

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE ARARAQUARA

Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

**Estudo fitoquímico, variação climática e potencial
biológico dos cladódios de variedades comerciais
de pitaya**

Renan Canute Kamikawachi

Orientador: Prof. Dr. Wagner Vilegas

Araraquara

2022



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"**

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Campus de Araraquara

Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas



Estudo fitoquímico variação climática e potencial biológico dos cladódios de variedades comerciais de pitaya

Renan Canute Kamikawachi

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos, para obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Wagner Vilegas

**Araraquara- SP
2022**

Kamikawachi, Renan Canute.
K715e Estudo fitoquímico variação climática e potencial biológico dos cladódios de variedades comerciais de pitaya / Renan Canute Kamikawachi. – Araraquara, 2022.
107 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas. Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos.

Orientador: Wagner Vilegas.

1. Perfil de metabólito. 2. Flavonoides. 3. GNPS. 4. Antioxidante. I. Vilegas, Wagner, orient. II. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE:

Estudo fitoquímico, sazonalidade e potencial farmacológico dos cladódios de espécies comerciais de pitaya

AUTOR: RENAN CANUTE KAMIKAWACHI

ORIENTADOR: WAGNER VILEGAS

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em Ciências, área: Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. WAGNER VILEGAS (Participação Virtual)
Departamento de Ciências Biológicas e Ambientais / Instituto de Biociências do
Campus do Litoral Paulista da Unesp

Profa. Dra. CLAUDIA MARIA FURLAN (Participação Virtual) Departamento de
Botânica / Instituto de Biociências da USP

Prof. Dr. GERALDO LUIZ GONÇALVES SOARES (Participação Virtual)
Departamento de Botânica / Instituto de Biociências da UFRGS

Profa. Dra. ALEXANDRA CHRISTINE HELENA FRANKLAND SAWAYA
(Participação Virtual) Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Unicamp

Prof. Dr. ODAIR JOSÉ GARCIA DE ALMEIDA (Participação Virtual)
Departamento de Ciências Biológicas e Ambientais / Instituto de Biociências do
Campus do Litoral Paulista da Unesp

Araraquara, 11 de janeiro de 2023

SUMÁRIO

1. Introdução	1
2. Objetivos	8
3. Material e Métodos	8
3.1. <i>Coleta</i>	8
3.2. <i>Preparação do extrato</i>	10
3.3. <i>Metabolômica untarget, variações climática e interespecífica</i>	
3.4. <i>Identificação das substâncias por espectrometria de massas de alta resolução (HRMS)</i>	11
3.5. <i>Avaliação da Atividade Antioxidante</i>	12
3.6. <i>Avaliação da atividade antiproliferativa em células de câncer de colo uterino</i>	12
3.7. <i>Avaliação genotoxicidade por ensaio de Cometa</i>	13
3.8. <i>Toxicidade aguda em <u>zebrafish</u></i>	13
3.9. <i>Desreplicação de flavonoides bioativos e variedades com potencial antiproliferativo</i>	13
4. Resultados e Discussão	14
4.1. <i>Metaboloma untarget de <u>Selenicereus</u></i>	15
4.2. <i>Efeitos da variação climática em <u>Selenicereus</u></i>	30
4.3. <i>Atividade Antioxidante de <u>Selenicereus</u></i>	62
4.4. <i>Avaliação da atividade antiproliferativa em células de câncer de colo uterino (HeLa)</i>	78
4.5. <i>Avaliação genotoxicidade por ensaio de Cometa</i>	80
4.6. <i>Toxicidade aguda em zebrafish de variedades selecionadas de</i>	

<u>Selenicereus</u>	80
5. Conclusões	84
6. Referência	86

Lista de Abreviaturas

ACN – Acetonitrila

AF – Ácido ferúlico

AHO – Ácido desoxioleonólico

AO – Ácido oleanólico

dHex – Desoxihexose

DPPH – 2,2-difenil-picrilhidrazila

MEOH – Metanol

GlucA – Ácido Glicurônico

GNPS – *Global Natural Products Social Molecular Networking*

Hex – Hexose

HPLC-ESI-IT-MSⁿ – Cromatografia Líquida de alta eficiência acoplado a espectrômetro de massas com fonte de ionização *electro spray* e analisador de Ion Trap

K – Kaempferol

IR – Isorhamnetina

OECD – *Organization for Economic Co-operation and Development*

Pent – Pentose

Q – Quercetina

Tr – Tempo de retenção

Lista de Figuras

Figura 1: Esquema do posicionamento taxonômico de *Selenicereus* na família Cactacea segundo Anderson, 2001.

Figura 2: Planta de *Selenicereus undatus*.

Figura 3: Estruturas das substâncias 1-15 presentes em flores, sementes e frutos no gênero *Selenicereus* (Ibrahim et. al. 2018).

Figura 4: Cromatograma resultante da análise por HPLC-ESI-IT-MSn do extrato metanólico dos cladódios da variedade Desert King referente ao mês de outubro/2019.

Figura 5: Rede molecular representando o metaboloma de *Selenicereus* e as classes de substâncias encontradas.

Figura 6: Heatmap do metaboloma das 17 variedades comerciais de *Selenicereus* investigadas.

Figura 7: Rede molecular comparando as substâncias encontradas nos extratos metanólicos da variedade Green Nigth com as demais variedades de *Selenicereus*.

Figura 8: Rede molecular comparativa das substâncias encontradas nos extratos metanólico da variedade híbrida Purple Haze, gerada pelo cruzamento das espécies *S. undatus* (Branca) e *S. guatemalensis* (American Beauty).

Figura 9: Rede molecular comparativa das substâncias encontradas nos extratos metanólicos da variedade híbrida Colombiana Roxa, gerada pelo cruzamento das espécies *S. megalanthus* (Colombiana) e *S. guatemalensis* (American Beauty).

Figura 10: Rede molecular comparativa das substâncias encontradas nos extratos metanólicos da variedade híbrida Desert King, gerada pelo cruzamento das espécies *S. megalanthus* (Colombiana) e *S. monacanthus* (Orejona).

Figura 11: Rede molecular comparativa das substâncias encontradas nos extratos metanólicos da variedade híbrida Zamorano, gerada pelo cruzamento das espécies *S. costaricensis* (Costa Rica) e *S. monacanthus* (Orejona).

Figura 12: Rede molecular comparando das substâncias encontradas nos extratos metanólicos das variedades Branca e Golden, ambas provenientes da espécie *S. undatus*.

Figura 13: Rede molecular comparando das substâncias encontradas nos extratos metanólicos das variedades Cerrado e Thick King, ambas provenientes da espécie *S. setaceus*.

Figura 14: A) Branca (*S. undatus*), B) Costa Rica (*S. costaricensis*), C) Orejona (*S. monacanthus*), D) Pink (*S. purpusii*), E) Zamorano (*S. monacanthus* x *S. costaricensis*), F) Golden (*S. undatus*), G) Delight (*S. undatus* x *S. guatemalensis*), H) Makisupa (*S. undatus* x *S. monacanthus*)

Figura 15a: Variação mensal do teor dos tipos de flavonoides ao longo do ano na

variedade American Beauty. (Q – derivados de Quercetina, IR- Isorhamnetina, K – derivados de Kaempferol e DQ– Diidroquercetina).

Figura 15b: Gráfico de dispersão gerado pela PLS-DA através dos dados metabolômicos das quatro estações da variedade American Beauty.

Figura 16a: Variação mensal do teor dos tipos de flavonoides ao longo do ano na variedade Branca. (Q – derivados de Quercetina, IR- Isorhamnetina, K – derivados de Kaempferol e DQ– Diidroquercetina)

Figura 16b: Gráfico de dispersão gerado pela PLS-DA através dos dados metabolômicos das quatro estações da variedade Branca.

Figura 17a: Variação mensal do teor dos tipos de flavonoides ao longo do ano na variedade Cerrado. (Q – derivados de Quercetina, IR- Isorhamnetina, K – derivados de Kaempferol e DQ– Diidroquercetina).

Figura 17b: Gráfico de dispersão gerado pela PLS-DA através dos dados metabolômicos das quatro estações da variedade Cerrado.

Figura 18a: Variação mensal do teor dos tipos de flavonoides ao longo do ano na variedade Chinesa. (Q – derivados de Quercetina, IR- Isorhamnetina, K – derivados de Kaempferol e DQ– Diidroquercetina).

Figura 18b: Gráfico de dispersão gerado pela PLS-DA através dos dados metabolômicos das quatro estações da variedade Chinesa.

Figura 19a: Variação mensal do teor dos tipos de flavonoides ao longo do ano na variedade Colombiana. (Q – derivados de Quercetina, IR- Isorhamnetina, K – derivados de Kaempferol e DQ– Diidroquercetina)

Figura 19b: Gráfico de dispersão gerado pela PLS-DA através dos dados metabolômicos das quatro estações da variedade Colombiana.

Figura 20: Variação mensal do teor dos tipos de flavonoides ao longo do ano na variedade Colombiana Roxa. (Q – derivados de Quercetina, IR- Isorhamnetina, K – derivados de Kaempferol e DQ– Diidroquercetina)

Figura 21a: Variação mensal do teor dos tipos de flavonoides ao longo do ano na variedade Condor. (Q – derivados de Quercetina, IR- Isorhamnetina, K – derivados de Kaempferol e DQ– Diidroquercetina)

Figura 21b: Gráfico de dispersão gerado pela PLS-DA através dos dados metabolômicos das quatro estações da variedade Condor.

Figura 22a: Variação mensal do teor dos tipos de flavonoides ao longo do ano na variedade Conne Mayer. (Q – derivados de Quercetina, IR- Isorhamnetina, K – derivados de Kaempferol e DQ– Diidroquercetina)

22b: Gráfico de dispersão gerado pela PLS-DA através dos dados metabolômicos das quatro estações da variedade Conne Mayer.

