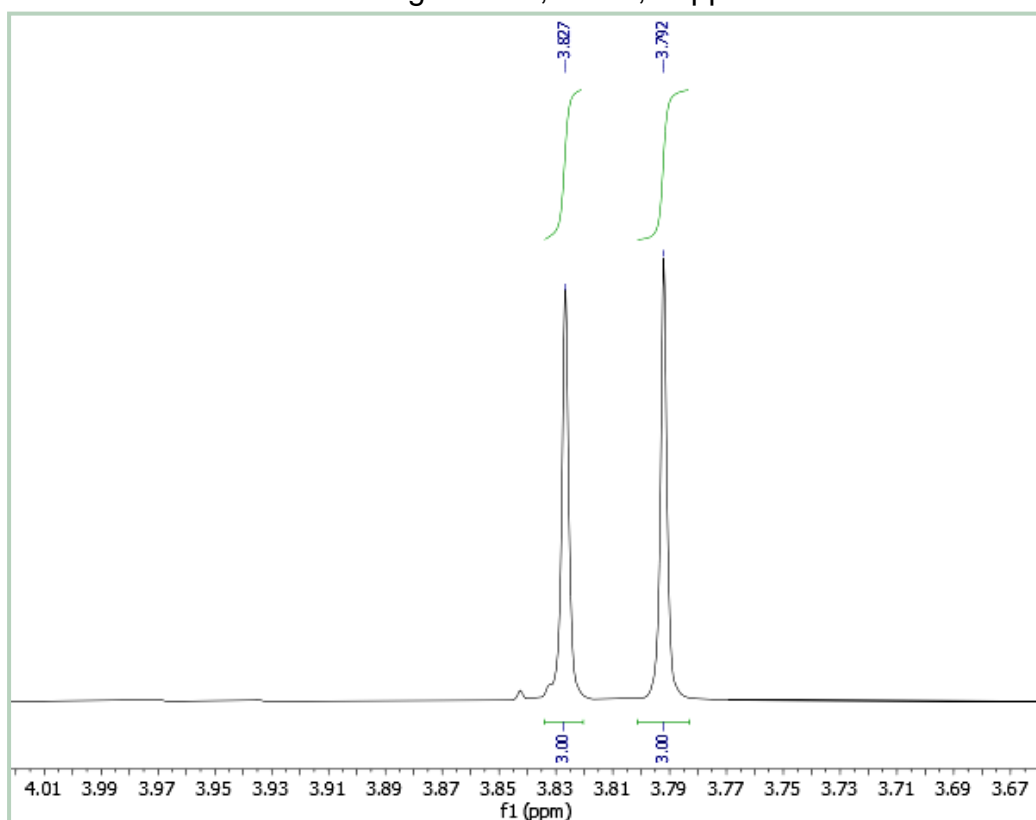


Figura 13 – Espectro de RMN de ^{13}C -BB (125 MHz, CDCl_3) de Ps-1.

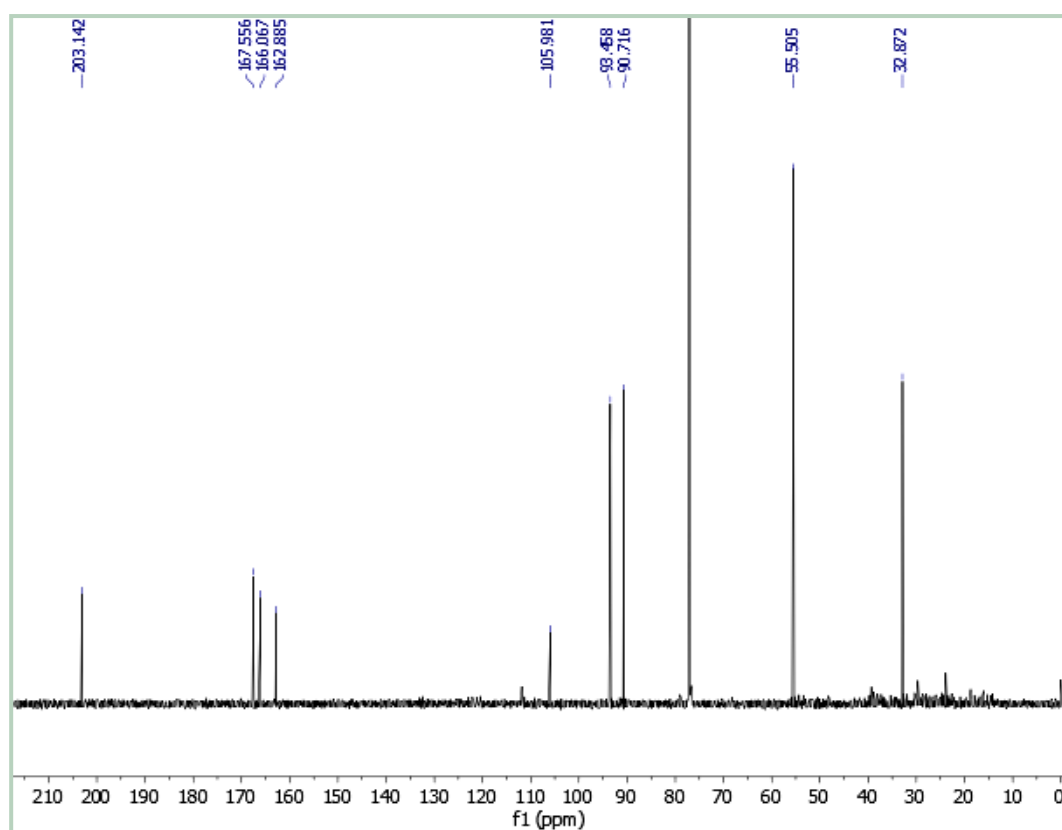


Figura 14 – Espectro de RMN de ^{13}C -DEPT 135 (125 MHz, CDCl_3) de Ps-1.

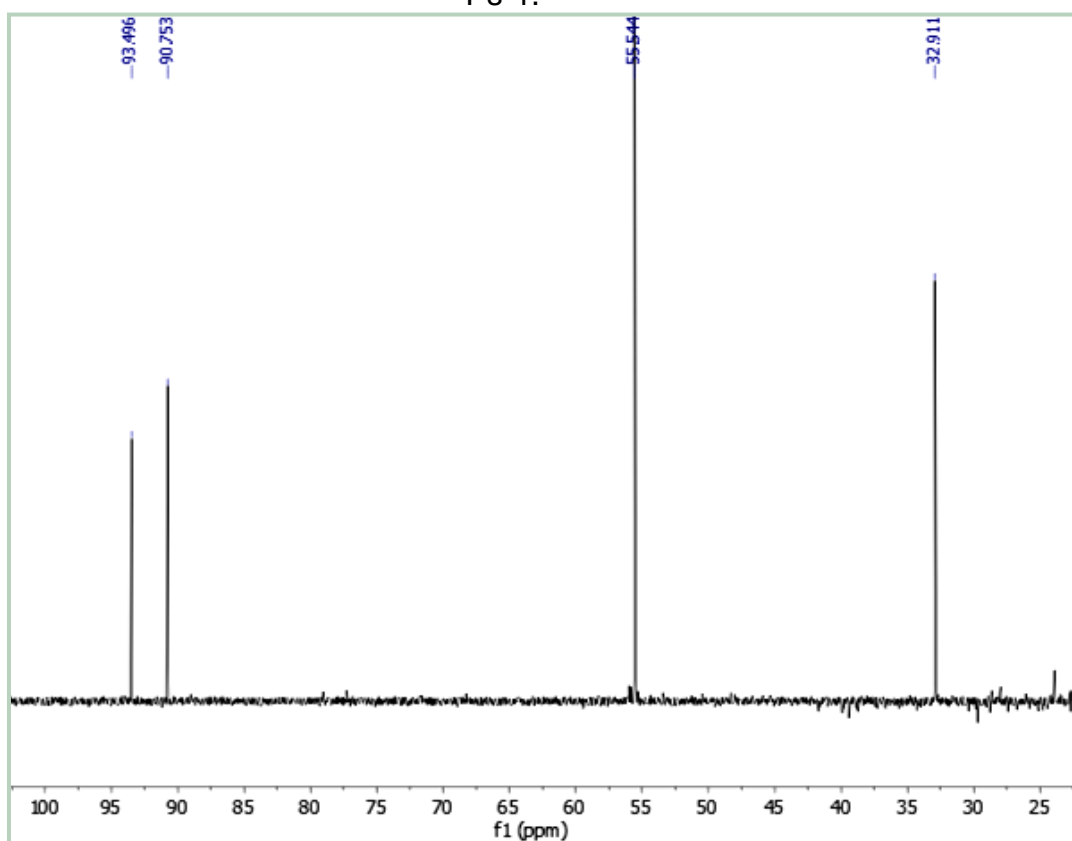
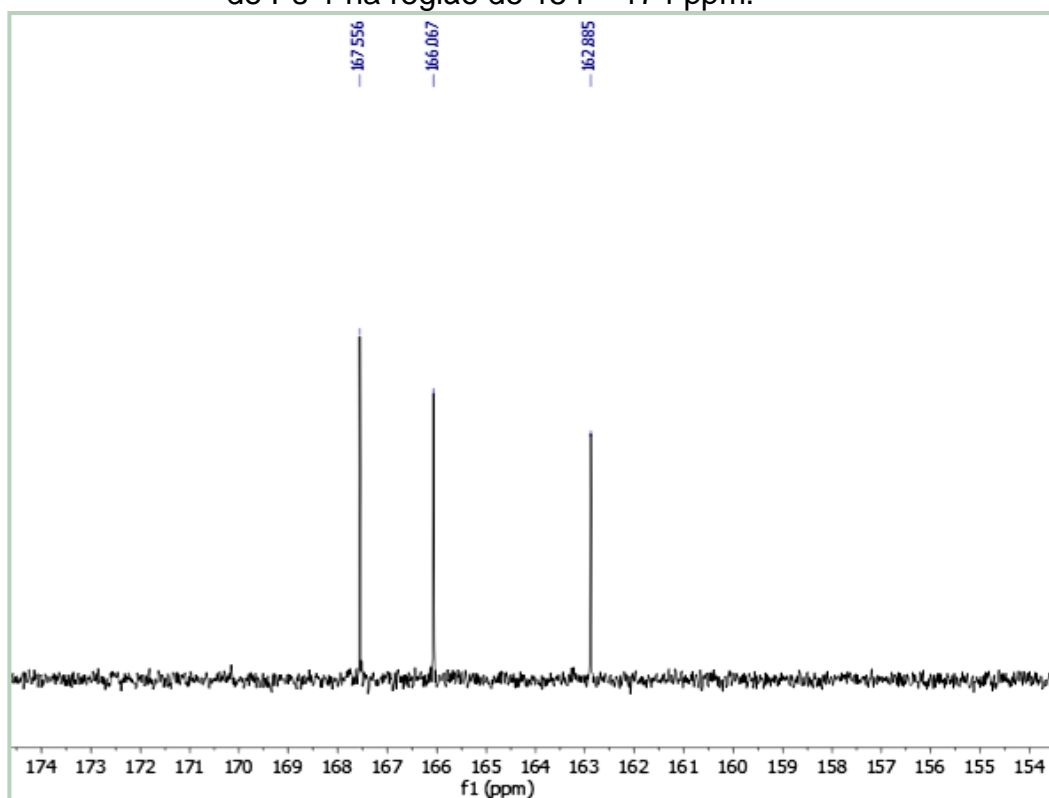


Figura 15 – Expansão do espectro de RMN de ^{13}C -BB (125 MHz, CDCl_3) de Ps-1 na região de 154 – 174 ppm.



5.2 Identificação estrutural de Ps-2

A substância codificada como **Ps-2** foi obtida como um cristal incolor, pesando 1,6 mg. O espectro de massas de alta resolução obtido por ESI-MS no modo positivo (Figura 17), mostrou o pico da molécula protonada em m/z 203,0339 $[M+H]^+$ compatível com a fórmula molecular $C_{11}H_6O_4$ (calc. 202,1650).

O espectro de RMN de 1H , obtido a 500 MHz em $DMSO-d_6$ (Figura 18) apresentou um par de dupletos em δ_H 6,38 (1H, d, $J = 9,6$ Hz) e δ_H 8,10 (1H, d, $J = 9,6$ Hz) característicos de hidrogênios olefínicos de esqueleto benzopirânico de cumarina, atribuídos a H-3 e H-4, respectivamente, sendo este último mais desprotegido devido a deslocalização de elétrons promovida pela carbonila do anel lactona. O deslocamento químico acima de δ_H 8,00 ppm atribuído a H-4 sugere substituição na posição C-5, uma vez que na ausência de substituição esse valor se encontra em torno de δ_H 7,80 ppm quando se compara com os dados de RMN de 1H do psoraleno (CHUNYAN *et al.*, 2009).

Também foi possível observar dois dupletos em δ_H 8,05 (1H, d, $J = 2,4$ Hz) e em δ_H 7,02 (1H, d, $J = 2,4$ Hz) com constante de acoplamento característica de anel furânico, os quais foram atribuídos a H-2' e H-3', respectivamente (Figuras 19 e 20). O valor de $^3J_{HH} = 2,4$ Hz foi fundamental para determinar se a cumarina é do tipo furânica ou simples. A medida da constante de acoplamento entre duas ligações C-H adjacentes é determinada pelo ângulo diedro α entre essas duas ligações e varia com o tamanho do anel em sistemas cíclicos e com a eletronegatividade do heteroátomo ali presente. Dessa forma, o valor médio de $^3J_{HH}$ esperado para hidrogênios olefínicos de um anel furânico é $J = 1,6-2,0$ Hz (PAVIA *et al.*, 2015).

Neste mesmo espectro foi observado um simpleto em δ_H 7,40 (1H, s) atribuído a H-8. A ausência de outros sinais sugeriu a atribuição do simpleto largo em δ_H 3,17 (1H, sl) a um grupo hidroxila inserido em C-5 (Figura 21). Após comparação dos dados espectrais de massas e de RMN de 1H obtidos com os dados da literatura, foi possível identificar **Ps-2** como a furanocumarina 5-hidroxipsoraleno ou bergaptol (Figura 16) (BITTERLING *et al.*, 2022), relatada pela primeira vez no gênero *Pilocarpus*.

Esse composto é bastante comum em espécies de *Citrus* (MATSUNO, 1956). Estudos anteriores relataram que bergaptol possui atividade inibitória do

complexo enzimático da citocromo P₄₅₀ melhorando a biodisponibilidade de drogas, ação antioxidante (GIRENNAVAR *et al.*, 2007), potencial antiproliferativo contra células HeLa e HepG2 (BAI *et al.*, 2016), antiaterosclerose por captação de colesterol e inibição de fatores inflamatórios (SHEN *et al.*, 2020) e ação fotoprotetora (BITTERLING *et al.*, 2022).

Figura 16 – Estrutura química de Ps-2 (bergaptol).

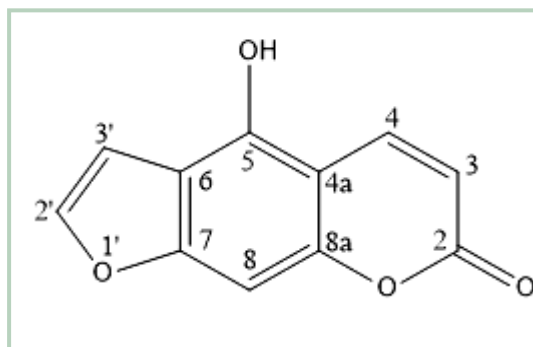


Figura 17 – Espectro de HR-ESI-MS de Ps-2.

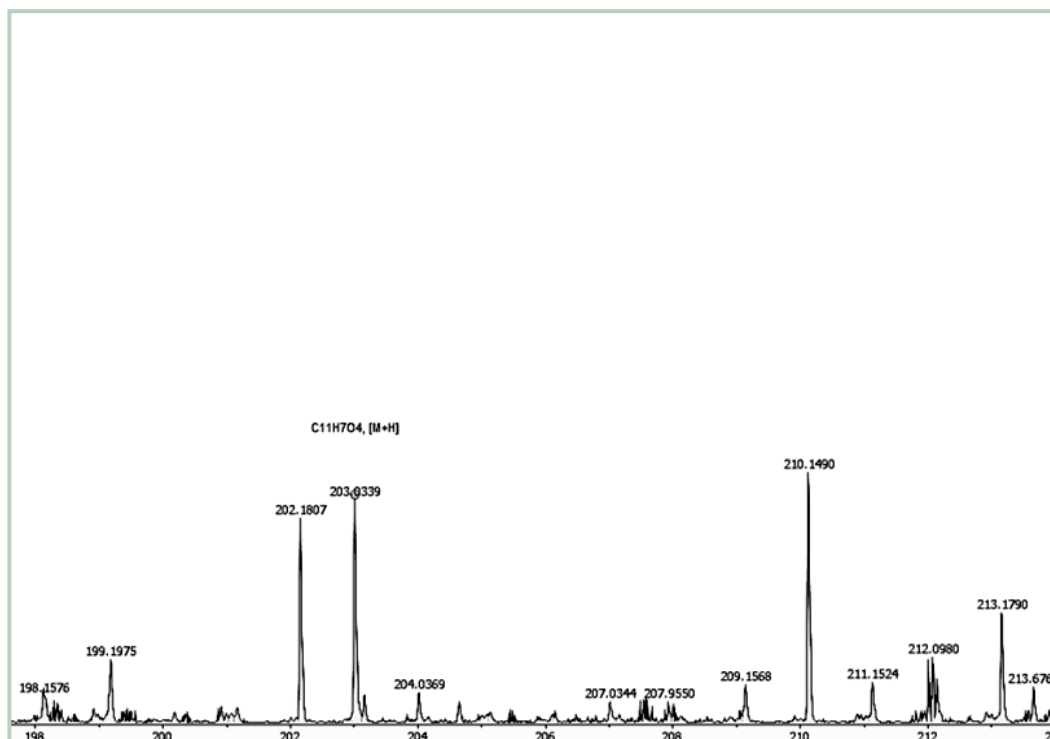


Tabela 2 – Dados de RMN de ^1H de Ps-2 comparados com dados da literatura para bergaptol^d.

	Ps-2 ^a	Bergaptol ^{b,d}
Posição	$\delta_{\text{H}}^{\text{c}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{c}}$
2	-	-
3	6,38 (d; 9,6)	6,24 (d; 9,7)
4	8,10 (d; 9,6)	8,24 (d; 9,7)
4a	-	-
5	-	-
6	-	-
7	-	-
8	7,40 (s)	7,14 (s)
8a	-	-
2'	8,05 (d; 2,4)	7,90 (d; 2,3)
3'	7,02 (d; 2,4)	7,18 (d; 2,3)
5-OH	3,17 (sl)	-

^a500 (^1H) MHz, DMSO- d_6 ; ^b600 (^1H) MHz, DMSO- d_6 ; ^cEm parêntesis: multiplicidade e J em Hz; ^dBitterling *et al.*, 2022.

Figura 18 – Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) de Ps-2.

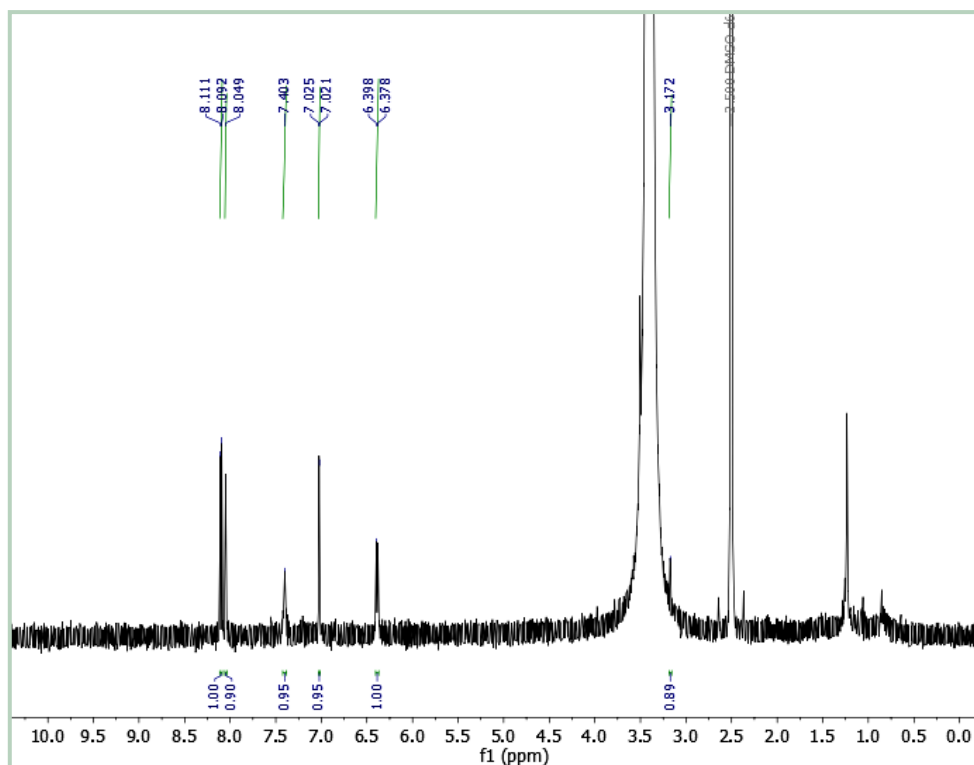


Figura 19 – Expansão do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) de Ps-2 na região de 8,01 – 8,13 ppm.

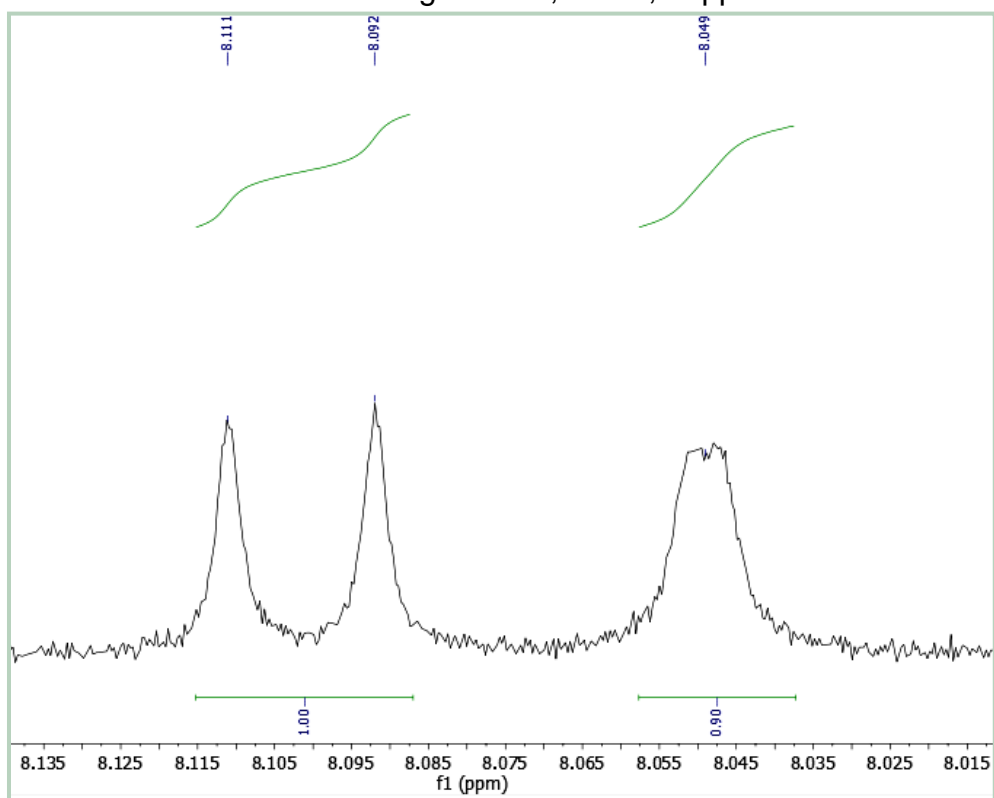


Figura 20 – Expansão do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) de Ps-2 na região de 6,30 – 7,50 ppm.

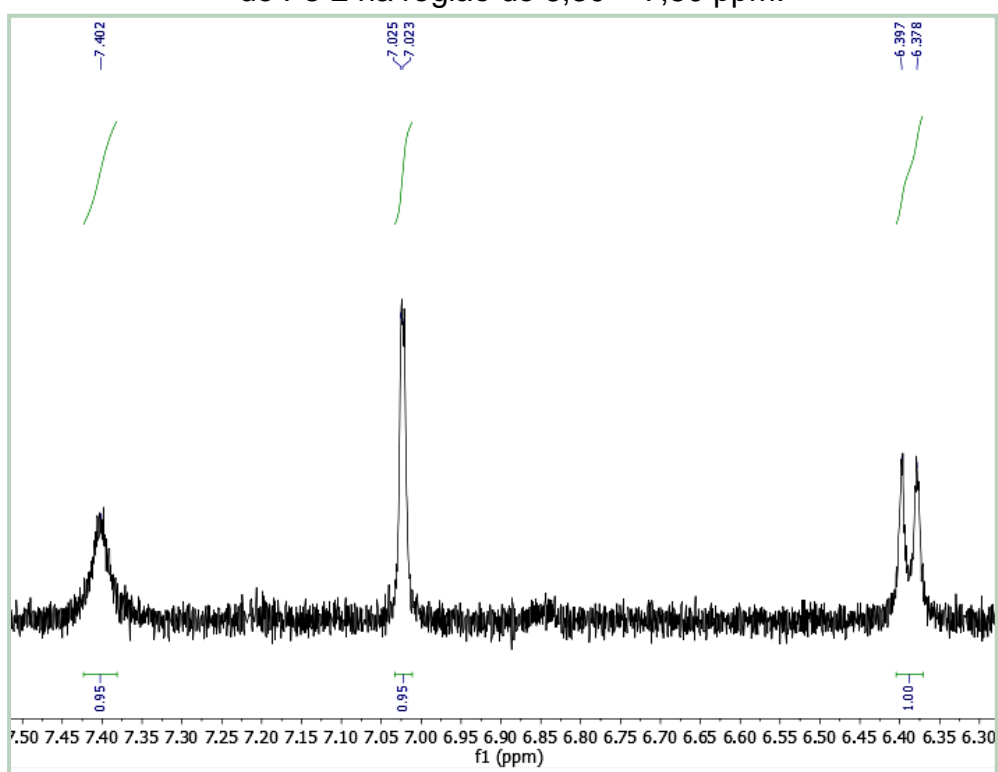
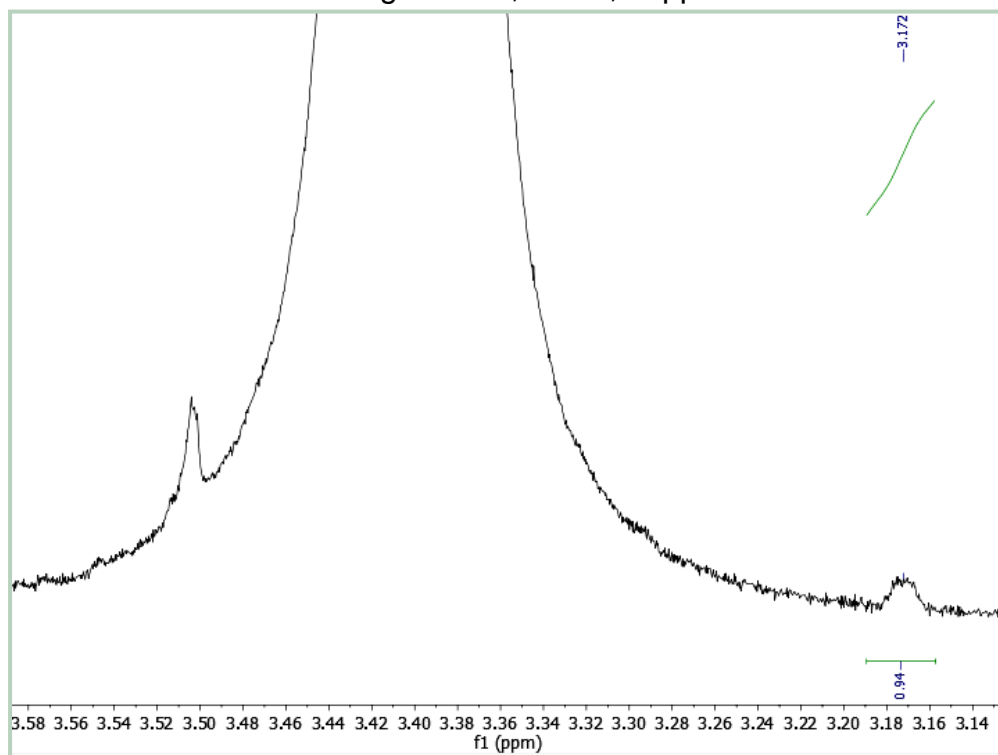


Figura 21 – Expansão do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) de Ps-2 na região de 3,14 – 3,58 ppm.

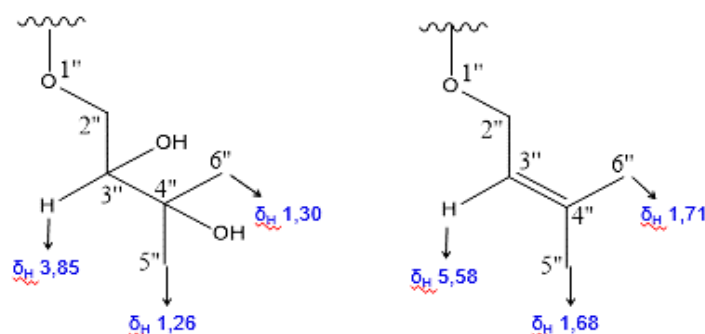


5.3 Identificação estrutural de Ps-3

A substância codificada como **Ps-3** foi obtida como um sólido amorfo amarelo, pesando no total 242,0 mg. O espectro de massas de alta resolução obtido por ESI-MS no modo positivo (Figura 23), mostrou o pico da molécula cationizada em m/z 327,0836 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ compatível com a fórmula molecular $\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{O}_6$ (calc. 304,2980).

O espectro de RMN de ^1H , obtido a 500 MHz em CDCl_3 (Figura 24) apresentou sinais característicos de anel δ -lactônico α,β insaturado de esqueleto cumarínico, sendo estes δ_{H} 6,32 (1H, d, $J = 9,6$ Hz) e δ_{H} 7,73 (1H, d, $J = 9,6$ Hz) atribuídos a H-3 e H-4, respectivamente. Também foi possível observar a presença de dois dupletos acoplando entre si com $J = 2,3$ Hz característico de anel furano, um em δ_{H} 7,66 (1H, d, $J = 2,3$ Hz) e o outro em δ_{H} 6,79 (1H, d, $J = 2,3$ Hz) atribuídos a H-2' e H-3', respectivamente. Além disso, o espectro apresentou um simpleto em δ_{H} 7,35 (1H, s) que foi atribuído a H-5 (Figuras 25 e 26). Isso foi sugerido pelo deslocamento químico de H-4, uma vez que quando ocorre substituição na posição C-5, este hidrogênio encontra-se desprotegido com deslocamento $\delta_{\text{H}} > 8,00$ ppm (SANDOVAL-MONTEMAYOR *et al.*, 2012).

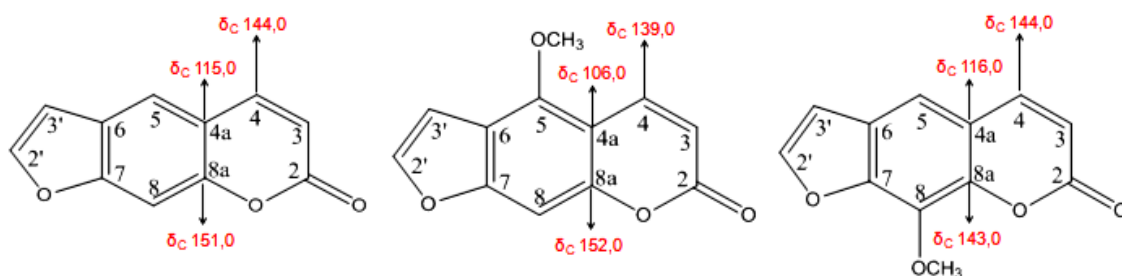
Neste mesmo espectro, foi observada a presença de sinais em δ_H 4,38 (1H, dd, $J = 10,2$ e $7,8$ Hz) e δ_H 4,72 (1H, dd, $J = 10,2$ e $2,6$ Hz), atribuídos a Ha-2'' e Hb-2'', em δ_H 3,85 (1H, dd, $J = 7,8$ e $2,6$ Hz) referente a H-3'' (Figura 27), além de dois singletos em δ_H 1,26 (3H, s) e δ_H 1,30 (3H, s), atribuídos aos hidrogênios H-5'' e H-6'' das metilas vizinhas à oxigenação. Esse conjunto de sinais sugeriu a presença de um grupo O-prenil modificado localizado em C-8, diferindo dos deslocamentos químicos apresentados para imperatorina, onde H-3'' aparece em δ_H 5,58 ppm e as metilas em δ_H 1,68 e δ_H 1,71 por efeito de desproteção da ligação dupla, como demonstrado abaixo (MADEIRO, 2016b).



O espectro de RMN de ^{13}C -BB (125 MHz, CDCl_3) apresentou dezesseis sinais correspondentes a sete carbonos não hidrogenados, seis a carbonos metínicos, um a carbono metilênico e dois a carbonos metílicos (Figura 28).

Os sinais em δ_C 146,8 e em δ_C 106,8 confirmaram a presença de um anel furânico, sendo atribuídos a C-2' e C-3', respectivamente (MACIAS *et al.*, 1990).

A substituição em C-8 foi confirmada pelos valores de deslocamento químico de C-4, C-4a e C-8a em δ_C 144,4, δ_C 116,4 e δ_C 143,1. De acordo com a literatura, quando o substituinte está inserido em C-5 os carbonos C-4 e C-4a sofrem efeito de proteção, aparecendo em torno de δ_C 139,0 e δ_C 106,0, respectivamente. Por outro lado, quando a substituição ocorre em C-8 o efeito de proteção é evidenciado em C-8a, que passa a apresentar deslocamento químico em torno de δ_C 143,0 ao invés de δ_C 152,0 ppm como demonstrado abaixo (MACIAS *et al.*, 1990).



Na região de carbonos alifáticos oxigenados (Figura 29), foram observados os sinais em δ_c 75,5, δ_c 76,1 e δ_c 71,5 que foram atribuídos aos carbonos do grupo prenil modificado C-2'', C-3'' e C-4'', respectivamente.

Os sinais mais protegidos do espectro em δ_c 25,0 e δ_c 26,5 foram atribuídos às metilas C-5'' e C-6''. As demais atribuições para o esqueleto furanocumarínico estão apresentadas na Tabela 3.

A partir da comparação dos dados espectrais obtidos de massas e de RMN de ^1H e ^{13}C com dados da literatura, foi possível identificar **Ps-3** como a furanocumarina prenilada heraclenol (Figura 22) (GUI *et al.*, 2020), relatada pela primeira vez em *Pilocarpus*, mas já reportada em outros gêneros de Rutaceae como *Phebalium* (GIRARD *et al.*, 2005), *Esenbeckia* (CARVALHO, PIRANI e FERREIRA, 2021), *Amyris* (BADAWI *et al.*, 1980) e *Ruta* (KABOUCHE *et al.*, 2003).

Estudos *in vitro* com heraclenol relataram sua atividade anti-HIV (ZHOU *et al.*, 2000), inibitória da biossíntese de melanina (BAEK *et al.*, 2003), antibacteriana contra *Pseudomonas aeruginosa* e *Bacillus cereus* (SOUZA, 2005), e inibitória da anidrase carbônica IX associada a tumor (FOIS *et al.*, 2020).

Figura 22 – Estrutura química de Ps-3 (heraclenol).

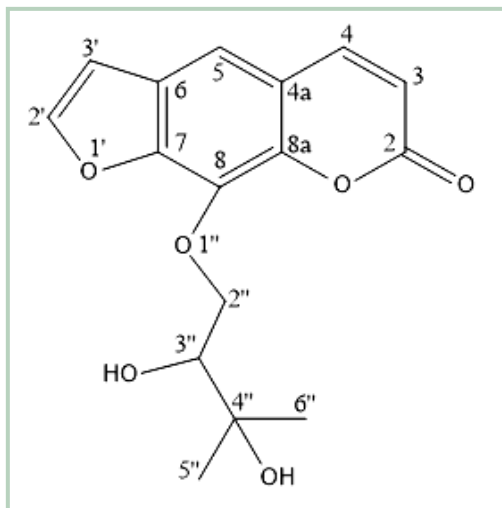
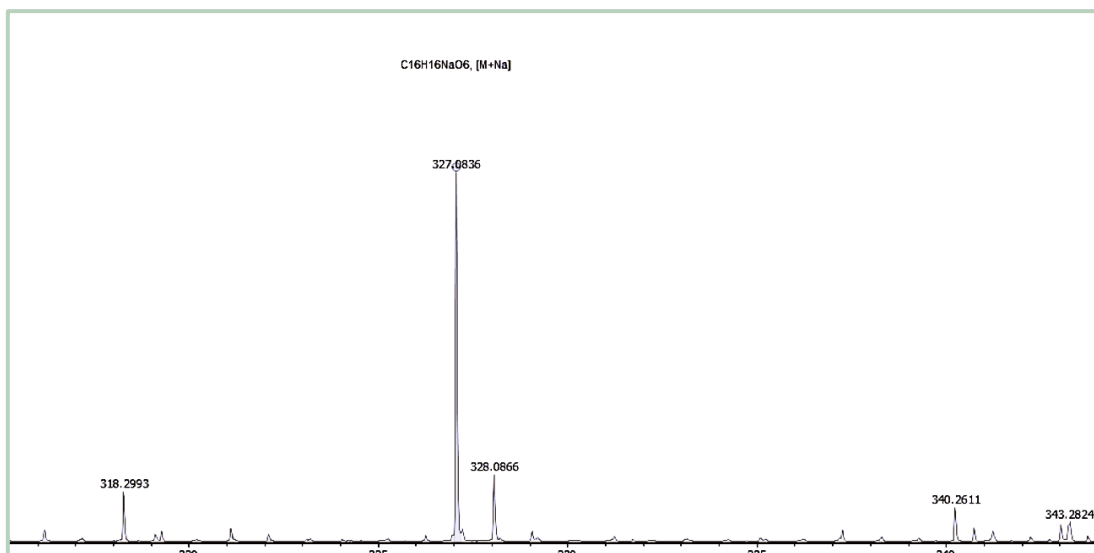


Figura 23 – Espectro de HR-ESI-MS de Ps-3.**Tabela 3**– Dados de RMN de ¹H e ¹³C de Ps-3 comparados com dados da literatura para heraclenol^d.

Posição	Ps-3 ^a		Heraclenol ^{b,d}	
	δ _C	δ _H ^c	δ _C	δ _H ^c
2	160,5	-	160,5	-
3	114,6	6,32 (d; 9,6)	114,6	6,37 (d; 9,8)
4	144,4	7,73 (d; 9,6)	144,5	7,79 (d; 9,8)
4a	116,4	-	116,4	-
5	113,6	7,35 (s)	113,6	7,37 (s)
6	126,1	-	126,1	-
7	147,7	-	148,7	-
8	131,5	-	131,6	-
8a	143,1	-	143,1	-
2'	146,8	7,66 (d; 2,3)	146,9	7,70 (d; 2,2)
3'	106,8	6,79 (d; 2,3)	106,9	6,85 (d; 2,2)
2''	75,5	Ha 4,38 (dd; 10,2 e 7,8) Hb 4,72 (dd; 10,2 e 2,6)	75,6	Ha 4,42 (dd; 10,2 e 8,0) Hb 4,76 (dd; 10,2 e 2,8)
3''	76,1	3,85 (dd; 7,8 e 2,6)	76,2	3,90 (dd; 8,0 e 2,8)
4''	71,5	-	71,6	-
5''	25,0	1,26 (s)	25,1	1,30 (s)
6''	26,5	1,30 (s)	26,5	1,34 (s)

^a500 (¹H) e 125 (¹³C) MHz, CDCl₃; ^b400 (¹H) e 100 (¹³C) MHz, CDCl₃; ^cEm parêntesis: multiplicidade e *J* em Hz; ^dGui *et al.*, 2020.

Figura 24 – Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) de Ps-3.

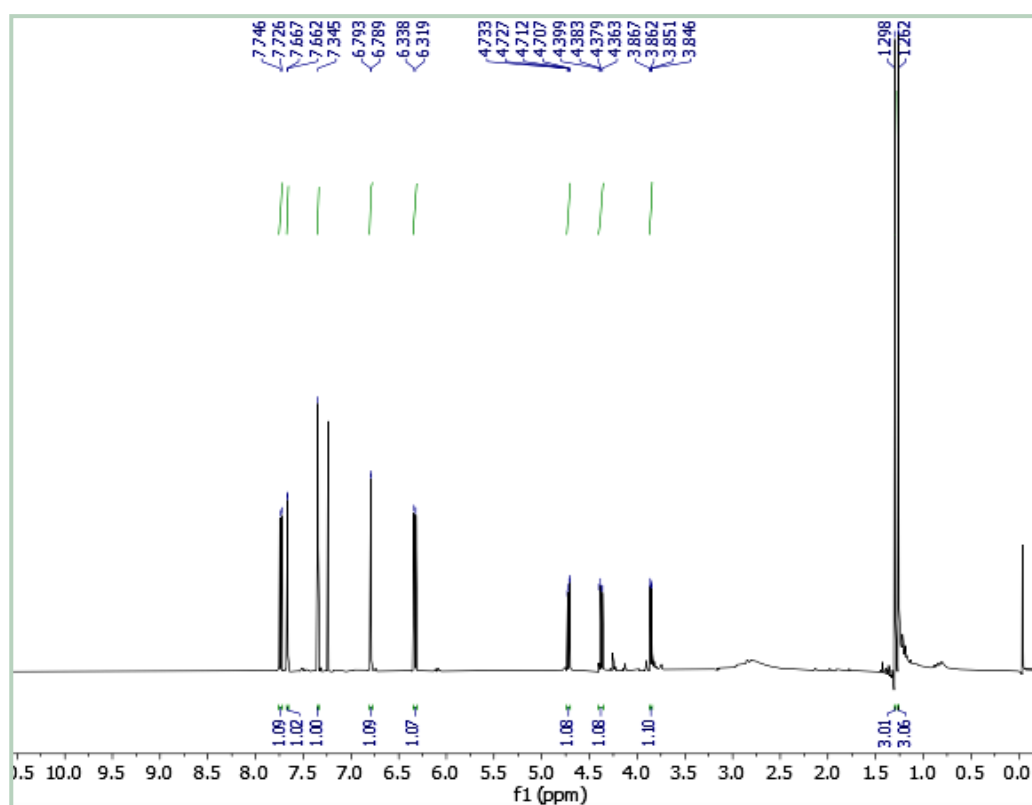


Figura 25 – Expansão do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) de Ps-3 na região de 7,32 – 7,76 ppm.