Figura 23a: Variação mensal do teor dos tipos de flavonoides ao longo do ano na

variedade Costa Rica. (Q – derivados de Quercetina, IR- Isorhamnetina, K – derivados de Kaempferol e DQ– Diidroquercetina)

Figura 23b: Gráfico de dispersão gerado pela PLS-DA através dos dados metabolômicos das quatro estações da variedade Costa Rica.

Figura 24a: Variação mensal do teor dos tipos de flavonoides ao longo do ano na variedade Desert King. (Q – derivados de Quercetina, IR- Isorhamnetina, K – derivados de Kaempferol e DQ– Diidroquercetina)

Figura 24b: Gráfico de dispersão gerado pela PLS-DA através dos dados metabolômicos das quatro estações da variedade Desert King.

Figura 25: Variação mensal do teor dos tipos de flavonoides ao longo do ano na variedade Golden. (Q – derivados de Quercetina, IR- Isorhamnetina, K – derivados de Kaempferol e DQ– Diidroquercetina)

Figura 25b: Gráfico de dispersão gerado pela PLS-DA através dos dados metabolômicos das quatro estações da variedade Golden.

Figura 25a: Variação mensal do teor dos tipos de flavonoides ao longo do ano na variedade Orejona. (Q – derivados de Quercetina, IR- Isorhamnetina, K – derivados de Kaempferol e DQ– Diidroquercetina)

Figura 26b: Gráfico de dispersão gerado pela PLS-DA através dos dados metabolômicos das quatro estações da variedade Orejona.

Figura 27a: Variação mensal do teor dos tipos de flavonoides ao longo do ano na variedade Pink. (Q – derivados de Quercetina, IR- Isorhamnetina, K – derivados de Kaempferol e DQ– Diidroquercetina)

Figura 27b: Gráfico de dispersão gerado pela PLS-DA através dos dados metabolômicos das quatro estações da variedade Pink.

Figura 28a: Variação mensal do teor dos tipos de flavonoides ao longo do ano na variedade Purple Haze. (Q – derivados de Quercetina, IR- Isorhamnetina, K – derivados de Kaempferol e DQ– Diidroquercetina)

Figura 28b: Gráfico de dispersão gerado pela PLS-DA através dos dados metabolômicos das quatro estações da variedade Purple Haze.

Figura 29a: Variação mensal do teor dos tipos de flavonoides ao longo do ano na variedade Thick King. (Q – derivados de Quercetina, IR- Isorhamnetina, K – derivados de Kaempferol e DQ– Diidroquercetina)

Figura 29b: Gráfico de dispersão gerado pela PLS-DA através dos dados metabolômicos das quatro estações da variedade Thick King.

Figura 30a: Variação mensal do teor dos tipos de flavonoides ao longo do ano na variedade Zamorano. (Q – derivados de Quercetina, IR- Isorhamnetina, K – derivados de Kaempferol e DQ– Diidroquercetina)

Figura 30b: Gráfico de dispersão gerado pela PLS-DA através dos dados

metabolômicos das quatro estações da variedade Zamorano.

Figura 31: Comparação entre as classes de metabólitos e a atividade antioxidante da variedade American Beauty.

Figura 32: Comparação entre as classes de metabólitos e a atividade antioxidante da variedade Branca.

Figura 33: Comparação entre as classes de metabólitos e a atividade antioxidante da variedade Cerrado.

Figura 34: Comparação entre as classes de metabólitos e a atividade antioxidante da variedade Chinesa.

Figura 35: Comparação entre as classes de metabólitos e a atividade antioxidante da variedade Colombiana.

Figura 36: Comparação entre as classes de metabólitos e a atividade antioxidante da variedade Colombiana Roxa.

Figura 37: Comparação entre as classes de metabólitos e a atividade antioxidante da variedade Condor.

Figura 38: Comparação entre as classes de metabólitos e a atividade antioxidante da variedade Conne Mayer.

Figura 39: Comparação entre as classes de metabólitos e a atividade antioxidante da variedade Costa Rica.

Figura 40: Comparação entre as classes de metabólitos e a atividade antioxidante da variedade Desert King.

Figura 41: Comparação entre as classes de metabólitos e a atividade antioxidante da variedade Golden.

Figura 42: Comparação entre as classes de metabólitos e a atividade antioxidante da variedade Orejona.

Figura 43: Comparação entre as classes de metabólitos e a atividade antioxidante da variedade Pink.

Figura 44: Comparação entre as classes de metabólitos e a atividade antioxidante da variedade Purple Haze.

Figura 45: Comparação entre as classes de metabólitos e a atividade antioxidante de Thick King.

Figura 46: Comparação entre as classes de metabólitos e a atividade antioxidante de Zamorano.

Figura 47: Gráfico de dispersão gerado com dos dados metabólicos anuais de American Beauty.

Figura 48: Gráfico de dispersão gerado com dos dados metabólicos anuais de

Branca.

Figura 49: Gráfico de dispersão gerado com dos dados metabólicos anuais de Desert King.

Figura 50: Gráfico de dispersão gerado com dos dados metabólicos anuais de Thick King.

Figura 51: Gráfico de dispersão gerado com dos dados metabólicos anuais de Zamorano

Figura 52: Exemplo demonstrado a ausencia de cauda no DNA das células, ou seja, ausência de genotoxicidade dos extratos testados de *Selenicereus*.

Figura 53: Rede metabolomica comparando os cinco extratos avaliados quanto a suas atividades antiproliferativas de *Selenicereus*.

Figura 54: Dendograma gerado dos dados metabolômicos anuais de todas as variedades, ressaltando o cluster em que está presente o extrato Zamorano 06.

Lista de Tabelas

Tabela 1: Exemplos de substâncias presentes em frutos, flores e sementes no gênero *Selenicereus*.

Tabela 2: Substâncias anotadas no metaboloma de *Selenicereus*.

Tabela 3: Substâncias identificadas através dos dados gerados por LC-HRMS e comparados por meio da ferramenta MetFrag com a base de dados PubChem.

Tabela 4: Atividade antioxidante (500 ug/mL) das variedades de *Selenicereus* ao longo do ano.

Tabela 5: Atividade antiproliferativa dos cinco extratos selecionados de *Selenicereus*

RESUMO

A busca por novas fontes de fármacos é incessável. A vasta biodiversidade brasileira a torna um objeto de estudos extremamente importante. Nesse contexto, dentre os cactos, o gênero *Selenicereus* (A.Berger) Britton & Rose, que produz espécies popularmente conhecidas como pitaya, chama atenção pelo alto valor de seu fruto. Grande parte dos estudos acerca do gênero *Selenicereus* está restrita aos frutos. A utilização dos frutos para a produção de fármacos apresenta dois problemas: 1) depende da época da frutificação e 2) a produção de fármacos compete com o mercado alimentício. Por outro lado, os cladódios (ramos) são presentes independentemente da sazonalidade, não apresentam alto valor de mercado, são produtos resultantes da poda e apresentam atividade antioxidante equiparável ao fruto. Para explorar essa lacuna de informação, investigamos a composição química sazonal (12 meses), a atividade antioxidante e atividade antiproliferativa dos cladódios de 17 variedades comerciais de *Selenicereus*. Foram preparados extratos metanólicos de cada uma das variedades coletadas, que foram analisadas por HPLC-ESI-IT-MSⁿ para obtenção de dados estruturais e metabólicos. O metaboloma revelou a presença de flavonoides derivados do Kaempferol, Isorhamnetina e Quercetina com até seis unidades glicosídicas. A análise através de plataforma GNPS evidenciou que esses flavonoides têm distribuição quali e quantitativamente diferentes em cada variedade, e que ocorrem flutuações na concentração dos flavonoides no decorrer do ano. A atividade antioxidante de cada uma das variedades refletiu a flutuação da variação quali e quantitativa dos flavonoides ao longo do ano. Entretanto, pelo menos cinco amostras promoveram a inibição de DPPH acima de 70%. Dentre as cinco amostras selecionadas, apenas Zamorano 06 promoveu atividade antiproliferativa e apresentou EC₅₀ de 278 µg/mL. As amostras selecionadas não apresentaram genotoxicidade nem toxicidade aguda em *Danio rerio*. Através da desreplicação, sugerimos que a atividade apresentada por Zamorano 06 está relacionada às substâncias dihidroquercetina, isorhamnetina-3-O-glicosídeo, quercetina-3-O-glicosídeo e isorhamnetina 3-(4Rha-galactosilrobinobiosídeo) e também sugerimos que outras nove amostras possam apresentar atividade antiproliferativa, pois estão no mesmo *cluster* que Zamorano 06.

Palavras-chave: perfil de metabólito, flavonoides, GNPS, antioxidante

ABSTRACT

The search for new sources of drugs is incessant. The vast Brazilian biodiversity makes it an extremely important object of study. In this context, among cacti, the genus *Selenicereus* (A.Berger) Britton & Rose, which produces species popularly known as pitaya, draws attention to the high value of its fruit. Most of the studies about the genus *Selenicereus* are restricted to fruits. The use of fruits for the production of drugs presents two problems: 1) it depends on the fruiting season and 2) the production of drugs competes with the food market. On the other hand, cladodes (branches) are present regardless of seasonality, do not have a high market value, are products resulting from pruning and have antioxidant activity comparable to the fruit. To explore this information gap, we investigated the seasonal chemical composition (12 months), antioxidant activity and antiproliferative activity of cladodes of 17 commercial varieties of *Selenicereus*. Methanolic extracts were prepared from each of the collected varieties, which were analyzed by HPLC-ESI-IT-MSn and by FIA-ESI-IT-MSn to obtain structural and metabolic data. The metabolome revealed the presence of flavonoids derived from Kaempferol, Isorhamnetin and Quercetin with up to six saccharide units. The analysis using the GNPS platform showed that these flavonoids have a qualitatively and quantitatively different distribution in each variety, and that there are fluctuations in the concentration of flavonoids throughout the year. The antioxidant activity of each variety reflected the fluctuation of the qualitative and quantitative variation of flavonoids throughout the year. However, at least five samples promoted DPPH inhibition above 70%. Among the five selected samples, only Zamorano 06 promoted antiproliferative activity and presented an EC50 of 278 µg/mL. The selected samples did not show genotoxicity neither acute toxicity in *Danio rerio*. Through dereplication, we suggest that the activity presented by Zamorano 06 is related to the substances dihydroquercetin, isorhamnetin-3-O-glucoside, quercetin-3-O-glucoside and isorhamnetin 3-(4Rha-galactosilrobinobioside) and we also suggest that other nine samples may present antiproliferative activity, as they are in the same cluster as Zamorano 06.

Keywords: metabolite profile, flavonoids, GNPS, antioxidant

Agradecimentos

Agradeço primeiramente aos meus pais, Carmen Canute Kamikawachi e Fausto Koichi Kamikawachi, por sempre me apoiarem e incentivarem meus estudos.

Ao meu orientador, Wagner Vilegas, por todos os ensinamentos e amizade desde minha iniciação científica.

Aos meus amigos da UNESP, os quais levarei para vida: Alexandre, Juan, Caio, Virginia e Clara.

Ao Prof. Leandro Mantovani pela colaboração e realização dos ensaios antiproliferativos.

À Profa. Tânia Costa por viabilizar os ensaios com zebrafish.

À CAPES, "O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001 pelo auxílio financeiro e pela bolsa concedida

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP

1. INTRODUÇÃO

Plantas são utilizadas como recursos medicinais desde o início das civilizações. Sumérios, egípcios e gregos descreviam diversas espécies para o preparo de receitas de drogas vegetais utilizadas no tratamento de enfermidades. No decorrer da história, a utilização de plantas como recurso medicinal passou a ser parte do conhecimento tradicional associado de cada povo e cultura (PETROVSKA, 2012).

O Brasil possui uma vasta biodiversidade que é utilizada por populações tradicionais. Entretanto, apenas 5% de todo o mercado brasileiro de medicamentos possuem origem vegetal (DUTRA *et al.*, 2016).

Isso ocorre também porque, para que um extrato vegetal possa ser utilizado adequadamente na obtenção de fitopreparados, é essencial que se conheçam sua composição química e a sua atividade biológica, de modo a garantir a segurança e a eficácia do fitopreparado. Do ponto de vista químico, é necessário padronizar esse extrato vegetal, ou seja, determinar sua composição qualitativa e quantitativa. Para que seja feita essa padronização, um dos requisitos fundamentais é a determinação do metaboloma da planta e, também, como ele se comporta ao longo do ano (SAHOO *et al.*, 2010).

Ainda, o Brasil é produtor de uma grande variedade de frutos, muitos dos quais são comercializados. No entanto, isso gera material de descarte, geralmente galhos e folhas, os quais são pouco utilizados, tendo baixo valor agregado.

Nesse contexto da pesquisa por materiais de origem vegetal que possam servir de base para a produção de fitopreparados associado ao emprego de materiais vegetais provenientes do descarte de produtos alimentícios, investigamos espécies da família Cactaceae. Essa família é um exemplo desse imenso patrimônio inexplorado, pois o Brasil possui a terceira maior diversidade de espécies do mundo, mas pouco se tem explorado desse táxon (MEIADO, 2012).

De acordo com Stevens (2017), existem aproximadamente 1866 espécies de cactos distribuídos em 139 gêneros. Esses organismos apresentam distribuição natural restrita à América, com exceção de *Rhipsalis baccifera* (Sol.) Stearn, que ocorre naturalmente na África e Ásia (ANDERSON, 2001; BARTHLOTT; HUNT, 1993). Os cactos são plantas com folhas modificadas em espinhos ou ausentes, caule suculento e geralmente habitam ambientes áridos ou semi-áridos (OCAMPO;

COLUMBUS, 2010). Entretanto, cerca 10% de sua diversidade são de espécies de hábitos epífitos e hemiepífitos que habitam o dossel das árvores em florestas neotropicais (BENZING, 2008; WALLACE; GIBSON, 2002), pertencendo às tribos Hylocereeae e Rhipsalideae (subfamília Cactoideae) (Fig. 1).

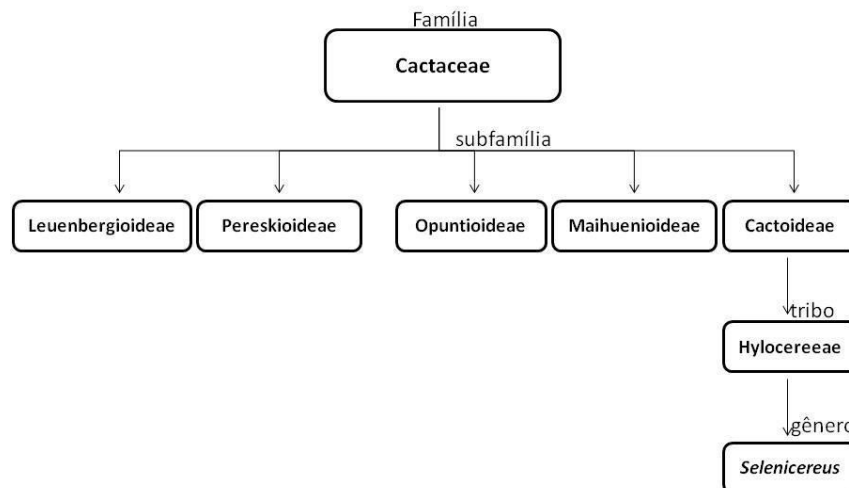


Figura 1: Esquema do posicionamento taxonômico de *Selenicereus* na família Cactaceae segundo Anderson, 2001.

Dentre os cactos epífitos, o gênero *Selenicereus* (A.Berger) Britton & Rose, cujas espécies são popularmente conhecidas como pitayas, nome indígena que significa fruto com escamas (CHAGAS *et al.*, 2014), tem ganhado foco devido ao alto valor econômico de seu fruto (Fig. 2). Esse gênero possui cerca de 15 espécies, sendo todas nativas das América Central e América do Sul, apresentando um *hotspot* na região tropical do México. As plantas de pitayas apresentam hábitos epífitos ou hemiepífitos, raízes aéreas, ramos de coloração verde-claro ou escuro, caule trilobado, flores alongadas podendo atingir até 32 centímetros e de antese noturna, frutos de formato globuloso a ovóide com sementes escuras e pericarpo escamoso (ANDERSON, 2001; ZAPPI *et al.*, 2007).

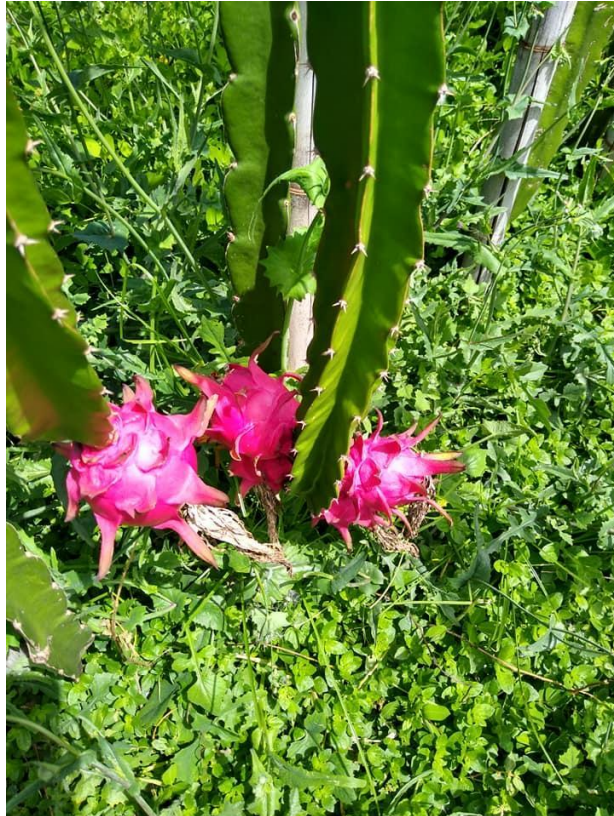


Figura 2: Planta de *Selenicereus undatus*

A classificação taxonômica do gênero *Selenicereus* vem sendo discutida há muito tempo e continuamente sua classificação é alterada. Em 1985, o *International Cactaceae Systematics Group* propôs a atual classificação da família Cactaceae, na qual os gêneros *Hylocereus* e *Selenicereus* são válidos. Entretanto, nessa classificação, as espécies *S. spinulosus*, *S. megalanthus* e *S. setaceus* estão todas agrupadas em *Selenicereus*. A classificação mais recente proposta por Krotkova *et al.* (2017) baseada em dados genéticos e morfoanatômicos propôs a fusão do gênero *Hylocereus* (antigo gênero das pitayas comerciais) ao *Selenicereus*, formando apenas um único grupo com todas as espécies. Porém, os autores destacam a necessidade de diversos métodos de análise (genética, anatômica, ambiental, etc.) e a combinação desses para melhor entendimento da filogenia desse grupo.