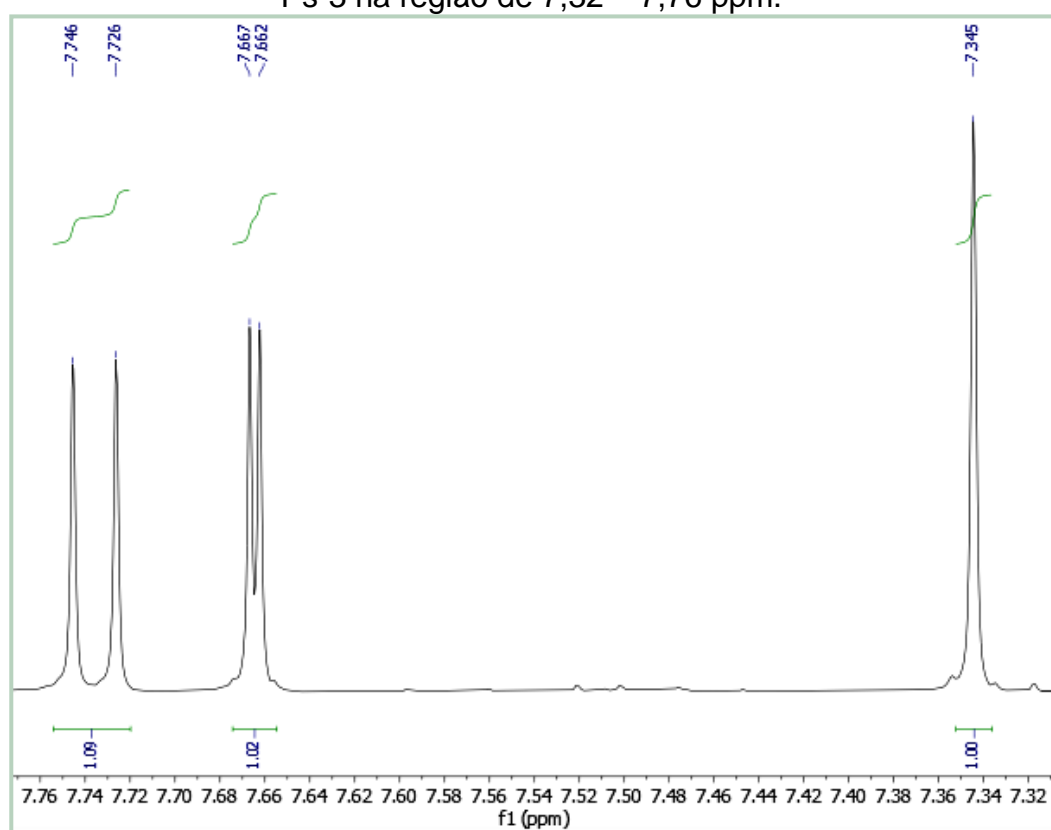


Figura 26 – Expansão do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) de Ps-3 na região de 6,32 – 6,80 ppm.

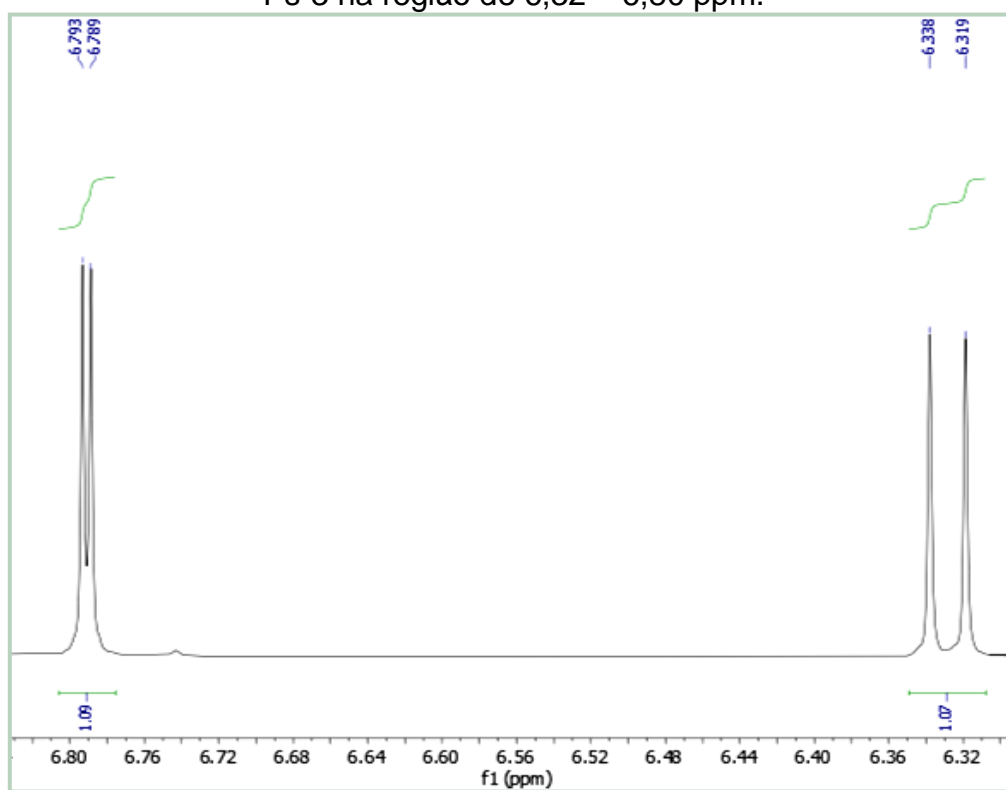


Figura 27 – Expansão do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) de Ps-3 na região de 3,85 – 4,75 ppm.

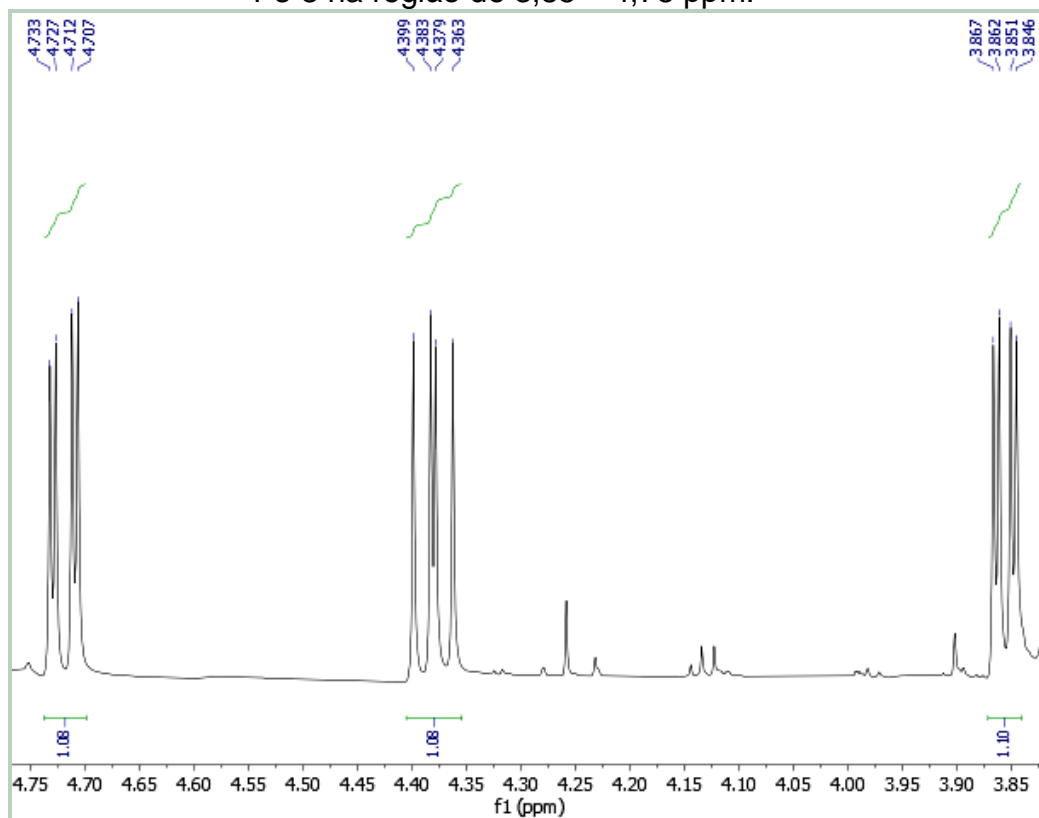


Figura 28 – Espectro de RMN de ^{13}C -BB (125 MHz, CDCl_3) de Ps-3.

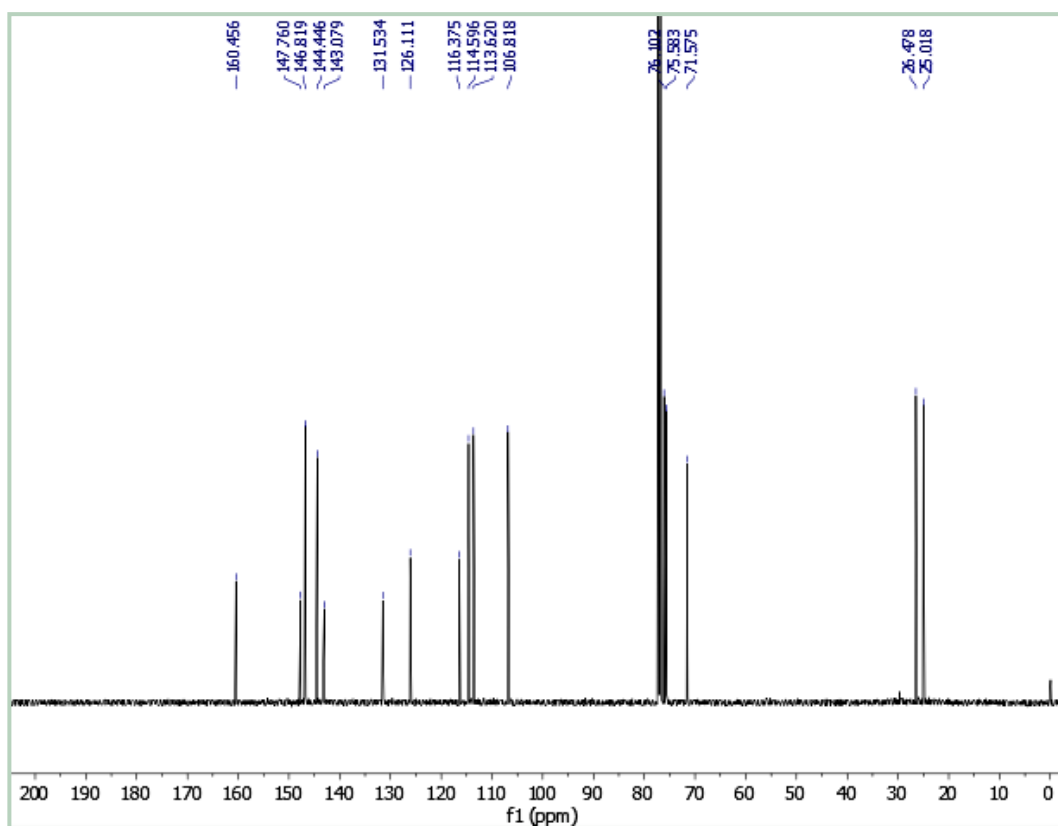
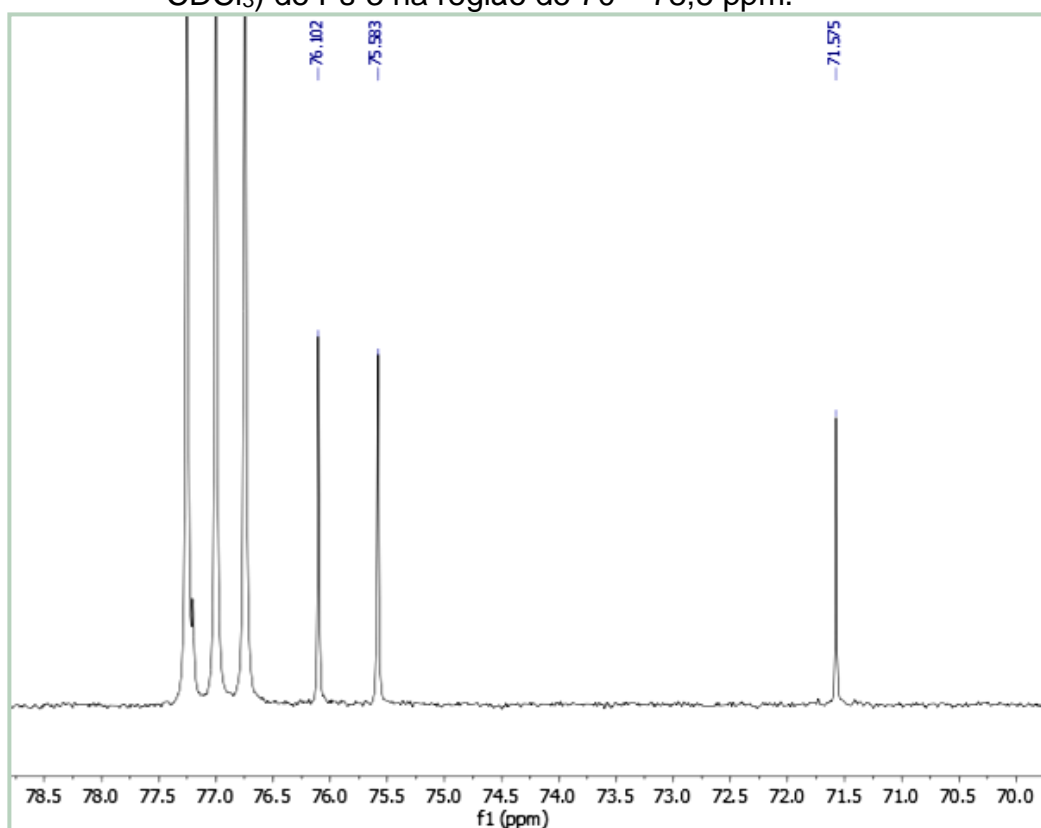


Figura 29 – Expansão do espectro de RMN de ^{13}C -BB (125 MHz, CDCl_3) de Ps-3 na região de 70 – 78,5 ppm.



5.4 Identificação estrutural de Ps-4

A substância codificada como **Ps-4** foi obtida como um sólido amorfo branco, pesando 4,0 mg. O espectro de massas de alta resolução obtido por ESI-MS no modo positivo (Figura 31), mostrou o pico da molécula protonada em m/z 287,0912 $[M+H]^+$ compatível com a fórmula molecular $C_{16}H_{14}O_5$ (calc. 286,2830).

O espectro de RMN de 1H , obtido a 400 MHz em $CDCl_3$ (Figura 32), apresentou um par de dupletos em δ_H 6,35 (1H, d, $J = 9,7$ Hz) e δ_H 7,74 (1H, d, $J = 9,7$ Hz) de esqueleto cumarínico, referentes a H-3 e H-4, respectivamente, e um par de dupletos em 7,65 (1H, d, $J = 2,3$ Hz) e δ_H 6,79 (1H, d, $J = 2,3$ Hz) característicos de anel furano, referentes a H-2' e H-3' (Figura 33).

Essas atribuições foram sustentadas pelas correlações apresentadas no espectro de correlação homonuclear COSY (Figuras 34 e 35) dos hidrogênios H-3 com H-4 e H-2' com H-3', confirmando que **Ps-4** se tratava de uma furanocumarina. Além disso, o espectro apresentou um simpleto em δ_H 7,35 (1H, s) que foi atribuído a H-5.

Neste mesmo espectro foi observado um duplete com integral para seis hidrogênios em δ_H 1,18 (6H, d, $J = 7,0$ Hz) de H-5'' e H-6'', e um septeto em δ_H 3,05 (1H, sept., $J = 7,0$ Hz) de H-4'' indicando a presença de um grupo dimetil geminado acoplando com um hidrogênio metínico adjacente (Figura 36). Isso foi confirmado pela observação de outro sistema de spin no espectro de COSY, que mostrou a correlação entre H-4'' e H-5''/H-6'' (Figura 37).

Também se observou um simpleto em δ_H 5,18 (2H, s) atribuído aos hidrogênios metilênicos de H-2'' sofrendo efeito de desproteção por eletronegatividade do átomo de oxigênio diretamente ligado ao carbono que os sustenta, por anisotropia do anel aromático e de um grupo carbonila vizinhos a eles. Esse conjunto de sinais e o deslocamento químico de H-4 abaixo de δ_H 8,00 ppm, sugeriu a presença de um grupo prenil modificado inserido em C-8.

A posição do grupo prenilóxi foi confirmada pelo sinal forte, apresentado no espectro de correlação heteronuclear HMBC (Figura 41 e 42), entre os hidrogênios Ha-2''/Hb-2'' com C-8 indicando uma correlação a três ligações de distância (3J). A presença de uma carbonila inserida em C-3'' foi confirmada pela correlação observada entre os hidrogênios Ha/b-2'', H-4'', H-5'' e H-6'' com um

sinal em δ_c 209,9 (C-3'') característico de carbonila de cetona (Figura 42) (PAVIA *et al.*, 2015).

A análise dos espectros bidimensionais de correlação heteronuclear direta HSQC (Figuras 38-40) permitiu a atribuição dos deslocamentos químicos de carbonos hidrogenados. E a partir da análise dos espectros de correlação heteronuclear a longa distância HMBC (Figuras 41-44) foi possível determinar os carbonos não hidrogenados. Todas as atribuições encontram-se compiladas na Tabela 4.

A partir da comparação dos dados espectrais de massas e de RMN de ^1H e ^{13}C obtidos com dados da literatura, foi possível identificar **Ps-4** como pabularinona (Figura 30) (MACIAS *et al.*, 1990; YAN *et al.*, 2020), relatada pela primeira vez no gênero *Pilocarpus*, mas já foi encontrada em outros gêneros de Rutaceae, como *Amyris* (HASBUN, 1985), *Phebalium* (GIRARD *et al.*, 2005) e na espécie *Clausena lansium* onde relataram sua atividade citotóxica (JIANG *et al.*, 2014) e antiinflamatória (SHEN *et al.*, 2012).

Figura 30 – Estrutura química de Ps-4 (pabularinona).

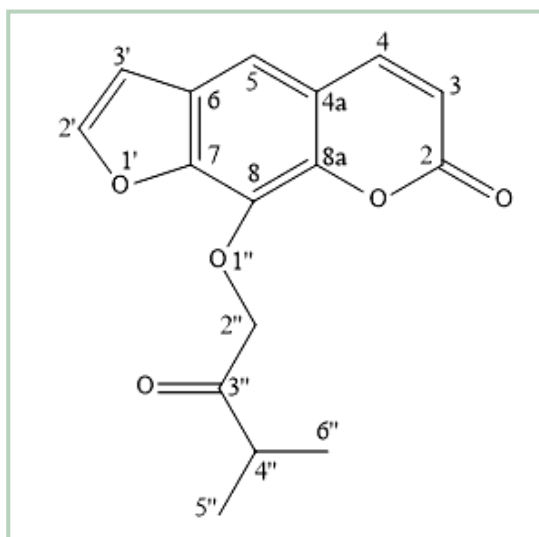


Tabela 4 – Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de Ps-4 comparados com dados da literatura para o Pabularinona^{d,e}.

Ps-4 ^a					Pabularinona ^{b,d}		
Posição	HSQC	HMBC	COSY				
	δ_{C}	$\delta_{\text{H}}^{\text{c}}$	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$	$^1\text{H} \times ^1\text{H}$	δ_{C}	$\delta_{\text{H}}^{\text{c}}$
2	160,0	-	H-3	H-4		160,1	-
3	114,9	6,35 (d; 9,7)			H-4	114,8	6,37 (d; 9,8)
4	144,3	7,74 (d; 9,7)		H-5	H-3	144,3	7,77 (d; 9,8)
4a	116,5	-	H-4;H-5	H-3		116,6	-
5	113,3	7,35 (s)		H-4		113,3	7,37 (s)
6	126,0	-	H-5;H-3'	H-2'		126,1	-
7	147,1	-		H-5; H-3' ;H-2'		147,1	-
8	131,2	-		Ha/b-2''		131,1	-
8a	142,6	-		H-4;H-5		142,6	-
2'	145,8	7,65 (d; 2,3)			H-3'	146,7	7,66 (d; 2,0)
3'	106,6	6,79 (d; 2,3)	H-2'	H-5	H-2'	106,8	6,82 (d; 2,0)
2''	75,4	Ha/Hb 5,18 (s)				75,3	5,20 (2H, s)
3''	209,9	-	Ha/b-2''; H-4''	H-5'';H-6''		209,9	-
4''	37,2	3,05 (sept.; 7,0)	H-5'';H-6''		H-5'';H-6''	37,0	3,06 (sept.; 6,8)
5''	18,1	1,18 (d; 7,0)		H-6''	H-4''	17,9	1,21 (d; 6,8)
6''	18,1	1,18 (d; 7,0)		H-5''	H-4''	17,9	1,21 (d; 6,8)

^a400 (^1H) e 100 (^{13}C) MHz, CDCl_3 ; ^b400 (^1H) e 100 (^{13}C) MHz, CDCl_3 ; ^cEm parêntesis: multiplicidade e J em Hz; ^dYAN *et al.*, 2020.

Figura 31 – Espectro de HR-ESI-MS de Ps-4.

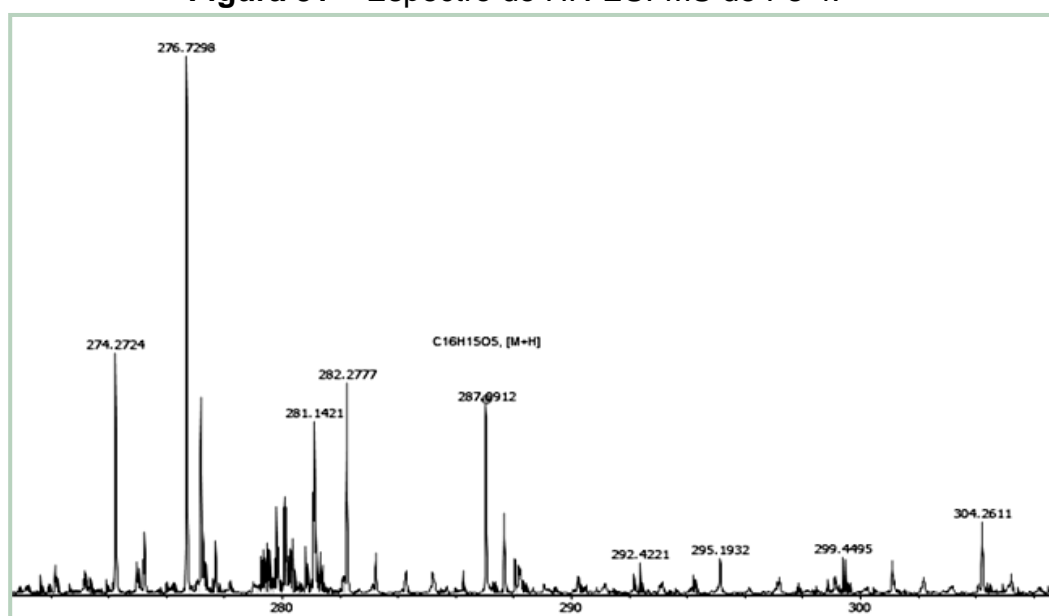


Figura 32 – Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) de Ps-4.

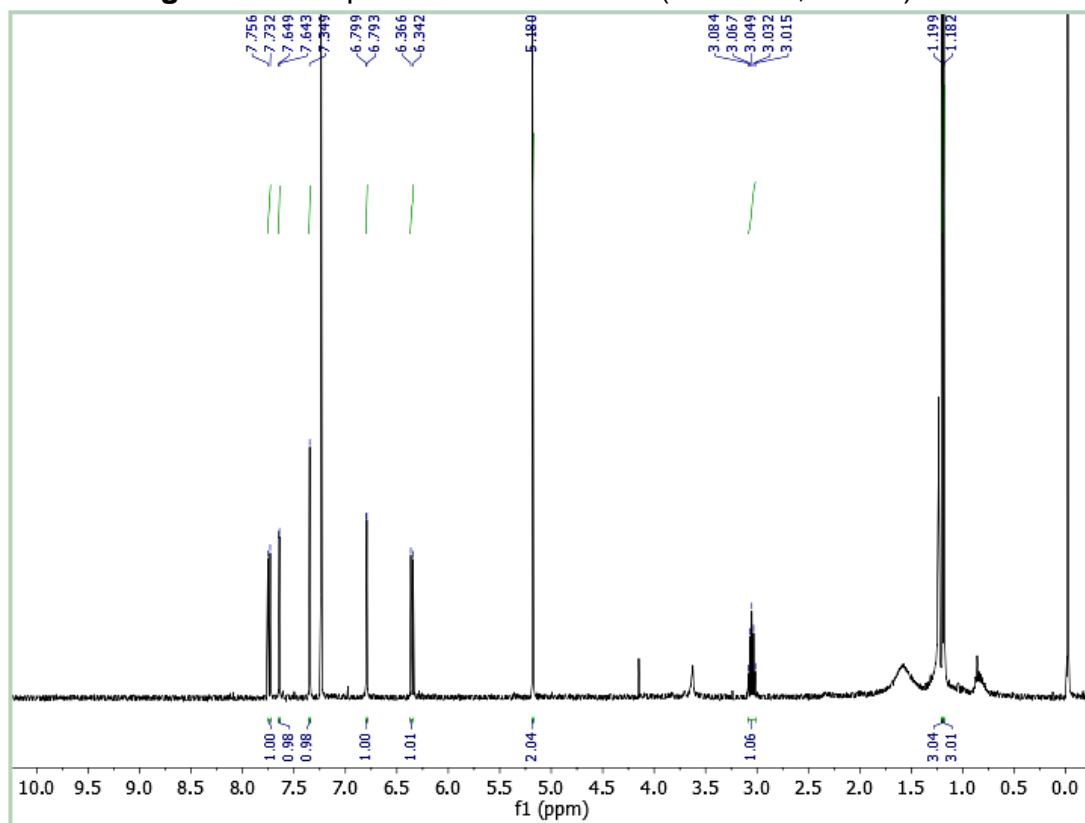


Figura 33 – Expansão do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) de Ps-4 na região de 6,30 – 7,80 ppm.

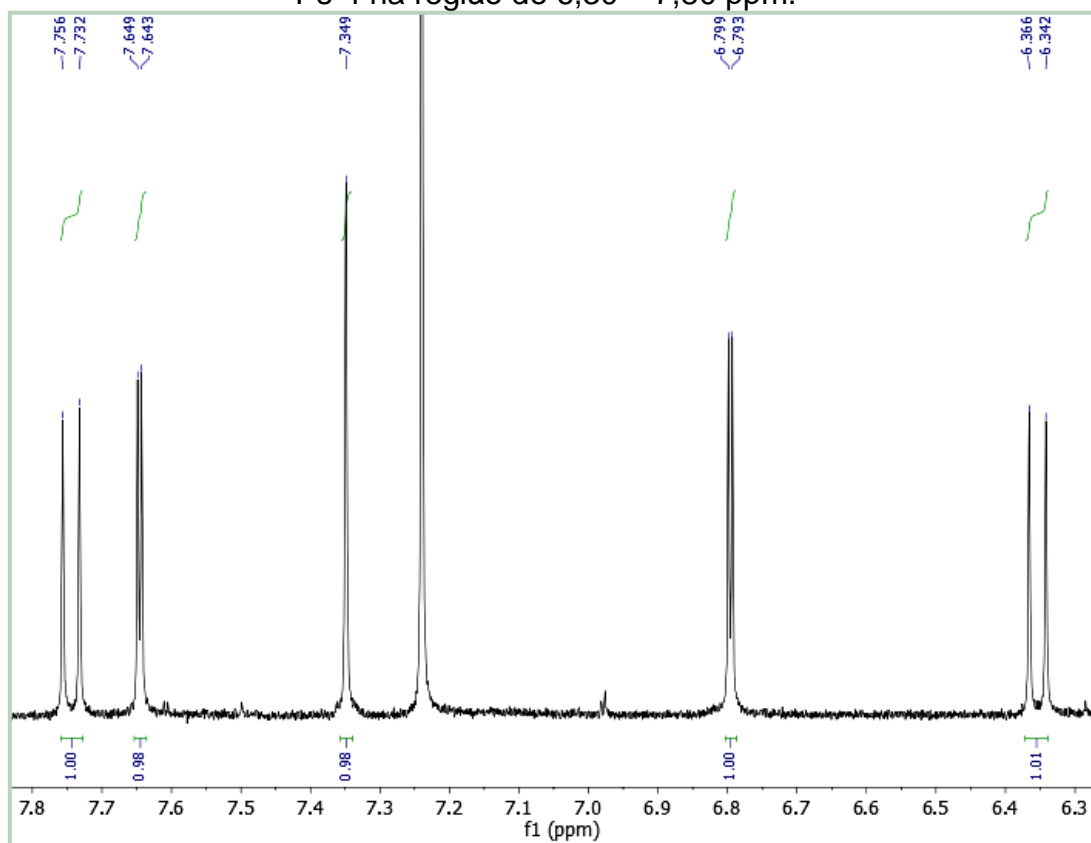


Figura 34 – Expansão do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) de Ps-4 na região de 2,92 – 3,16 ppm.

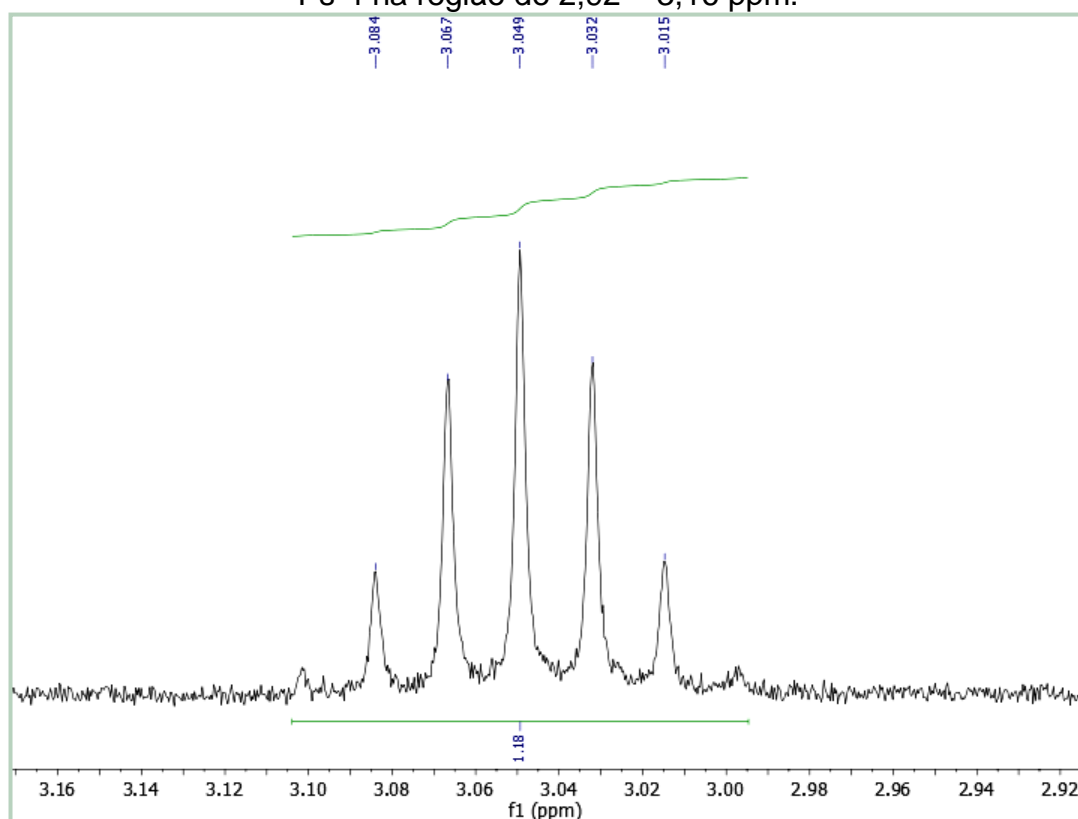


Figura 35 – Espectro de RMN – COSY ^1H - ^1H (400 MHz, CDCl_3) de Ps-4.

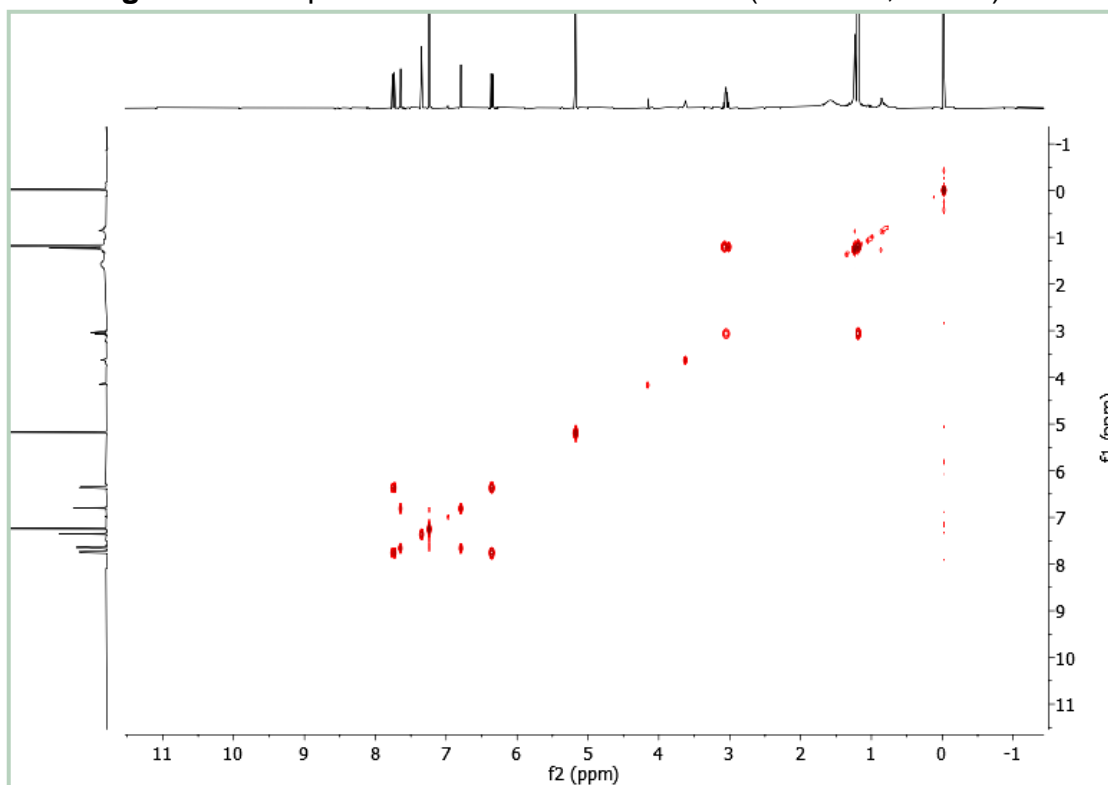


Figura 36 – Expansão do espectro de RMN-COSY ^1H - ^1H (400 MHz, CDCl_3) de Ps-4 na região de (6,20 – 7,90 ppm) x (6,10 – 7,90 ppm).

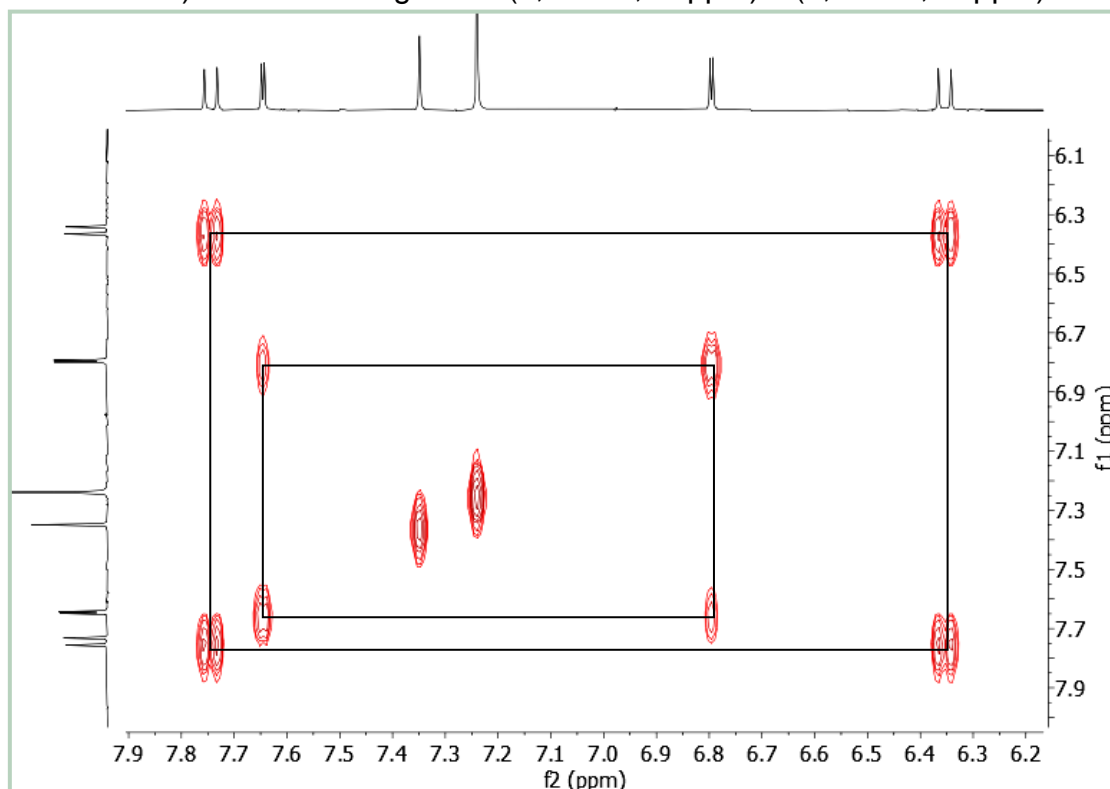


Figura 37 – Expansão do espectro de RMN-COSY ^1H - ^1H (400 MHz, CDCl_3) de Ps-4 na região de (1,10 – 3,30 ppm) x (0,50 – 3,50 ppm).

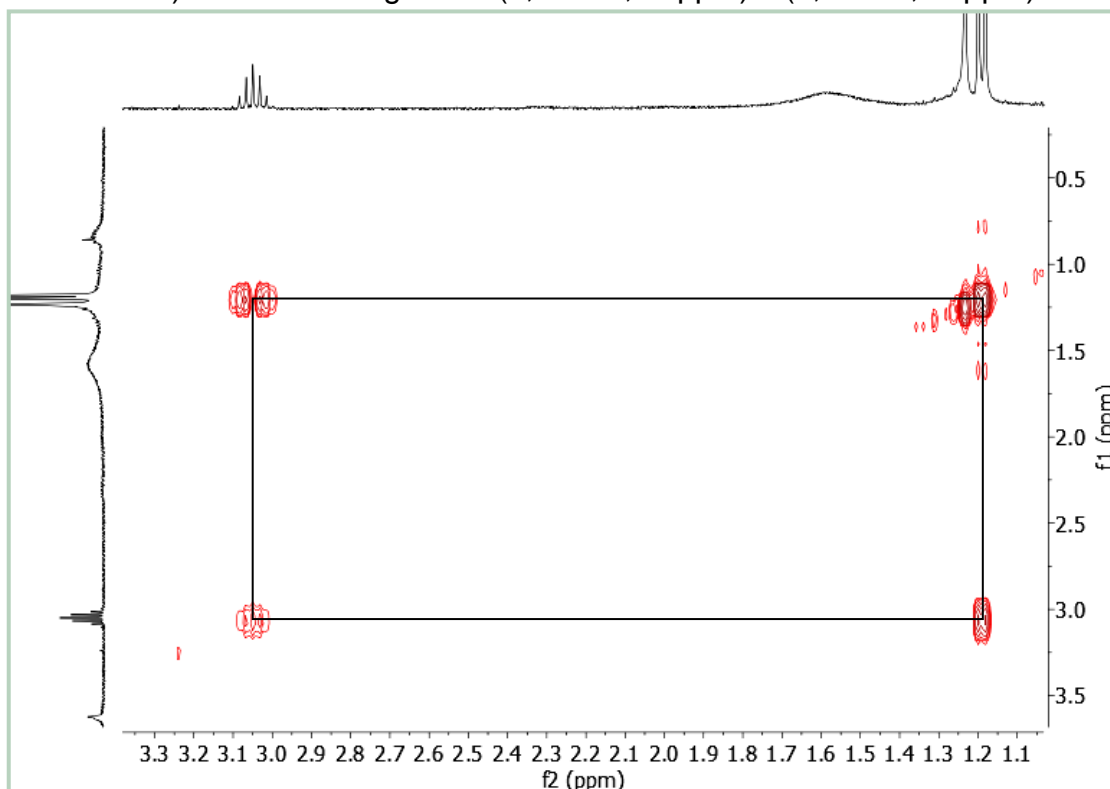


Figura 38 – Espectro de RMN-HSQC (400 e 100 MHz, CDCl_3) de Ps-4.

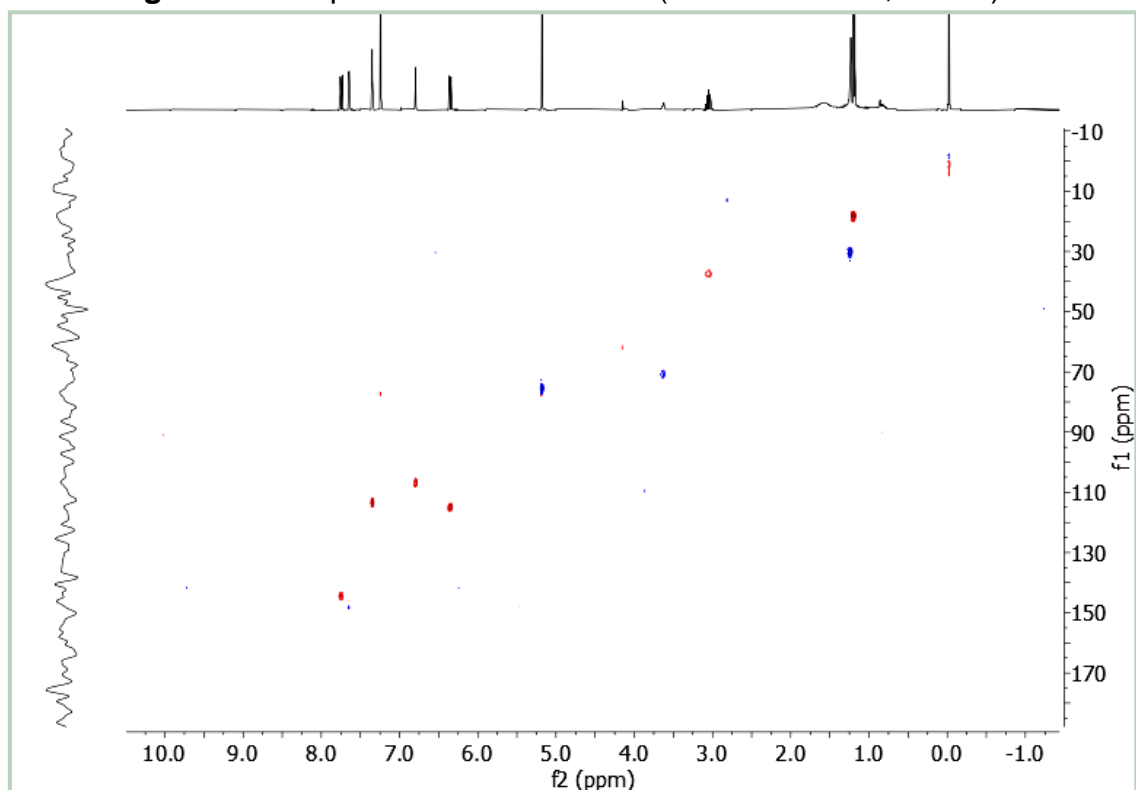


Figura 39 – Expansão do espectro de RMN-HSQC (400 e 100 MHz, CDCl_3) de Ps-4 na região de (6,30 – 7,70 ppm) x (110,0 – 145,0 ppm).

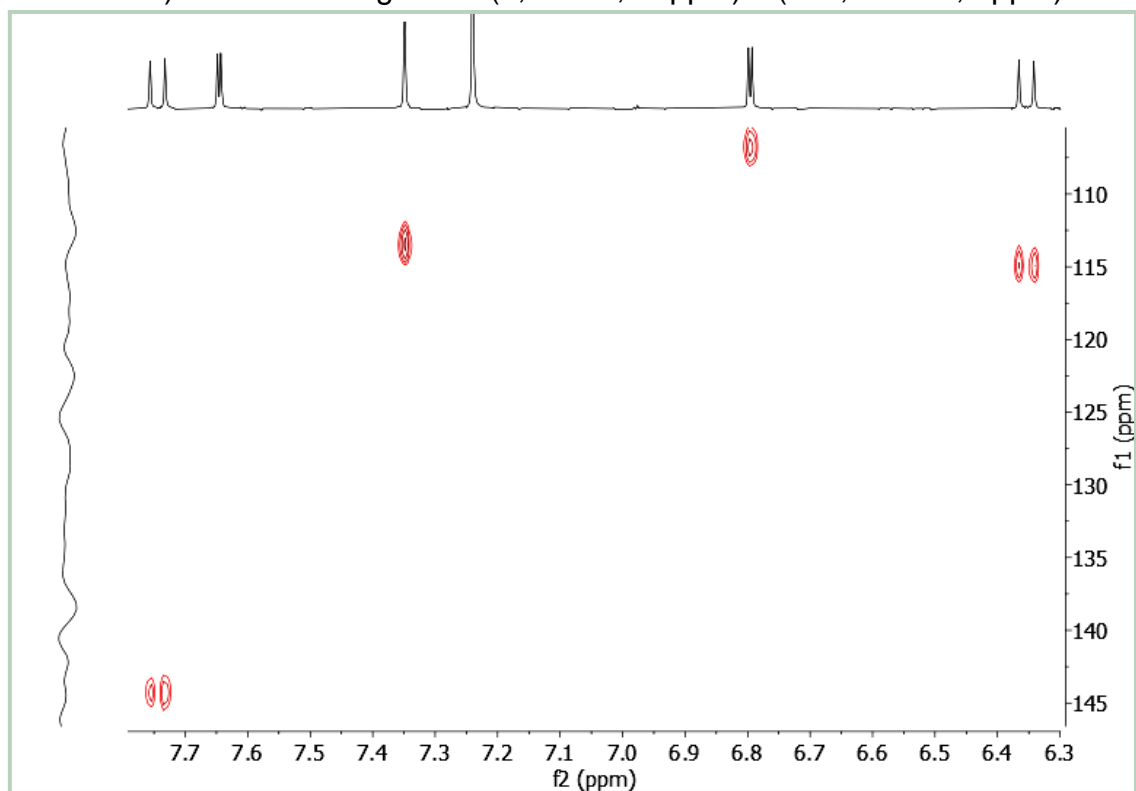


Figura 40 – Expansão do espectro de RMN-HSQC (400 e 100 MHz, CDCl_3) de Ps-4 na região de (1,10 – 5,40 ppm) x (15,0 – 75,0 ppm).

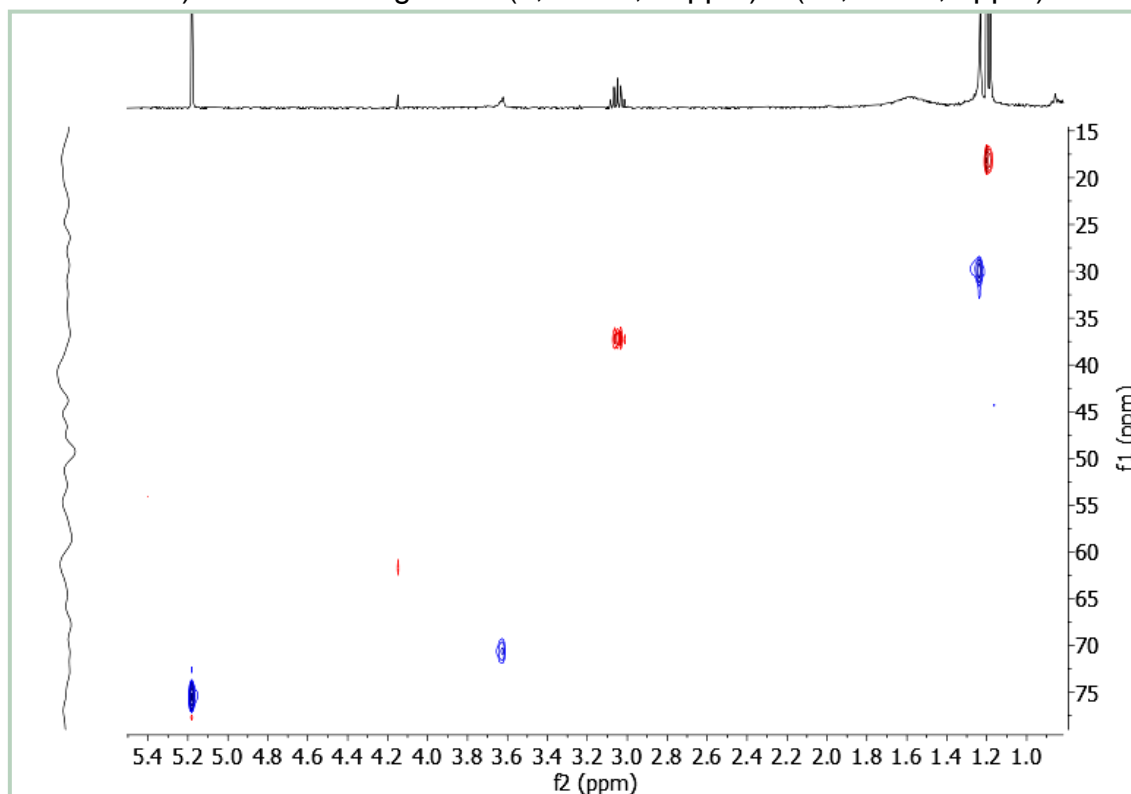


Figura 41 – Espectro de RMN-HMBC (400 e 100 MHz, CDCl_3) de Ps-4.

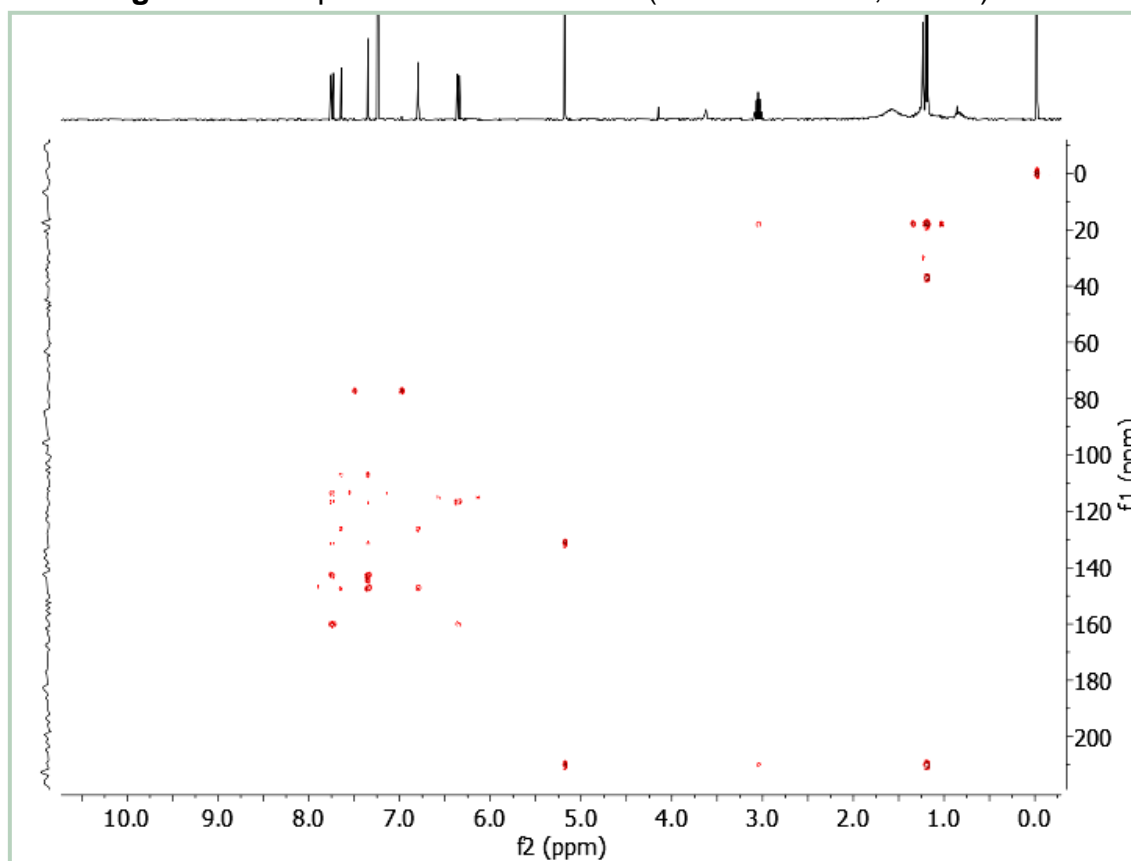


Figura 42 – Expansão do espectro de RMN-HMBC (400 e 100 MHz, CDCl_3) de Ps-4 na região de (1,20 – 5,40 ppm) x (130,0 – 210,0 ppm).

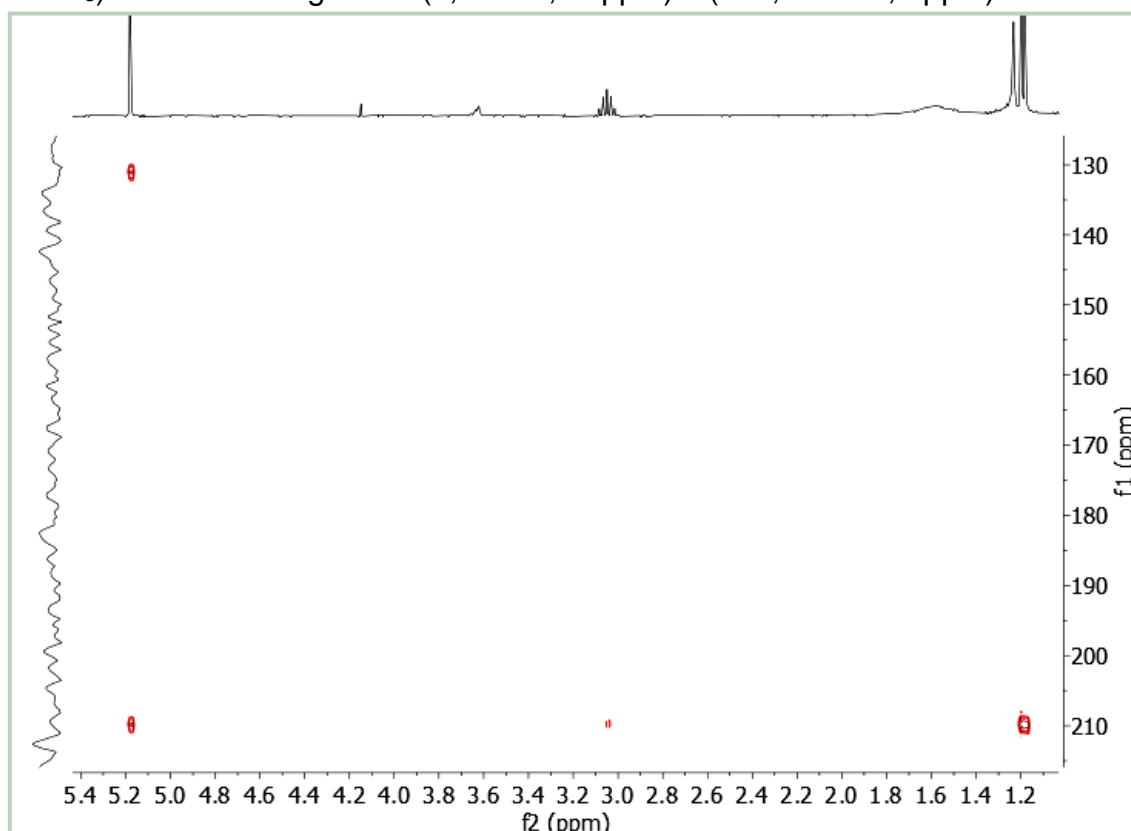


Figura 43 – Expansão do espectro de RMN-HMBC (400 e 100 MHz, CDCl_3) de Ps-4 na região de (6,10 – 7,90 ppm) x (105,0 – 160,0 ppm).

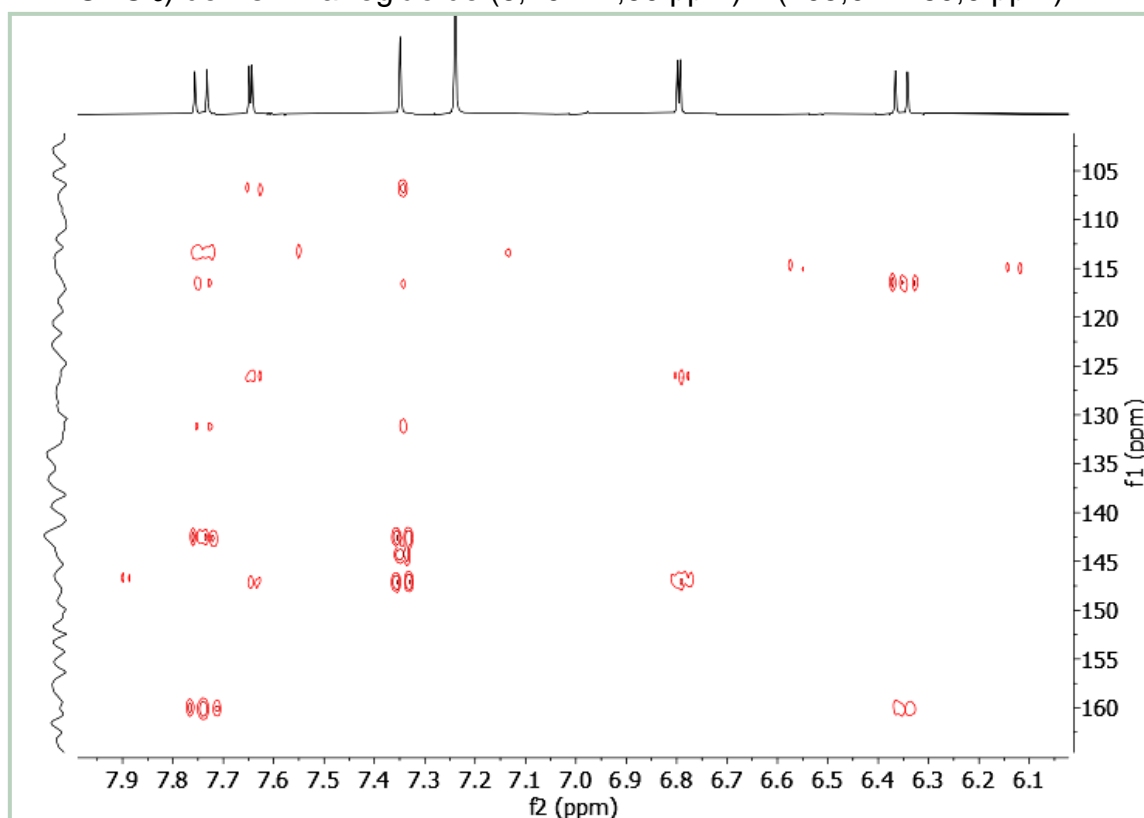
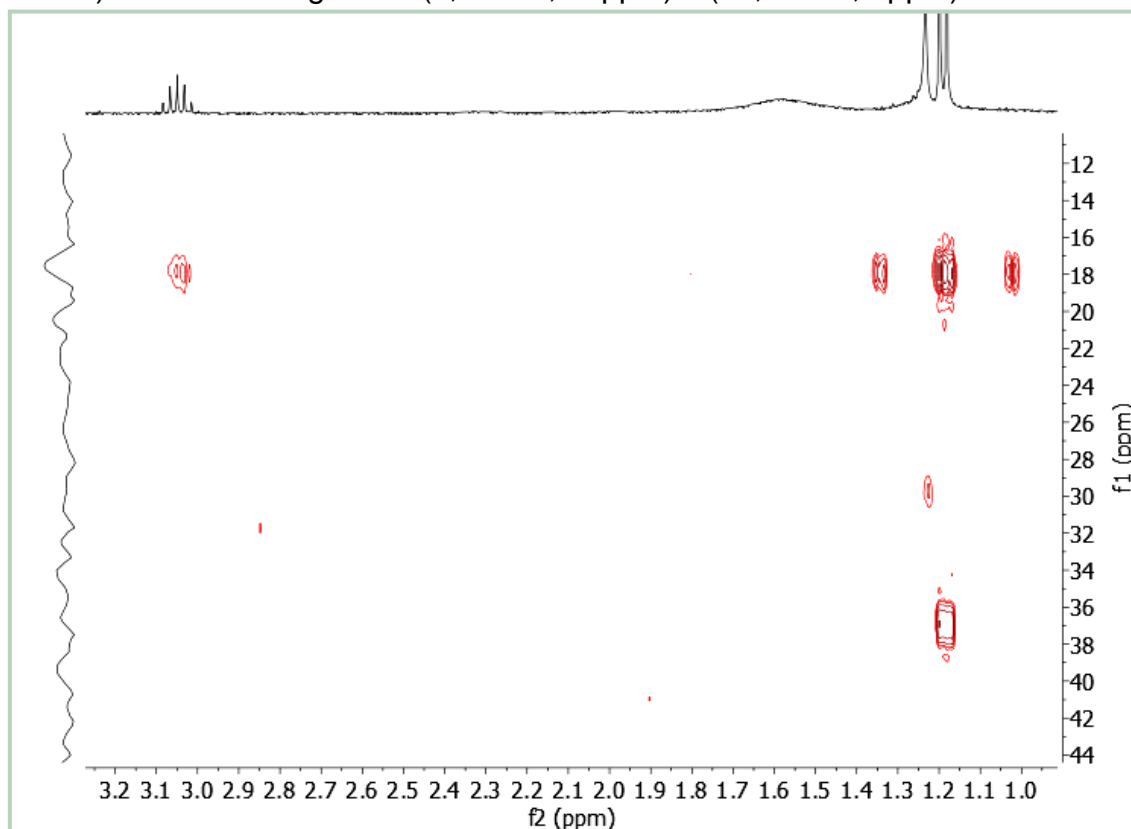


Figura 44 – Expansão do espectro de RMN-HMBC (400 e 100 MHz, CDCl_3) de Ps-4 na região de (1,00 – 3,20 ppm) x (12,0 – 44,0 ppm).



5.5 Identificação estrutural de Ps-5

A substância codificada como **Ps-5** foi obtida como um sólido amorfo marrom claro, pesando no total 16,4 mg. O espectro de massas de alta resolução obtido por ESI-MS no modo positivo (Figura 46), mostrou o pico da molécula cationizada em m/z 345,0503 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ compatível com a fórmula molecular $\text{C}_{16}\text{H}_{15}\text{ClO}_5$ (calc. 322,7400).

O espectro de RMN de ^1H (Figura 47), obtido a 500 MHz em CDCl_3 , apresentou um conjunto de sinais em δ_{H} 6,35 (1H, d, $J = 9,6$ Hz), δ_{H} 7,75 (1H, d, $J = 9,6$ Hz), 7,69 (1H, d, $J = 2,3$ Hz), δ_{H} 6,81 (1H, d, $J = 2,3$ Hz) e δ_{H} 7,38 (1H, s) característicos de esqueleto furanocumarínico, os quais foram atribuídos a H-3, H-4, H-2', H-3' e H-5, respectivamente (Figuras 48 e 49). No espectro de correlação homonuclear de COSY (Figuras 55 e 56) foram observadas correlações entre H-3 e H-4, e entre H-2' e H-3', confirmando o tipo de esqueleto proposto.

Também foi possível observar sinais em δ_H 4,44 (1H, dd, $J = 10,2$ e $8,0$ Hz) e δ_H 4,85 (1H, dd, $J = 10,2$ e $3,0$ Hz) atribuídos aos hidrogênios metilênicos diasterotópicos Ha-2'' e Hb-2'' e em 4,08 (1H, dd, $J = 8,0$ e $3,0$ Hz) do hidrogênio oximetínico H-3'' (Figura 50). Tais atribuições foram sustentadas pelo espectro de COSY (Figura 57), que apresentou correlações do hidrogênio Ha-2'' com Hb-2'' e H-3''.

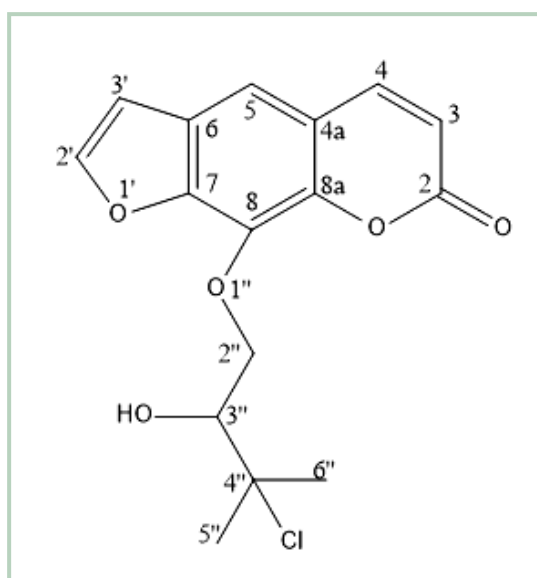
Além disso, foi observado dois simpletos com integral para três hidrogênios cada em δ_H 1,67 (3H, s) e δ_H 1,68 (3H, s) H-5'' e H-6'' (Figura 51), indicando a presença de duas metilas sofrendo efeito de desproteção por um elemento eletronegativo adjacente a elas, onde foi sugerido que se tratava de um átomo de cloro, coerente com o valor de deslocamento químico para hidrogênios do carbono α ao carbono ligado ao halogênio (por volta de δ_H 1,69 ppm). Isso corroborou o sinal apresentado no espectro de RMN de ^{13}C (Figura 54) em δ_C 71,0 ppm, que se encontra dentro da faixa esperada para carbono ligado a um átomo de cloro que vai de δ_C 35-80 ppm (PAVIA *et al.*, 2015).

Os espectros de RMN de ^{13}C -BB (125 MHz, $CDCl_3$) (Figuras 52-54) apresentaram quinze sinais correspondentes a dezesseis carbonos, dos quais sete são carbonos não hidrogenados, seis carbonos metínicos, um metilênico e dois metílicos.

O conjunto de sinais abaixo de δ_H 5,00 ppm apresentado no espectro de RMN de 1H , juntamente com quantidade de sinais observada no espectro de RMN de ^{13}C , sugeriu a presença de um grupo prenil modificado na estrutura. A posição desse grupo em C-8 foi confirmada pela correlação (3J) apresentada no espectro de HMBC (Figuras 59 e 60), entre os hidrogênios Ha-2''/Hb-2'' com C-8. Todas as atribuições encontram-se compiladas na Tabela 5.

Após comparação dos dados espectrais de massas e de RMN de 1H e ^{13}C obtidos com dados da literatura, **Ps-5** foi identificada como 8-O-(3-cloro-2-hidroxisopentil)-psoraleno ou isosaxalina (Figura 45) (CAO *et al.*, 2020).

Essa substância está sendo relatada pela primeira vez no gênero *Pilocarpus*, mas já foi encontrada em Rutaceae nas espécies *Murraya koenigii* (REISCH *et al.*, 1994) e *Clausena dunniana* (CAO *et al.*, 2020). Isosaxalina foi estudada quanto à sua atividade inibitória da biossíntese de melanina (BAEK *et al.*, 2003).

Figura 45 – Estrutura química de Ps-5 (isosaxalina).**Tabela 5** – Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de Ps-5 comparados com dados da literatura para isosaxalina^d.

Ps-5 ^a					Isosaxalina ^{b,d}	
Posição	δ_{C}	HSQC $\delta_{\text{H}}^{\text{c}}$	HMBC $^2J_{\text{CH}}$	COSY $^1\text{H} \times ^1\text{H}$	δ_{C}	$\delta_{\text{H}}^{\text{c}}$
2	160,3	-	H-3		160,3	-
3	115,0	6,36 (d; 9,6)	H-4	H-4	115,0	6,37 (d; 9,6)
4	144,4	7,75 (d; 9,6)		H-3	144,4	7,76 (d; 9,6)
4a	116,7	-	H-4; H-5		116,7	-
5	114,0	7,38 (s)		H-4	114,0	7,35 (s)
6	126,2	-	H-3'		126,2	-
7	148,2	-		H-3'	148,1	-
8	131,7	-		Ha/b-2''	131,7	-
8a	143,6	-		H-4	143,5	-
2'	147,0	7,69 (d; 2,3)	H-3'	H-3'	147,0	7,70 (d; 2,2)
3'	107,0	6,81 (d; 2,3)	H-2'	H-2'	107,0	6,83 (d; 2,2)
2''	75,4	Ha 4,44 (dd; 10,2 e 8,0) Hb 4,85 (dd; 10,2 e 3,0)		Hb-2''; H-3'' Ha-2''	75,4	Ha 4,54 (dd; 10,4 e 7,5) Hb 4,86 (dd; 10,4 e 2,9)
3''	77,4	4,08 (dd; 8,0 e 3,0)		H-5''; H-6''	75,4	4,09 (dd; 7,5 e 2,9)
4''	71,0	-	H-5''; H-6''	Ha/b-2''	71,1	-
5''	28,6	1,67 (s)		H-6''	28,6	1,68 (s)
6''	29,7	1,68 (s)		H-5''	29,7	1,70 (s)

^a500 (^1H) e 125 (^{13}C) MHz, CDCl_3 ; ^b400 (^1H) e 100 (^{13}C) MHz, CDCl_3 ; ^cEm parêntesis: multiplicidade e J em Hz; ^dCao *et al.*, 2020.

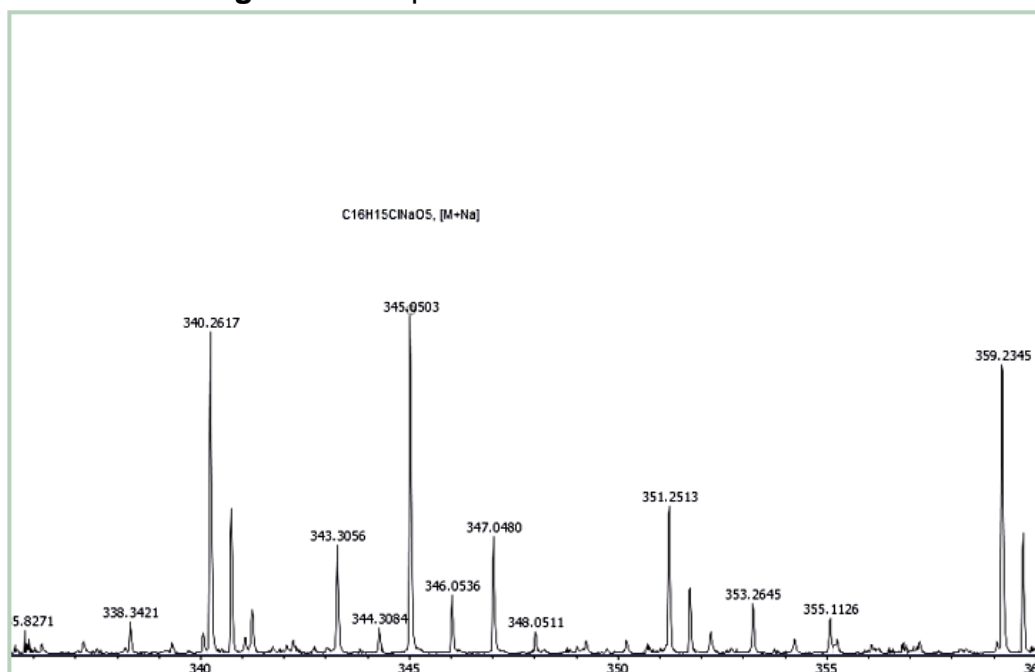
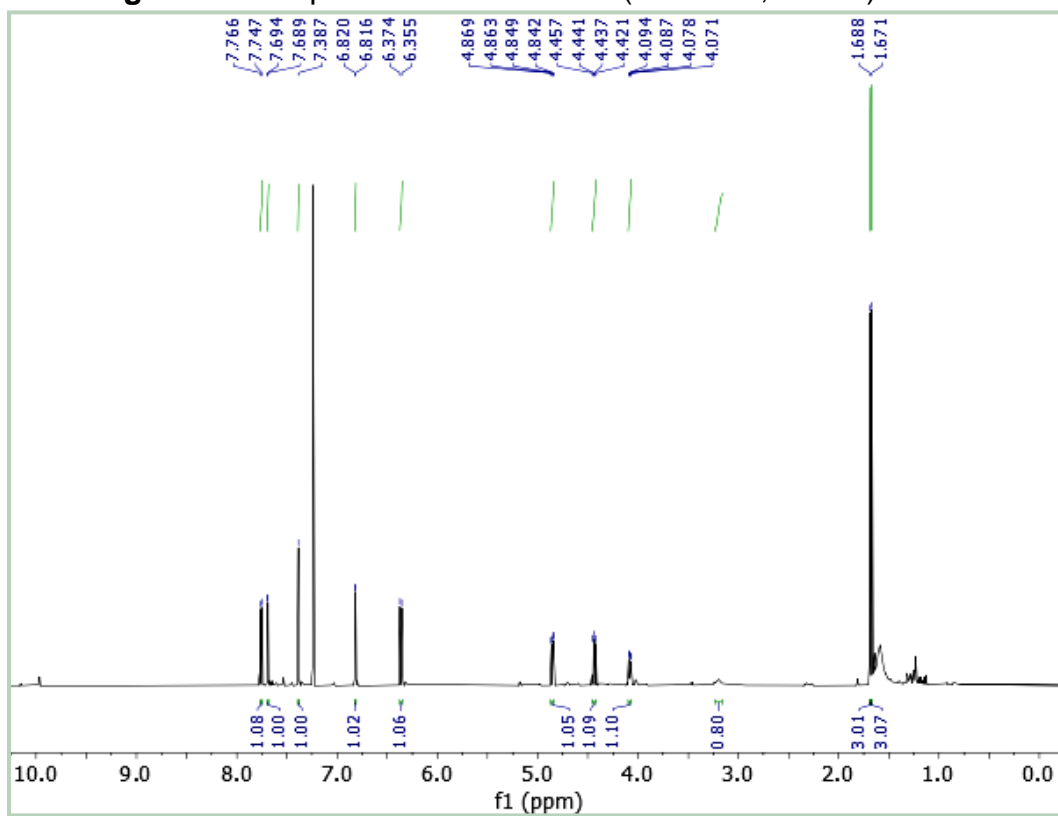
Figura 46– Espectro de HR-ESI-MS de Ps-5.**Figura 47** – Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) de Ps-5.

Figura 48 – Expansão do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) de Ps-5 na região de 7,36 – 7,80 ppm.

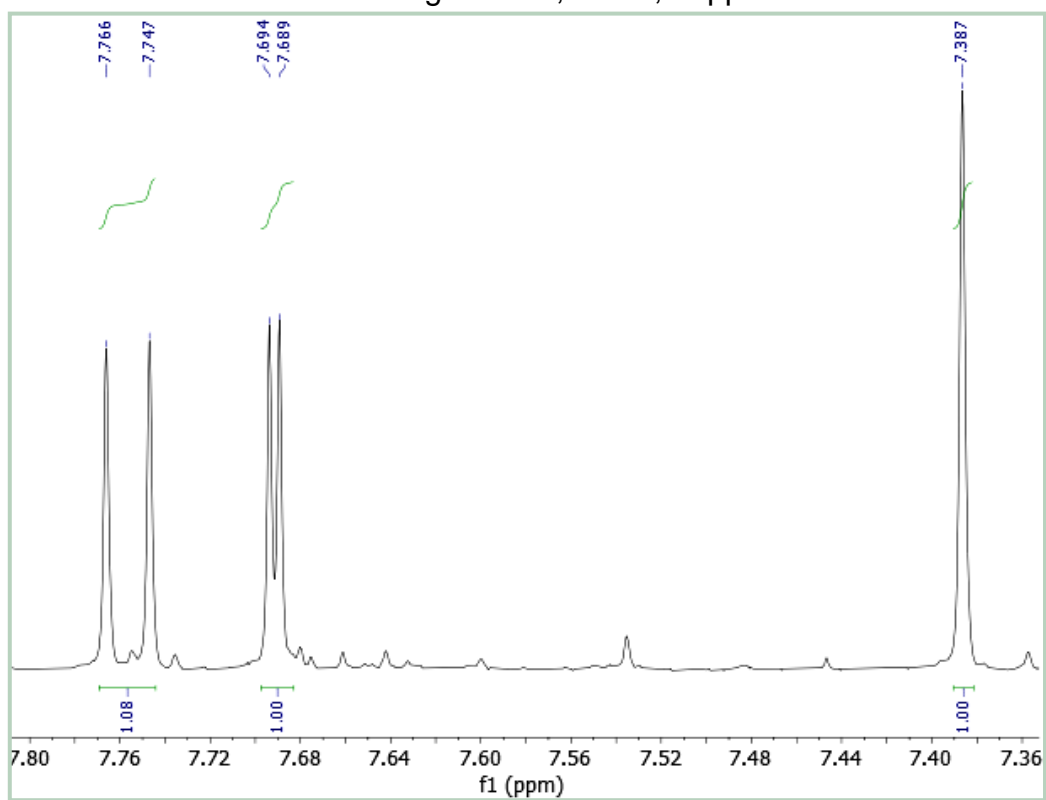


Figura 49 – Expansão do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) de Ps-5 na região de 6,34 – 6,86 ppm.

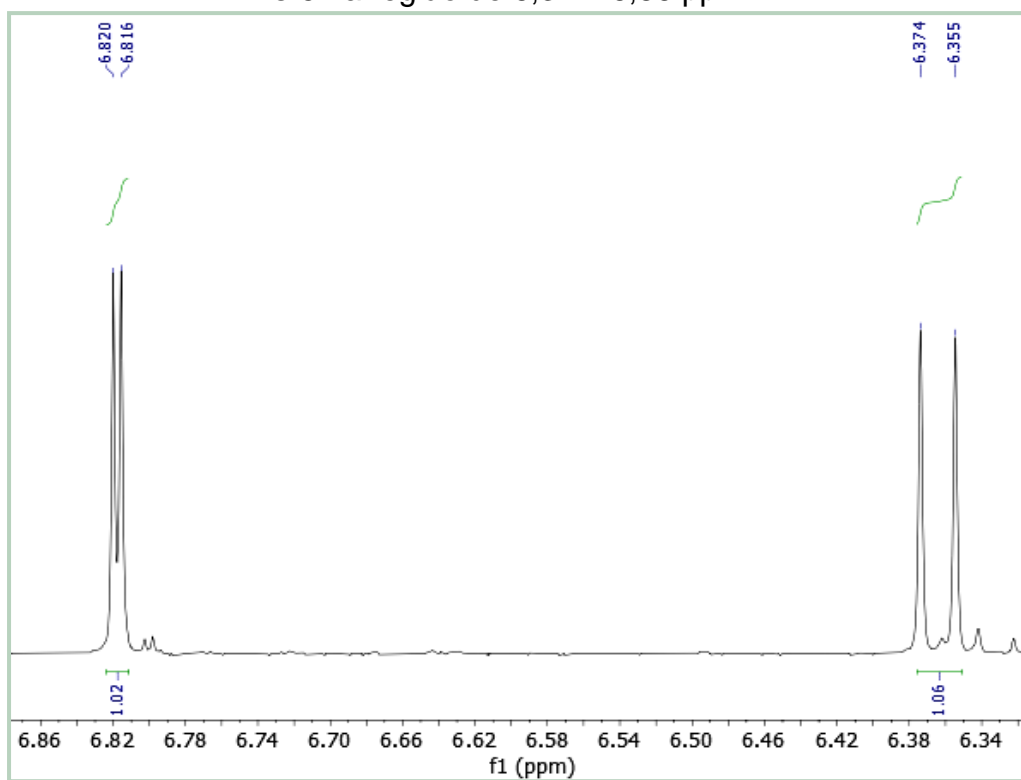


Figura 50 – Expansão do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) de Ps-5 na região de 4,05 – 4,90 ppm.

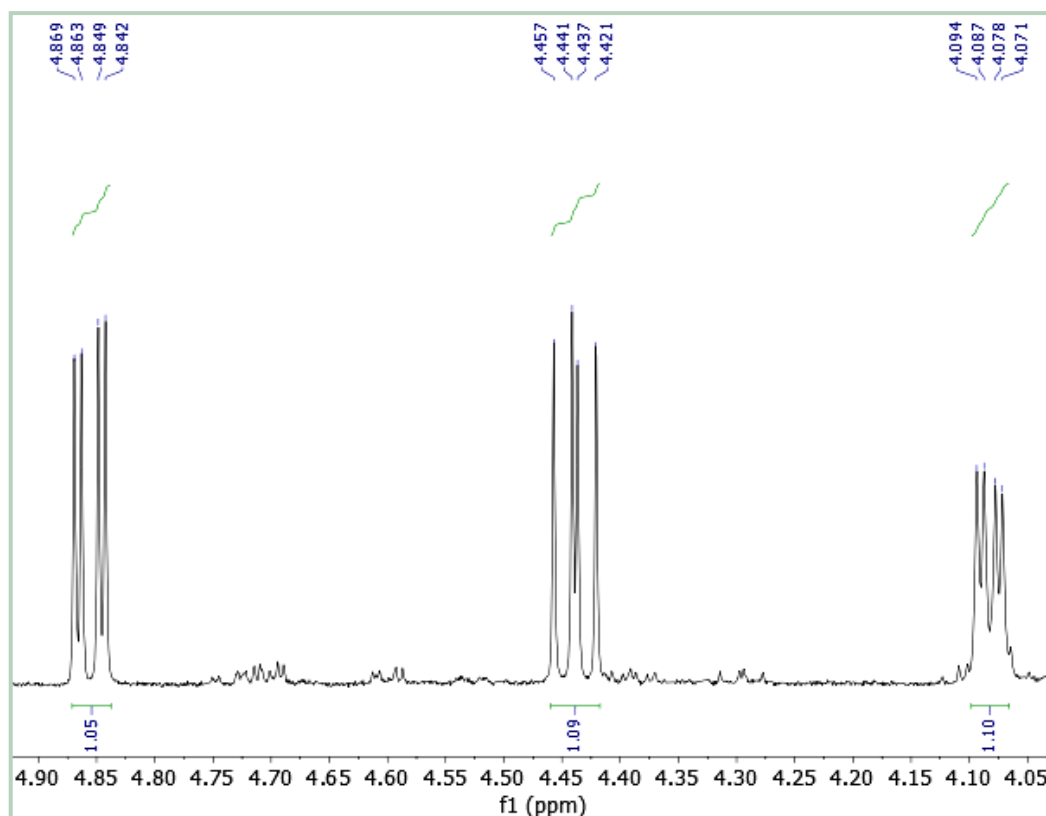


Figura 51 – Expansão do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) de Ps-5 na região de 1,49 – 1,83 ppm.