Outra característica importante sobre as pitayas refere-se às suas variedades. Variedades ou cultivares são plantas que apresentam características diferentes das demais, podendo ser de ocorrência natural ou agronômica, pois diversos institutos desenvolvem programas com o objetivo de criar novas variedades. Há também fazendas que desenvolvem de forma independente variedades de pitayas, as quais são criadas através de seleções artificiais ou por hibridização (variedade criada a

partir de duas espécies botanicamente identificadas, e. g. *S. megalanthus* e *S. monacanthus* originaram *S. megalanthus* x *S. monacanthus* variedade denominada Desert King), resultando em uma grande diversidade fenotípica e de difícil identificação botânica, pois há poucas informações sobre suas origens (ZIMMERMAN *et al.*, 2017; CRANE; BALERDI, 2006). No entanto, nenhum dos estudos publicados na literatura define quais variedades estão sendo investigadas, sendo que apenas é descrito o nome científico. Isso dificulta a reprodutibilidade do trabalho investigativo e a confiabilidade dos resultados, uma vez que uma única espécie pode apresentar diversas variedades, o que pode influenciar quali e quantitativamente nos metabólitos secundários, como também é visto em outras plantas (Acquavia *et al.* 2021). Essa grande quantidade de variedades ocorre pelo alto valor econômico dos frutos, os quais têm sido investigados como alimento funcional.

Estudos abordando a composição química e as atividades farmacológicas das partes reprodutivas (fruto e flores) da pitaya reportaram atividades antioxidante (TSAI *et al.*, 2019), anticancerígena (LUO *et al.*, 2014), antimicrobiana (NURMAHANI *et al.*, 2012), antidiabética (OMIDIZADEH *et al.*, 2014), cicatrizante (PEREZ *et al.*, 2005) e anti-inflamatória (EKA *et al.*, 2017).

Do ponto de vista químico, a revisão realizada por Ibrahim *et al.* (2018) relatou a presença de 69 substâncias da classe das betalaínas, 10 da classe dos flavonoides e 16 ácidos fenólicos. Exemplificamos a seguir algumas dessas classes de substâncias (Tabela 1 e Figura 3).

Tabela 1: Exemplos de substâncias presentes em frutos, flores e sementes no gênero *Selenicereus*

nº	Substância	Parte da planta
1	Ácido <i>p</i> -Hidroxibenzoico	Fruto, semente
2	Ácido Protocatecuico	Fruto, semente
3	Ácido Vanílico	Fruto, semente
4	Ácido Caféico	Fruto, semente
5	Ácido Gálico	Fruto, semente
6	Ácido Siríngico	Fruto, semente

7	Ácido <i>trans</i> -3,4-Dimetoxicinâmico	Flor
8	Ácido <i>trans</i> -Ferúlico	Flor
9	Diidroquercetina	Flor
10	Diidrokaempferol	Flor
11	Kaempferol-3-O- β -D- glucopiranosideo	Flor
12	Kaempferol-3-neohesperidosideo	Flor
13	Betanidina-5-O-(6)-O- acetil- β -glucopiranosideo	Fruto
14	Indicaxantina	Fruto
15	Ácido g-Aminobutirico-betaxantina	Fruto

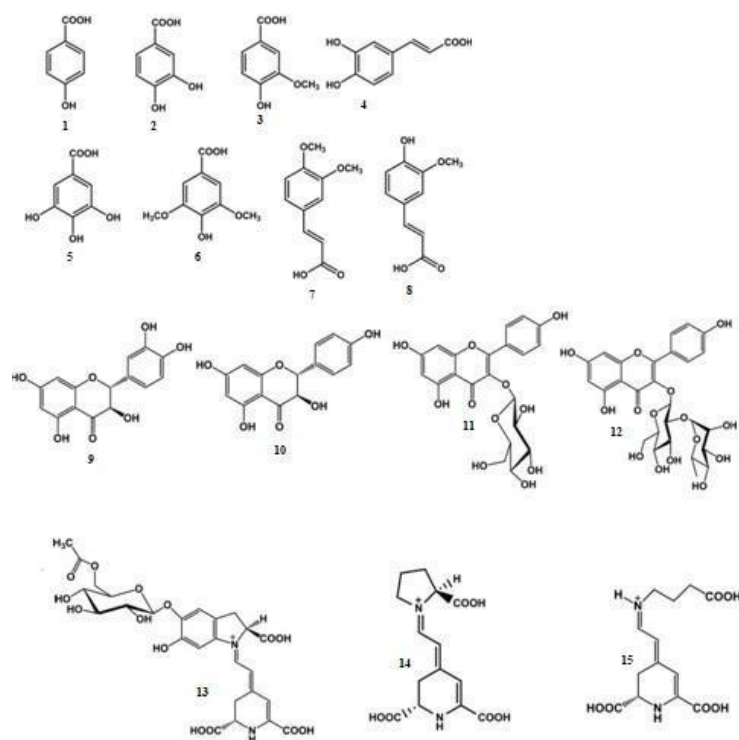


Figura 3: Estruturas das substâncias **1-15** presentes em flores, sementes e frutos no gênero *Selenicereus* (Ibrahim et. al. 2018)

Entretanto, grande parte do conhecimento químico e do potencial farmacológico do gênero *Selenicereus*, até o momento, está restrito aos frutos. Do ponto de vista da obtenção de um fitopreparado, a utilização dos frutos apresenta dois inconvenientes: 1) depende da época da frutificação e 2) o uso dos frutos para a produção de fármacos compete com o mercado alimentício.

Por outro lado, os cladódios (conhecidos como ramos) são presentes independentemente da sazonalidade. Obtidos da poda, eles não apresentam valor de mercado e são tidos como um problema para o descarte, que tem custo elevado, não contribuindo nem para a redução de gastos, nem para a geração de lucro (SPINELLI; PICCHI, 2009). Assim, o estudo químico dos cladódios pode fornecer indicativos para uma possível agregação de valor a esse material, como, por exemplo, a identificação de moléculas que possam ser úteis para a produção de fármacos. Tendo em vista essa possibilidade, é também importante que se avalie se há ou não variação da composição química decorrente de variações sazonais, tendo

em vista que esse fator pode levar a complexas implicações na relação dose/resposta (ALSOHAILI *et al.*, 2018).

No que diz respeito à atividade farmacológica dos cladódios, Tsai *et al.* (2019) avaliaram o teor de compostos fenólicos, a atividade antioxidante, a atividade protetora do DNA, a atividade anticancerígena e a atividade cicatrizante *in vitro* de diferentes partes de *Selenicereus polyrhizus*. Em todos os experimentos foram observados resultados positivos para o extrato metanólico dos cladódios, e em todos os casos os extratos dos cladódios foram mais efetivos quando comparados aos extratos da flor e do fruto. Esses autores afirmam que plantas que apresentam atividade antioxidante têm sido frequentemente estudadas pelo seu potencial em reduzir os danos causados pelo estresse oxidativo. Os autores relatam que o estresse oxidativo tem relação direta com doenças relacionadas ao envelhecimento como o câncer e doenças neurodegenerativas.

Uma das formas em que o câncer se desenvolve é devido ao dano causado ao DNA pelo estresse oxidativo, por isso a busca por plantas que apresentam atividade antioxidante e sejam capazes de proteger o DNA tem relevância para a saúde (NURCHOLIS *et al.* 2021). Além disso, tem crescido os relatórios descrevendo toxicidade secundária e efeitos colaterais graves como: gastrite, anorexia e neuropatia. Ademais, os medicamentos alopáticos possuem elevado custo e, portanto, populações em países desenvolvidos e em desenvolvimento utilizam-se de produtos naturais de plantas como uma fonte alternativa para o tratamento de câncer (OYENIHI; SMITH, 2019).

Pelo exposto, visando investigar o potencial químico, biológico e a utilização sustentável dos resíduos da poda em cultivos de pitaya, o presente estudo buscou avaliar a composição química dos metabólitos secundários e o potencial biológico de 14 espécies e 17 variedades comerciais de *Selenicereus* cultivadas na fazenda Pitaya-BR (Votuporanga, SP). Para a visualização do panorama químico, foram empregadas técnicas de cromatografia líquida (LC) acopladas com técnicas de espectrometria de massas (MS). Na parte biológica, foram avaliadas as atividades antioxidante usando 2,2-difenil-picrilhidrazila (DPPH) e antiproliferativa em células de câncer de colo uterino usando Brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio (MTT) e foi avaliada a capacidade de dano ao DNA pelo ensaio de cometa dos extratos dessas plantas.

2. OBJETIVOS

Avaliar o potencial químico e biológico dos cladódios provenientes da poda de plantas do gênero *Selenicereus*.

Objetivos específicos

- Obter um panorama químico dos metabólitos secundários presentes nos extratos metanólicos dos cladódios de *Selenicereus*;
- Proceder à avaliação sazonal da composição química de *Selenicereus* por métodos quimiométricos;
- Avaliar a atividade antioxidante das variedades mais promissoras;
- Avaliar a atividade antiproliferativa das variedades mais promissoras;
- Avaliar o dano de DNA induzido pelas variedades mais promissoras;
- Avaliar a toxicidade aguda em *Zebrafish* das variedades mais promissoras.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Coleta

Foram coletados três indivíduos de cada uma das 17 variedades comerciais de espécies de *Selenicereus* (Quadro 1) entre os meses de maio/2019 a abril/2020 no município de Votuporanga-SP, na fazenda BR Pitaya Brasil (20°23'10.1"S 49°54'47.6"W). A coleta de três indivíduos buscou reduzir a variabilidade intraespecífica. As exsicatas foram depositadas no Herbário da Universidade Santa Cecília (Santos-SP).