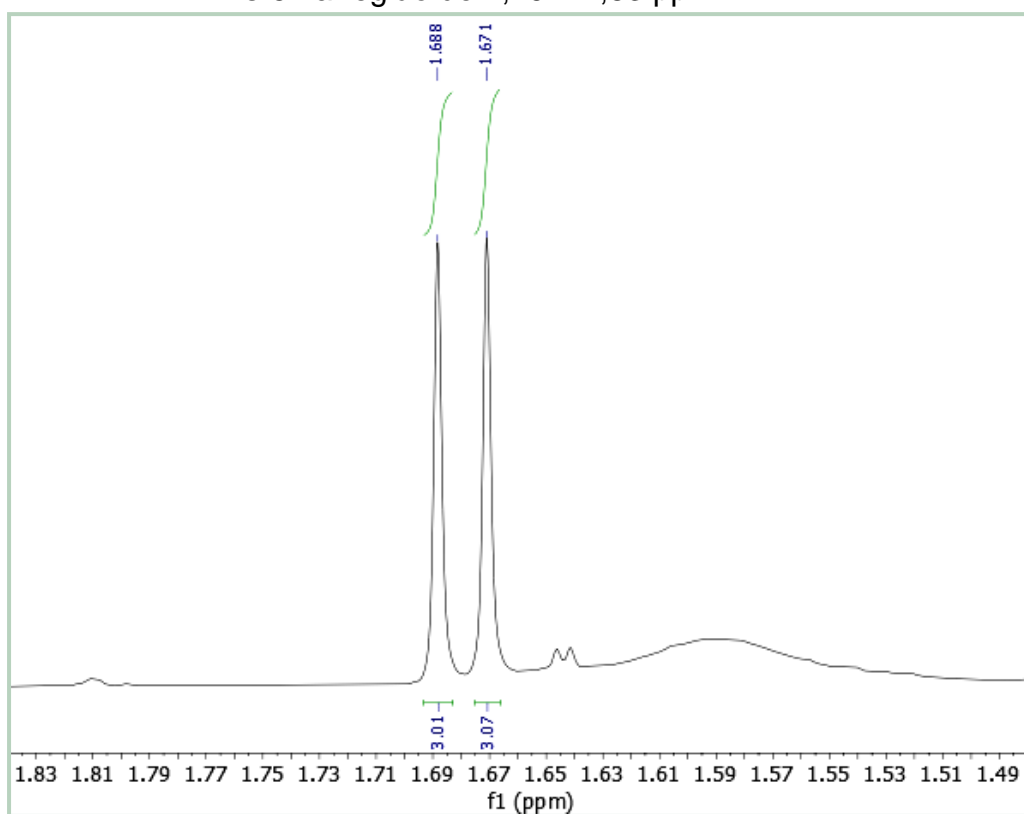


Figura 52– Espectro de RMN de ^{13}C – BB (125 MHz, CDCl_3) de Ps-5.

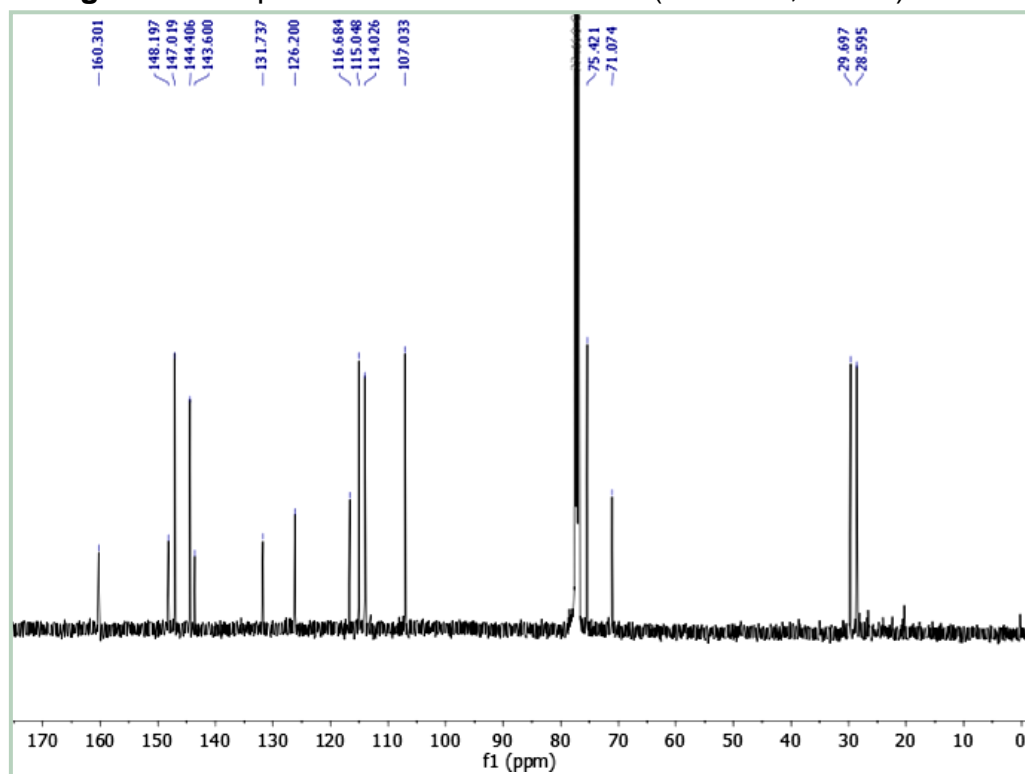


Figura 53 – Expansão do espectro de RMN de ^{13}C – BB (125 MHz, CDCl_3) de Ps-5 na região de 102,0 – 162,0 ppm.

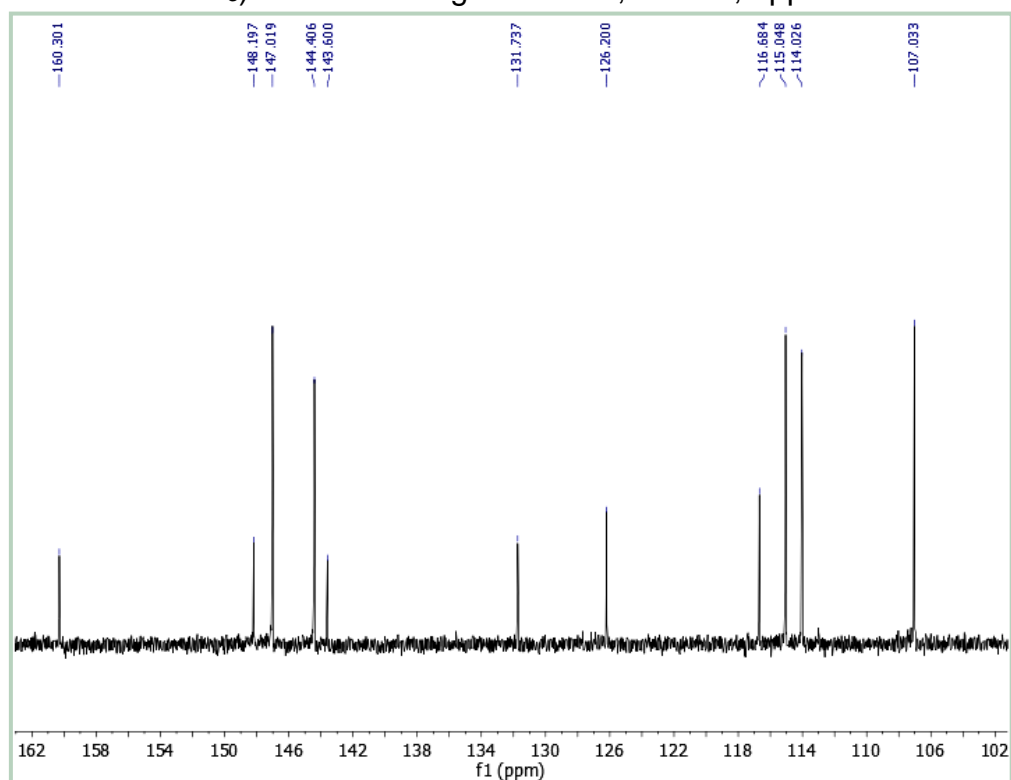


Figura 54 – Expansão do espectro de RMN de ^{13}C – BB (125 MHz, CDCl_3) de Ps-5 na região de 24,0 – 78,0 ppm.

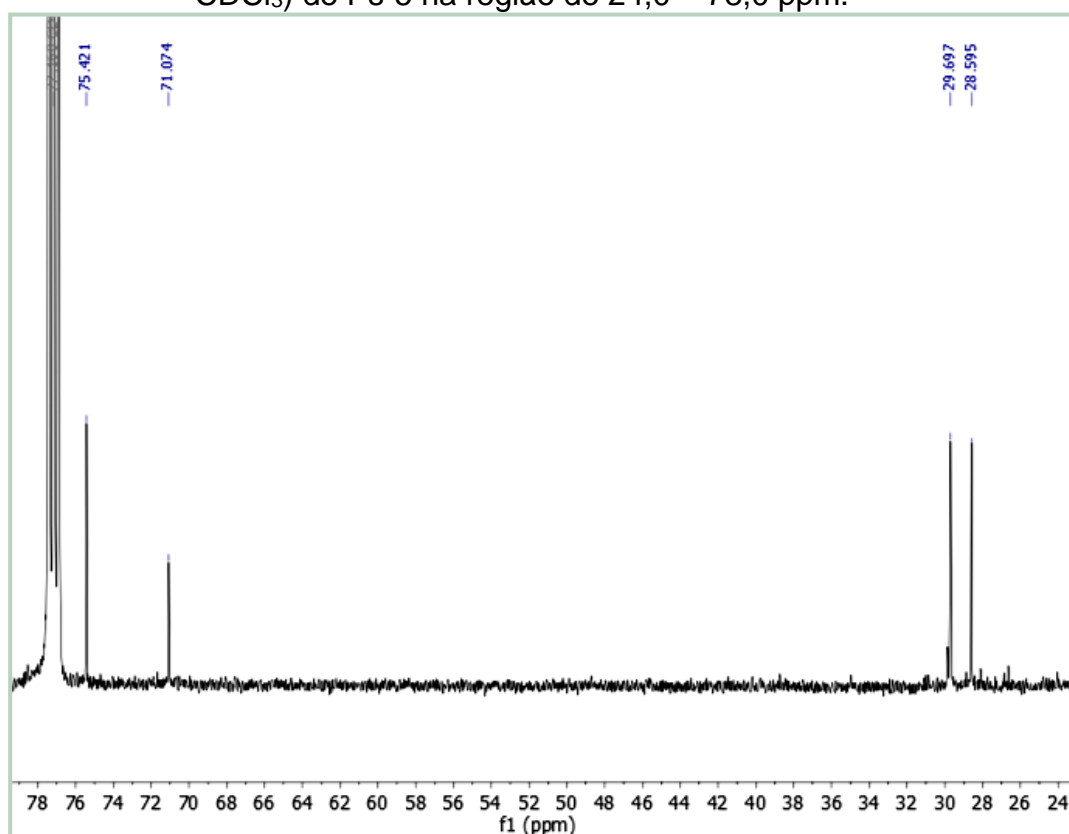


Figura 55 – Espectro de RMN-COSY ^1H - ^1H (500 MHz, CDCl_3) de Ps-5.

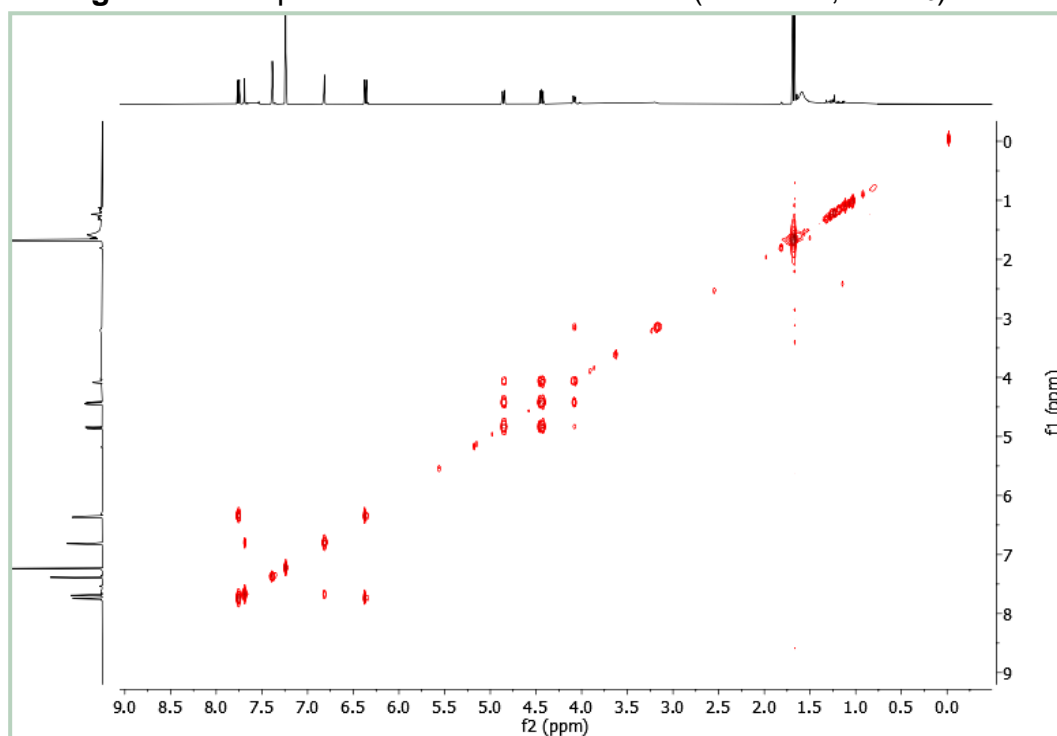


Figura 56 – Expansão do espectro de RMN-COSY ^1H - ^1H (500 MHz, CDCl_3) de Ps-5 na região de (6,20 – 7,90 ppm) x (6,00 – 8,20 ppm).

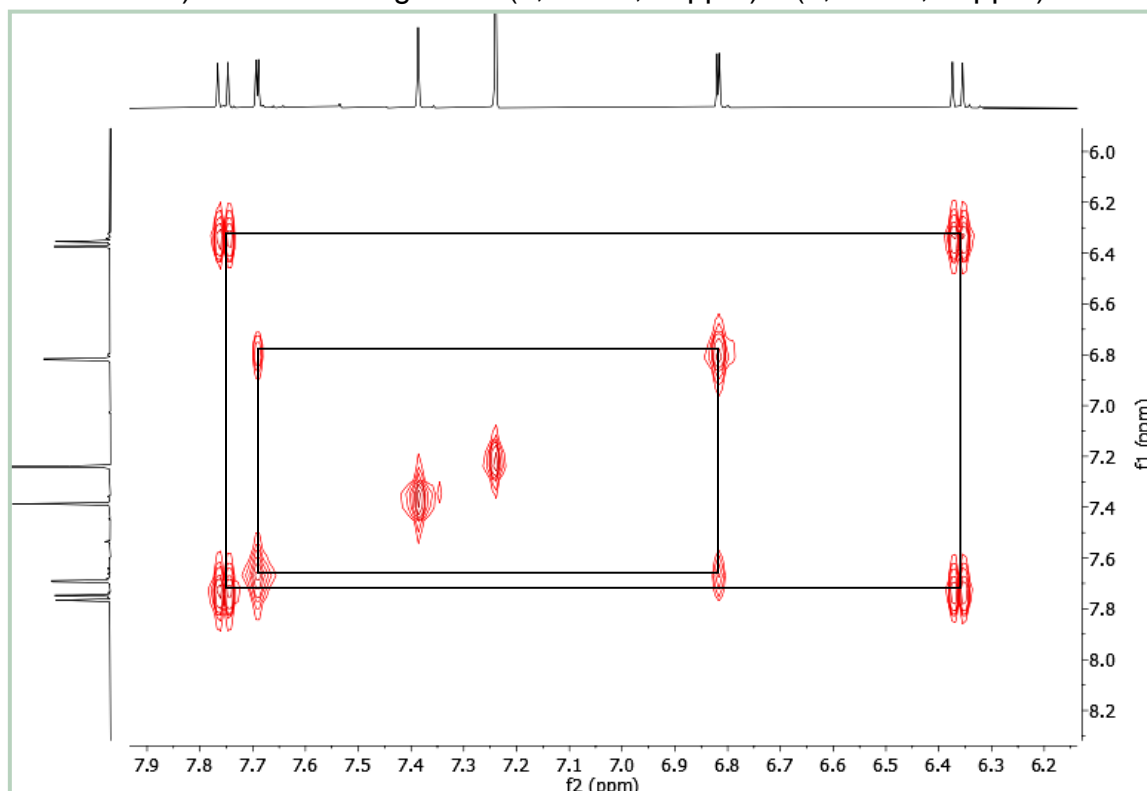


Figura 57 – Expansão do espectro de RMN-COSY ^1H - ^1H (500 MHz, CDCl_3) de Ps-5 na região de (3,80 – 5,00 ppm) x (3,60 – 5,30 ppm).

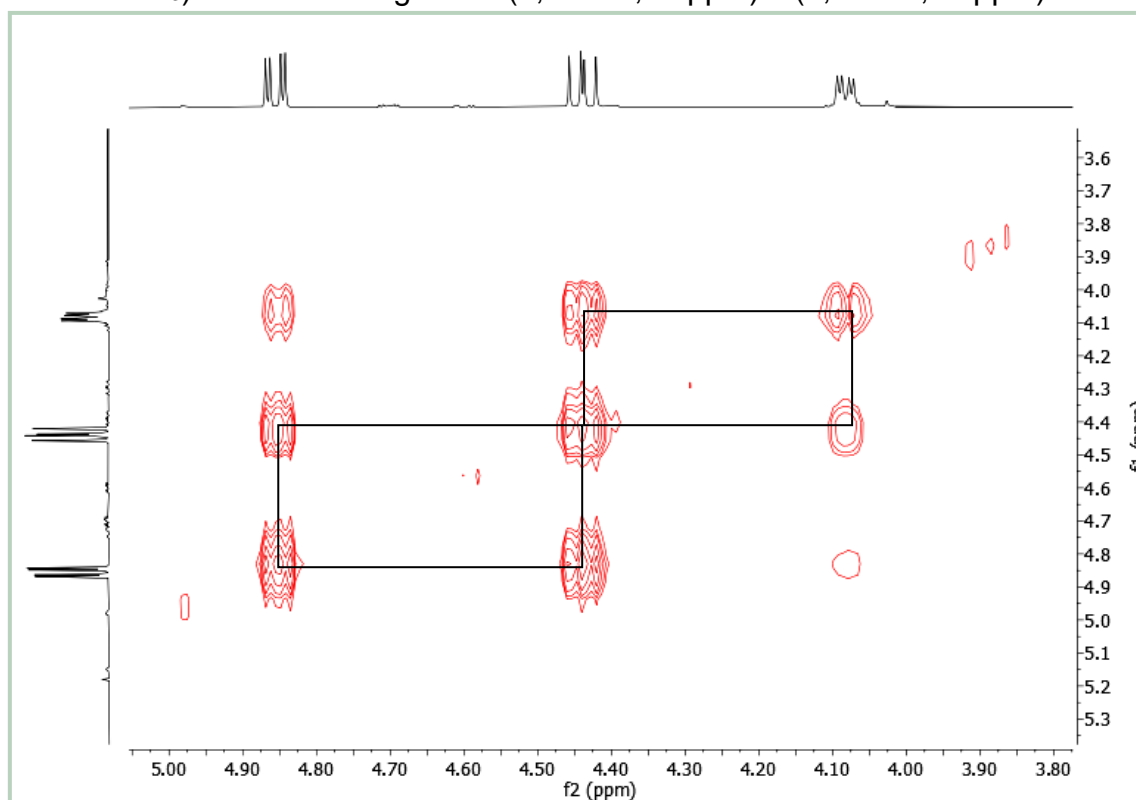


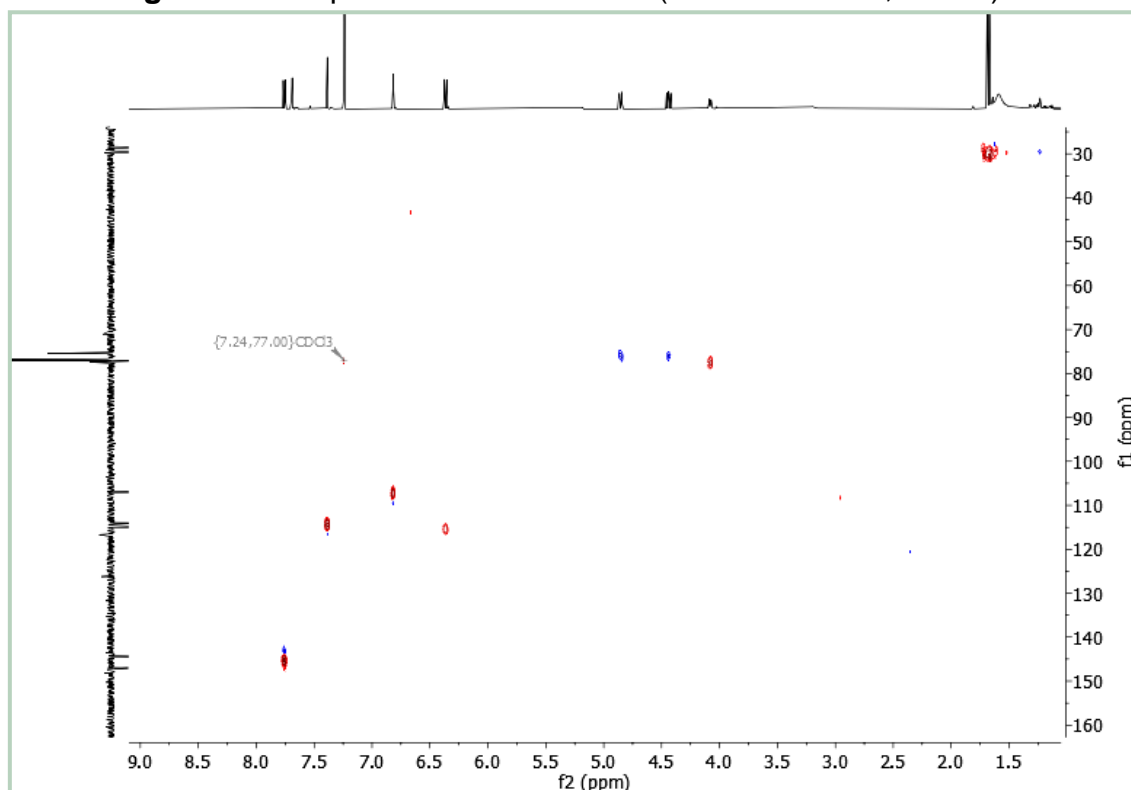
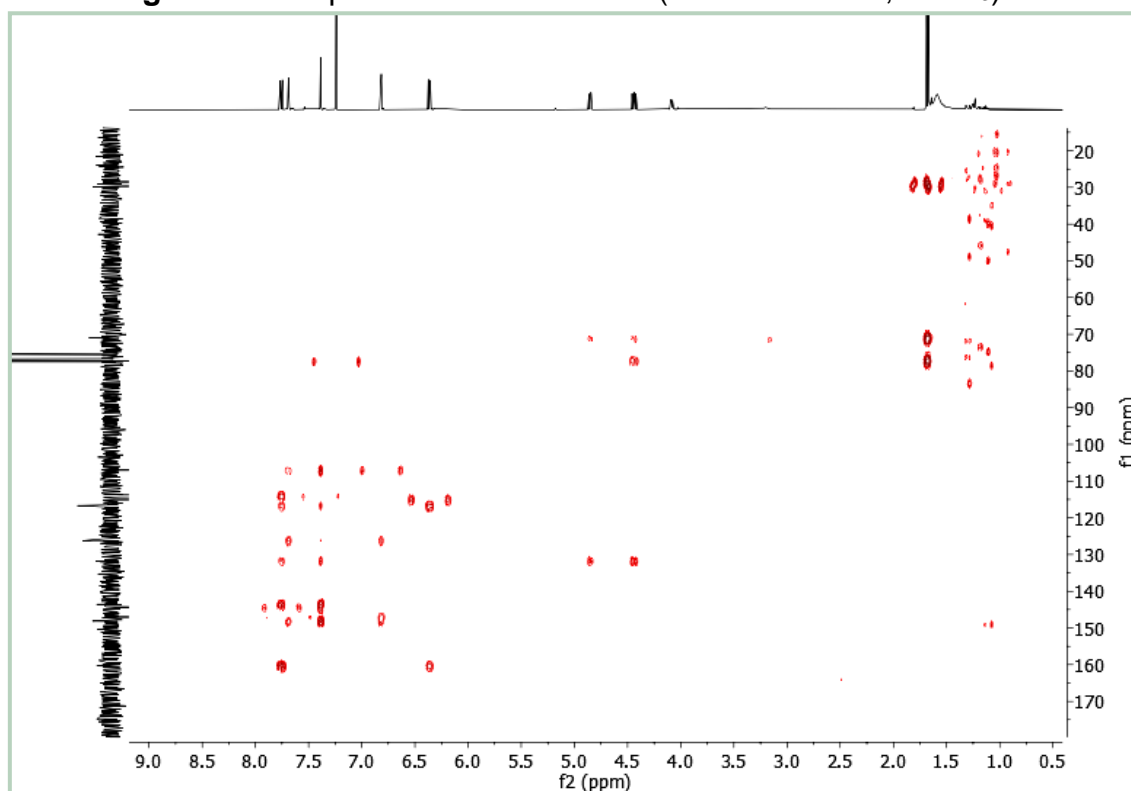
Figura 58 – Espectro de RMN-HSQC (500 e 125 MHz, CDCl_3) de Ps-5.**Figura 59** – Espectro de RMN-HMBC (500 e 125 MHz, CDCl_3) de Ps-5.

Figura 60 – Expansão do espectro de RMN-HMBC (500 e 125 MHz, CDCl_3) de Ps-5 na região de (4,50 – 8,00 ppm) x (105,0 – 165,0 ppm).

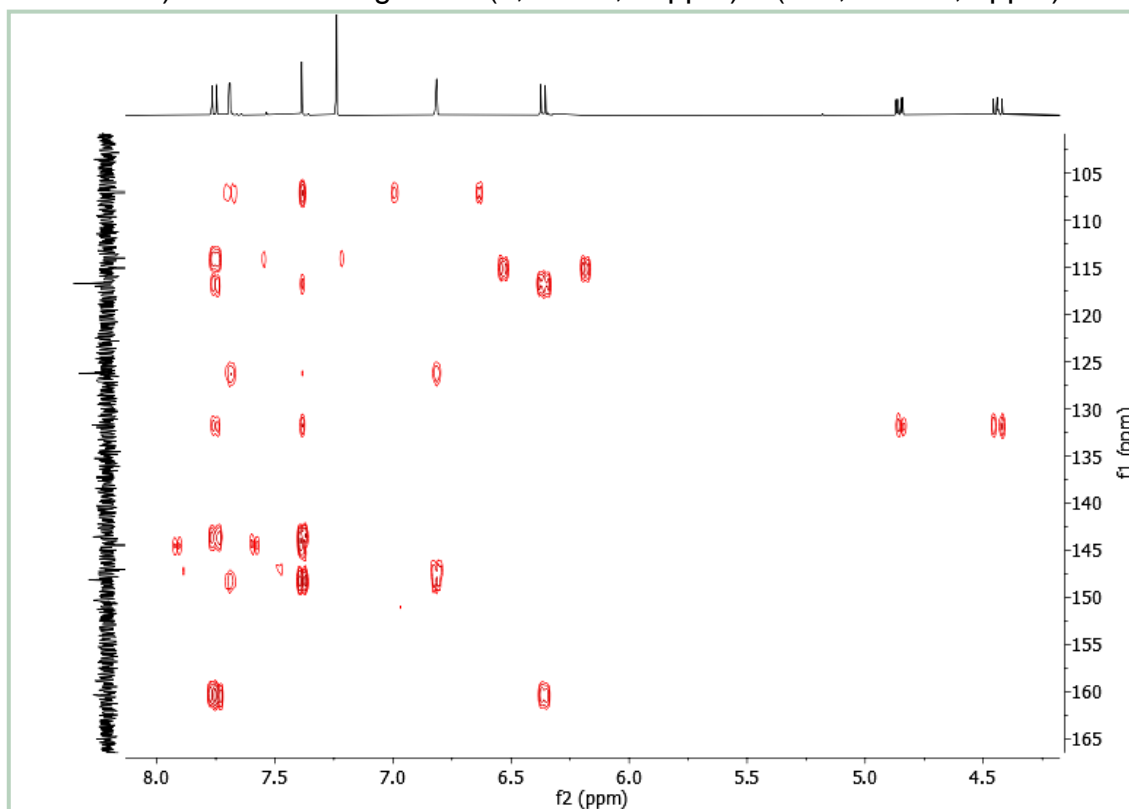
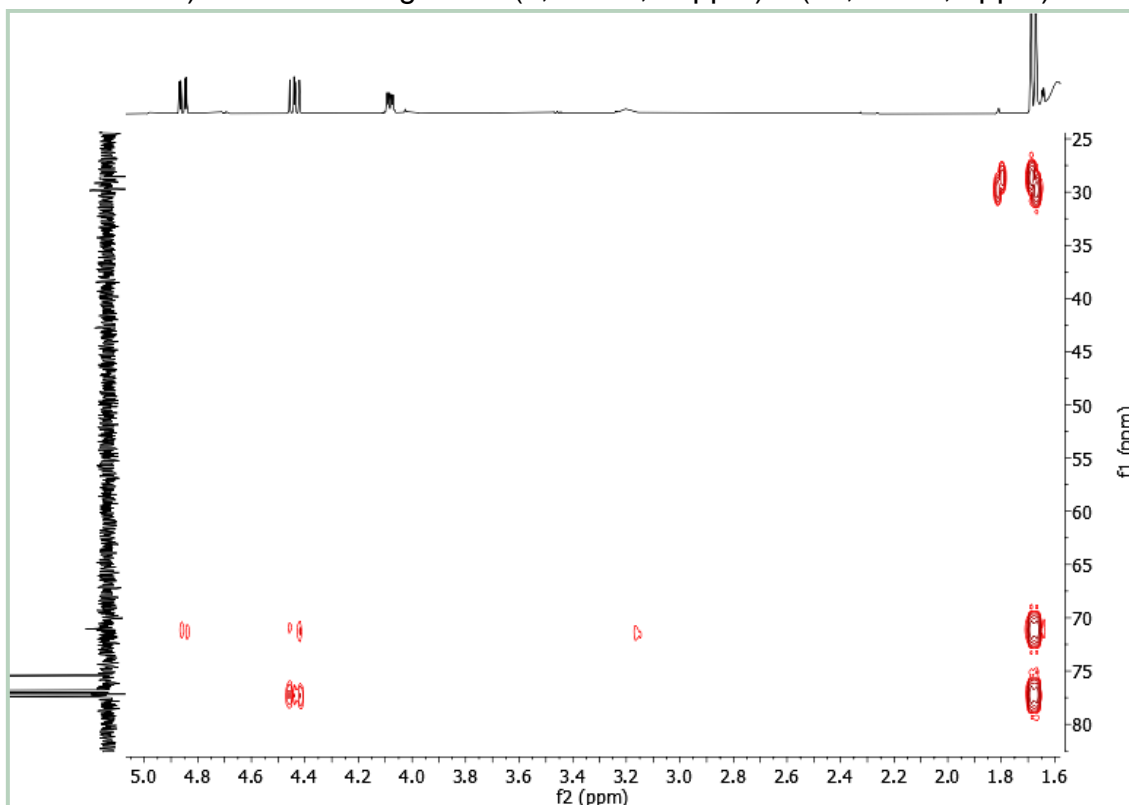


Figura 61 – Expansão do espectro de RMN-HMBC (500 e 125 MHz, CDCl_3) de Ps-5 na região de (1,60 – 5,00 ppm) x (25,0 – 80,0 ppm).



5.6 Identificação estrutural de Ps-6

A substância codificada como **Ps-6** foi obtida como um líquido oleoso amarelado, pesando 8,2 mg. O espectro de massas de alta resolução obtido por ESI-MS no modo positivo (Figura 63), mostrou o pico da molécula cationizada em m/z 355,1147 $[M+Na]^+$ compatível com a fórmula molecular $C_{18}H_{20}O_6$ (calc. 332,3520).

O espectro de RMN de 1H , obtido a 500 MHz em $CDCl_3$ (Figura 64), apresentou um conjunto de sinais característicos de furanocumarina sendo estes em δ_H 6,35 (1H, d, $J = 9,6$ Hz), δ_H 7,74 (1H, d, $J = 9,6$ Hz), 7,68 (1H, d, $J = 2,2$ Hz), δ_H 6,80 (1H, d, $J = 2,2$ Hz) e δ_H 7,36 (1H, s), os quais foram atribuídos a H-3, H-4, H-2', H-3' e H-5, respectivamente (Figuras 65 e 66). Estes acoplamentos foram confirmados pelo espectro de correlação homonuclear COSY (Figura 73 e 74), que mostrou correlações entre H-3 e H-4, e entre H-2' e H-3'.

Também foi possível observar um conjunto de sinais referentes a uma prenila, sendo dois duplo dupletos em δ_H 4,38 (1H, dd, $J = 10,3$ e $8,2$ Hz) e δ_H 4,72 (1H, dd, $J = 10,3$ e $3,1$ Hz) atribuídos aos hidrogênios geminados Ha-2'' e Hb-2'', respectivamente, acoplando entre si com $J = 10,3$ e acoplando com o um hidrogênio vicinal H-3'' em δ_H 4,00 (1H, dd, $J = 8,2$ e $3,1$ Hz) (Figura 67). Isso corroborou as correlações apresentadas no espectro de COSY, de Ha-2'' com Hb-2'' e com H-3'' (Figura 75). A inserção do grupo prenilóxi em C-8 sugerida pelo deslocamento químico de H-4 ($< \delta_H$ 8,00 ppm), foi confirmada pelas correlações vistas no mapa de correlação HMBC entre os hidrogênios Ha/b-2'' com C-8 a três ligações de distância (3J).

Além disso, foram observados dois simpletos com integral para três hidrogênios cada em δ_H 1,25 (3H, s) e δ_H 1,26 (3H, s) atribuídos às duas metilas H-5'' e H-6'' (Figura 69). Este mesmo espectro apresentou ainda três sinais sendo estes em δ_H 3,45 (1H, dq, $J = 15,6$ e $7,0$ Hz) e δ_H 3,47 (1H, dq, $J = 15,6$ e $7,0$ Hz) que se sobrepuseram, e em δ_H 1,13 (3H, dd, $J = 7,0$ e $7,0$ Hz) atribuídos, respectivamente, ao CH_2 e CH_3 de um radical etóxi (Figuras 68 e 69). A correlação entre os hidrogênios metilênicos e metílicos foram evidenciadas no espectro de COSY (Figura 76).

A presença de uma etoxila foi confirmada pelo experimento DEPT-135 (Figura 72), que apresentou um sinal em δ_c 56,7 sugestivo de carbono metilênico

oxigenado. O espectro de correlação heteronuclear HMBC (Figura 80) não apresentou muitas correlações, portanto, o mapa de correlação espacial NOESY (Figura 77 e 78) foi essencial para determinar que tal grupo conecta-se na molécula no final da prenila, em C-4''. Esse experimento mostrou que os hidrogênios oximetilênicos ($-\text{OCH}_2\text{CH}_3$) apresentam NOE com H-3'', H-5'' e H-6''.

O experimento DEPT-135 auxiliou as atribuições dos deslocamentos químicos em δ_c 75,5 a C-2'' e em δ_c 75,7 a C-3'', uma vez que as correlações apresentadas no espectro de HSQC na região de (3,95 – 4,95 ppm) x (70 – 80 ppm) (Figura 79) estavam muito próximas.

O espectro de RMN de ^{13}C -BB (125 MHz, CDCl_3) (Figura 70 e 71) apresentou apenas doze sinais, pois a maioria dos carbonos quaternários não relaxaram o suficiente devido à baixa concentração da amostra analisada. Portanto, as demais atribuições foram feitas por análise dos espectros bidimensionais e estão compiladas na Tabela 6.

Após comparação dos dados espectrais de massas e de RMN de ^1H e ^{13}C obtidos com dados da literatura, **Ps-6** foi identificada como 8-(3''-etoxi-2''-hidroxi-3''-metilbutoxi)-furo[3,2-g]cumarina ou 8-(3-etoxi-2-hidroxi-3-metilbutiloxi)-psoraleno (Figura 62) anteriormente isolada de *Clausena dunniana* (CAO *et al.*, 2020), mas relatada pela primeira vez no gênero *Pilocarpus*. Essa substância compõe, juntamente com outros compostos, uma formulação patenteada com função neuroprotetora (IP YUKI-YU, IP CHUI-FUN e GUO, 2011).

Figura 62 – Estrutura química de Ps-6
(8-(3-etoxi-2-hidroxi-3-metilbutiloxi)-psoraleno).

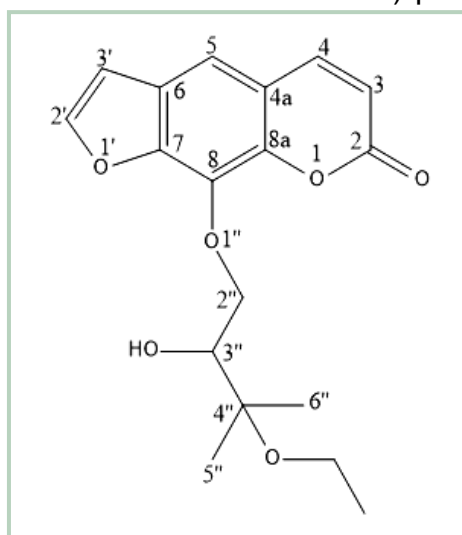


Tabela 6 – Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de Ps-6 comparados com dados da literatura para 8-(3-etoxi-2-hidroxi-3-metilbutiloxi)-psoraleno ^d.

Ps-6 ^a					8-(3-etoxi-2-hidroxi-3-metilbutiloxi)-psoraleno ^d			
Posição	HSQC		HMBC		COSY	NOESY	δ_{C}	$\delta_{\text{H}}^{\text{c}}$
	δ_{C}	$\delta_{\text{H}}^{\text{c}}$	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$	$^1\text{Hx}^1\text{H}$	$^1\text{Hx}^1\text{H}$		
2	160,2	-	H-3	H-4			160,4	-
3	114,8	6,35 (d; 9,6)			H-4	H-2	114,9	6,36 (d; 9,6)
4	144,3	7,74 (d; 9,6)			H-3		144,4	7,76 (d; 9,6)
4a	116,4	-	H-4	H-3			116,7	-
5	113,4	7,36 (s)		H-4			113,6	7,37 (s)
6	126,0	-	H-3'	H-2'			126,1	-
7	148,0	-		H-2';H-3'			148,3	-
8	131,8	-		Ha/b-2''			132,1	-
8a	143,5	-		H-4;H-5			143,6	-
2'	146,7	7,68 (d; 2,2)	H-3'		H-3'		146,9	7,69 (d; 1,9)
3'	106,8	6,80 (d; 2,2)	H-2'	H-5	H-2'		106,9	6,82 (d; 1,9)
2''	75,5	Ha 4,38 (dd;10,3 e 8,2) Hb 4,72 (dd;10,3 e 3,1)			Hb-2''; H-3'' Ha-2''		75,9	Ha 4,40 (dd; 10,3 e 7,5) Hb 4,72 (dd; 10,3 e 2,5)
3''	75,7	4,00 (dd; 8,2 e 3,1)	Ha/b-2''	H-5''; H-6''			76,0	4,00 (dd; 7,5 e 2,5)
4''	75,9	-	H-5''; H-6''	Ha/b-2''			75,6	-
5''	22,0	1,25 (s)		H-6''			22,1	1,26 (s)
6''	21,3	1,26 (s)		H-5''			21,5	1,27 (s)
- OCH₂CH₃	56,7	3,45 (dq; 15,6 e 7,0) 3,47 (dq; 15,6 e 7,0)				H-3''; H-5''; H-6''	56,9	3,47 (m)
- OCH₂CH₃	16,0	1,13 (dd; 7,0 e 7,0)					16,2	1,14 (t; 6,9)

^a500 (^1H) e 125 (^{13}C) MHz, CDCl_3 ; ^b400 (^1H) e 100 (^{13}C) MHz, CDCl_3 ; ^cEm parêntesis: multiplicidade e J em Hz; ^dCao *et al.*, 2020.