Espécie	Voucher	Variedade	Ano/mês da coleta											
			2019								2020			
			05	06	07	08	09	10	11	12	01	02	03	04

<i>S. costaricensis</i>	HUSC 72.564	I.Costa Rica		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
<i>xS. purpusii</i>	HUSC 12.399	II.Pink	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
<i>S. guatemalensis</i>	HUSC 72.559	III.American Beauty		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
<i>xS. guatemalensis</i>	HUSC 72.563	IV.Condor	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
	HUSC 72.561	V. Chinesa	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
<i>S. undatus x S. guatemalensis</i>	HUSC 12.400	VI. Purple Haze	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
<i>S. undatus</i>	HUSC 12.331	VII. Branca	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
	HUSC 12.397	VII. Golden	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
<i>S. megalanthus</i>	HUSC 12.402	IX. Colombiana	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
<i>S. megalanthus x S. guatemalensis</i>	HUSC 72.562	X. Colombiana Roxa			X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X

<i>S. megalanthus</i> x <i>S. monacanthus</i>	HUSC 72.560	XI. Desert King	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
<i>S. monacanthus</i>	HUSC 12. 398	XII. Orejona	X	X	X	X	X	X	X	X	X		X	X
<i>S. monacanthus</i> x <i>S. costaricensis</i>	HUSC 12.401	XII. Zamorano	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
<i>S. setaceus</i>	HUSC 12.403	XIV. Cerrado	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
	HUSC 12.566	XV. Thick King	X	X	X	X	X	X	X	X	X		X	X
<i>S. undatus</i> x <i>S. stenoptereus</i>	HUSC 72.558	XVI. Conne Mayer		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
<i>S. spinulosus</i>	HUSC 76.565	XVII. Green Night	X	X	X	X	X	X	X	X	X		X	X

3.2 Preparação do Extrato

Três indivíduos de cada uma das 17 variedades de *Selenicereus* foram secos em estufa de ar circulante a 60°C e, em seguida, triturados em moinho de facas, formando um *pool* de cada uma das variedades. O pó (100 mg) foi extraído por maceração assistida por banho ultrassônico com 1 mL de metanol por 10 min. Em seguida, o material resultante foi centrifugado a 3000 rpm e o sobrenadante filtrado em filtro Millex 0,22 µm.

Em sequência, os extratos foram submetidos ao *clean-up* utilizando-se cartuchos Sep-Pak C18 de fase reversa (tamanho da partícula 45µ e diâmetro e

poro 60 Å). O cartucho foi ativado com 450 µL de metanol (MeOH grau MS), 450 µL de H₂O Milli Q, equilibrado com 450 µL de MeOH, e eluído com MeOH. O eluato foi então seco, pesado e diluído, obtendo-se a solução estoque de concentração de 0,5 mg/mL, a qual foi utilizada nas próximas etapas.

3.3 Metabolômica untarget, variações climática e interespecífica

Os dados metabolômicos (área do pico, íon desprotonado, área do pico, tempo de retenção e fragmentação) foram gerados por cromatografia líquida de alta eficiência acoplado a espectrômetro de massas (Thermo Fisher®) com fonte de ionização *electro spray* e analisador de Ion Trap (HPLC-ESI-IT-MSⁿ) utilizando a ferramenta *ion-tree* em modo negativo presente no próprio espectrômetro de massas, sob as seguintes condições: coluna Phenomenex® Luna C18 (250 x 4.6mm 5 µm) e gradiente: 0-60 min (5-100% ACN) sob fluxo de 0,350 mL/min e temperatura do capilar 350°C. Os solventes utilizados foram água acidificada (0,1% ácido fórmico) e ACN grau MS acidificada (0.1% ácido fórmico). Os gases utilizados foram nitrogênio (fluxo de 50 unidades arbitrárias) e hélio (fluxo de 10 unidades arbitrárias) foi utilizado como gás de colisão.

Os dados espectrométricos obtidos foram convertidos para o formato .mzXML no software MSConverter (ProteoWizard) e, em seguida, foram triados no software MzMine2 para eliminação de ruídos (a intensidade selecionada foi de 1E4), adutos, contaminantes e artefatos.

Após a triagem, os dados foram carregados para o servidor FTP(FileZilla, versão 3.10.1.1), integrados na abordagem de redes de interações moleculares e comparados ao banco de dados (ou molecular networking), por meio da plataforma GNPS (Global Natural Products Social Molecular Networking) (WANG *et al.*, 2016). Isso gerou uma rede molecular que mostra todas as substâncias (nós) e a relação de proximidade entre elas (arestas), o tamanho do nodo corresponde diretamente a abundância da substância nas amostras analisadas e o gráfico pizza interno dos nodos representam a quantidade relativa da substância entre as variedades comparadas, assim facilitando a visualização do metaboloma.

Os dados também foram submetidos na plataforma MetaboAnalyst 5.0 (PANG *et al.*, 2021) para análises estatísticas multivariadas como: análise de componentes principais (PCA) e análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA). O filtro utilizado foi *relative standard deviation* (RSD) e normalização ocorreu por

auto scaling.

3.4 Identificação das substâncias por espectrometria de massas de alta resolução (HRMS)

Para identificação das substâncias, uma amostra do extrato do mês de outubro da variedade Desert King foi submetida a cromatografia líquida de ultra performance acoplada a espectrometria de massas de alta resolução. A amostra foi escolhida por apresentar todos os flavonoides das demais variedades.

O equipamento utilizado foi um sistema UHPLC modelo Nexera X2 (Shimadzu Corporation, Japão) composto por bomba quaternária, autoamostrador e forno de colunas acoplado a um espectrômetro de massa de alta resolução (HRMS) modelo maXis 4G q-TOF MS (Bruker Daltonics, Alemanha) com fonte de eletrospray operado no modo de íon negativo e íon positivo, utilizando a ferramenta Auto-MS para obtenção de espectros MS2. Foi utilizada uma coluna de fase reversa modelo Acquity UPLC HSS T3 2.1 x 100 mm, 1.8 µm com pré-coluna modelo VanGuard HSS T3 2.1 x 5 mm, 1.8 µm (Waters Technologies, Irlanda), mantidas a 40°C. O gradiente de corrida utilizado foi: proporção inicial de 5% de B, gradiente linear até 100% de B em 14 min, isocrático com 100% de B por 2 min, e reequilíbrio nas condições iniciais (5% de B) por 4 min (tempo total de análise de 20 min). A vazão da fase móvel foi fixada em 400 µL/min e o volume de injeção igual a 0,5 µL. As fases móveis usadas foram: água ultrapura (A) e acetonitrila (B), ambas acidificadas com ácido fórmico a 0,1% (V/V).

3.5 Avaliação da atividade antioxidante

Foi empregado o ensaio colorimétrico com 2,2-difenil-picrilhidrazila (DPPH)/detecção do potencial sequestrador de radicais livres padronizado por Nurcholis *et al.* (2021). Foram aplicados 100 µL das amostras obtidas em 3.2. em microplacas de 96 poços e, então, foram adicionados 100 µL de solução a 0,06 mM de DPPH a cada poço. Após 45 minutos de reação, foi realizada a leitura da absorvidade molar destas soluções a 517 nm. O decréscimo na absorvidade molar expressa o potencial antioxidante da amostra teste que é representada por uma curva da concentração pela porcentagem da variação da absorvidade molar (A). Rutina e Trolox foram utilizados como padrão positivo para curva de inibição, os resultados obtidos das amostras foram plotados na curva para estabelecimento da

relação de equivalência Extrato(g)/Padrão(g).

3.6 Avaliação da atividade antiproliferativa em células de câncer de colo uterino

A atividade antiproliferativa foi avaliada pelo método colorimétrico de MTT (3-(4,5-dimethizzol-yl)-2-5-diphenyl tetrazoliumbromide) padronizado por Loosdrecht *et al.* (1991). Em uma microplaca de 24 poços contendo células de linhagem Hela, foram adicionados extratos nas concentrações de 200, 250, 300, 350 e 400 µg/mL e incubadas por 24 horas a 37 °C e 5% de CO₂. Após a incubação, foi adicionado uma solução de MTT 5 mg/mL a 10% (378 µL de meio sem soro e antibiótico + 42 µL de MTT) e incubados por uma hora. Após esse período, o meio foi retirado e substituído por dimetilsulfóxido (DMSO) e agitado vigorosamente até a homogeneização. A leitura foi realizada a 517 nm.

3.7 Avaliação genotoxicidade por ensaio de Cometa

O ensaio para avaliar a genotoxicidade dos extratos de pitaya foi realizado seguindo o protocolo estabelecido por Liu e colaboradores (2017) utilizando a solução neutra de eletroforese e concentrações do extrato de 100, 200 e 400 µg/mL.

3.8 Toxicidade aguda em adultos zebrafish

A toxicidade aguda em *zebrafish* (*Danio rerio*) foi analisada através da metodologia proposta pela OECD (2019). Os animais adultos (n = 10/grupo) foram tratados com 20 µL por via oral com auxílio de uma pipeta com os extratos selecionados (0,1 mg/mL, 0,5mg/mL e 1mg/mL) a partir das etapas anteriores ou veículo (DMSO 5%) e inseridos em aquários de 22 L, também foi incluído um grupo naive o qual não recebeu nenhum tratamento. A quantidade de animais mortos foi contada nos períodos de 24h, 48h, 72h e 96h.

3.9 Desreplicação de flavonoides bioativos e variedades com potencial antiproliferativo

Em busca de identificar as possíveis moléculas que promoveram atividade antiproliferativa na etapa anterior, as substâncias presentes nos extrato metanólicos das cinco amostras testadas foram comparados na plataforma GNPS. As moléculas consideradas como possíveis promotoras da atividade antiproliferativa foram

selecionadas de acordo com as seguintes características: 1) Presença na amostra com atividade antiproliferativa; 2) Maior teor na amostra com atividade antiproliferativa comparada às demais variedades.