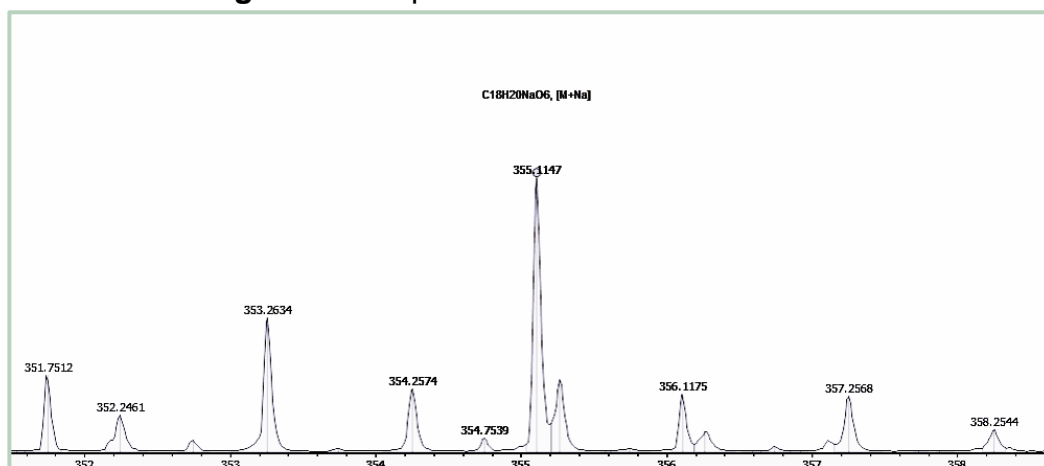
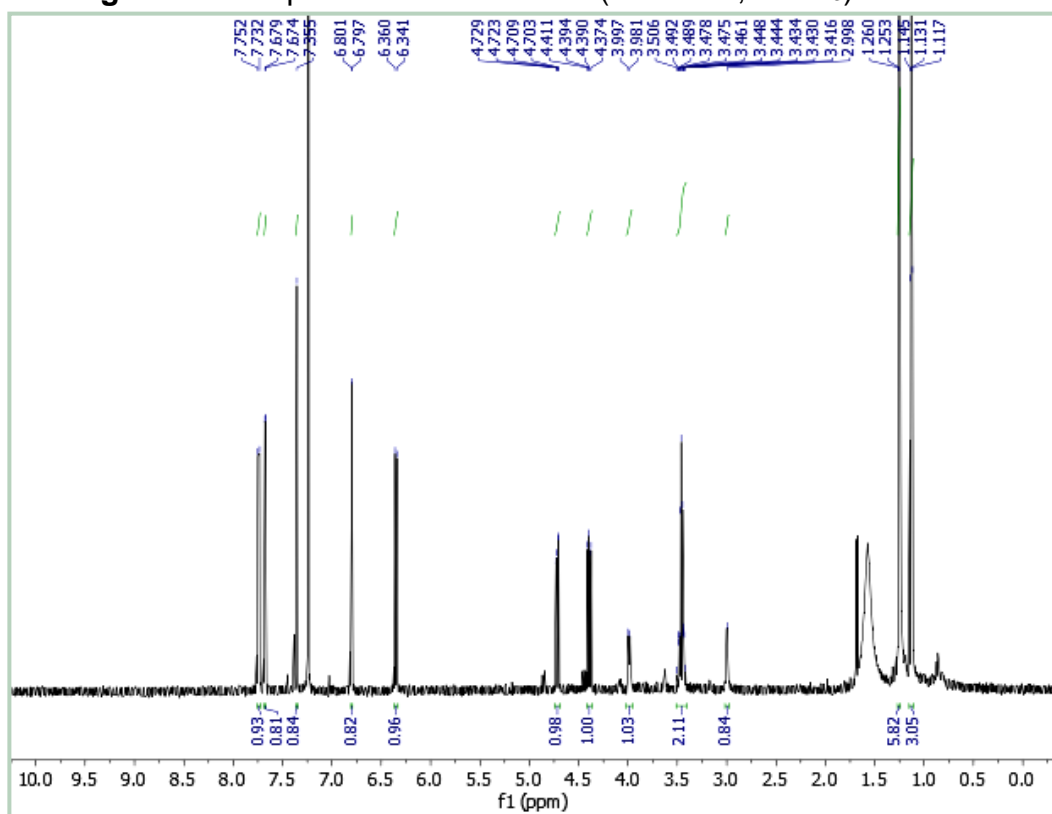
Figura 63– Espectro de HR-ESI-MS de Ps-6.**Figura 64** – Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) de Ps-6.

Figura 65 – Expansão do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) de Ps-6 na região de de 7,32 – 7,76 ppm.

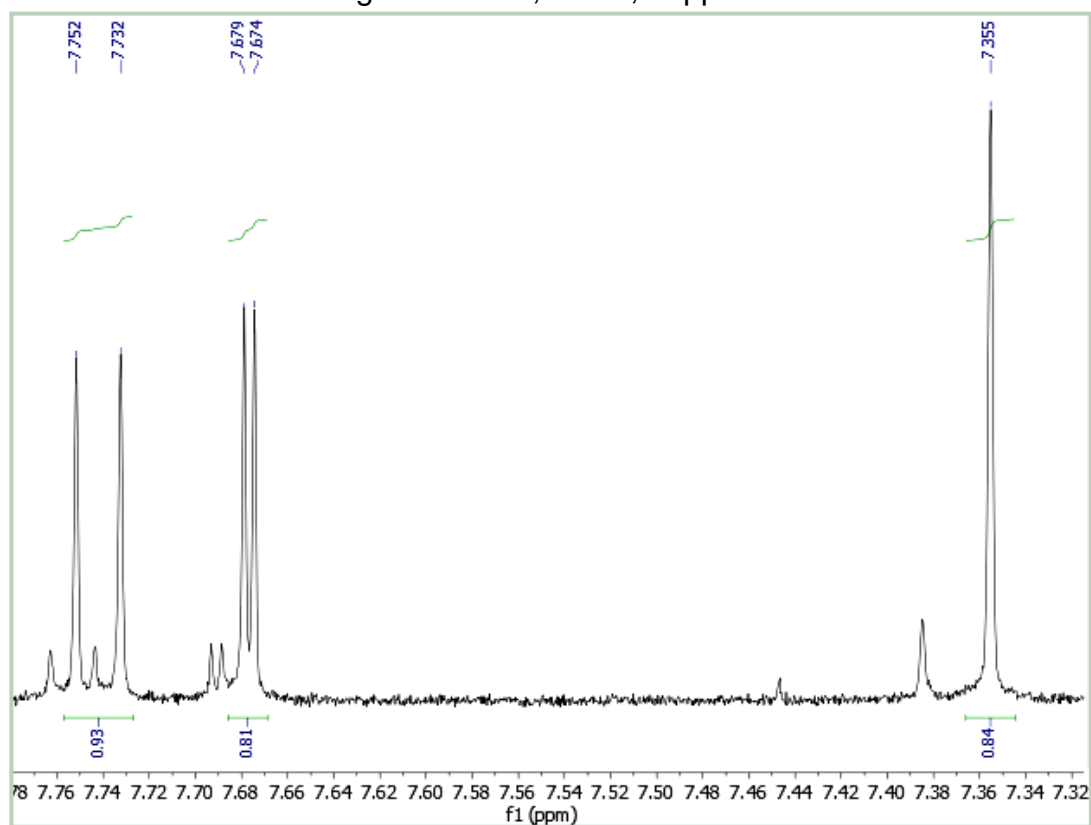


Figura 66 – Expansão do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) de Ps-6 na região de de 6,28 – 6,84 ppm.

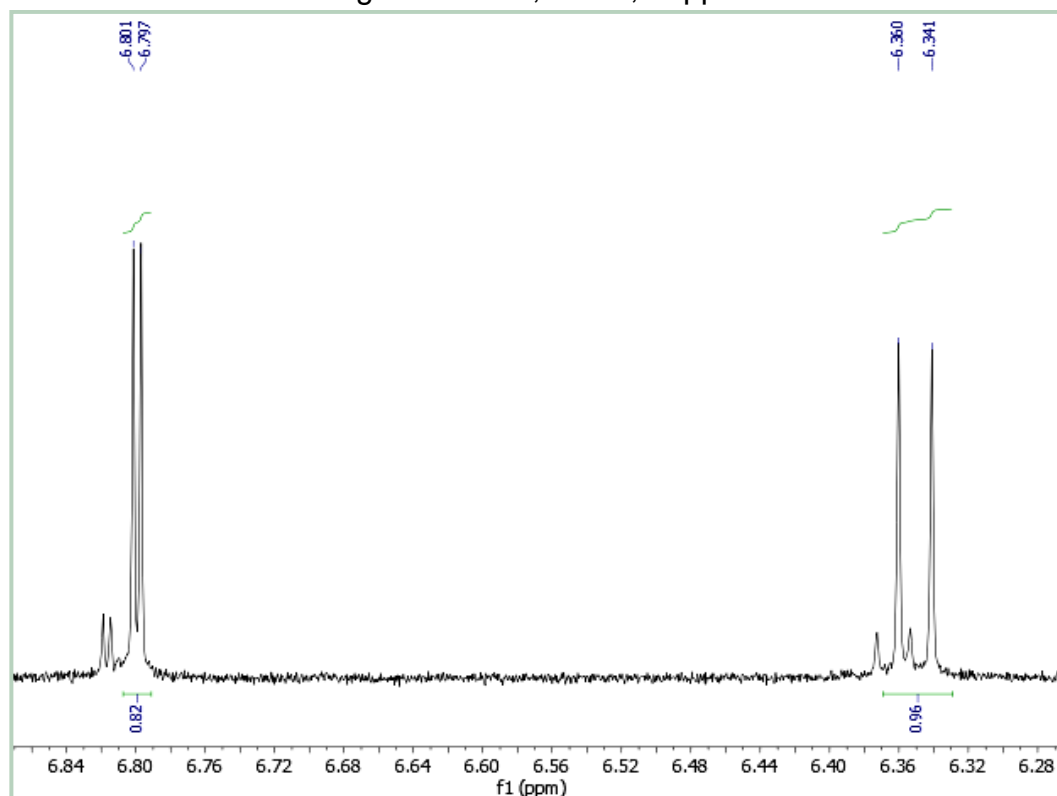


Figura 67 – Expansão do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) de Ps-6 na região de de 3,95– 4,75 ppm.

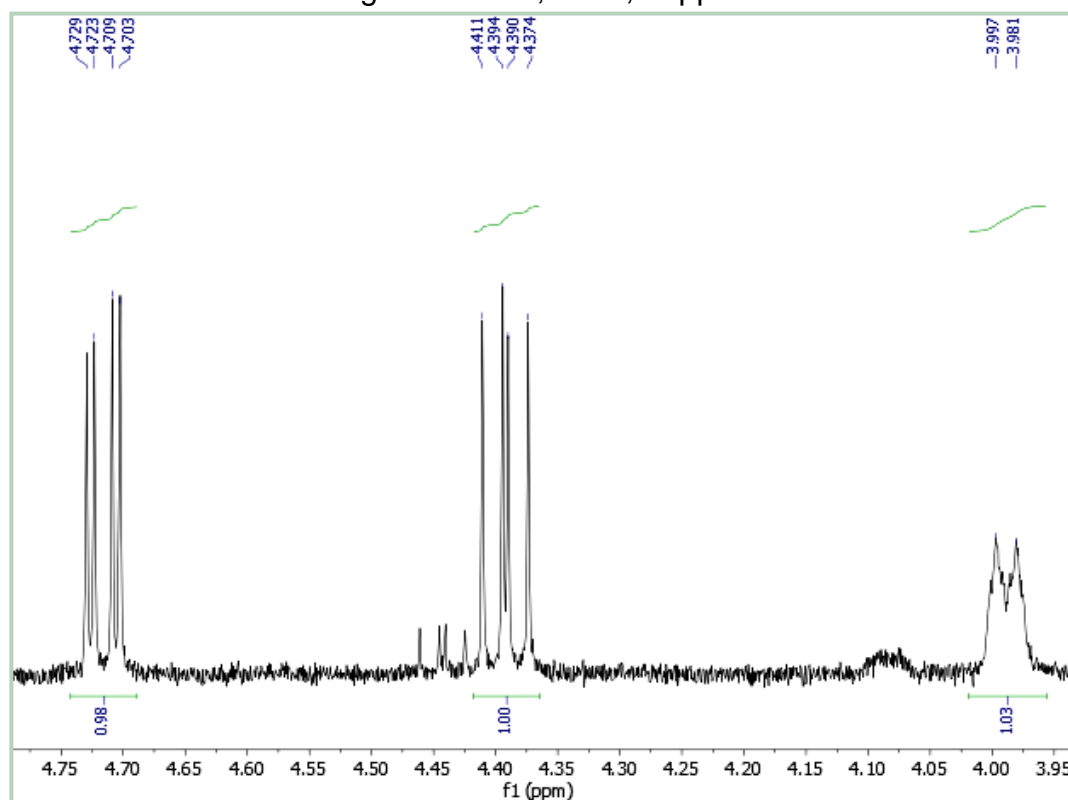


Figura 68 – Expansão do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) de Ps-6 na região de de 3,40– 3,51 ppm.

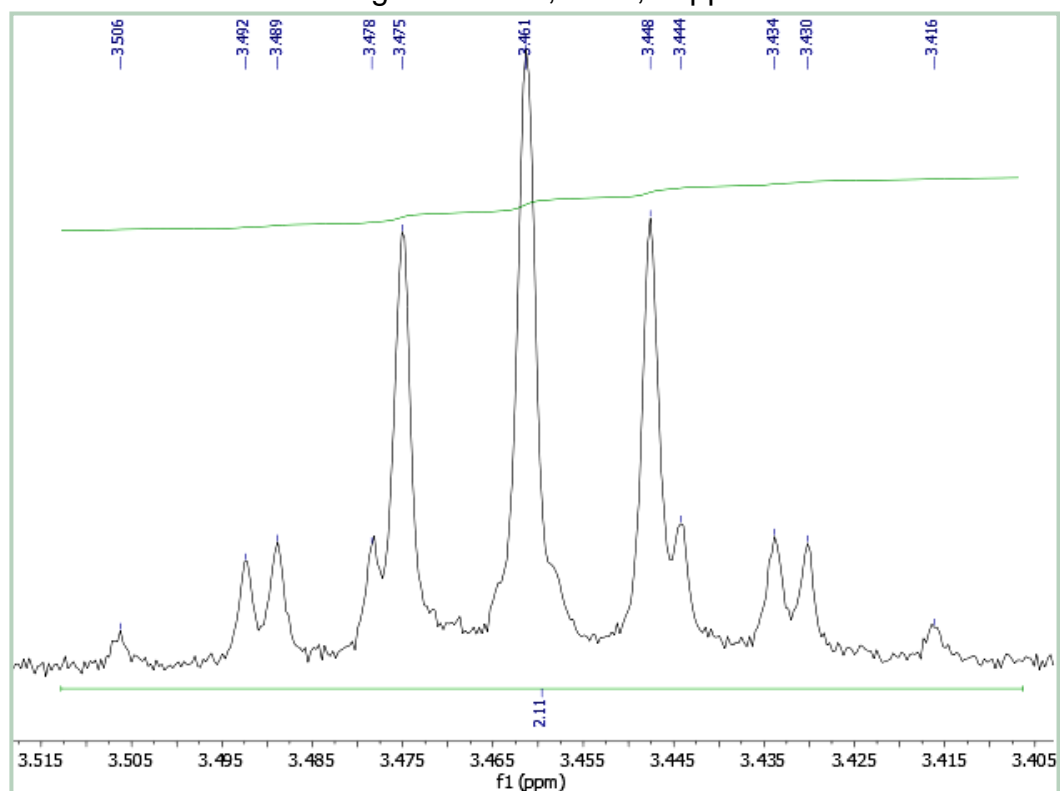


Figura 69 – Expansão do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) de Ps-6 na região de de 1,08– 1,30ppm.

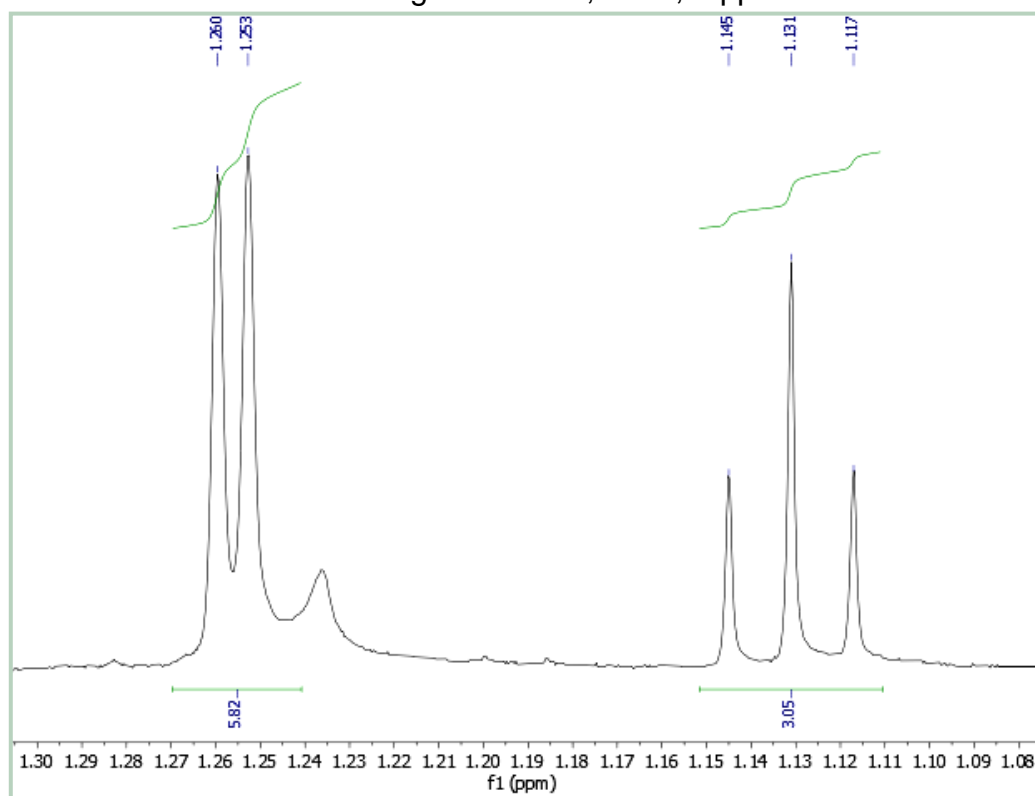


Figura 70 – Espectro de RMN de ^{13}C – BB (125 MHz, CDCl_3) de Ps-6.

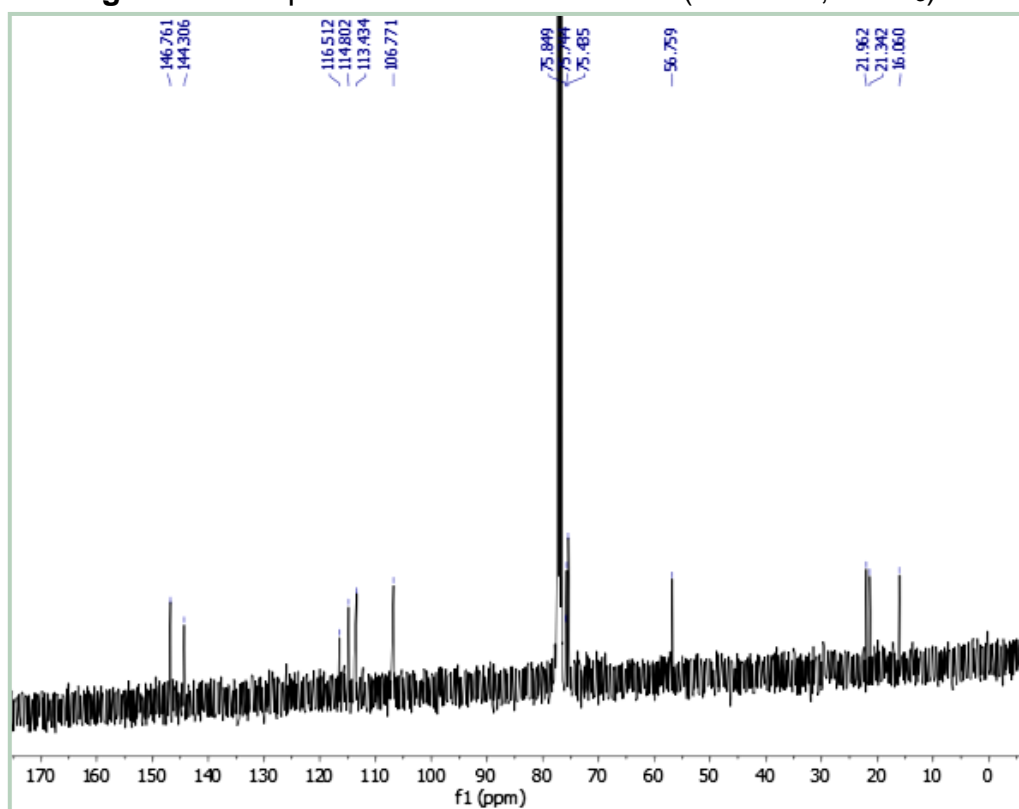


Figura 71 – Expansão do espectro de RMN de ^{13}C – BB (125 MHz, CDCl_3) de Ps-6 na região de de 74,6– 78,2 ppm.

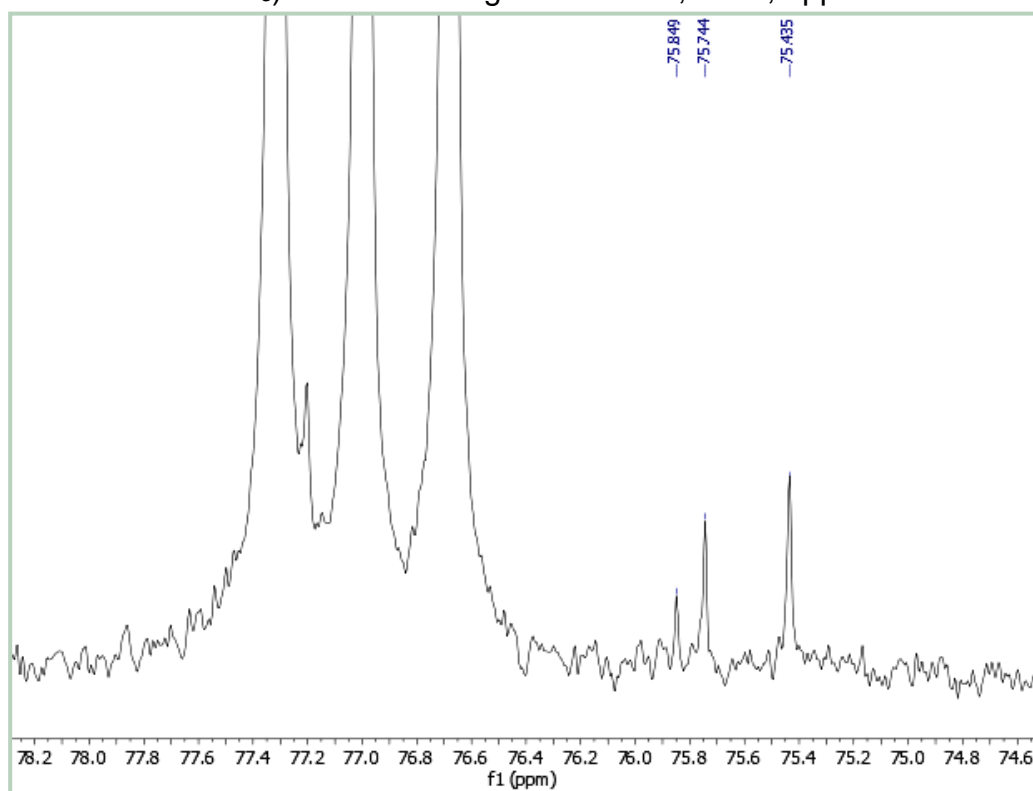


Figura 72 – Espectro de RMN de ^{13}C -DEPT 135 (125 MHz, CDCl_3) de Ps-6.

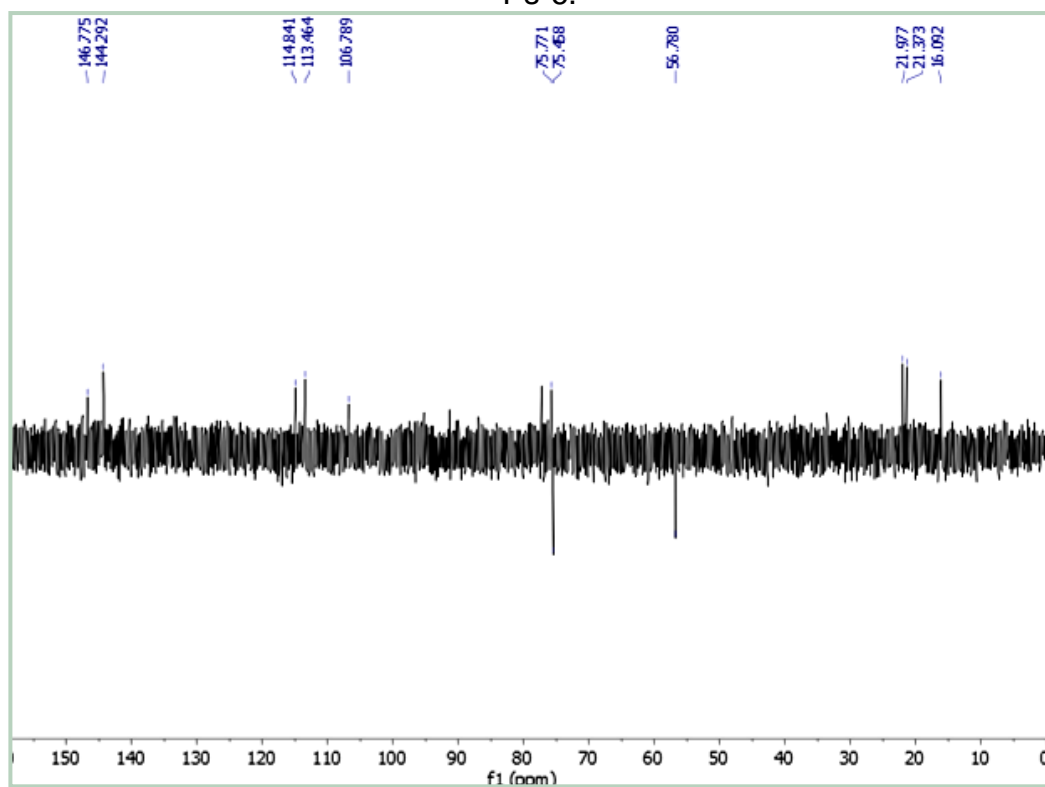


Figura 73 – Espectro de RMN-COSY ^1H - ^1H (500 MHz, CDCl_3) de Ps-6.

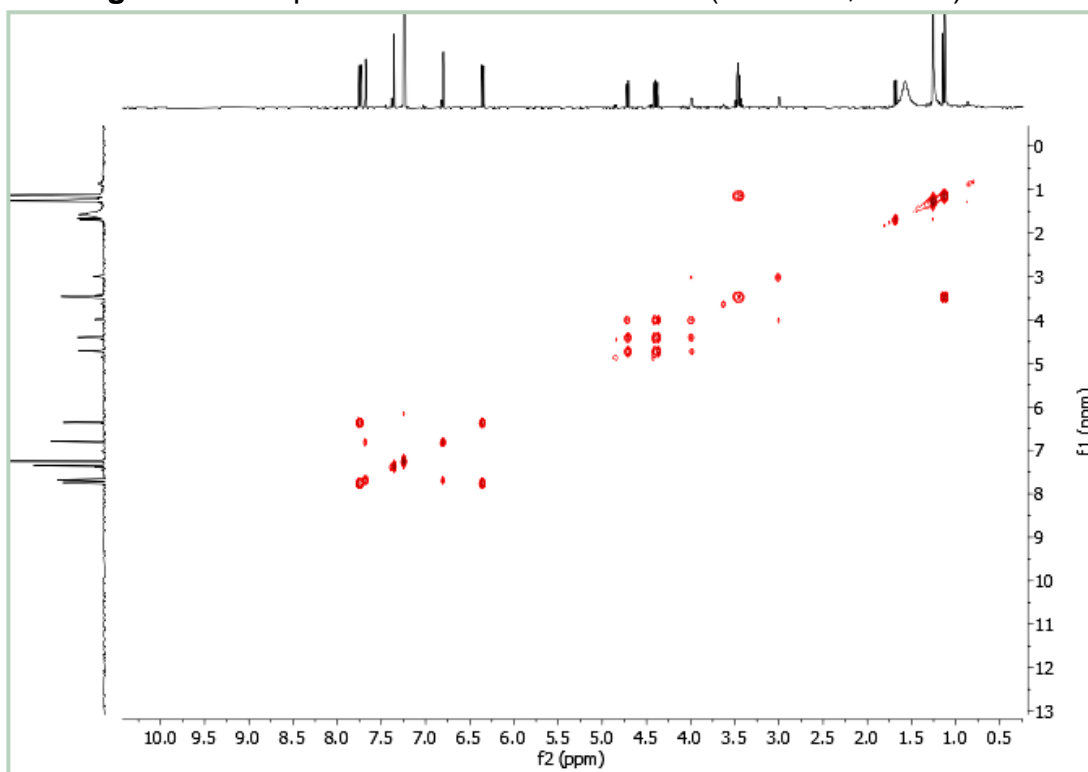


Figura 74 – Expansão do espectro de RMN-COSY ^1H - ^1H (500 MHz, CDCl_3) de Ps-6 na região de (6,20 – 8,00 ppm) x (5,80 – 8,20 ppm).

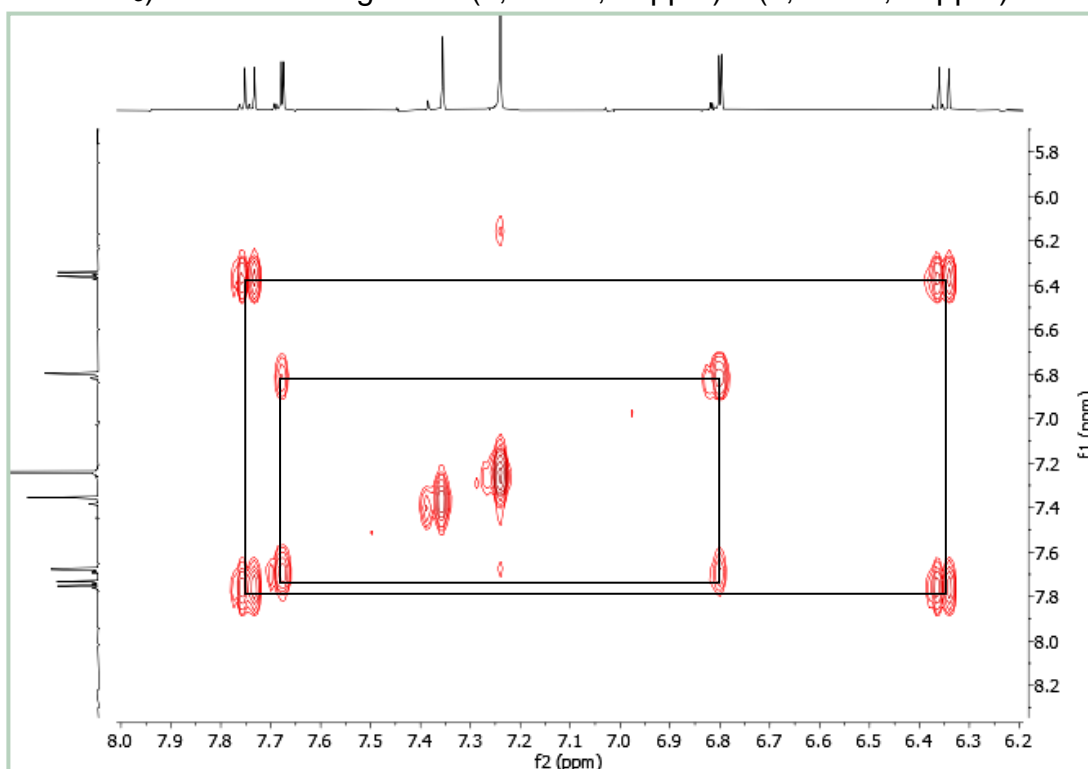


Figura 75 – Expansão do espectro de RMN-COSY ^1H - ^1H (500 MHz, CDCl_3) de Ps-6 na região de (3,80 – 4,90 ppm) x (3,50 – 5,30 ppm).

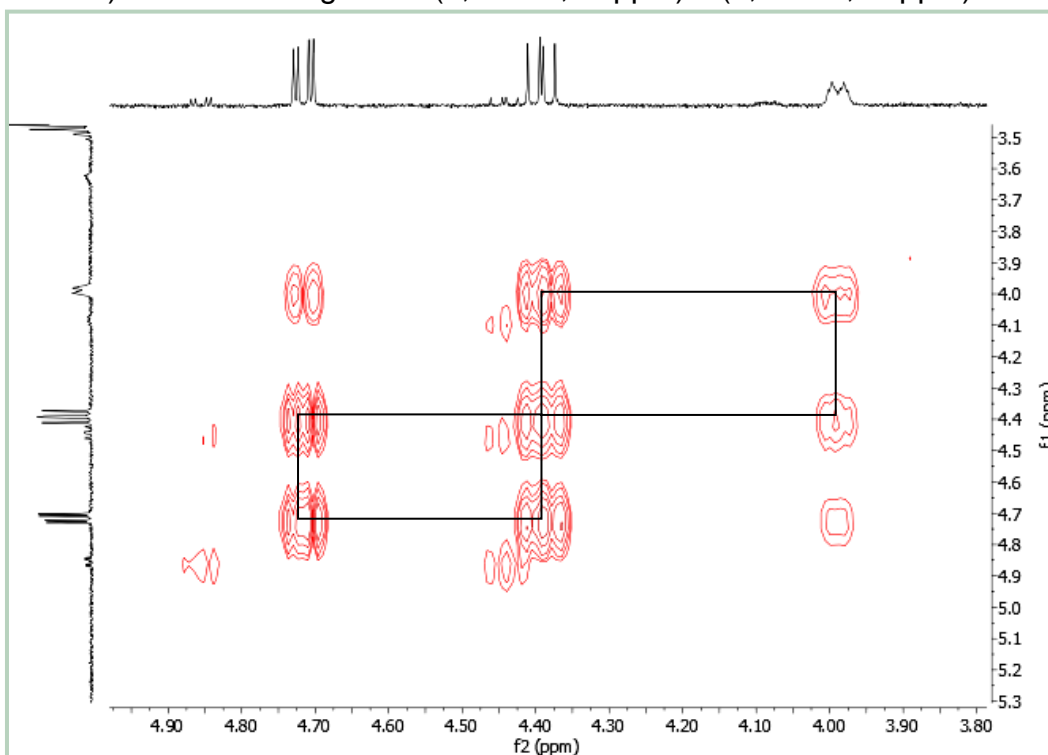


Figura 76 – Expansão do espectro de RMN-COSY ^1H - ^1H (500 MHz, CDCl_3) de Ps-6 na região de (0,80 – 4,00 ppm) x (0,5 – 4,00 ppm).

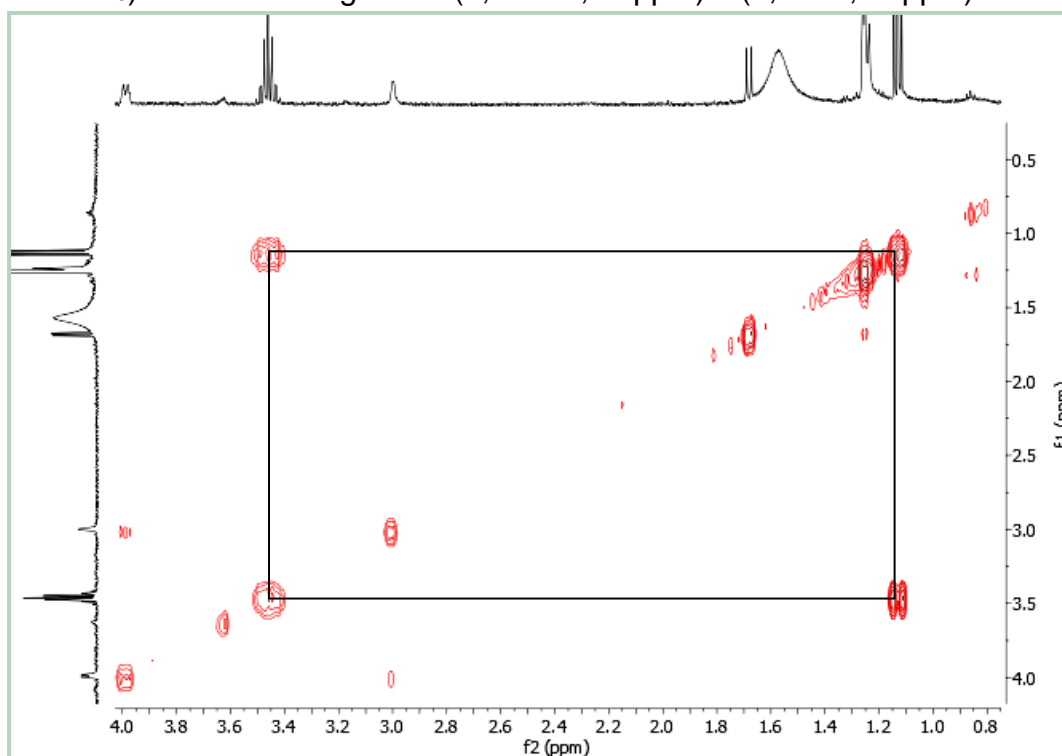


Figura 77 – Espectro de RMN-NOESY ^1H - ^1H (500 MHz, CDCl_3) de Ps-6.

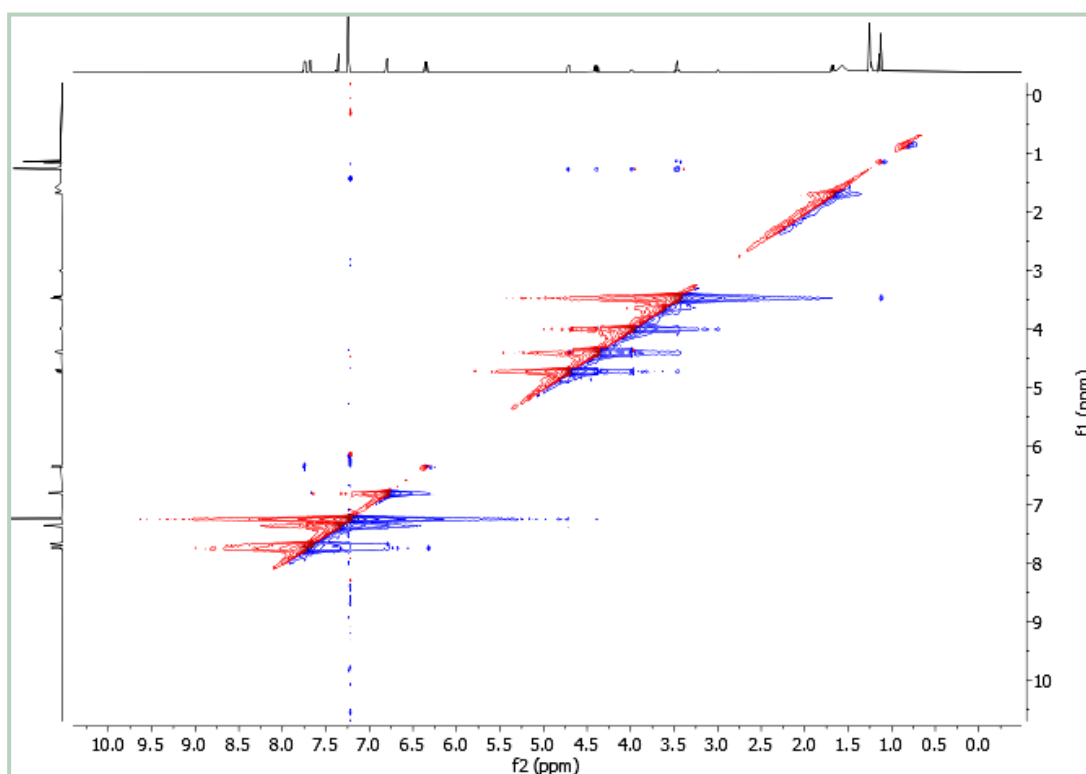


Figura 78 – Expansão do espectro de RMN-NOESY ^1H - ^1H (500 MHz, CDCl_3) de Ps-6 na região de (1,00 – 4,60 ppm) x (1,00 – 4,80 ppm).

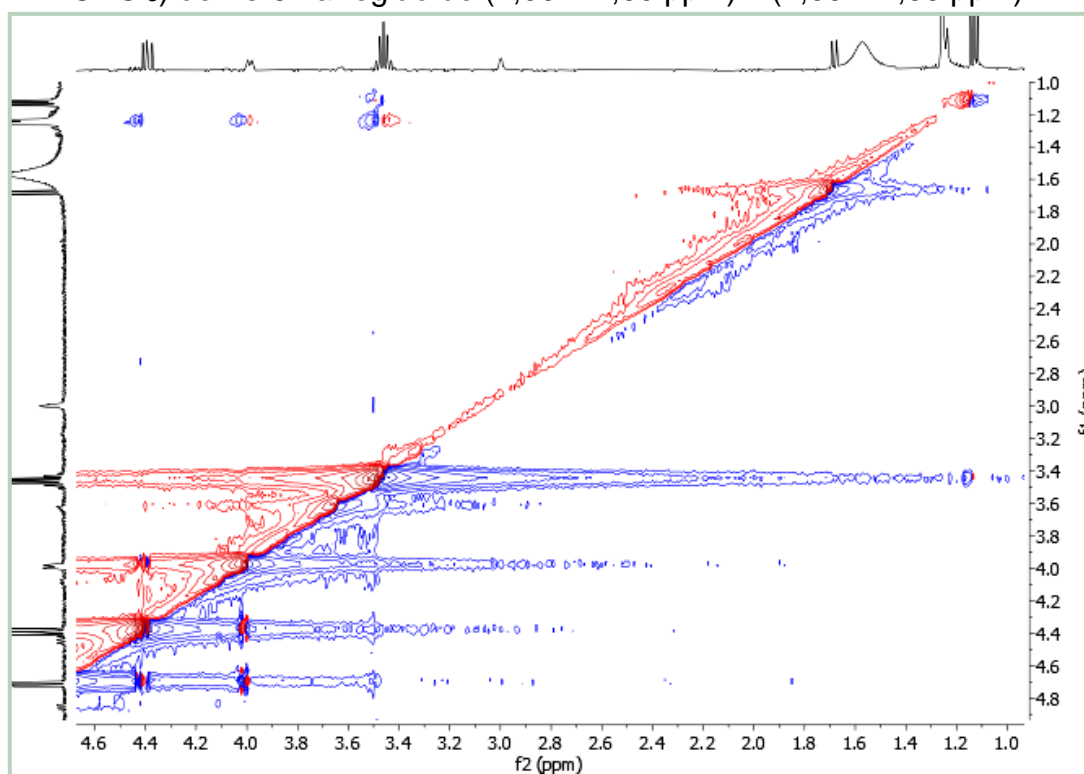


Figura 79 – Espectro de RMN-HSQC (500 e 125 MHz, CDCl_3) de Ps-6.

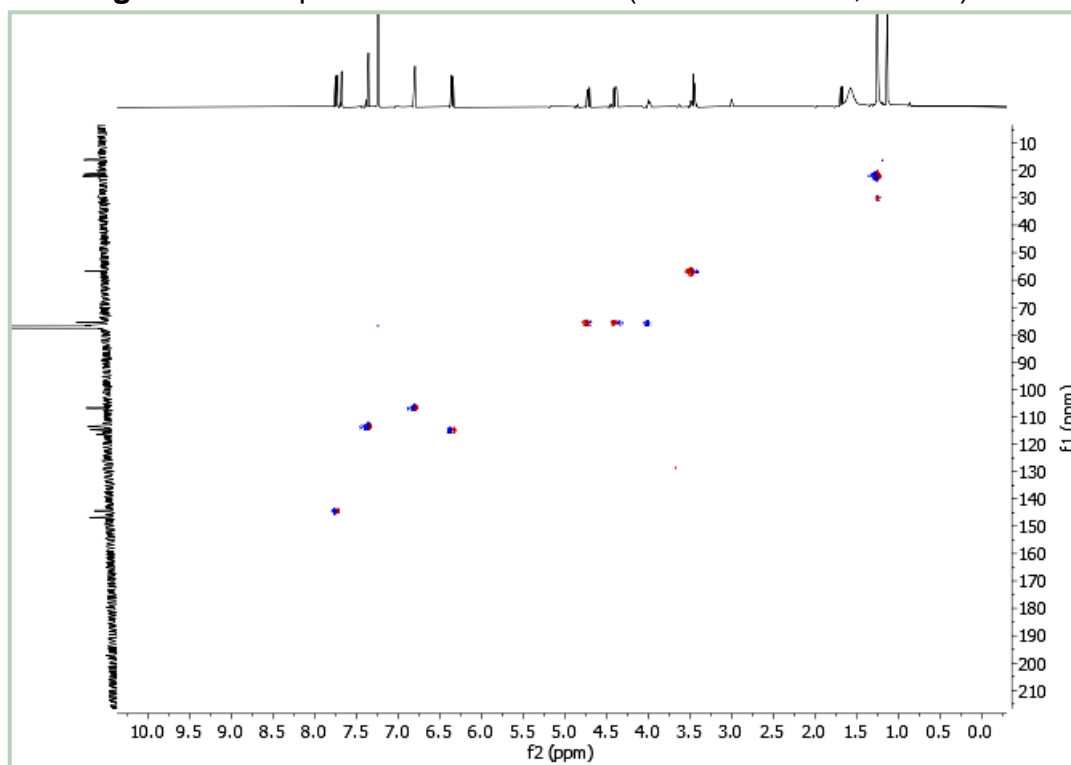


Figura 80 – Espectro de RMN-HMBC (500 e 125 MHz, CDCl_3) de Ps-6.

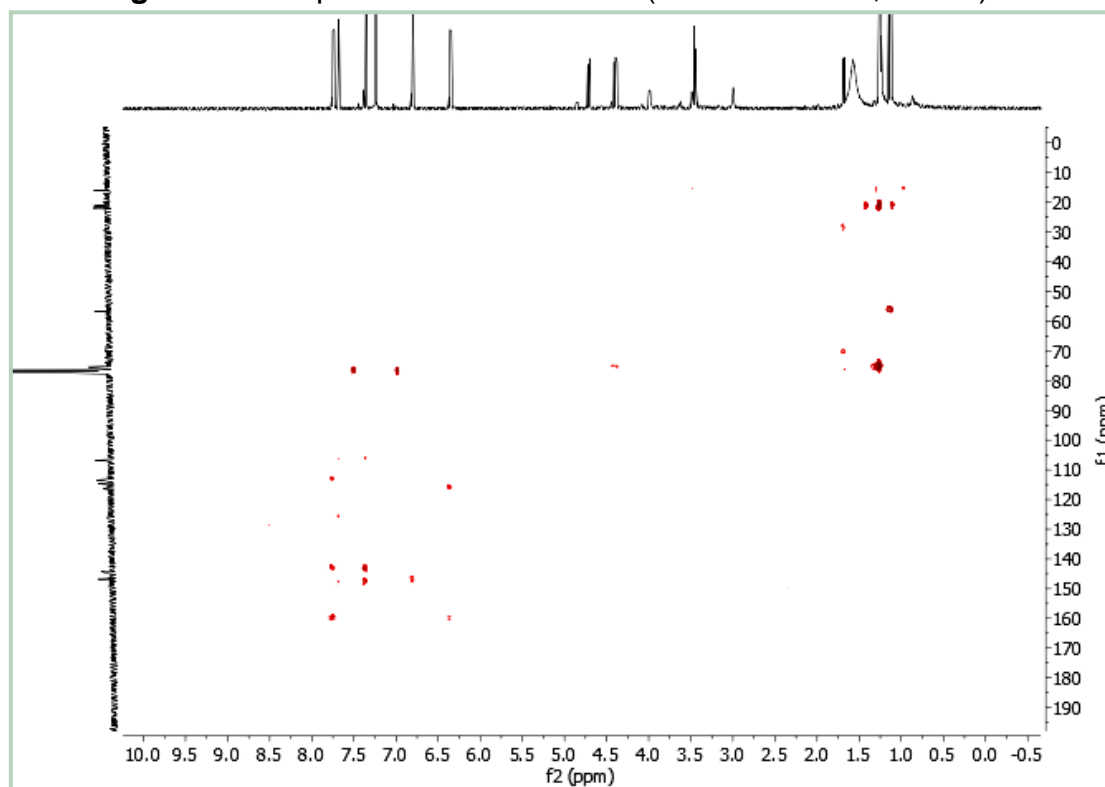


Figura 81 – Expansão do espectro de RMN-HMBC (500 e 125 MHz, CDCl_3) de Ps-6 na região de (6,30 – 7,90 ppm) x (105,0 – 160,0 ppm).

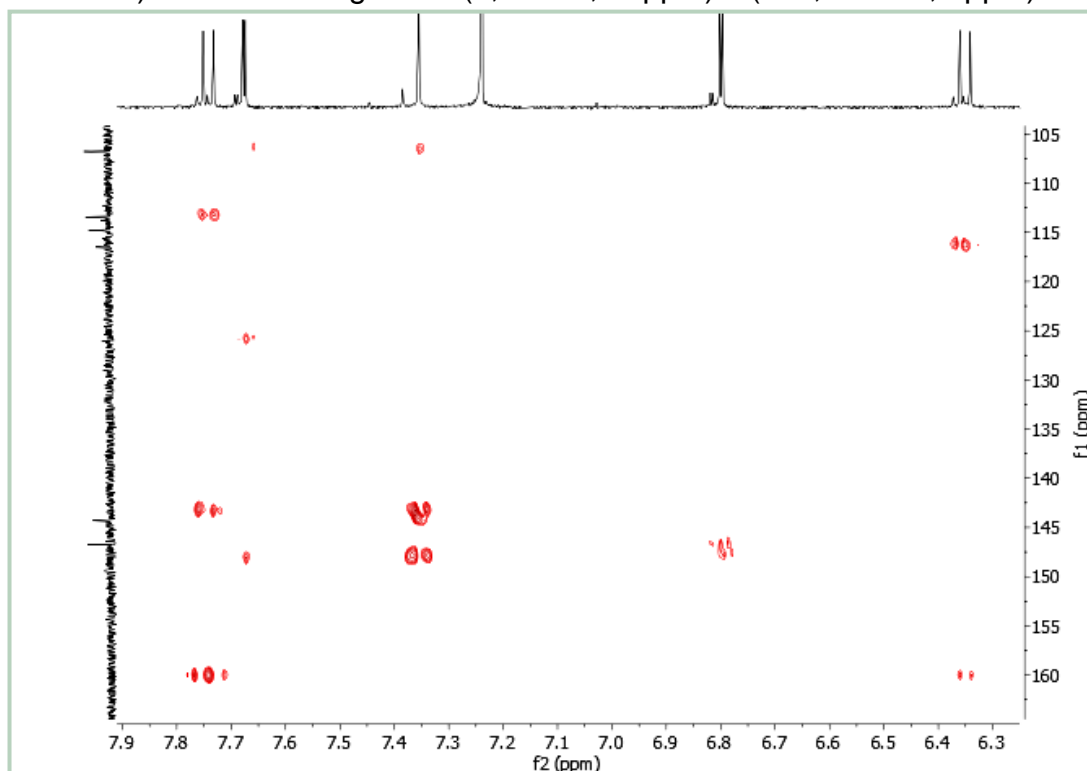
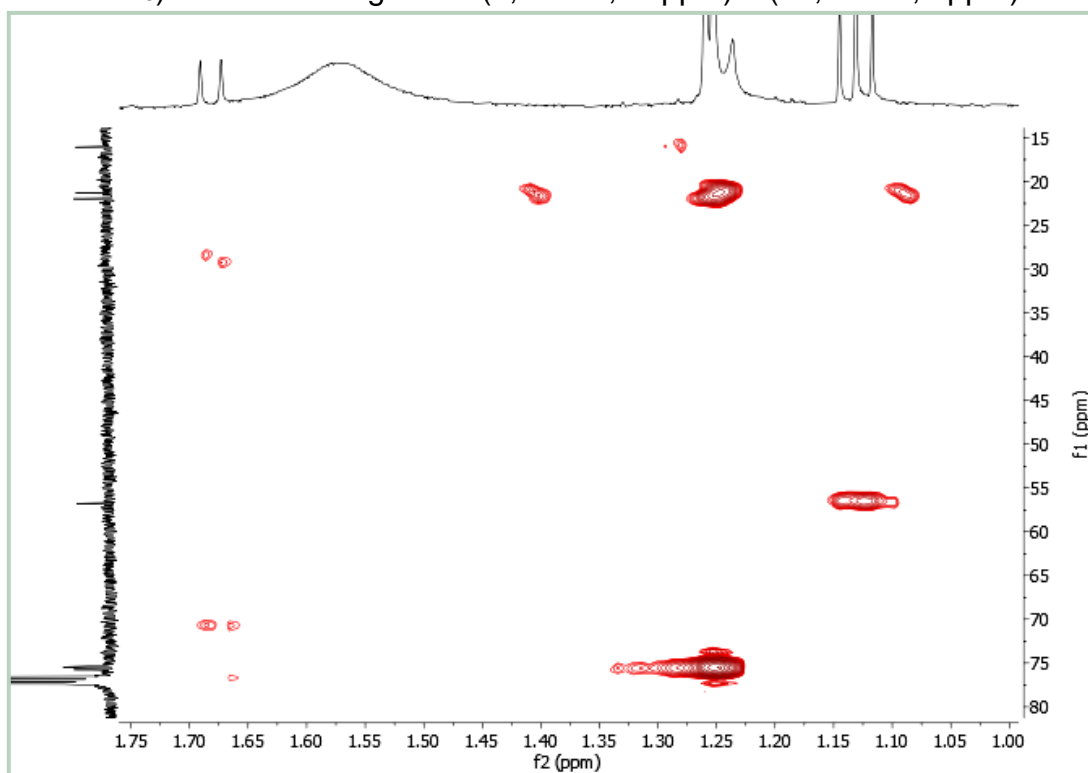


Figura 82 – Expansão do espectro de RMN-HMBC (500 e 125 MHz, CDCl_3) de Ps-6 na região de (1,00 – 1,75 ppm) x (15,0 – 80,0 ppm).



5.7 Identificação estrutural de Ps-7

A substância codificada como **Ps-7** foi obtida como um sólido amorfo amarelo, pesando 6,8 mg. O espectro de massas de alta resolução obtido por ESI-MS no modo positivo (Figura 84), mostrou o pico da molécula protonada em m/z 193,0506 $[M+H]^+$ compatível com a fórmula molecular $C_{10}H_8O_4$ (calc. 192,1700).

O espectro de RMN de 1H , obtido a 400 MHz em CD_3OD (Figura 85), apresentou um par de dupletos em δ_H 6,20 (1H, d, $J = 9,4$ Hz) e δ_H 7,85 (1H, d, $J = 9,4$ Hz), atribuídos a H-3 e H-4, respectivamente, e um par de simpletos em 6,77 (s) e δ_H 7,10 (s) caracterizando um esqueleto de cumarina simples (Figura 86). A ausência de acoplamento entre esses dois últimos sinais sugeriu que ambos estavam em posição para entre eles, portanto, foram atribuídos a H-8 e H-5, respectivamente.

Essas atribuições foram sustentadas pelo espectro de correlação homonuclear COSY (Figuras 89 e 90) que apresentou apenas correlação entre os hidrogênios H-3 e H-4. Além disso, foi observado um simpleto com integral para três hidrogênios em δ_H 3,90 (3H, s), característico de metoxila, que poderia estar localizada na posição C-6 ou C-7. De acordo com a biossíntese dessa classe de compostos, foi sugerido que o outro substituinte se tratasse de uma hidroxila.

O espectro de RMN de ^{13}C -BB (100 MHz, CD_3OD) apresentou dez sinais correspondentes a cinco carbonos não hidrogenados, sendo três oxigenados e um carbonílico, a quatro carbonos metínicos e um metoxílico (Figuras 87 e 88).

Os deslocamentos químicos de C-5 (δ_C 110,0) e C-8 (δ_C 104,0) foram atribuídos pelas correlações diretas observadas no espectro de HSQC (Figura 93) desses carbonos com H-5 e H-8, respectivamente. A posição dos substituintes foi confirmada após comparação dos dados de RMN obtidos com os dados da literatura, e da análise das correlações do experimento de HMBC (Figuras 94-96) onde foram observadas correlações fortes de H-5 com C-4, C-7 e C-8a a três ligações de distância, e com C-6 a duas ligações. Bem como, correlações entre H-8 e C-6, C-7 e C-8a. Além disso, H-5 apresentou NOE com os hidrogênios metoxílicos (Figuras 91 e 92). Dessa forma, foi possível concluir que o grupo $-OH$ estava inserido em C-7 e o grupo $-OCH_3$ em C-6.

Após comparação dos dados espectrais obtidos de massas, RMN de ^1H e ^{13}C com dados da literatura, **Ps-7** foi identificada como 6-metoxi-7-hidroxicumarina ou escopoletina (Figura 83) (QURADHA *et al.*, 2021), isolada pela primeira vez da espécie *P. spicatus*, mas anteriormente relatada em outras espécies do gênero, como *Pilocarpus grandiflorus* (SOUZA *et al.*, 2005), *Pilocarpus alvaradoi* (MARIN *et al.*, 2018) e *Pilocarpus pennatifolius* (ALLEVATO *et al.*, 2019). Escopoletina possui atividade antimicrobiana, antifúngica (GNONLONFIN, SANNI e BRIMER, 2012), anti-inflamatória (LI *et al.*, 2020), antioxidante e ação atenuante da resistência à insulina (HAE-IN LEE e MI-KYUNG LEE, 2015).

Figura 83 – Estrutura química de Ps-7 (escopoletina).

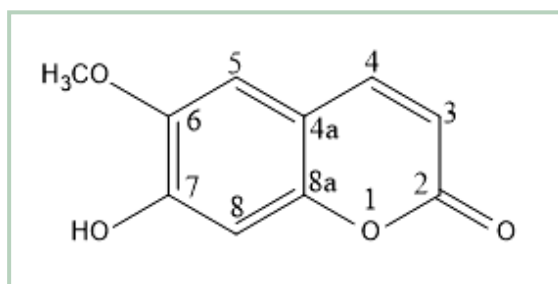


Figura 84 – Espectro de HR-ESI-MS de Ps-7.

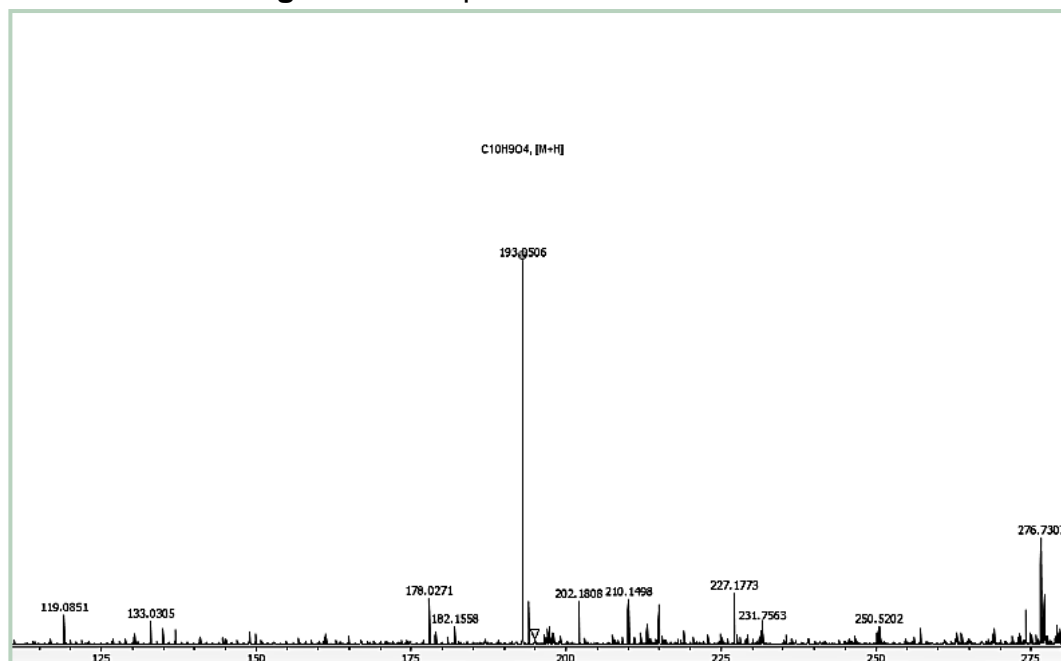


Tabela 7 – Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de Ps-7 comparados com dados da literatura para a Escopoletina^d.

Ps-7 ^a					Escopoletina ^d	
Posição	HSQC		HMBC		COSY	$\delta_{\text{H}}^{\text{c}}$
	δ_{C}	$\delta_{\text{H}}^{\text{c}}$	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$	$^1\text{Hx}^1\text{H}$	
2	164,1	-	H-3	H-4		-
3	112,6	6,20 (d; 9,4)			H-4	6,21 (d; 9,4)
4	146,1	7,85 (d; 9,4)		H-5	H-3	7,86 (d; 9,4)
4a	112,5	-	H-4	H-3		-
5	110,0	7,10 (s)		H-4		7,10 (s)
6	147,1	-	H-5	H-8; -OCH ₃		-
7	153,0	-	H-8	H-5		-
8	104,0	6,77 (s)				6,77 (s)
8a	151,4	-	H-8	H-4; H-5		-
-OCH ₃	56,8	3,90 (s)				3,90 (s)

^a400 (^1H) e 100 (^{13}C) MHz, CD_3OD ; ^b500 (^1H) e 125 (^{13}C) MHz, CD_3OD ; ^cEm parêntesis: multiplicidade e J em Hz; ^dQuradha *et al.*, 2020.

Figura 85 – Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CD_3OD) de Ps-7.

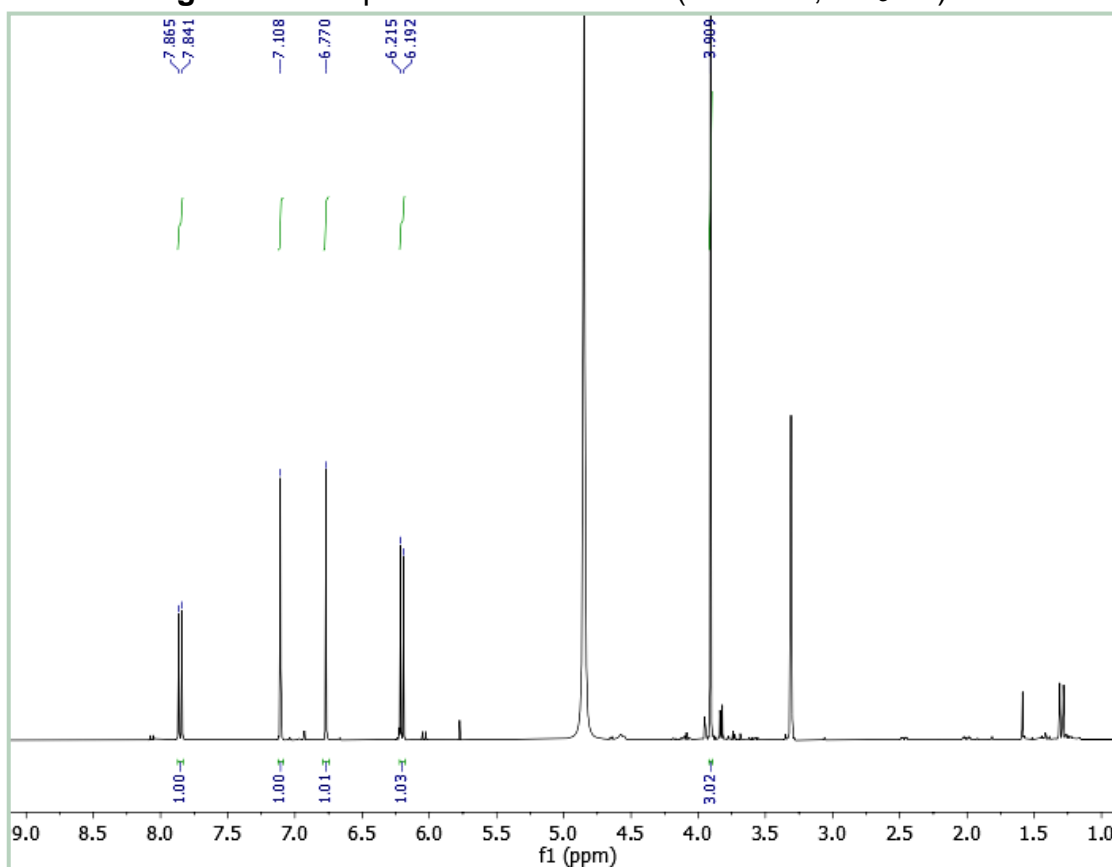


Figura 86 – Expansão do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CD_3OD) de Ps-7 na região de 6,00 – 8,00 ppm.

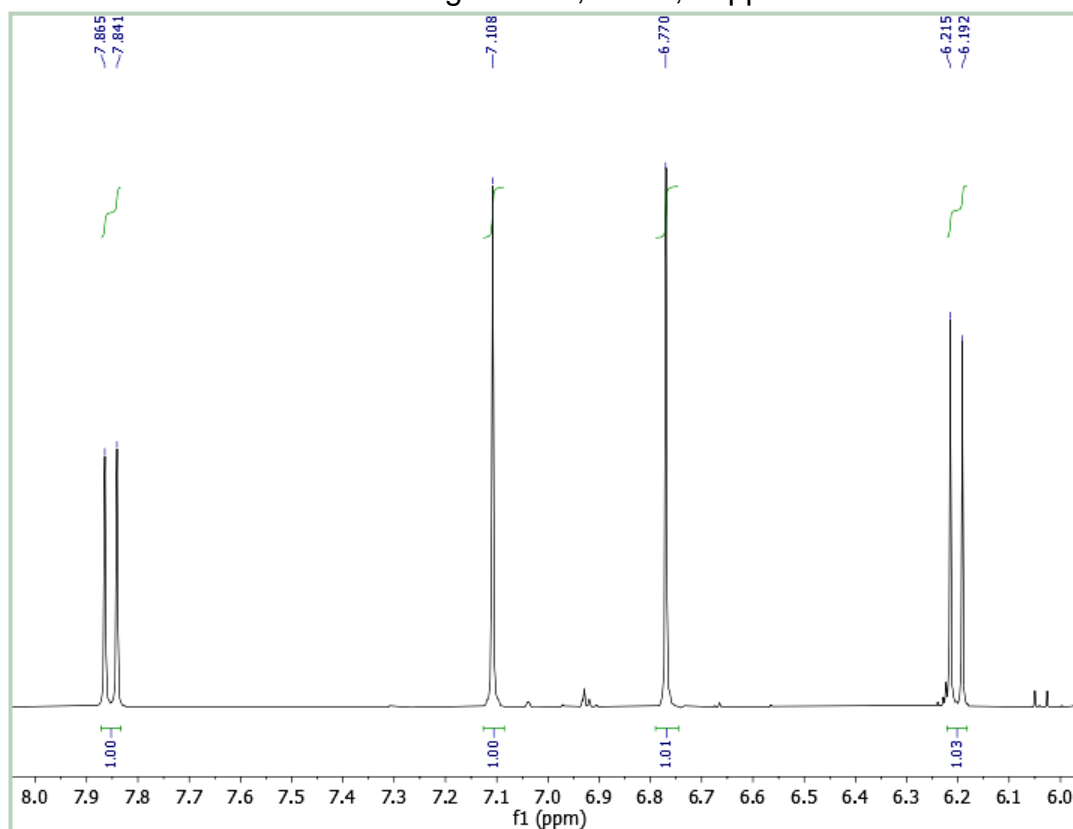


Figura 87 – Espectro de RMN de ^{13}C – BB (100 MHz, CD_3OD) de Ps-7.

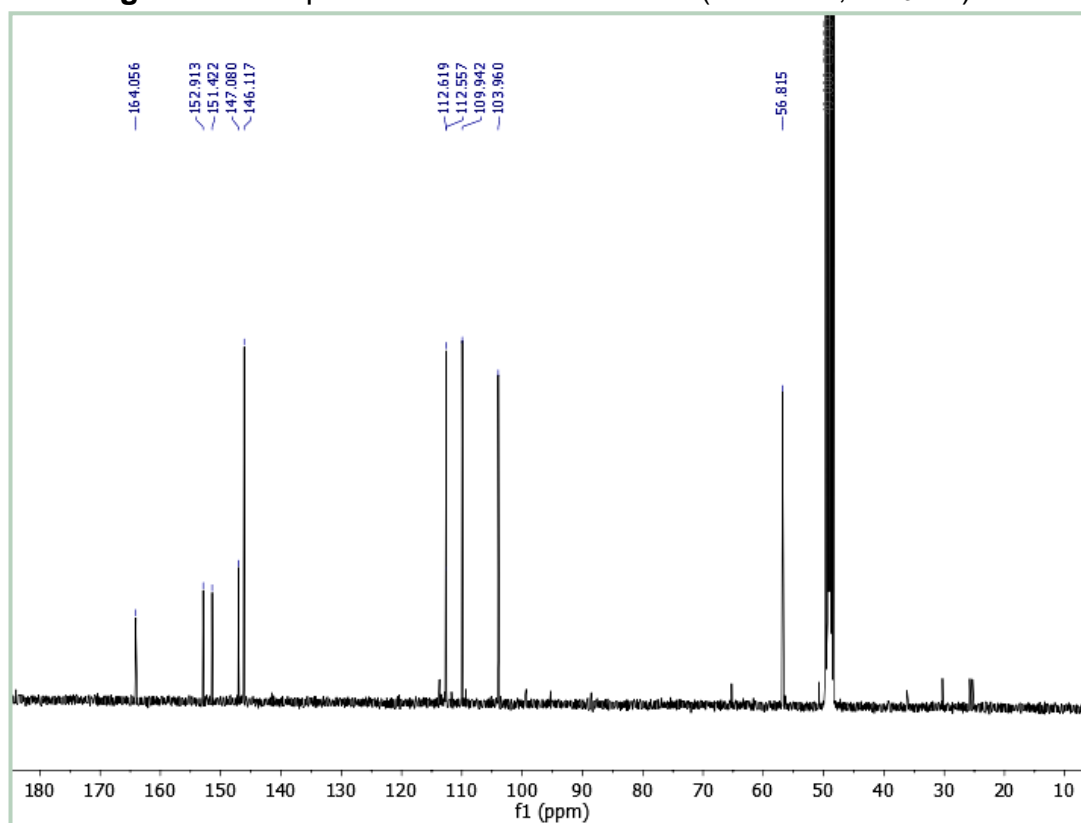


Figura 88 – Expansão do espectro de RMN de ^{13}C – BB (100 MHz, CD_3OD) de Ps-7 na região de de 104,0– 113,0 ppm.

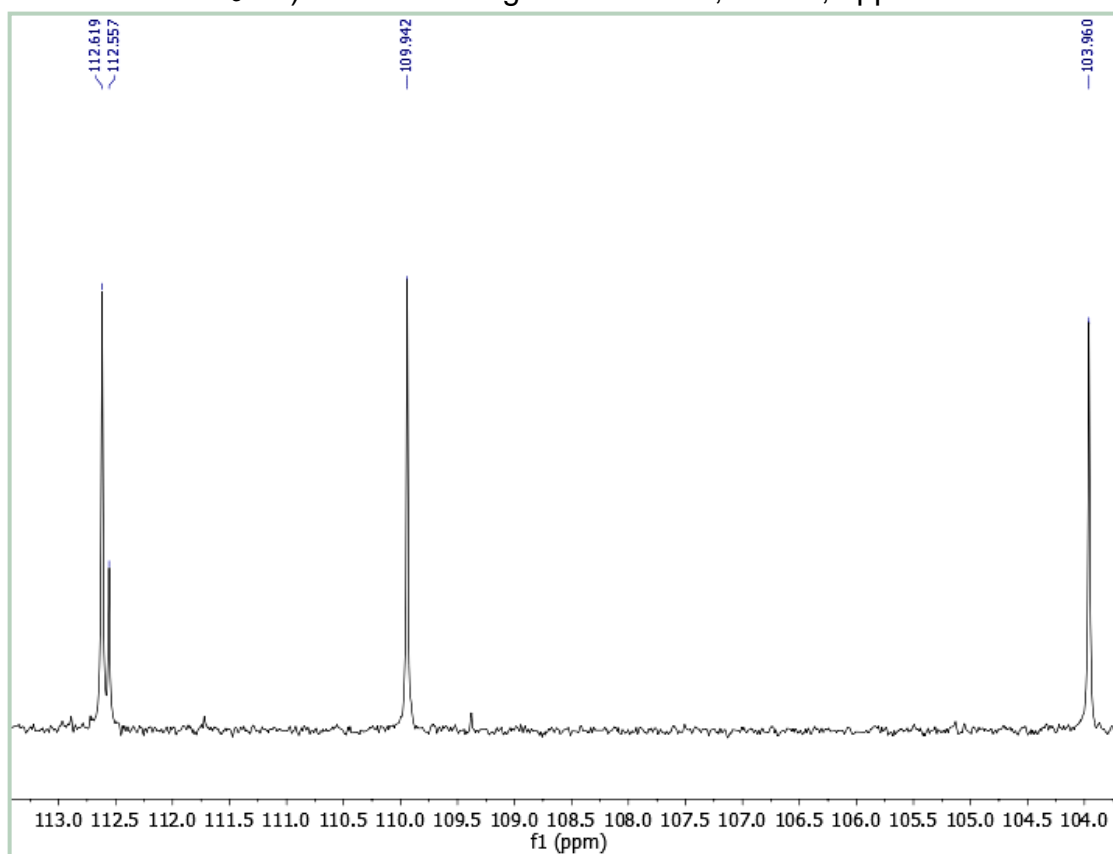


Figura 89 – Espectro de RMN-COSY ^1H - ^1H (400 MHz, CD_3OD) de Ps-7.

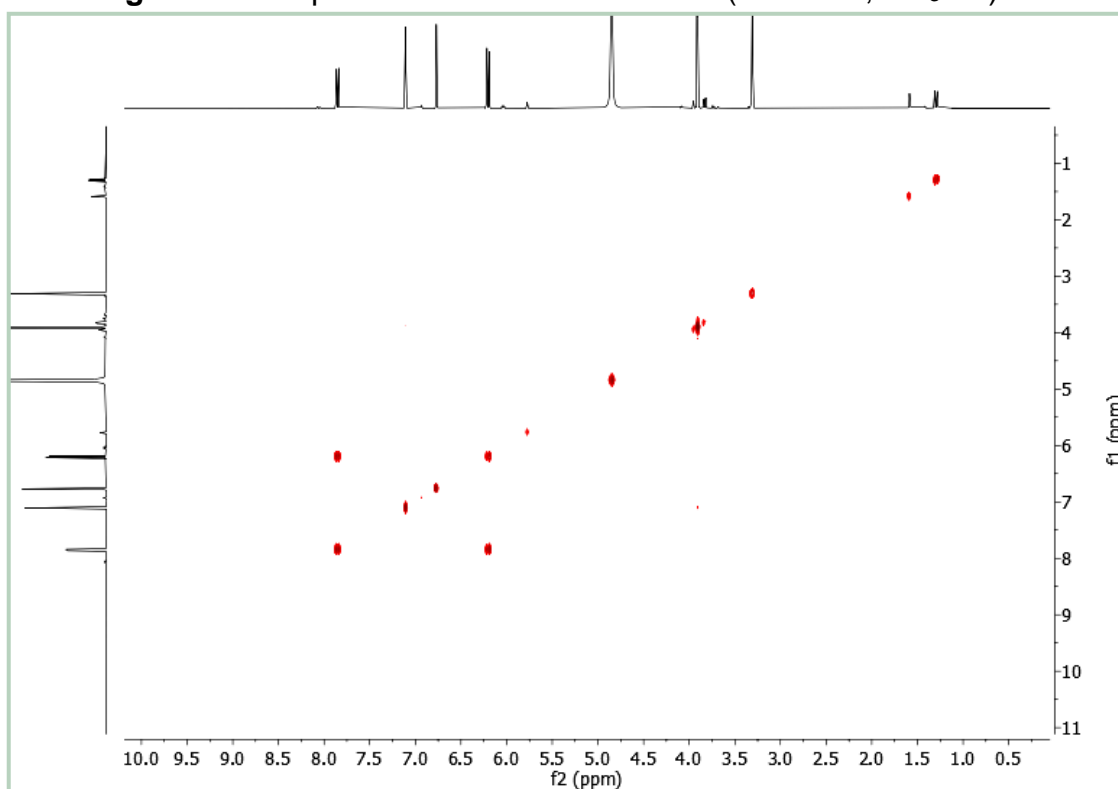


Figura 90 – Expansão do espectro de RMN-COSY ^1H - ^1H (400 MHz, CD_3OD) de Ps-7 na região de (5,70 – 8,30 ppm) x (6,00 – 8,00 ppm).

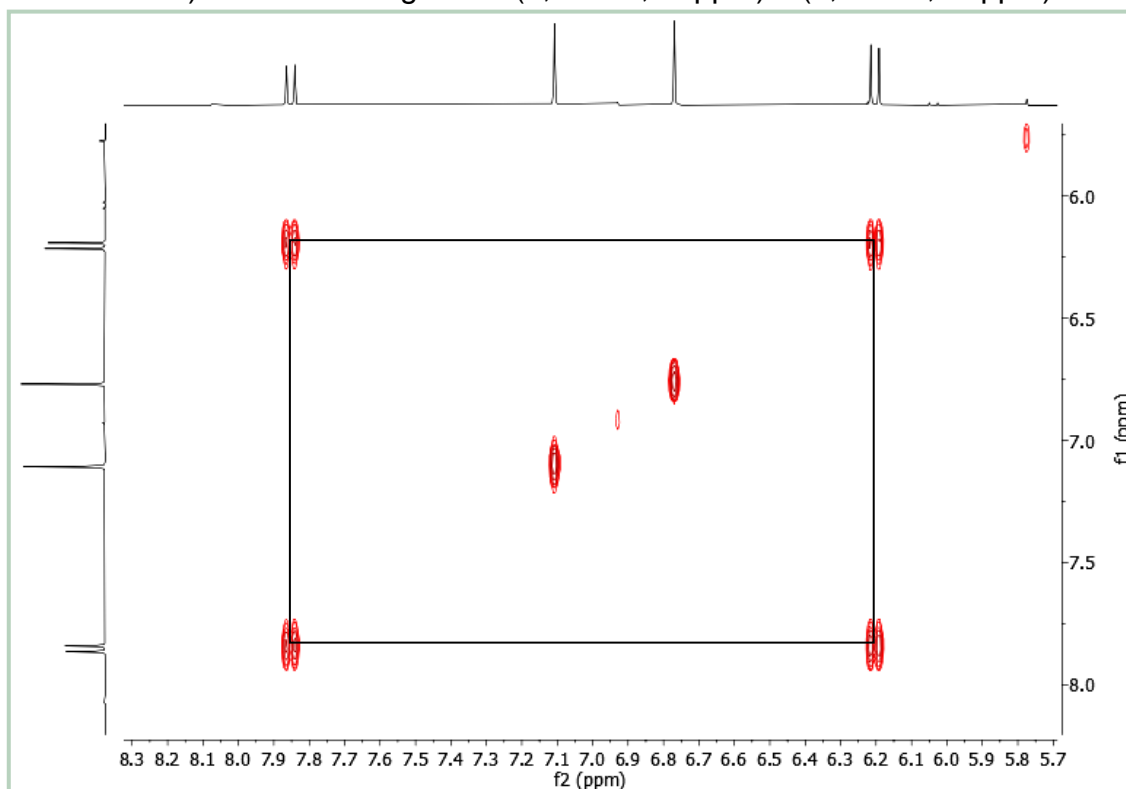


Figura 91 – Espectro de RMN-NOESY ^1H - ^1H (400 MHz, CD_3OD) de Ps-7.

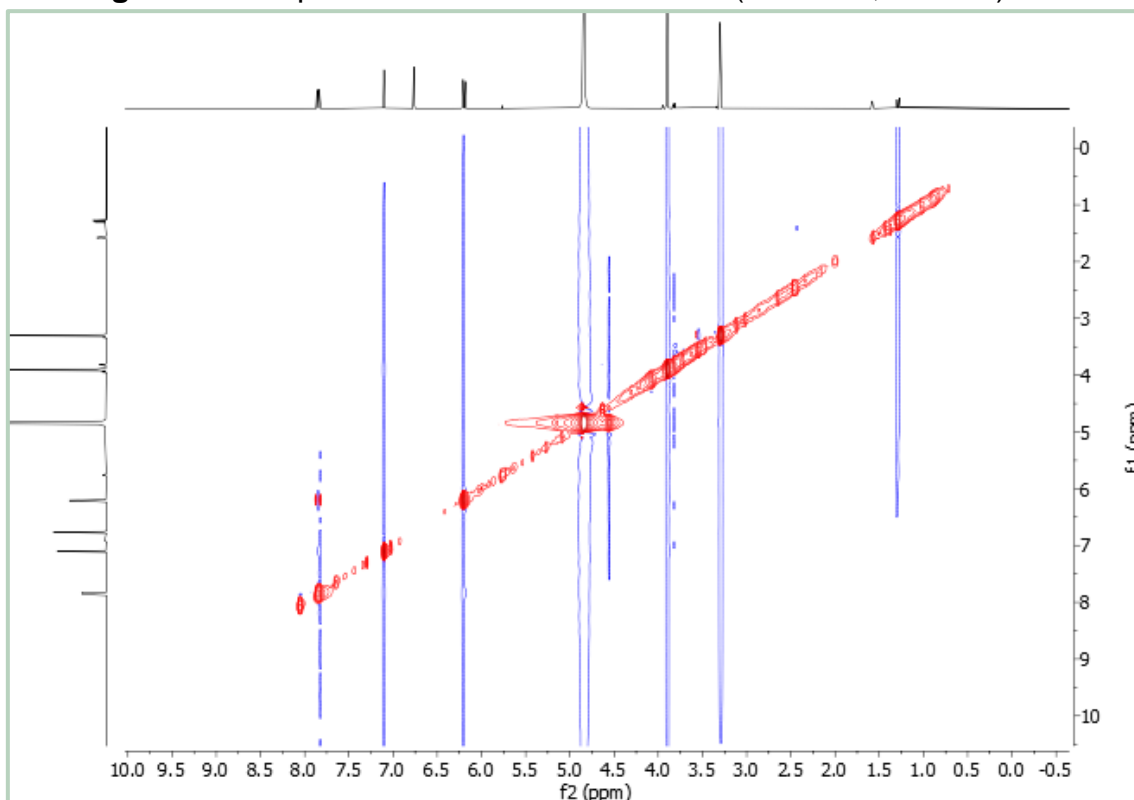


Figura 92 – Expansão do espectro de RMN-NOESY ^1H - ^1H (400 MHz, CD_3OD) de Ps-7 na região de (3,00 – 7,50 ppm) x (3,60 – 7,40 ppm).