Após a seleção dos flavonoides, foram triados dados de presença/ausência e área do pico gerados pelas análises por espectrometria de massas desses flavonoides em todas as variedades e meses coletados. Esses dados foram então submetidos à plataforma Metaboanalyst para a elaboração de um dendrograma, no qual as amostras mais próximas da amostra com atividade antiproliferativa foram indicadas como amostras com potencial antiproliferativo.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na fazenda Pitaya-BR, os cladódios são descartados a cada poda, o que ocorre mensalmente. Para avaliar a composição química, a sazonalidade e o possível potencial biológico desse material para a produção de fitopreparados, foram coletados três indivíduos de cada uma das 17 variedades de pitaya mencionadas no Quadro 1, de modo a diminuir a variabilidade intraespecífica. Em seguida, foram transportados para o laboratório no mesmo dia, higienizados e secos durante sete dias. Após estarem secos, foram moídos e transformados em pó, os quais foram pesados e extraídos gerando os extratos metanólicos de cada uma das 17 variedades.

Em seguida, a fim de obter um panorama da composição química, os extratos foram analisados por *HPLC-ESI-IT-MS*ⁿ utilizando a ferramenta *ion-tree*, que possibilitou obter informações de fragmentação para cada molécula detectada. Tendo em vista o enorme volume de análises cromatográficas realizadas, optamos por inserir apenas um exemplo de cromatograma na Fig. 4. Os outros resultados estão disponíveis em <https://1drv.ms/u/s!AoaBO3Rdu3GFjRURdVWSkbMtZfbe?e=W3LDuf>. Dados similares foram utilizados para análises do metaboloma *untarget* e sobre a sazonalidade de *Selenicereus*.

As primeiras substâncias que eluíram foram os sacarídeos, nos tempos de retenção entre 9.25 a 9.30 min, seguidos pelo ácido cítrico em 17.40 min. Os flavonoides começaram a eluir aos 18.70 min. Entretanto, pela complexidade estrutural dos flavonoides (alto nível de glicosilação, ramificação das cadeias glicosídicas, diversidade de agliconas) a sequência de eluição dos flavonoides

hexaglicosilados, pentaglicosilados, tetraglicosilados e triglicosilados não seguiu uma ordem correspondente ao nível glicosilação, como usualmente ocorre. Na Fig. 4 apresentamos um exemplo de cromatograma de *Selenicereus*, pelo qual podemos observar o comportamento heterogêneo de eluição dos flavonoides. Por exemplo, o flavonoide pentaglicosilado de m/z 1077 $[M-H]^-$ (Tr 19,46 min) eluiu após o flavonoide tetraglicosilado de m/z 901 $[M-H]^-$ (Tr 18,57 min).

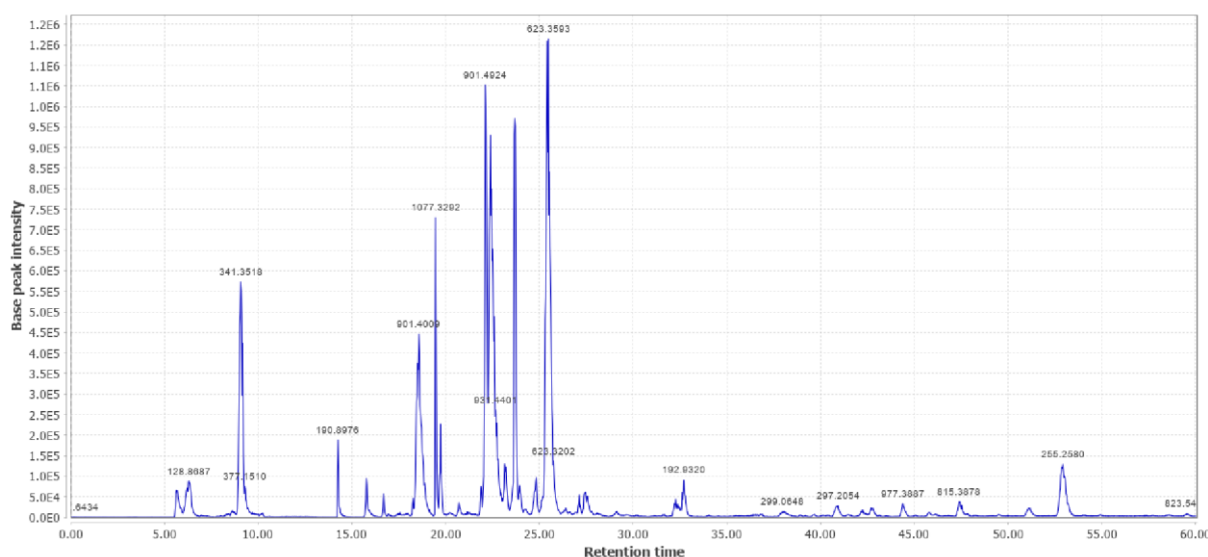


Figura 4: Cromatograma resultante da análise por *HPLC-ESI-IT-MSⁿ* do extrato metanólico dos cladódios da variedade Desert King referente ao mês de outubro/2019.

4.1 *Metaboloma* untarget de *Selenicereus*

A determinação dos componentes polares de um extrato vegetal é muito importante para a futura elaboração de um fitopreparado, tendo em vista que substâncias de alta polaridade apresentam maior solubilidade em água. Considerando que a química dos seres vivos é essencialmente aquosa, é primordial conhecer a composição química quali e quantitativa desses extratos vegetais.

As análises metabólicas foram conduzidas utilizando o panorama químico anual de cada uma das variedades, ou seja, dados mensais obtidos pelas análises por *HPLC-ESI-IT-MSⁿ* durante os 12 meses foram agrupados para o estabelecimento do panorama químico de cada uma das variedades.

No total das 17 variedades investigadas, foi possível anotar 41 substâncias, das quais 25 são flavonoides, 12 saponinas, dois ácidos orgânicos e dois sacarídeos (Tabela 2). Os flavonoides apresentaram-se, majoritariamente, como derivados glicosilados da quercetina, isorhamnetina ou kaempferol, de acordo com a detecção de sinais das agliconas de m/z 301, 315 e 285, respectivamente, contendo de uma

até seis unidades glicosídicas. As saponinas são derivadas do ácido oleanólico ou hidroioleanólico, que foram detectados pelos sinais de m/z 455 ou m/z 471, respectivamente, contendo de duas a cinco unidades glicosídicas.

Dessas substâncias, apenas **20, 23, 25, 26 e 29** já haviam sido descritas em diferentes partes de pitayas, mas não ainda nos cladódios.

Tabela 2: Substâncias anotadas no extrato metanólico de *Selenicereus*.

Substância	Tr (min)	[M-H] ⁻	Fragmentações (MS ²)	Proposta estrutural
1	9.27	377	341, 215	Sacarose Diidrato'
2	9.29	341	323, 179, 161, 143, 119, 113	Maltose'
3	17.46	191	173, 110	Ácido cítrico'
4	18.74	1209	1063, 901, 739, 593, 447, 285	K-Hex-dHex-dHex-Hex-Hex-dHex
5	19.14	1093	931, 785, 769, 623, 477, 315	IR-Hex-dHex-dHex-Hex-dHex
6	19.80	1239	1093, 931, 769, 623, 477, 315	IR-Hex-dHex-dHex-Hex-Hex-dHex
7	20.27	1063	917, 771, 755, 609, 301	Q-dHex-Hex-dHex-Hex-dHex-dHex
8	21.06	917	771, 755, 609, 301	Q-dHex-Hex-dHex-Hex-dHex
9	21.35	1047	901, 755, 739, 593, 447, 285	K-Hex-dHex-dHex-Hex-dHex
10	21.70	915	769, 623, 315	IR-Hex-dHex-dHex-dHex
11	21.76	885	739, 593, 285	K-dHex-Pent-dHex-dHex
12	21.90	1077	931, 769, 623, 315	IR-dHex-Hex-dHex-Hex-dHex
13	21.90	771	625, 463, 301	Q-Hex-Hex-dHex
14	22.18	901	755, 739, 593, 447, 285	K-Hex-dHex-dHex-Hex-dHex
15	23.12	487	443, 355, 311, 234, 193	AF-Hex-Pent
16	23.79	755	609, 447, 301	Q-dHex-Hex-dHex

17	23.92	931	769, 623, 315	IR-Hex-dHex-dHex-Hex
18	24.76	785	623, 477, 315	IR-Hex-dHex-Hex
19	24.98	739	593, 447, 285	K-Hex-dHex-dHex
20	25.25	769	623, 477, 315	IR-Hex-dHex-dHex
21	25.26	625	463, 301	Q-Hex-Hex
22	26.02	639	477, 315	IR-Hex-Hex
23	26.12	609	463, 301	Q-Pent-dHex
24	26.74	1133	971, 809, 647, 471	AHO-GlucA-Hex- Hex-Hex
25	26.91	593	447, 285	K-dHex-Pent
26	27.48	623	477, 315	IR-Hex-dHex
27	27.60	463	301	Q-Hex
28	29.07	477	315	IR-Hex
29	29.27	303	285, 177, 125	Diidroquercetina#
30	29.83	1117	955, 793, 631, 455	AO-GlucA-Hex-Hex-Hex
31	30.23	971	809, 647, 471	AHO-GlucA-Hex-Hex
32	31.59	811	649, 473	não identificado
33	32.01	1263	1117, 955, 793, 631, 455	AO-GlucA-Hex-Hex-Hex-dHex
34	33.13	809	647, 471	AHO-GlucA-Hex
35	34.76	1101	939, 793, 631, 455	AO-GlucA-Hex-dHex-Hex
36	35.23	1087	925, 793, 631, 455	AO-GlucA-Hex-Pent-Hex
37	35.48	955	793, 631, 455	AO-GlucA-Hex-Hex
38	37.03	925	763, 631, 455	AO-GlucA-Pent-Hex

39	38.16	793	631, 455	AO-GlucA-Hex
40	39.89	301	271, 255, 241, 171, 150	Quercetina*
41	40.40	939	793, 631, 455	AO-GlucA-Hex-dHex

Tr: tempo de retenção cromatográfico; K: Kaempferol; Q: Quercetina; IR: Isorhamnetina; AF: Ácido ferúlico; AO: Ácido Oleanólico; AHO: Ácido Hidroxioleanólico; Hex: Hexose, dHex: Desoxihexose, Pent: Pentose; GlucA: Ácido Glicurônico.