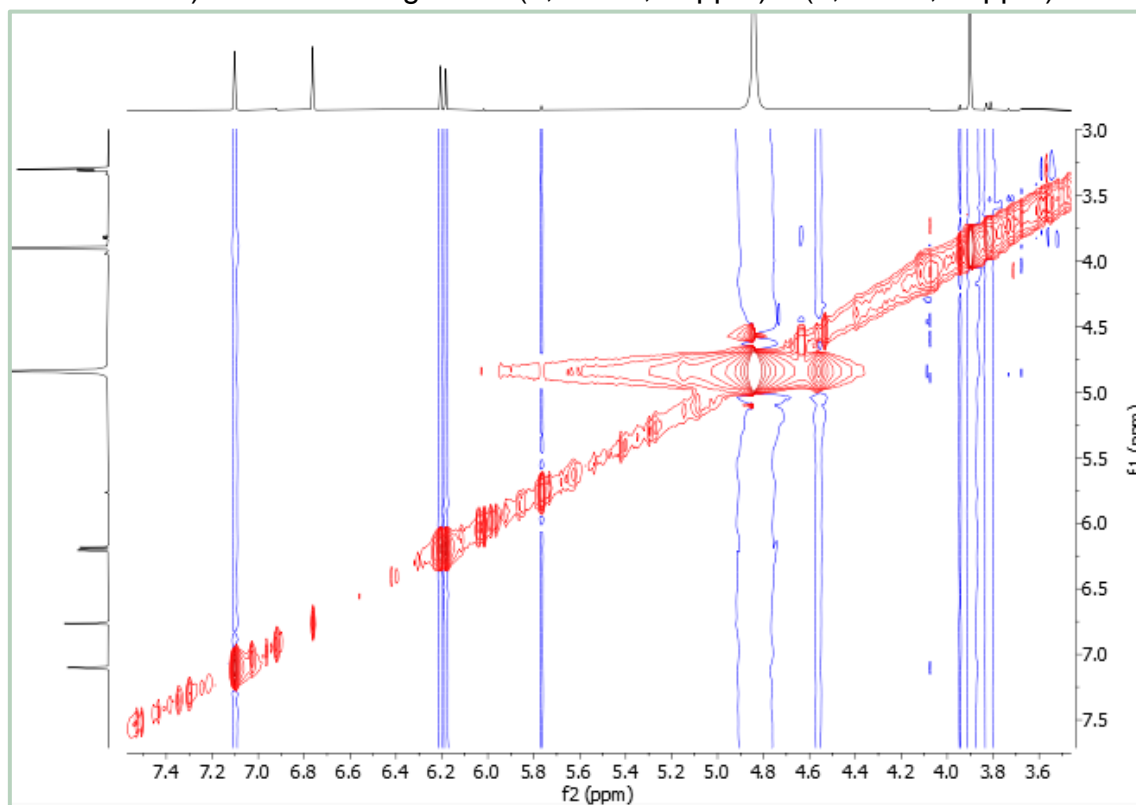


Figura 93 – Espectro de RMN-HSQC (400 e 100 MHz, CD_3OD) de Ps-7.

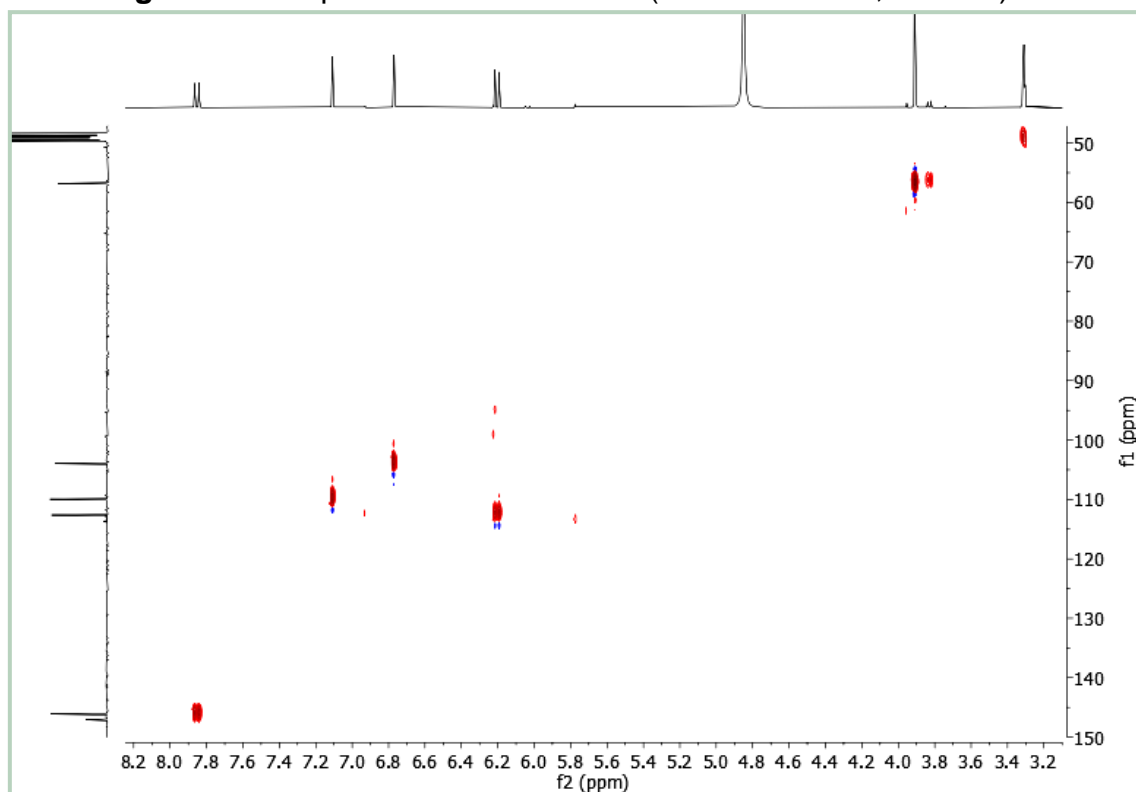


Figura 94 – Espectro de RMN-HMBC (400 e 100 MHz, CD_3OD) de Ps-7.

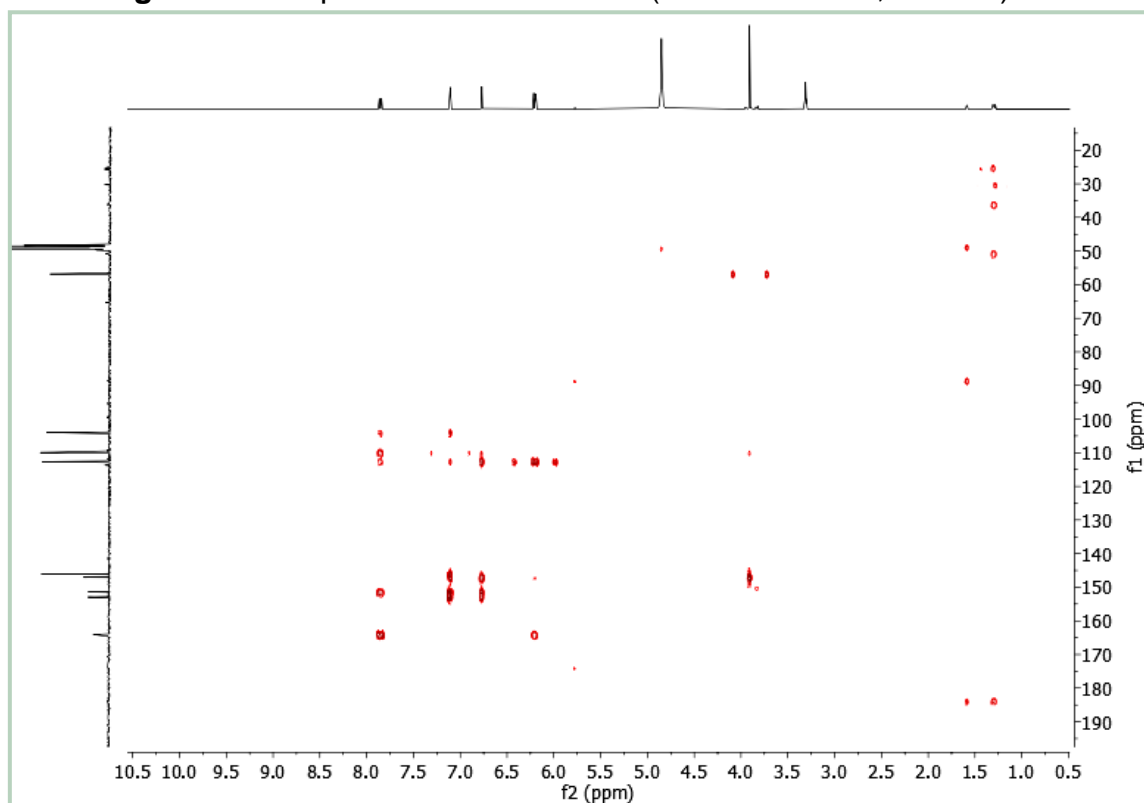


Figura 95 – Expansão do espectro de RMN-HMBC (400 e 100 MHz, CD_3OD) de Ps-7 na região de (3,60 – 8,60 ppm) x (140,0 – 165,0 ppm).

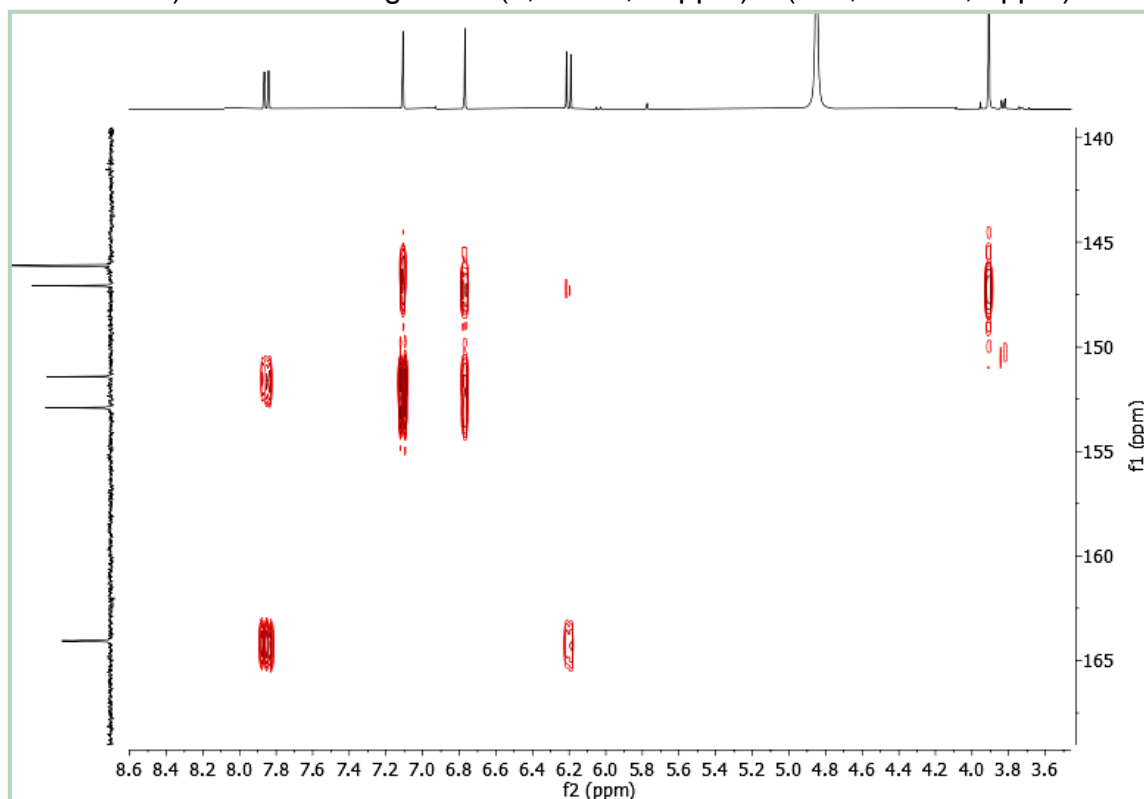
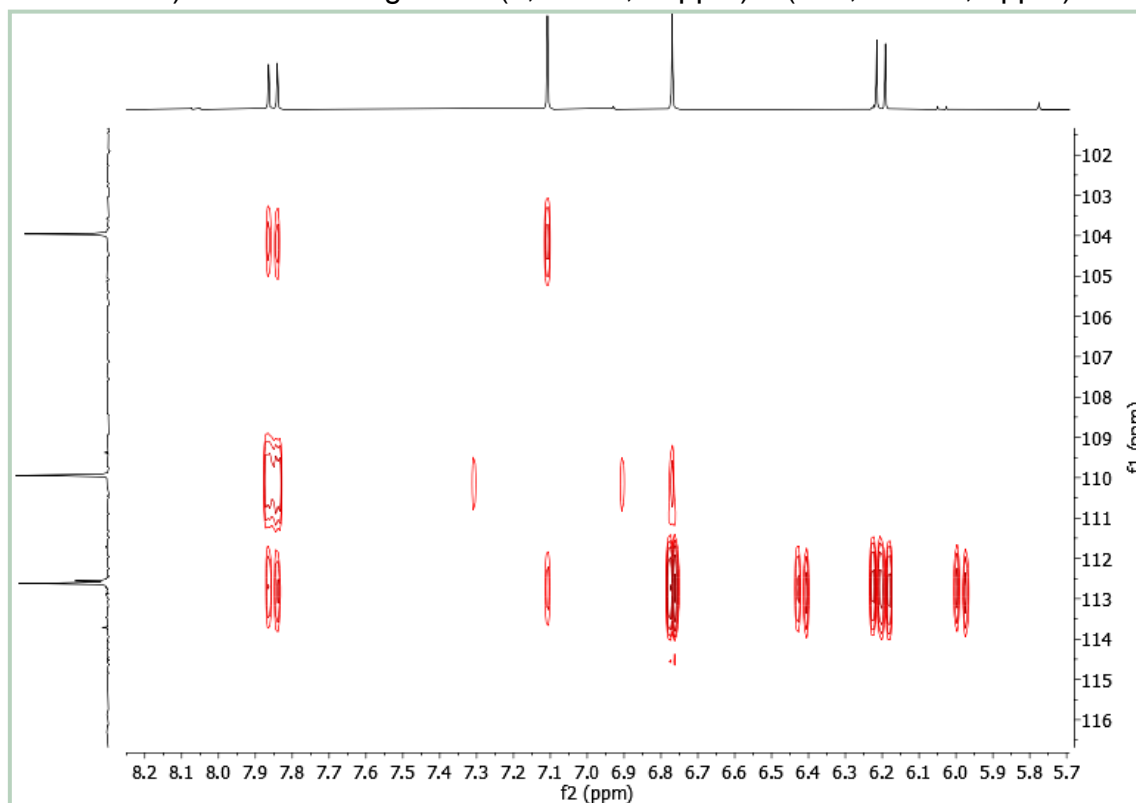


Figura 96 – Expansão do espectro de RMN-HMBC (400 e 100 MHz, CD₃OD) de Ps-7 na região de (5,70 – 8,20 ppm) x (102,0 – 116,0 ppm).



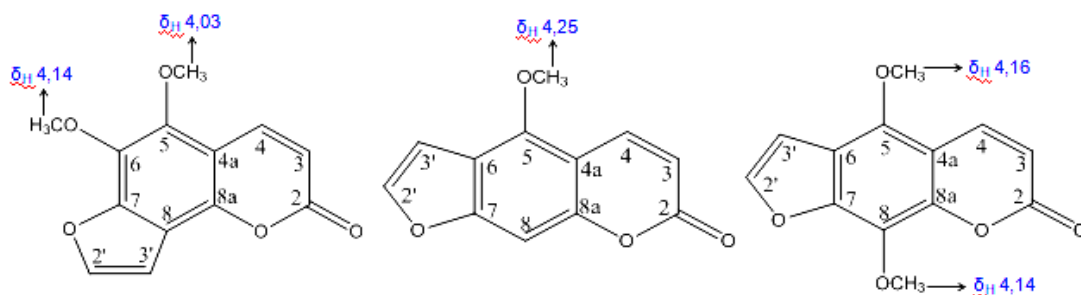
5.8 Identificação estrutural de Ps-8

A substância codificada como **Ps-8** foi obtida como um sólido amorfo branco cintilante, pesando 60,0 mg. O espectro de massas de alta resolução obtido por ESI-MS no modo positivo (Figura 98), mostrou o pico da molécula protonada em m/z 247,0607 $[M+H]^+$ compatível com a fórmula molecular C₁₃H₁₀O₅ (calc. 246,2180).

O espectro de RMN de ¹H, obtido a 400 MHz em CDCl₃ (Figura 99), apresentou sinais de esqueleto furanocumarínico em δ_H 6,27 (1H, d, J = 9,8 Hz), δ_H 8,10 (1H, d, J = 9,8 Hz), 7,60 (1H, d, J = 2,3 Hz) e δ_H 6,98 (1H, d, J = 2,3 Hz), que foram atribuídos a H-3, H-4, H-2' e H-3', respectivamente (Figura 100). Além disso, foram observados dois simpletos com integral para três hidrogênios cada em δ_H 4,14 (s) e δ_H 4,15 (s), que foram atribuídos as duas metoxilas inseridas em C-5 e C-8, respectivamente (Figura 101).

Isso foi confirmado no espectro de RMN de ^{13}C -BB (Figura 104) pela presença de dois sinais em δ_{C} 60,8 e δ_{C} 61,7 característicos de metoxilas. As posições desses dois substituintes em C-5 e C-8 foram confirmadas pelo efeito de proteção observado nos carbonos C-4, C-4a e C-8a que apresentaram deslocamentos químicos em δ_{C} 139,4, δ_{C} 107,7 e δ_{C} 143,7, respectivamente. Como discutido anteriormente de acordo com a literatura, na ausência de oxigenação nas posições citadas, esses valores apareceriam em torno de δ_{C} 144,0, δ_{C} 115,0 e δ_{C} 152,0, respectivamente (MACIAS *et al.*, 1990).

Segundo Murray e Jorge (1984), quando a estrutura da furanocumarina é angular, a 5-OCH₃ possui deslocamento próximo a δ_{H} 4,00 ppm e quando é linear, esse valor é encontrado próximo a δ_{H} 4,25 ppm. Portanto, os deslocamentos químicos apresentados para as metoxilas, em δ_{H} 4,14 e δ_{H} 4,15, não foram suficientes para confirmar a linearidade da estrutura. Entretanto, após comparação com dados da literatura foi observado que no caso da furanocumarina angular pimpinelina as metoxilas aparecem em δ_{H} 4,03 (5-OCH₃) e δ_{H} 4,14 (8-OCH₃), e no caso da furanocumarina linear isopimpinelina tais valores aparecem em δ_{H} 4,16 e δ_{H} 4,14 (O'NEILL *et al.*, 2013), semelhantes aos dados de **Ps-8** como demonstrado abaixo.



O espectro de RMN de ^{13}C -BB (100 MHz, CDCl₃) (Figura 102 e 103) apresentou no total treze sinais correspondentes a sete carbonos não hidrogenados, quatro carbonos metínicos e dois metoxílicos.

Após comparação dos dados espectrais de massas e RMN de ^1H e ^{13}C obtidos com dados da literatura, **Ps-8** foi identificada como 5,8-dimetoxipsoraleno ou isopimpinelina (Figura 97) (KHASANA *et al.*, 2018), relatada pela primeira vez na espécie *Pilocarpus spicatus*, mas anteriormente isolada de *Pilocarpus goudotianus* (AMARO-LUIS *et al.*, 1990).

Isopimpineline possui diversas atividades relatadas na literatura, como atividade antioxidante (KHASANA *et al.*, 2018), anticolinesterásica (DINCEL *et al.*, 2013), antimicobacteriana (O'NEILL *et al.*, 2013), vasorelaxante (CHIOU *et al.*, 2001) e moduladora da resistência bacteriana à eritromicina (MADEIRO *et al.*, 2017).

Figura 97 – Estrutura química de Ps-8 (isopimpineline).

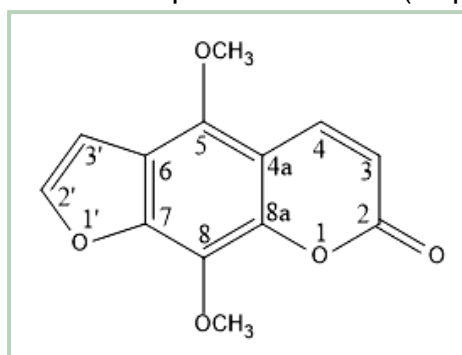


Figura 98 – Espectro de HR-ESI-MS de Ps-8.

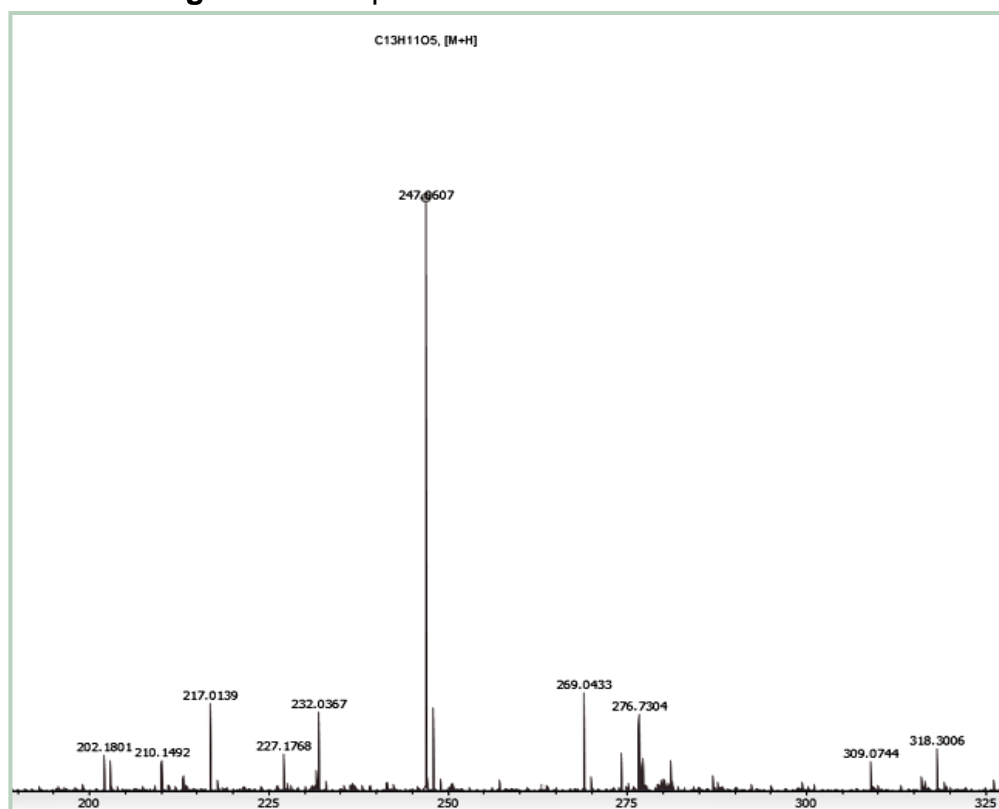


Tabela 8 – Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de Ps-8 comparados com dados da literatura para Isopimpineline^d.

Posição	Ps-8 ^a		Isopimpineline ^{b,d}	
	δ_{C}	$\delta_{\text{H}}^{\text{c}}$	δ_{C}	$\delta_{\text{H}}^{\text{c}}$
2	160,4	-	160,6	-
3	112,9	6,27 (d; 9,8)	112,8	6,26 (d; 9,8)
4	139,4	8,10 (d; 9,8)	139,5	8,10 (d; 9,8)
4a	107,7	-	107,6	-
5	128,2	-	128,2	-
6	114,8	-	114,8	-
7	150,0	-	150,0	-
8	144,3	-	144,3	-
8a	143,7	-	143,7	-
2'	145,1	7,60 (d; 2,3)	145,2	7,61 (d; 2,2)
3'	105,0	6,98 (d; 2,3)	105,2	6,99 (d; 2,2)
5 -OCH ₃ -	61,7	4,14 (s)	61,8	4,14 (s)
8 -OCH ₃ -	60,8	4,15 (s)	60,8	4,16 (s)

^a400 (^1H) e 100 (^{13}C) MHz, CDCl_3 ; ^b400 (^1H) e 100 (^{13}C) MHz, CDCl_3 ; ^cEm parêntesis: multiplicidade e J em Hz; ^dKhasanah *et al.*, 2018.

Figura 99 – Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) de Ps-8.

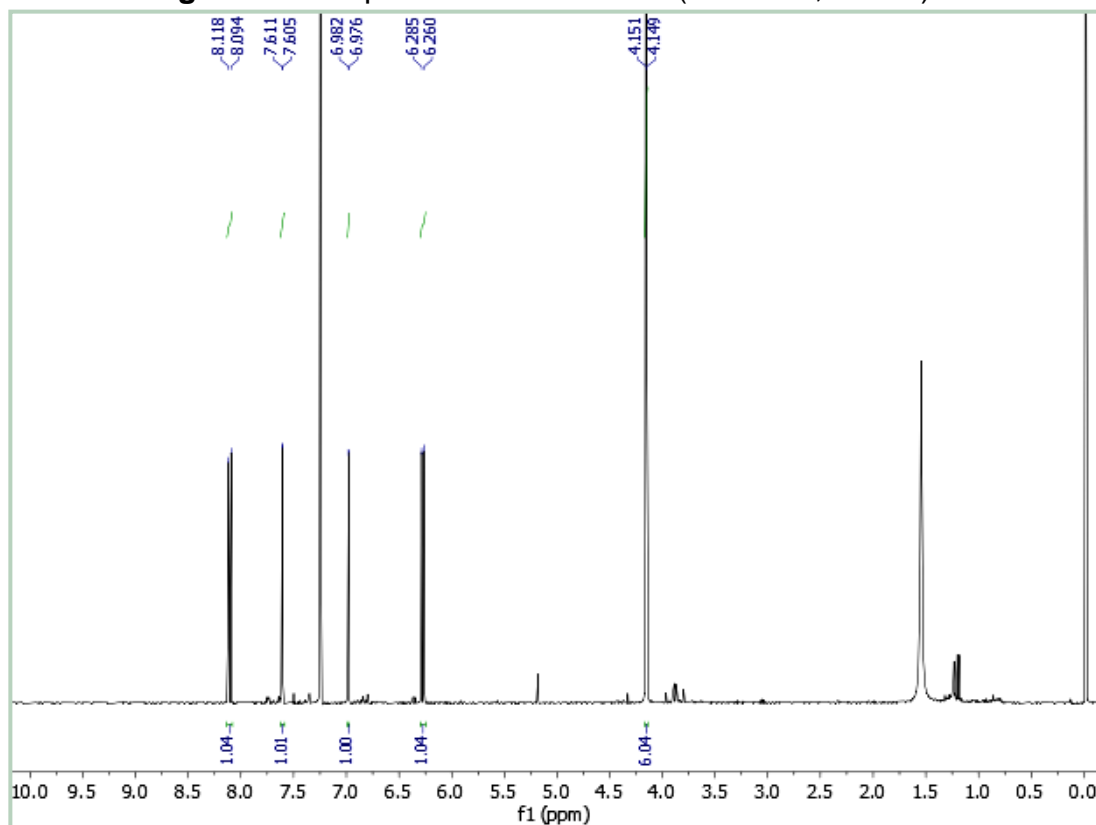


Figura 100 – Expansão do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) de Ps-8 na região de 6,20 – 8,20 ppm.

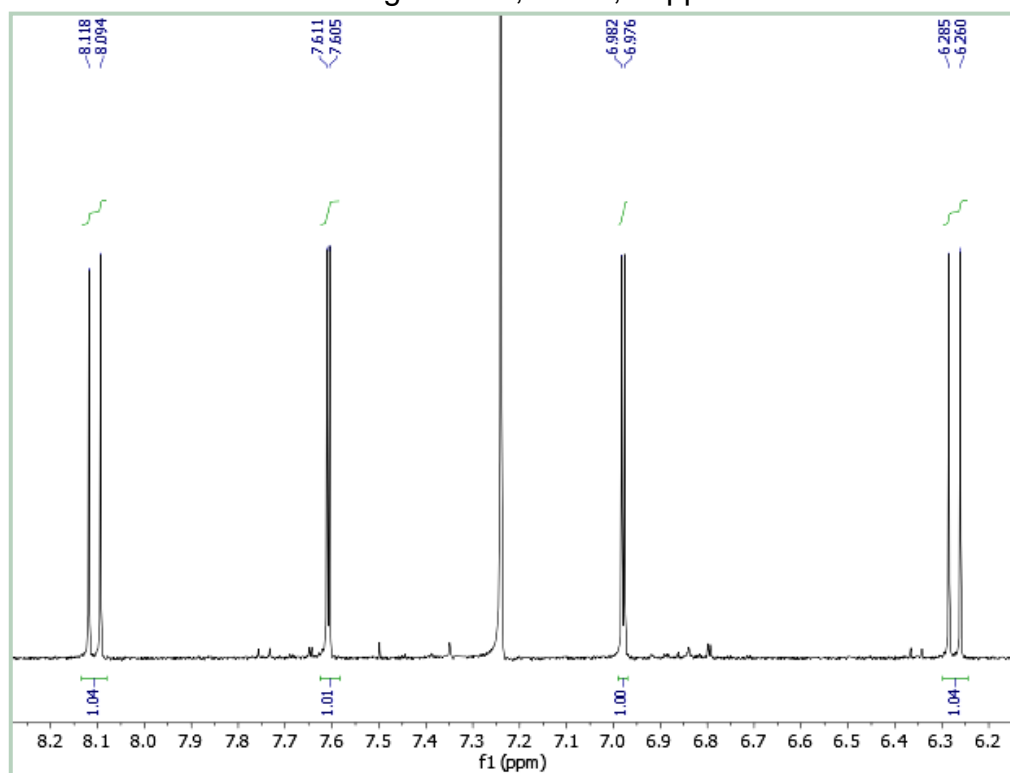


Figura 101 – Expansão do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) de Ps-8 na região de 4,10 – 4,20 ppm.

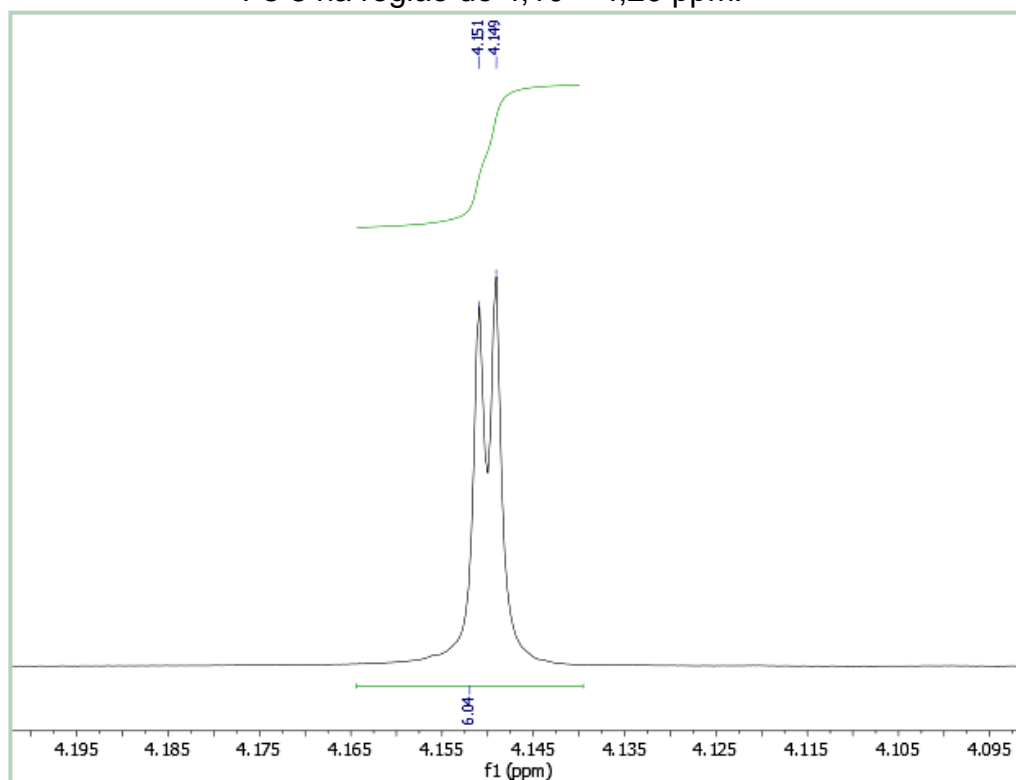


Figura 102 – Espectro de RMN de ^{13}C – BB (100 MHz, CD_3OD) de Ps-8.

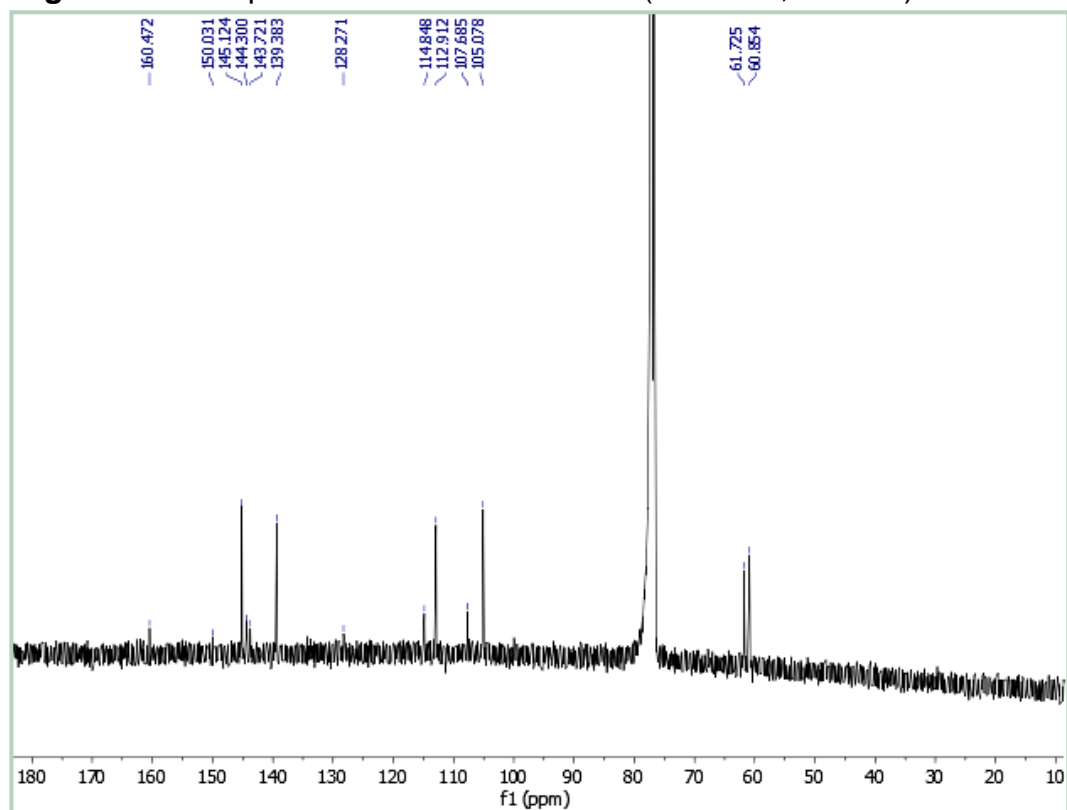


Figura 103 – Expansão do espectro de RMN de ^{13}C – BB (100 MHz, CD_3OD) de Ps-8 na região de 102,0 – 162,0 ppm.

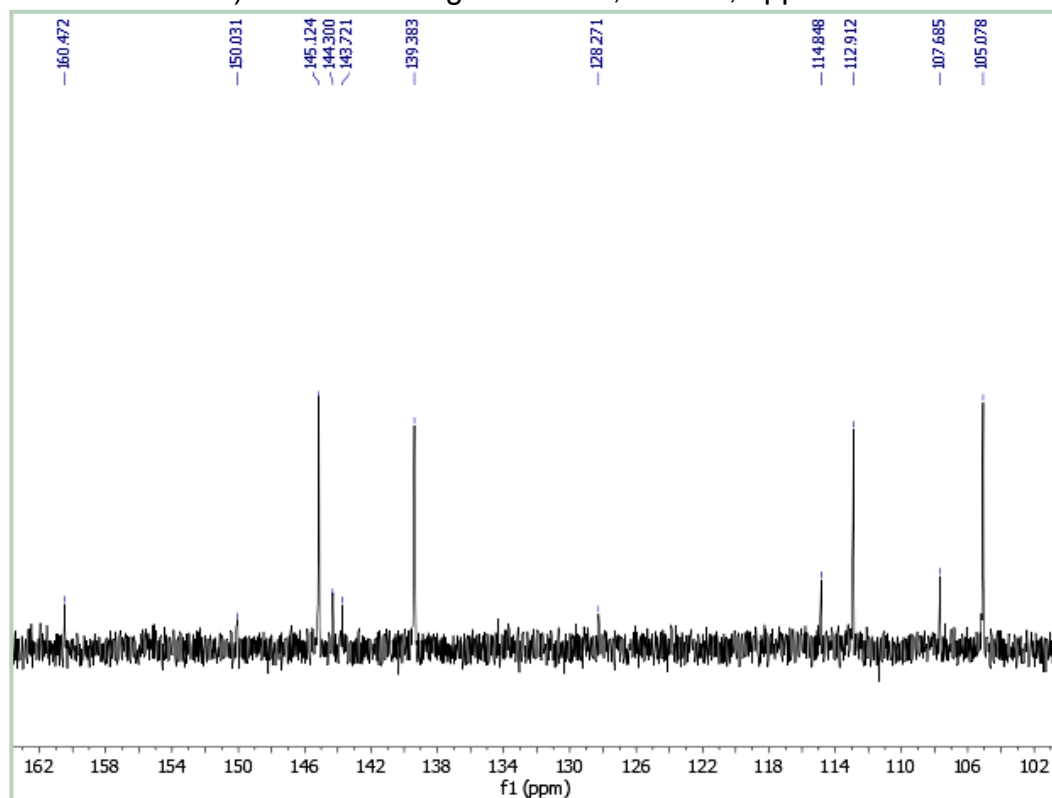
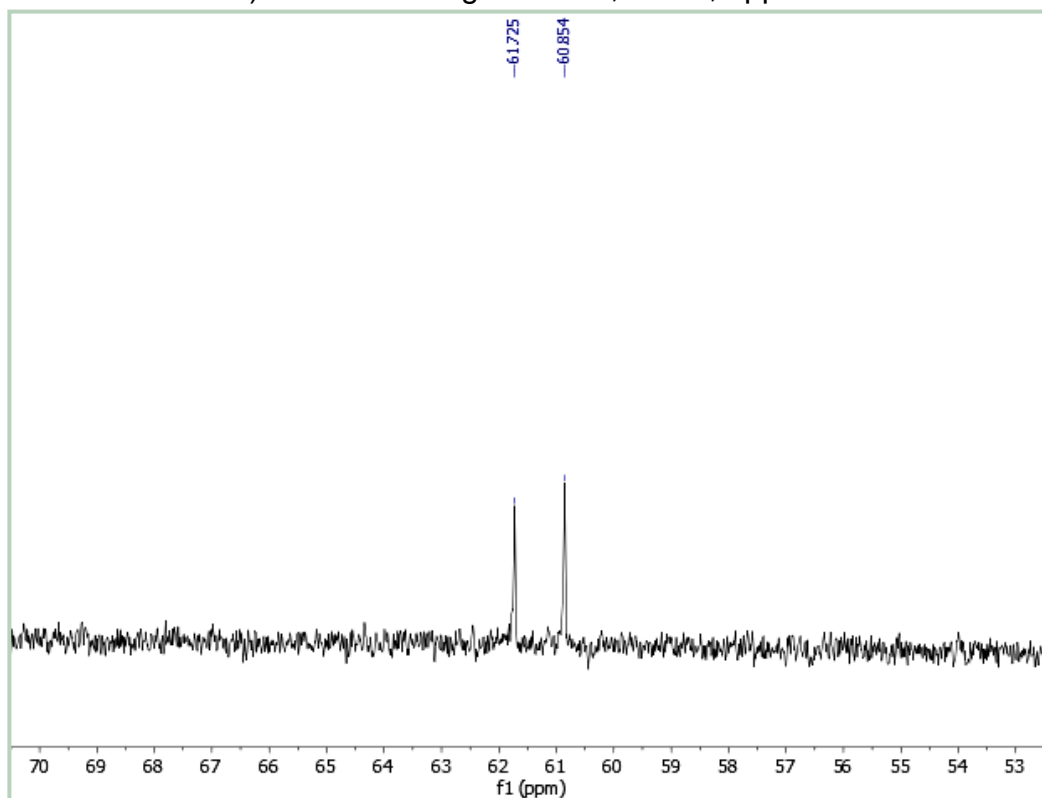


Figura 104 – Expansão do espectro de RMN de ^{13}C – BB (100 MHz, CD_3OD) de Ps-8 na região de 53,0 – 70,0 ppm.



5.9 Avaliação da atividade moduladora da resistência a drogas em *Staphylococcus aureus*

Agentes moduladores da resistência a drogas são compostos que potencializam a atividade de um antibiótico contra cepas resistentes, os quais podem atuar como inibidores da bomba de efluxo de tais microrganismos (GIBBONS, 2004). Diante disso, foi avaliado o efeito modulador da resistência a drogas de duas cumarinas isoladas no presente trabalho, heraclenol e isoxalina, sobre norfloxacin e brometo de etídio utilizando uma cepa de efluxo de *S. aureus*.

Uma vez incorporados no meio de crescimento, o heraclenol promoveu uma redução de duas vezes a CIM do norfloxacin e a isosaxalina reduziu oito vezes a CIM deste antibiótico. Em combinação com o brometo de etídio, o heraclenol reduziu quatro vezes sua CIM e a isosaxalina promoveu uma redução de mais de oito vezes. As concentrações inibitórias mínimas para o antibiótico e biocida, sozinhos ou em combinação com as cumarinas testadas, estão apresentadas na Tabela 9.

Tabela 9 – Concentração inibitória mínima (CIM) de norfloxacino e brometo de etídio na ausência e na presença das cumarinas testadas contra a cepa SA1199-B de *Staphylococcus aureus*.

Substâncias ($\frac{1}{4}$ da CIM)	CIM ($\mu\text{g/mL}$) SA1199-B	
	Norfloxacino	Brometo de etídio
-	>128	64
Heraclenol	64 (2)	16 (4)
Isosaxalina	16 (8)	≤ 8 (8)

Em parêntesis: fatores de redução da CIM.

As duas cumarinas testadas apresentaram-se como bons agentes moduladores da atividade antimicrobiana, reduzindo a concentração necessária de norfloxacino para inibir o crescimento da bactéria de efluxo. Ambas apresentam semelhança estrutural, por se tratarem de furanocumarinas lineares O-preniladas em C-8, diferindo apenas no substituinte em C-4” onde no heraclenol está inserida uma hidroxila, e na isosaxalina um átomo de cloro. A presença de um grupo prenil é fundamental para a atividade, uma vez que confere às substâncias um caráter lipofílico, facilitando a solubilidade destas na membrana da célula bacteriana e ligação aos transportadores de efluxo ali presentes, inibindo a remoção do fármaco (GIBBONS, 2004).

A importância de um grupo prenil para atividade moduladora das cumarinas foi demonstrada anteriormente no trabalho desenvolvido por Madeiro e colaboradores (2017), onde as cumarinas bergapteno e xantotoxina não modularam a atividade dos antibióticos testados, enquanto apenas a cumarina prenilada imperatorina apresentou tal atividade (MADEIRO *et al.*, 2017).

As cumarinas também foram testadas em combinação com o brometo de etídio, um substrato da bomba de efluxo escolhido como padrão para avaliação da atividade inibitória de cepas *S. aureus* SA1199-B uma vez que este é o único mecanismo conhecido de resistência bacteriana a essa substância (KUMAR *et al.*, 2008). Diante disso, a redução da CIM do brometo de etídio sugere que o efeito modulador da resistência bacteriana a norfloxacino em *S. aureus* SA1199-B promovido pelas cumarinas testadas ocorre por inibição da bomba de efluxo norA (FALCÃO-SILVA *et al.*, 2009).

Para contribuir com os resultados aqui expostos, outras pesquisas devem ser realizadas comprovando que as cumarinas preniladas, heraclenol e isosaxalina, são promissores agentes moduladores da atividade antibacteriana em combinação com antibióticos comerciais. A possibilidade de utilização desses compostos no combate à resistência microbiana eleva os produtos naturais a uma posição de valorização, estimulando o investimento em pesquisas dessa área.

06 | CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

O estudo fitoquímico de *Pilocarpus spicatus* sbsp. *aracatensis* Kaastra resultou no isolamento de oito substâncias, sendo estas uma acetofenona, a xantoxilina, isolada pela primeira vez no gênero *Pilocarpus*, e sete cumarinas, bergaptol, heraclenol, pabularinona, isosaxalina e 8-(3-etoxi-2-hidroxi-3-metilbutiloxi)-psoraleno, relatadas pela primeira vez no gênero *Pilocarpus*, escopoletina e isopimpinellina, relatadas pela primeira vez na espécie *P. spicatus*.

A avaliação do efeito modulador da resistência a drogas mostrou que as duas cumarinas testadas apresentaram boa atividade moduladora, onde o heraclenol reduziu duas vezes a CIM do norfloxacino, e a isosaxalina reduziu oito vezes.

A redução da CIM do brometo de etídio, em quatro vezes pelo heraclenol, e em mais de oito vezes pela isosaxalina, demonstrou que ambos os compostos são inibidores putativos do sistema de efluxo em bactérias.

Este trabalho contribuiu para a ampliação do conhecimento químico e farmacológico da espécie *Pilocarpus spicatus*, mostrando seu potencial como fonte de cumarinas, que constituem uma classe de metabólitos secundários de importância biológica e industrial.

REFERÊNCIAS

- ALLEVATO, D.M.; KIYOTA, E.; MAZZAFERA, P.; NIXON, K. C. Ecometabolomic analysis of wild populations of *Pilocarpus pennatifolius* (Rutaceae) using unimodal analyses. **Frontiers in Plant Science**, v.10, n. 258, 2019.
- AMARO-LUIS, J. M.; MASSANET, G. M.; PANDO, E.; RODRIGUEZ-LUIS, F.; ZUBIA, E. New coumarins from *Pilocarpus goudotianus*. **Planta Medica**, v. 56, n. 3, p. 304-306, 1990.
- ANDRADE-NETO, M.; CUNHA, U. A.; MAFEZOLI, J.; SILVEIRA, E. R. Volatile constituents of different populations of *Pilocarpus spicatus* Saint Hill. (Rutaceae) from the Northeast of Brazil. **Journal of Essential Oil Research**, v. 14, n. 5, p.319-324, 2002.
- ANDRADE-NETO, M.; SILVEIRA, E. R.; BRAZ-FILHO, R.; GAMBARDELA, M. T. P.; SANTOS, R.H. A. 2-Methyl-25-ethyl-dammarane derivatives from *Pilocarpus spicatus*. **Phytochemistry**, v. 35, n. 3, p. 739-743, 1994.
- APG IV, 2016 Apg IV (Angiosperm Phylogeny Group). 2016. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 181, p.1-20, 2016.
- APOLINÁRIO, R.; NOGUEIRA, J.; COSTA, M. G. S.; SANTOS-MALLET, J.; SANTOS, M. G.; AZAMBUJA, P.; MELLO, C. B.; GONZALEZ, M. S.; ROCHA, L.; FEDER, M. D. Insecticidal activity of *Pilocarpus spicatus* Saint-Hilaire (Rutaceae) essential oil against the crop pest *Dysdercus peruvianus* (Guérin-Méneville, 1831) and *Oncopeltus fasciatus* (Dallas, 1852). **Research, Society and Development**, v. 9, n. 11, 2020.
- ARAÚJO, I. S. OLIVEIRA, G. M.; LACERDA, L. B.; BATISTA, J. L.; LOPES, G. N. Perspectivas atuais da utilização de bioinseticidas em *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Revista Brasileira de Meio Ambiente**, v.7, n.3, p. 20-27, 2019.
- BADAWI, M. M.; SEIDA, A. A.; KHINGHORN, A. D.; CORDELL, G. A.; FARNSWORTH, N. R. Potencial anticancer agents XVIII constituents of *Amyris pinnata*. **Journal of Natural Products**, v. 44, n. 3, p. 331-334, 1980.
- BAEK, S.; KIM, J.; KIM, H.; LEE, S.; LEE, C.; KHO, Y.; LEE, C. Melanin biosynthesis inhibitory activities of coumarins isolated from *Angelica polymorpha* MAXIM. **Korean Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.31, n.2, p. 135-139, 2003.
- BAI, Y.; LI, D.; ZHOU, T.; QIN, N.; LI, Z.; YU, Z.; HUA, H. Coumarins from the roots of *Angelica dahurica* with antioxidant and antiproliferative activities. **Journal of Functional Foods**, v.20, p. 453-462, 2016.

BERTRAND, C.; FABRE, N.; MOULIS, C. Constituents of *Pilocarpus trachylophus*. **Fitoterapia**, v. 72, n. 7, p. 844-847, 2001.

BITTENCOURT, C. B.; NASCIMENTO, M. G. P.; MORAES, J. C. M.; COSTA, D. N.; SANTOS, J. O.; ANDRADE, I. M. Prospecção científica e tecnológica do gênero *Pilocarpus* Vahl. **Cadernos de Prospecção – Salvador**, v. 13, n. 4, p. 1205-1219, 2020.

BITTERLING, H.; LORENZ, P.; VETTER, W.; KAMMERER, D.; STINTZING, C. Photo-protective effects of selected furocoumarins on β -pinene, R-(+)-limonene and γ -terpinene upon UV-A irradiation. **Journal of Photochemistry & Photobiology**, v. 424, n. 11, 2022.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Práticas integrativas e complementares: plantas medicinais e fitoterapia na Atenção Básica/Ministério da Saúde**. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. – Brasília: Ministério da Saúde, 2012. 156 p.: il. – (Série A. Normas e Manuais Técnicos) (Cadernos de Atenção Básica; n. 31).

BRASIL, 2022a. Ministério do Meio Ambiente. **Biodiversidade**. Disponível em: <https://www.gov.br/mma/pt-br/assuntos/biodiversidade>. Acesso em: Jan 2022.

BRASIL, 2022b. Ministério do Meio Ambiente. **Biodiversidade brasileira**. Disponível em: <https://antigo.mma.gov.br/biodiversidade/biodiversidade-brasileira.html>. Acesso em: Jan 2022.

CALIXTO, J. B.; MIGUEL, O. G.; YUNES, R. A.; RAE, G. A. Action of 2-hydroxy-4,6-dimethoxyacetophenone isolated from *Sebastiania schottiana*. **Planta Medica**, v. 56, n. 1, p. 31-35, 1990.

CAO, N.; ZHU, S.; LI, J.; TU, P.; JIANG, Y. Coumarins from the stems and leaves of *Clausena dunniana* H. Lév. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 90, p. 104048, 2020.

CÁPOLI, Elaine Alves. **O uso de *Pilocarpus* (Jaborandi) na área farmacêutica**. 2019. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) – Universidade de Uberaba, Uberaba – MG, 2019.

CARMO, G.; FERNANDES, T. S.; PEDROSO, M.; FERRAZ, A.; NETO, A. T.; SILVA, U. F.; MOSTARDEIRO, M. A.; BACK, D. F.; DALCOL, I. I.; MOREL, A. F. Phytochemical and antimicrobial study of *Pilocarpus pennatifolius* Lemaire. **Fitoterapia**, v. 131, p. 1-8, set. 2018.

CARRULO, Diana Correia. **Cosméticos naturais e sustentáveis: uma tendência expressa em rotulagem e certificação experiência profissionalizante na vertente de investigação e farmácia comunitária**. 2020. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Beira Interior, Covilhã, Portugal, 2020.

- CARVALHO, J. C. S.; PIRANI, J. R.; FERREIRA, M. J. P. *Esenbeckia* (Pilocarpinae, Rutaceae): chemical constituents and biological activities. **Brazilian Journal of Botany**, 2021.
- CECHINEL-FILHO, V.; VAZ, Z.; ZUNINO, L.; CALIXTO, J.; YUNES, R. Synthesis of xanthoxylone derivatives with antinociceptive and antioedematogenic activities. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 31, n. 10, p. 833-839, 1996.
- CHERMENSKAYA, T. D.; STEPANYCHEVA, E. A.; SHCHENIKOVA, A. V.; SAVELIEVA, E. I.; CHAKAEVA, A. S. Insecticidal effects of *Ungernia severtzovii* bulb extracts against the grain aphid *Schizaphis graminum* (Rondani). **Industrial Crops and Products**, v. 36, n. 1, p. 122–12, 2012.
- CHIOU, W.; HUANG, Y.; CHEN, C.; CHEN, C. Vasorelaxing effect of coumarins from *Cnidium monnieri* on rabbit corpus cavernosum. **Planta Medica**, v. 67, n. 3, p. 282-284, 2001.
- CHUNYAN, C.; BO, S.; PING, L.; JINGMEI, L.; ITO, Y. Isolation and purification of psoralen and bergapten from *Ficus carica* leaves by high-speed countercurrent chromatography. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 32, n.1, p. 136-143, 2009.
- COSTA, J. F. O.; JUIZ, P.; PEDRO, A. S.; DAVID, J. P.; DAVID, J. M.; GIULIETTI, A. M.; FRANÇA, F.; SANTOS, R. R.; SOARES, M. B. P. Immunomodulatory and antibacterial activities of extracts from Rutaceae species. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 4, p. 502-505, 2010.
- COLE, T. C. H.; GROPPA, M. **Rutaceae Phylogeny Poster**. 2020. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/324647641>. Acesso em: Jan de 2022.
- DEWICK, P. M. **Medicinal natural products : a biosynthetic approach**. Paul M. Dewick. – 2nd ed. John Wiley & Sons Ltd. 2002.
- DINCEL, D.; HATİPOĞLU, S. D.; GOREN, A.C.; TOPÇU, G. Anticholinesterase furocoumarins from *Heracleum platytaenium*, a species endemic to the Ida Mountains. **Turkish Journal of Chemistry**, v.37, p. 675-683, 2013.
- FALCÃO-SILVA, V. S.; SILVA, D. A.; SOUZA, M. F. V.; SIQUEIRA-JUNIOR, J. P. Modulation of Drug Resistance in *Staphylococcus aureus* by a kaempferol glycoside from *Herissantia tiubae* (Malvaceae). **Phytotherapy Research**, v. 23, n. 10, p. 1367–1370, 2009.
- FARIA, M. S.; SOMNER, G. V.; ROSA, M. M. T. Rutaceae Juss. da Marambaia, RJ. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, supl. 2, p. 291-293, jul. 2007.

FEDER, D.; GONZALEZ, M. S.; MELLO, C. B.; SANTOS, M. G.; ROCHA, L.; KELECOM, A.; FOLLY, E. Exploring the insecticide and acaricide potential of development regulators obtained from restinga vegetation from Brazil. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 91, n. 1, 2019.

FOIS, B.; DISTINTO, S.; MELEDDU, R.; DEPLANO, S.; MACCIONI, E.; FLORIS, C.; ROSA, A.; NIEDDU, M.; CABONI, P.; SISSI, C.; ANGELI, A.; SUPURAN, C.; COTTIGLIA, F. Coumarins from *Magydaris pastinacea* as inhibitors of the tumour-associated carbonic anhydrases IX and XII: isolation, biological studies and in silico evaluation. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 35, n. 1, p. 539-548, 2020.

FREITAS, A. M.; LIMA, R. A. Um estudo bibliográfico sobre a *Ruta graveolens* L. (Rutaceae). **Revista Biodiversidade**, v.20, n.3, p. 111-120, 2021.

FREITAS, P. R.; ARAÚJO, A. C. J.; BARBOSA, C. R. S.; MUNIZ, D. F.; SILVA, A. C. A.; ROCHA, J. E.; OLIVEIRA-TINTINO, C. D. M.; RIBEIRO-FILHO, J.; SILVA, L. E.; CONFORTIN, C.; AMARAL, W.; DESCHAMPS, C.; BARBOSA-FILHO, J. M.; LIMA, N. T. R.; TINTINO, S. R.; COUTINHO, H. D. M. GC-MS-FID and potentiation of the antibiotic activity of the essential oil of *Baccharis reticulata* (ruiz & pav.) pers. and α -pinene. **Industrial Crops & Products**, v. 145, p.112106, 2020.

GIBBONS, S. Anti-staphylococcal plant natural products. **Natural Products Reports**, v. 21, n. 2, p. 263–277, 2004.

GIRARD, C.; MUYARD, F.; COLOMBAIN, M.; TILLEQUIN, F.; WATERMAN, P.; BÉVALOT, F. Coumarins from *Phebalium* aff. *Brachycalyx*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 33, n. 11, p. 1195-1201, 2005.

GIRENNAVAR, B.; JAYAPRAKASHA, G. K.; JADEGOUD, Y.; GOWDA, G. A. N.; PATIL, B. S. Radical scavenging and cytochrome P450 3A4 inhibitory activity of bergaptol and geranylcoumarin from grapefruit. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 15, n. 11, p. 3684–36, 2007.

GLOWKA, K. K. O.; MARQUES, S. A.; MOURA, G. S. Conhecimento popular sobre plantas medicinais em comunidades rurais do Município de Laranjeiras do Sul, Paraná. **Revista Verde**, v. 16, n.1, p.48-59, 2021.

GNONLONFIN, G. J. B.; SANI, A.; BRIMER, L. Review scopoletin – a coumarin phytoalexin with medicinal properties. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 31, n. 1, p. 47-56, 2012.

GUI, Y.; ZE-HUA, Q.; YING-JU, W.; JUN-YU, Z.; YU-ZHENG, Z.; YAN-PING, L.; YAN-HUI, F. Study on coumarins and alkaloids from stems of *Clausena lenis*. **Chinese Traditional and Herbal Drugs**, v. 51, n. 7, p. 1825-1830, 2020.

HAE-IN LEE; MI-KYUNG LEE. Effects of Scopoletin supplementation on insulin resistance and antioxidant defense system in chronic alcohol-fed rats. **Journal of the Korean Society of Food, Science and Nutrition**, v. 44, n. 2, p. 173-181, 2015.

HASBUN, C. Coumarins from bark of *Amyris barbata*. **Journal of Natural Products**, v. 49, n. 5, p. 948-949, 1985.

HOFFMANN, R.; ANJOS, M. C. R. Construção histórica do uso de plantas medicinais e sua interferência na socialização do saber popular. **Guaju**, v.4, n.2, p. 142-163, 2018.

IP, Y.Y.; IP, C.F.; GUO, S.J. Neuro-protective effects of *Adelostemma gracillimum* and its isolated compounds. **World Intellectual Property Organization**, 2011. US: WO 2011114220A1

JANG, H. S.; JEONG, B.; CHOI, S. Y.; LEE, J.; KWON, Y. S.; YANG, H. The rapid discrimination and quality assessment of three *Zanthoxylum* species using ¹H NMR spectrometry. **International Journal of Analytical Chemistry**, v. 2020, p. 1-7, 2020.

JATAV, S.; PANDEY, N.; DWIVEDI, P.; BANSAL, R.; AHLUWALIA, V.; TIWARI, V. K.; MISHRA, B. B. Isolation of a new flavonoid and waste to wealth recovery of 6-O-Ascorbyl Esters from Seeds of *Aegle marmelos* (family- Rutaceae). **Natural Product Research**, v. 33, n. 15, p. 2236-2242, 2018.

JIANG, H.; ZHANG, W.; YOU, C.; YANG, K.; FAN, L.; FENG, J.; CHEN, J.; YANG, Y.; WANG, C.; DENG, Z.; YIN, H.; DU, S. Two new cytotoxic constituents from the *Clausena lansium* (Lour.) Skeels. **Phytochemistry**, v.9, p. 92-95, 2014.

KAASTRA, R. C. New taxa and combination in Rutaceae. **Acta Botanica Neerlandica**, v. 26, n. 6, p. 471-488, 1977.

KAATZ, G. W.; SEO, S. M. Inducible NorA-mediated multidrug resistance in *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 39, n. 12, p. 2650-2655, 1995.

KABOUCHE, Z.; BENKIKI, N.; SEGUIN, E.; BRUNEAU, C. A new dicoumarinyl ether and two rare furocoumarins from *Ruta montana*. **Fitoterapia**, v. 74, n. 1-2, p. 194–196, 2003.

KHASANAH, S. N. N.; IMANIAH, N.; SAPUTRI, R. D.; TJAHJANDARIE, T. S.; TANJUNG, M. Antioksidan kumarin terisoprenilasi dan alkaloid indol dari kulit batang *Zanthoxylum ovalifolium* Tutchet. **Jurnal Kimia Mulawarman**, v.15, n. 2, p. 76-81, 2018.

KUBITZKI, K., KALLUNKI J. A., DURETTO M. & WILSON P. G. Rutaceae. In K. KUBITZKI (Ed.) **The families and genera of vascular plants**. Vol. X. Heidelberg: Springer, 2011, p. 276-356. ISBN : 978-3-642-14396-0.

KUMAR, A.; KHAN, I. A.; KOUL, S.; KOUL, J. L.; TANEJA, S. C.; ALI, I.; ALI, F.; SHARMA, S.; MIRZA, Z. M.; KUMAR, M.; SANGWAN, P. L.; GUPTA, P.; THOTA, N.; QAZI, G. N. Novel structural analogues of piperine as inhibitors of the NorA efflux pump of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 61, n. 6, p. 1270– 1276, 2008.

LIMA, D. F.; LIMA, L. I.; ROCHA, J. A.; ANDRARE, I. M.; GRAZINA, L. G.; VILLA, C.; MEIRA, L.; VÉRAS, L. M. C.; AZEVEDO, I. F. S.; BIASE, A. G.; COSTA, J.; OLIVEIRA, M. B. P. P.; MAFRA, I.; LEITE, J. R. S. A. Seasonal change in main alkaloids of jaborandi (*Pilocarpus microphyllus* Stapf ex Wardleworth), an economically important species from the Brazilian flora. **PLOS ONE**, v. 12, n. 2, p. 1-19, 2017.

LI, X.; KIM, K.; ZHANG, X.; OH, H.; KIM, Y.; LIU, X. Study on chemical constituents and their anti-inflammatory activity from ethyl acetate extract of fruits of *Acanthopanax henryi* (Oliv.) Harms. **Natural Product Research and Development**, v. 32, n. 3, p. 427-434, 2020.

LIMA JÚNIOR, R. N.; ABREU, F. O. M. S. Produtos naturais utilizados como coagulantes e floculantes para tratamento de águas: Uma Revisão sobre Benefícios e Potencialidades. **Revista Virtual de Química**, v.10, n.3, p. 709-735, 2018.

LU, M.; DU, Z.; YUAN, S.; MA, Q.; HAN, Z.; TU, P.; JIANG, Y. Comparison of the preventive effects of *Murraya exotica* and *Murraya paniculata* on alcohol-induced gastric lesions by pharmacodynamics and metabolomics. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 281, p. 1-10, 2021.

MACIAS, F. A.; MASSANET, G. M.; RODRIGUEZ-LUIS, F.; SALVÁ-J. ¹³C NMR of Coumarins- IV Furanocoumarins. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 28, n. 3, p. 219-222, 1990.

MADEIRO, S.A.L.; BORGES, N. H. P. B.; SOUTO, A. L.; FIGUEIREDO, P. T. R.; SIQUEIRA-JUNIOR, J. P.; TAVARES, J. F. Modulation of the antibiotic activity against multidrug resistant strains of coumarins isolated from Rutaceae species. **Microbial Pathogenesis**, v. 104, p. 151-154, 2017.

MADEIRO, S. A. L.; COSTA, V. C. O.; DUARTE, S. L. F.; DA CUNHA, C. P.; SCOTTI, M. T.; AGRA, M. F.; BRAZ-FILHO, R.; DA SILVA, M. S.; TAVARES, J. F. Brazoxide A, a new tirucallane triterpene from *Pilocarpus spicatus* subsp. *aracatensis* Kaastra. **Revista Virtual de Química**, v. 8, n. 1, p. 196-203, 2016a.

MADEIRO, Sara Alves Lucena. **Contribuição ao conhecimento fitoquímico e biológico de duas espécies de Rutaceae da flora paraibana**. 2016. Tese de Doutorado (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa- PB, 2016b.

MAFEZOLI, J.; VIEIRA, P. C.; FERNANDES, J. B. SILVA, M. F. G. F.; ALBUQUERQUE, S. In vitro activity of Rutaceae species against the trypomastigote form of *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 73, n. 1-2, p. 335–340, 2000.

MARIN, F. J.; TORRES, O. L.; ROBLEDO, S. M.; DORIA, M. E. Estudio fitoquímico y evaluación de la actividad antioxidante y leishmanicida de la especie *Pilocarpus alvaradoi* (Rutaceae). **Información Tecnológica**, v. 29, n. 3, p. 177-186, 2018.

MATIUCCI, M. A.; ROCHA, J. D. M.; CHAMBÓ, A. P. S.; ALVES, L. F. S.; SILVA, A. A.; OLIVEIRA, G. G.; CORRÊA, S. S.; SILVA, A. F.; GASPARINO, E.; GOES, E. S. R.; SOUZA, M. L. R. Ação antioxidante de pigmentos naturais em filés de tilápia do Nilo defumados. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 13, p. 1-12, 2021.

MATSUNO, T. Studies on the Components of Citrus Species (Rutaceae). IV. Studies on the constituents of the Orange Oil. **J-STAGE-YAKUGAKU ZASSHI**, v. 79, n. 4, p. 540-541, 1959.

MELLO, C. B.; UZEDA, C. D.; BERNARDINO, M. V.; MENDONÇA-LOPES, D.; KELECOM, A.; FEVEREIRO, P. C. A.; GUERRA, M. S.; OLIVEIRA, A.P.; ROCHA, L. M.; GONZALEZ, M. S. Effects of the essential oil obtained from *Pilocarpus spicatus* Saint-Hilaire (Rutaceae) on the development of *Rhodnius prolixus* nymphs. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 4, p. 514-520, 2007.

MOHAMED, Z. A.; ELIASER, E. M.; MAZZON, E.; ROLLIN, P.; LIAN EE, G. C.; RAZIS, A. F. A. Neuroprotective Potential of Secondary Metabolites from *Melicope lunu-ankenda* (Rutaceae). **Molecules**, v. 24, n. 17, p. 1-21, 2019.

MOLEEPHAN, W.; WITTAYALERTPANYA, S.; RUANGRUGSI, N.; LIMPANASITHIKUL, W. Effect of xanthoxylol on melanin content and melanogenic protein expression in B16F10 melanoma. **Asian Biomedicine**, v. 6, n. 3, p. 413-422, 2012.

MONTEIRO, S.C.; BRANDELLI, C.L.C. **Farmacobotânica: Aspectos Teóricos e Aplicação**. 1. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017. 160 p. ISBN: 8582714408.

MORTON, C. M.; TELMER, C. New Subfamily Classification for the Rutaceae. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 99, n. 4, p. 620–641, 2014.

MOURA, D. F.; MELO, M. A.; BARROS, D. M.; ROCHA, T. A.; SILVA, F. A.; SILVA, G. M.; OLIVEIRA, G. B.; MEDEIROS, S. M. F. R. S.; CAVALCANTI, I. D. L.; MACÊDO, D. C. S.; SOARES, J. C. S.; NUNES, J. S.; SIQUEIRA, T. T. A.; LEITE, A. R. F.; COSTA, M. P.; DINIZ, M. A.; COSTA, M. P.; SANTOS, J. M. S.; FONTE, R. A. B. A importância da biossegurança na produção e utilização de produtos naturais e fitoterápicos. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 2, p.7054-7062, 2020.

MURRAY, R. D. H.; JORGE, Z. D. A simple method for differentiating between angular and linear 5-methoxyfuranocoumarins. **Phytochemistry**, v. 23, n. 3, p. 697-699, 1984.

NOGUEIRA, J. A. P.; FIGUEIREDO, A.; DUARTE, J. L.; ALMEIDA, F. B.; SANTOS, M. G.; NASCIMENTO, L. M.; FERNANDES, C. P.; MOURÃO, S. C.; TOSCANO, J. H. B.; ROCHA, L. M.; CHAGAS, A. S. C. Repellency effect of *Pilocarpus spicatus* A. St.-Hil essential oil and nanoemulsion against *Rhipicephalus microplus* larvae. **Experimental Parasitology**, v. 215, 2020.

O'BRIEN, J.; WILSON, I.; ORTON, T.; POGNAN, F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. **European Journal of Biochemistry**, v. 267, p. 5421-5426, 2000.

OLIMAT, S. Pilocarpine alkaloid a review. **EAS Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 2, n. 4, p. 161-165, 2020.

OLIVEIRA, A. P. et al. Chemical and biological investigations of *Pilocarpus spicatus* essential oils. **Boletín Latinoamericano y Del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, 2010.

OMBITO, J. O.; CHI, G. F.; WANSI, J. D. Ethnomedicinal uses, phytochemistry, and pharmacology of the genus *Vepris* (Rutaceae): A review. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 267, n. 1, p. 1-85, 2021.

OMUJAL, F.; TENDA, K. I.; LUTOTI, S.; KIRABO, I.; KASANGO, S. D.; NAMBATYA, K. G. Phytochemistry and anti-inflammatory activity of ethanolic root bark extract of *Vepris nobilis* Mziray (Rutaceae family). **Scientific African**, v. 9, p. 1-8, 2020.

O'NEILL, T.; JOHNSON, J. A.; WEBSTER, D.; GRAY, C. A. The Canadian medicinal plant *Heracleum maximum* contains antimycobacterial diynes and furanocoumarins. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 147, n.1, p. 232-237, 2013.

OTHMAN, S. N. A. M.; HASSAN, M. A.; NAHAR, L.; BASAR, N.; JAMIL, S.; SARKER, S. D. Essential Oils from the *Malaysian Citrus* (Rutaceae) Medicinal Plants. **Medicines**, v. 3, n. 13, p. 1-11, 2016.

PAVÃO, F.; CASTILHO, M. S.; PUPO, M. T.; DIAS, R. L. A.; CORREA, A. G.; FERNANDES, J. B.; SILVA, M. F. G. F.; MAFEZOLI, J.; VIEIRA, P. C.; OLIVA, G. Structure of *Trypanosoma cruzi* glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase complexed with chalepin, a natural product inhibitor, at 1.95 Å resolution. **Federation of European Biochemical Societies**, v. 520, n. 1-3, p. 13-17, 2002.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; VYVYAN, J. R. **Introdução à espectroscopia**. 4. ed. Cengage Learning, 2015.

PAW, M.; BEGUM, T.; GOGOI, R.; PANDEY, S. K.; LAL, M. Chemical composition of *Citrus limon* L. Burmf Peel essential oil from north east India. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v. 23, n. 2, p. 337-344, 2020.

PETIT, A.; POLONOWSKY, M. Two new alkaloids isolated from a species of Jaborandi. **Journal of Chemical Society**, abstr. 72, v. 1, n. 583, 1897.

PIRANI, J.R. 2002. Rutaceae *In*: WANDERLEY, M.G.L., SHEPHERD, G.J., GIULIETTI, A.M., MELHEM, T.S., BITTRICH, V., KAMEYAMA, C. (eds.) **Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo**. Instituto de Botânica, São Paulo, vol. 2, p. 281-308. ISBN 85-7523-053-0.

PIRANI, J. R.; DEVECCHI, M. F. Flora das cangas da Serra dos Carajás, Pará, Brasil: Rutaceae. **Rodriguésia**, v. 69, n. 1, p. 209-217, 2018.

PIRANI, J.R.; GROppo, M. 2020. Rutaceae *in* **Flora do Brasil 2020**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB212>. Acesso em: Jan de 2022.

PUTRI, R. J.; ALDIN, M. F.; SAPUTRI, R. D.; TJAHJANDARIE, T. S.; TANJUNG, M. Antifeedant Activity of Benzopyrans from *Melicope latifoli*. **Indonesia Chimica Acta**, v. 13, n. 2, p. 51-54, 2020.

RASHID, M. A.; GRAY, A. I.; WATERMAN, P. G. Coumarins from *Pheballium tuberosum* ssp. *megaphyllum* and *Pheballium filifolium*. **Journal of Natural Products**, v. 55, n. 7, p. 851-858, 1992.

QUADER, A.; ARMSTRONG, J. A.; GRAY, A. I.; HARTLEY, T. G.; WATERMAN, P. G. Chemosystematics of *Acradenia* and general significance of acetophenones in the Rutaceae. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 19, n. 2, p. 171-176, 1991.

QURADHA, M. M.; KHAN, R.; ADHIKARI, A.; RAUF, A., RASHID, U.; BAWAZEER, S.; AL-AWTHAN, Y. S.; BAHATTAB, O.; MUBARAK, M.S. Isolation, biological evaluation, and molecular docking studies of compounds from *Sophora mollis* (Royle) Graham Ex Baker. **American Chemical Society Omega**, v. 6, n. 24, p. 15911–15919, 2021.

REIS, Gabriela Santana. **Levantamento do uso de plantas medicinais por agricultores de municípios de Sergipe**. 2018. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) – Universidade Federal de Sergipe, Lagarto, 2018.

REISCH, J.; ADEBAJO, A. C.; ALADESANMI, A. J.; ADESINA, K. S.; BERGENTHAL, D.; MEVE, U. Chemotypes of *Murraya koenigii* growing in Sri Lanka. **Planta Medica**, v. 60, n. 3, p. 295-296, 1994.

RODRIGUES, Ana Rita Miradouro. **Produtos Naturais na Descoberta de Fármacos**. 2018. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Fernando Pessoa, Porto, Portugal, 2018.

SADGROVE, N. J.; GONÇALVES-MARTINS, M.; JONES, G. L. Chemogeography and antimicrobial activity of essential oils from *Geijera parviflora* and *Geijera salicifolia* (Rutaceae): two traditional Australian medicinal plants. **Phytochemistry**, v. 104, p. 60-71, 2014.

SANDOVAL-MONTEMAYOR, N. E.; GARCÍA, A.; ELIZONDO-TREVIÑO, E.; GARZA-GONZÁLEZ, E.; ALVAREZ, L.; CAMACHO-CORONA, M. R. Chemical composition of hexane extract of *Citrus aurantifolia* and anti-*Mycobacterium tuberculosis* activity of some of its constituents. **Molecules**, v. 17, n. 9, p. 11173-11184, 2012.

SANTOS, A.P.; MORENO, P. R. H. *Pilocarpus* spp.: A survey of its chemical constituents and biological activities. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 40, n. 2, p. 116-137, 2004.

SANTOS, F. A.; CUNHA, G. M. A.; VIANA, G. S. B.; RAO, V. S. N.; MANOEL, A. N.; SILVEIRA, E. R. Antibacterial activity of essential oils from *Psidium* and *Pilocarpus* species of plants. **Phytotherapy Research**, v. 11, n.1, p. 67-69, 1997.

SARAIVA-FILHO, D. E.; SAOUSA, J. B.; SANTOS, H. S.; FONTENELLE, R. O. S. Compostos químicos isolados de extratos e óleos essenciais do gênero *Zanthoxylum Linnaeus* (Rutaceae) e seu potencial antimicrobiano. **Hoehnea**, v. 47, 2020.

SARTOR, C. F. P.; LIMA, M. P.; SILVA, M. F. G. F.; FERNANDES, J. B.; FORIM, M. R.; PIRANI, J. R. New Limonoids from *Dictyoloma vandellianum* and *Sohnreyia excelsa*: chemosystematic considerations. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 30, n. 11, p. 2464-2476, 2019.

SARKER, S. D.; NAHAR, L. In: A.D. Kinghorn, H. Falk, S. Gibbons, J. Kobayashi (eds.), **Progress in the Chemistry of Organic Natural Products**, v. 106, DOI: 10.1007/978-3-319-59542-9_3

SECA, A. M. L. Produtos naturais como medicamentos de sucesso. **Açore Magazine** – UAciência, pag. 6-7, 2020.

SHEN, D.; CHAO, C.; CHAN, H.; HUANG, G.; HWANG, T.; LAI, C.; LEE, K.; THANG, T.; WU, T. Bioactive constituents of *Clausena lansium* and a method for discrimination of aldose enantiomers. **Phytochemistry**, v. 82, p. 110-117, 2012.

SHEN, C.; WANG, T.; JIANG, J.; HUANG, C.; ZHU, W. Bergaptol from blossoms of *Citrus aurantium* L. var. *amara* Engl inhibits LPS-induced inflammatory responses and ox-LDL-induced lipid deposition. **Food and Function**, v. 11, n. 6, p. 4915-4926, 2020.

SILVA, C.V.; BOMFIM, F.C.C.; DOS SANTOS, M.A.V. ; VELOZO, E.S. Estudo fitoquímico e avaliação in vitro da atividade anti-*Trypanosoma cruzi* cepa Y de *Pilocarpus spicatus* St. Hil. (Rutaceae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.16, n.4, p.812-818, 2014.

SILVA, J. C. R.; RAO, V. S. N. Involvement of serotonin and eicosanoids in the rat paw oedema response to the essential oil of *Pilocarpus spicatus*. **Mediators of Inflammation**, v.1, n.3, p. 167-169, 1992.

SILVA, F. A.; BIZERRA, A. M. C.; FERNANDES, P. R. D. Testes fitoquímicos em extratos orgânicos de *Bixa orellana* L (urucum). **Holos**, v. 2, p. 484-498, 2018.

SILVA, J. G. S.; JUNIOR, R. S. M.; LOBATO, A. K. C. L. Coagulantes naturais utilizados no tratamento de efluentes em indústrias têxteis. **Cadernos de Prospecção** – Salvador, v. 13, n. 5, p. 1450-1463, 2020.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMAN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS. Florianópolis: Editora da UFSC, 2007. 548 p. ISBN: 978-85- 7025- 927-1 (Editora da UFRGS). ISBN: 978-85-328-0395-5 (Editora da UFSC).

SIMONSEN, H. T.; ADSERSEN, A.; BREMNER, P.; HEINRICH, M.; SMITT, W. U.; JAROSZEWSKI, J. W. Antifungal constituents of *Melicope borbonica*. **Phytotherapy Research**, v. 18, n. 7, p. 542-545, 2004.

SOUSA, A. A; SANTOS, A. K. G.; ROCHA, F. D. L. J. Plantas medicinais em enfermagem: os saberes populares e o conhecimento científico. **Extensão em Debate**, v.3, n.1, p. 48-67, 2019.

SOUZA, A. O.; BESSA, D. H. R. F.; FERNANDES, C. C.; PEREIRA, P. S.; MARTINS, C. H. G.; MIRAND, M. L. D. Phytochemical screening of extracts from *Spiranthera odoratissima* A. St.-Hil. (Rutaceae) leaves and their in vitro antioxidant and anti-*Listeria monocytogenes* activities. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 42, n.1, 2020.

SOUZA, Simone Machado. **Atividade antibacteriana de cumarinas naturais e derivados**. 2005. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.

SUN, K. Purification and identification of Xanthoxylin. **Modern Food Science and Technology**, v. 31, n. 1, p. 137-141, 2015.

TADA, Y.; SHIKISHIMA, Y.; TAKAISHI, Y.; SHIBATA, H.; HIGUTI, T.; HONDA, G.; ITO, M.; TAKEDA, Y.; KODZHIMATOV, O. K.; ASHURMETOV, O.; OHMOTO, Y. Coumarins and g-pyrone derivatives from *Prangos pabularia*: antibacterial activity and inhibition of cytokine release. **Phytochemistry**, v.59, n.6, p. 649–654, 2002.

TAHSIN, T.; WANSI, J. D.; AL-GROSHI, A.; EVANS, A.; NAHAR, L.; MARTIN, C.; SARKER, S. D. Cytotoxic Properties of the Stem Bark of *Citrus reticulata* Blanco (Rutaceae). **Phytotherapy Research**, v. 31, n. 8, p. 1215-1219, 2017.

TAVARES, W. Bactérias gram-positivas problemas: resistência do estafilococo, do enterococo e do pneumococo aos antimicrobianos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 33, n. 3, p. 281-301, 2000.

VALENCIENNES, E.; SMADJA, J.; CONAN, J. Y. Screening for biological activity and chemical composition of *Euodia borbonica* var. *borbonica* (Rutaceae), a medicinal plant in Reunion Island. **Journal of Ethnopharmacology**, v.64, n. 3, p. 283–288, 1999.

VIANA, P. O.; RAMOS, A. C. C. A. Utilização de plantas medicinais como ferramenta de estímulo para o resgate de cultura e qualidade de vida. **Saber Científico**, v. 8, n. 1, p. 89-102, 2019.

VIVIAN, M. A.; GROSSKOPF, E. J.; NUNES, G. C.; ITAKO, A. T.; MODES, K. S. Qualidade e eficiência de produtos naturais no tratamento preservativo das madeiras de *Araucaria angustifolia*, *Eucalyptus viminalis* e *Pinus taeda*. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v. 19, n.1, p. 35-47, 2020.

VIZZOTTO, M.; KROLOW, A. C.; WEBER, G. E. B. Metabólitos secundários encontrados em plantas e sua importância. Embrapa Clima Temperado. Documentos, 316. **Embrapa**, Pelotas-RS, 2010.

WONGTHET, N.; SANEVAS, N.; SCHINNERL, J.; VALANT-VETSCHERA, K.; BACHER, M.; VAJRODAYA, S. Chemodiversity of *Clausena excavata* (Rutaceae) and related species: coumarins and carbazoles. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 80, p. 84–90, Jul. 2018.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Traditional herbal remedies for primary health care**. Regional Office for South-East Asia, 2010. ISBN 978-92-9022. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/206024>. Acesso em: 12 Jan 2022.

WU, L.; WANG, X.; XU, W.; FARZANEH, F.; XU, R. The structure and pharmacological functions of coumarins and their derivatives. **Current Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 32, p. 4236-4260, 2009.

YAN, G.; QIAO, Z.; WU, Y.; ZHOU, J.; ZHANG, Y.; LIU, Y.; FU, Y. Study on coumarins and alkaloids from stems of *Clausena lenis*. **Chinese Traditional and Herbal Drugs**, v. 51, n. 7, p. 1825-1830, 2020.

ZHOU, P.; TAKAISHI, Y.; DUAN, H.; CHEN, B.; HONDA, G.; ITOH, M.; TAKEDA, Y.; KODZHIMATOV, O.; LEE, K. Coumarins and bicoumarin from *Ferula sumbul*: anti-HIV activity and inhibition of cytokine release. **Phytochemistry**, v. 53, n. 6, p. 689-697, 2000.