#Substâncias identificadas em frutos e flores de pitayas (Ibrahim *et al.* 2018)

*Substâncias identificadas por padrão.

†Substâncias identificadas putativamente por comparação com banco de dados da plataforma GNPS.

Através do experimento de LC-HRMS foi possível identificar 16 flavonoides dos 25 detectados por LC-MS (Tabela 3).

Tabela 3: Substâncias identificadas putativamente através dos dados gerados por LC-HRMS e comparados por meio da ferramenta MetFrag com a base de dados PubChem.

Substância	Calculada	Observada [M+H] ⁺	Δ ppm	PubChem
5	1065.3147	1065.3301	14.41	ID 25232864
8	919.2724	919.2718	-0.75	ID 101125928
9	1049.3354	1049.3370	1.44	Cordylasin A
10	917.2932	917.2934	0.19	ID 102370510
11	887.2826	887.2843	1.85	Kaempferol 3- Isorhamnosideo- 7-rhamnosideo
12	1079.3460	1079.3477	1.53	ID 89528194
14	903.2775	903.2791	1.68	ID 101251983
16	757.2196	757.2199	0.30	ID 44259158
17	933.2881	933.2889	0.81	ID 101785514
18	787.2302	787.2306	0.46	ID 72708392
19	741.2247	741.2247	-0.07	ID 101143223
20	771.2353	771.2359	0.76	ID 71307082
26	625.1774	625.1775	0.15	Isorhamnetina- 3-O-rutinosideo
27	463.0882	463.0881	-0.22	Quercetina-3-O- glicosideo

28	479.1195	479.1188	-1.46	Isorhamnetina-3-O-glicosideo
----	----------	----------	-------	------------------------------

Na rede metabolômica das variedades de pitaya gerada pela plataforma GNPS (Fig. 5) cada nodo representa uma substância, as arestas mostram a proximidade dessas substâncias de acordo com o padrão de fragmentação por espectrometria de massas, enquanto o tamanho do nodo corresponde à quantidade da substância, proveniente da área sob o pico cromatográfico. Dessa forma, podemos observar que os flavonoides são as substâncias predominantes do gênero *Selenicereus*, sendo as substâncias **26**, **20** e **19** as de maior ocorrência em praticamente todas as variedades.

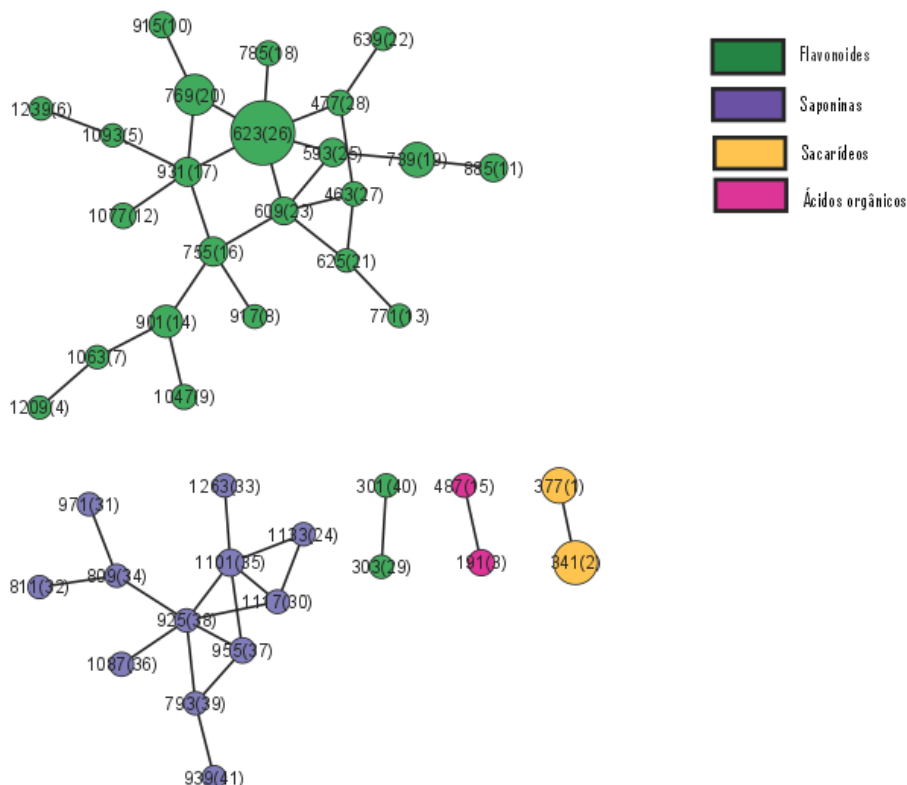


Figura 5: Rede molecular representando as substâncias encontradas nos extratos metanólicos de *Selenicereus* e as classes de substâncias encontradas no extrato metanólico.

As saponinas derivadas do ácido oleanólico ou hidroxioleanólico apresentam de duas a cinco unidades glicosídicas. Contudo, elas foram observadas apenas em alguns meses e em algumas variedades. Estudos apontam as saponinas como substâncias de proteção contra herbívora e antiparasitárias, podendo ser esta a

causa do aparecimento ocasional dessa classe de substâncias (HUSSAIN *et al.* 2019).

Apesar de a classe predominante nas pitayas estudadas ser a dos flavonoides (especialmente os glicosilados), nossos resultados mostram que cada uma das variedades apresentou um panorama químico distinto. O *heatmap* (Fig. 6) mostra a quantidade relativa de cada substância para cada variedade, indo do verde claro (menor teor) até o vermelho claro (maior teor). Deve-se observar que o *heatmap* é o resultado fornecido pelo Metaboanalyst, sendo que a linha horizontal superior, (contendo os retângulos coloridos) agrupamentos entre as variedades mais afins. As linhas verticais mostram os agrupamentos entre as substâncias de maior teor relativo que ocorrem na mesma variedade.

A seguir, fornecemos algumas indicações de como esse *heatmap* foi analisado. Por exemplo, podemos observar que a variedade Desert King foi aquela que apresentou o maior teor dos flavonoides hexa e pentaglicosilados **4, 5, 6, 7, 9, 12**, e, por isso, a plataforma faz, na linha vertical, o agrupamento entre essas substâncias. Por outro lado, a variedade Orejona possui o maior teor do flavonoide tetraglicosilado **17**, enquanto na variedade Condor ocorreu maior teor dos flavonoides monoglicosilados **28**, diglicosilados **21** e **22** e triglicosilados **18**. Por fim, a variedade Green Night mostrou o maior teor de todas as saponinas detectadas.

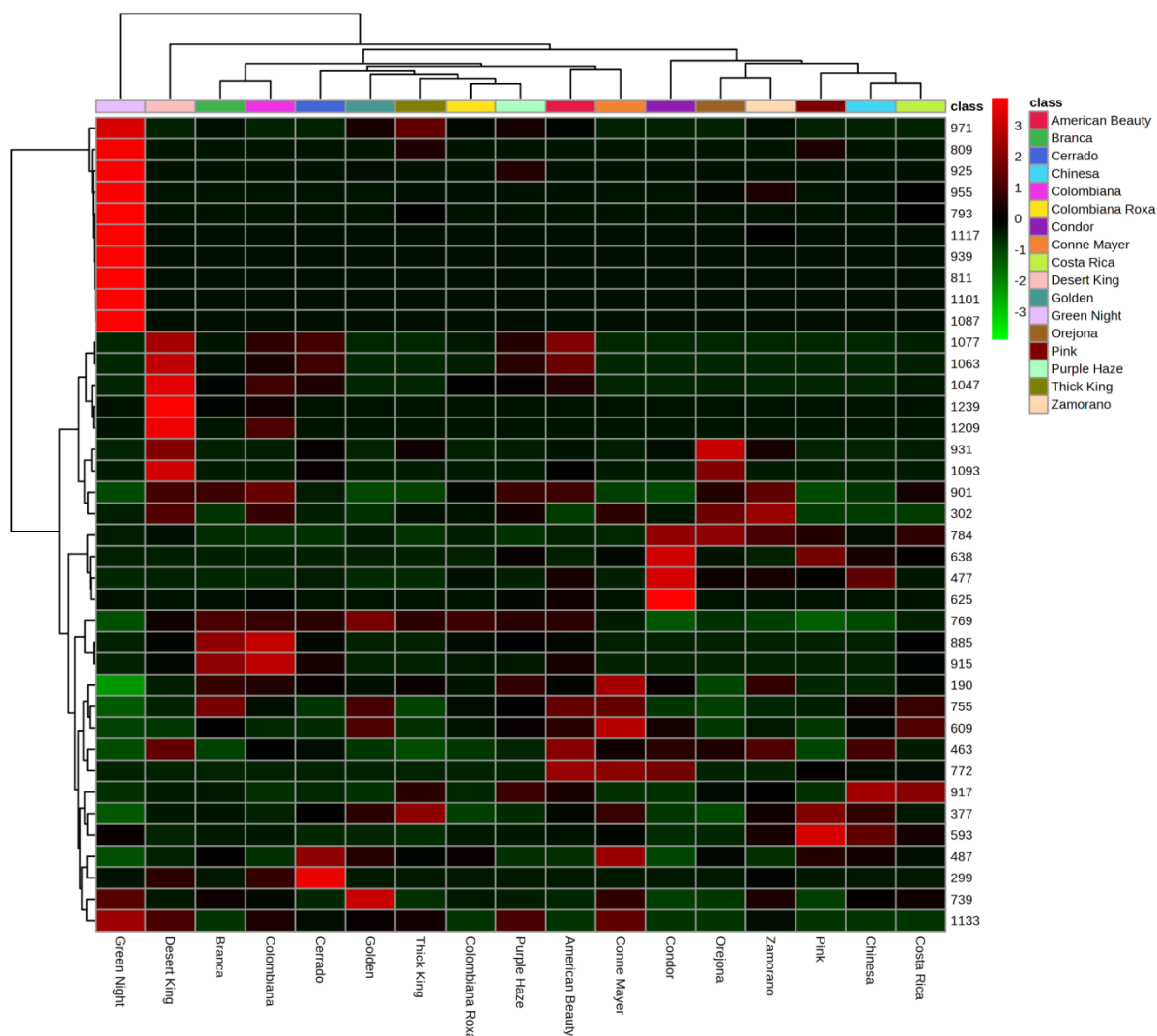


Figura 6: Heatmap das substâncias encontradas no extratos metanólicos das 17 variedades comerciais de *Selenicereus* investigadas.

A variedade Green Night (*S. spinulosus*), quando comparada às demais, apresentou perfil químico distinto, e a única que apresentou quantidade de saponinas muito maior do que a dos flavonoides. Todas são derivadas do ácido oleanólico ou hidroxioleanólico contendo de duas a cinco unidades sacarídicas. Os poucos flavonoides anotados são, na maior parte, diglicosilados e triglicosilados (**18**, **19**, **20**, **25** e **26**) e observamos apenas traços de tetra e pentaglicosilados. A rede molecular comparando Green night (roxo) com as demais espécies de pitaya (verde) pode ser entendida pela Figura 5, que mostra as classes de substâncias presentes nas pitayas, e pela Figura 7, que mostra os componentes químicos que ocorrem nelas. Essas redes demonstram que saponinas derivadas do ácido oleanólico (**30**, **33**, **35**, **36**, **37**, **38**, **39** e **41**) e do ácido hidroxioleanólico (**24**, **31** e **34**) ocorrem

majoritariamente em Green Night, e que as únicas exceções foram os flavonoides derivados de Kaempferol **19** e **25**, que apresentaram maior teor em Green Night. Nas outras variedades de pitayas, os componentes majoritários são os flavonoides, sendo que as saponinas são praticamente inexistentes.

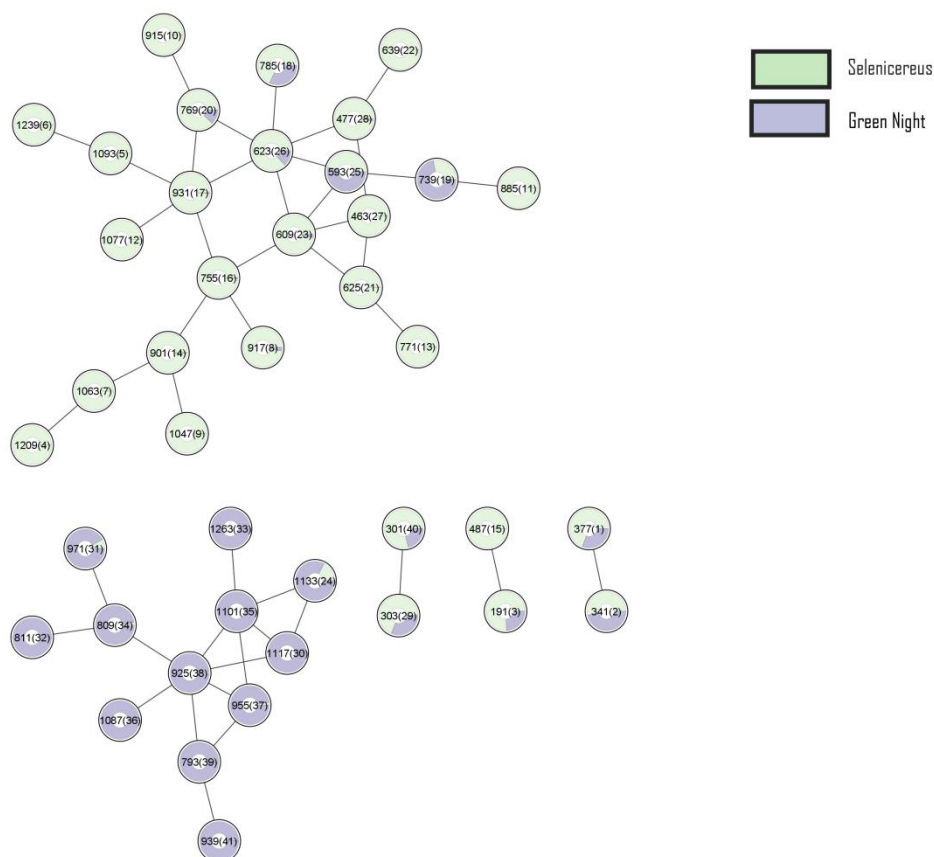


Figura 7: Rede molecular comparando as substâncias encontradas nos extratos metanólicos da variedade Green Night com as demais variedades de *Selenicereus*.

A classificação botânica atual inclui todas as pitayas no gênero *Selenicereus*, enquanto que a classificação de Bauer inclui as pitayas no gênero *Hylocereus* e outras espécies no gênero *Selenicereus*. Nossos resultados corroboram com a classificação proposta por Bauer (2003), que coloca *S. spinulosus* como pertencente ao gênero *Selenicereus*, visto que essa espécie apresentou perfil químico baseado em saponinas, significativamente diferente das demais, baseados em flavonoides. Ao mesmo tempo, *S. megalanthus* e *S. setaceus* corroboram com a classificação de Bauer (2003), em que ambas estão incluídas no gênero *Hylocereus*, pois apresentaram perfil metabólico similar às outras espécies analisadas, formado pelas espécies de pitayas comerciais, constituído principalmente por flavonoides. As classificações posteriores a Bauer (2003) propunham que essas duas espécies

fossem agrupadas a *S. spinulosus* no gênero *Selenicereus*. No entanto, nossos resultados se contrapõem a essa proposta.

A variedade Purple Haze tem como progenitores as espécies *S. undatus* (Branca) e *S. guatemalensis* (American Beauty). A rede molecular (Fig. 8) mostra que Purple Haze possui os flavonoides **7, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 16, 17, 18, 19, 20, 23, 25, 26, 27, 28, 29**, que são as mesmas substâncias presentes nos progenitores. Porém, Purple Haze também possui o flavonoide **22**, e não possui o flavonoide **5**, que está presente na progenitora Branca.

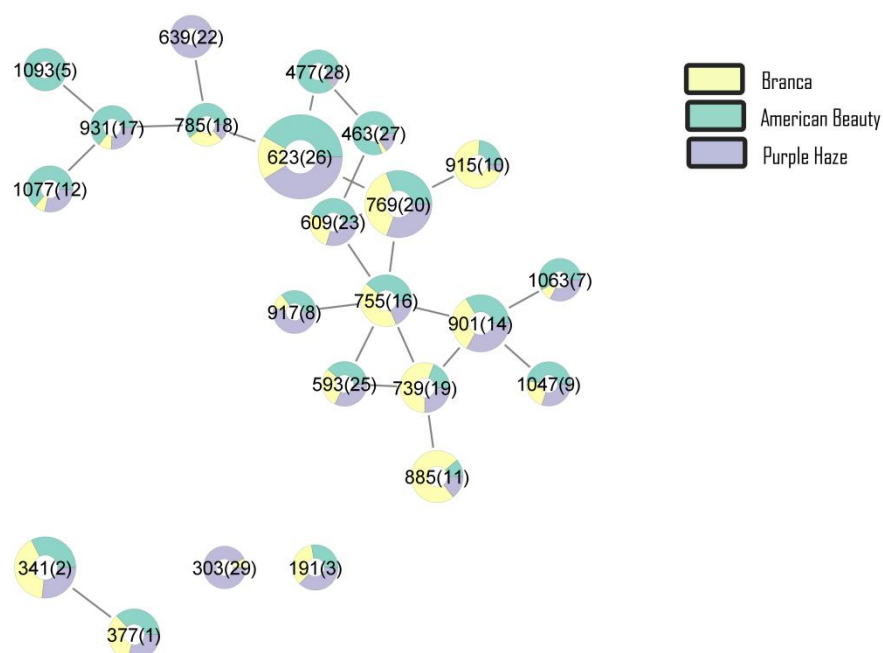


Figura 8: Rede molecular comparativa das substâncias encontradas nos extratos metanólicos da variedade híbrida Purple Haze, gerada pelo cruzamento das espécies *S. undatus* (Branca) e *S. guatemalensis* (American Beauty).

A variedade Colombiana Roxa foi gerada através do cruzamento das espécies *S. megalanthus* (Colombiana) e *S. guatemalensis* (American Beauty). Na rede molecular (Fig. 9), observamos que Colombiana Roxa possui Diidroquercetina (29), além de flavonoides monoglicosilados (25, 26), diglicosilados (21, 23, 24), triglicosilados (16, 18, 19, 20), tetraglicosilados (8, 10, 11, 12, 14, 17) e pentaglicosilado (9). Entretanto, não apresentou flavonoides presentes na espécie progenitora *S. guatemalensis* (5), e na espécie progenitora *S. megalanthus* (4, 6, 40).

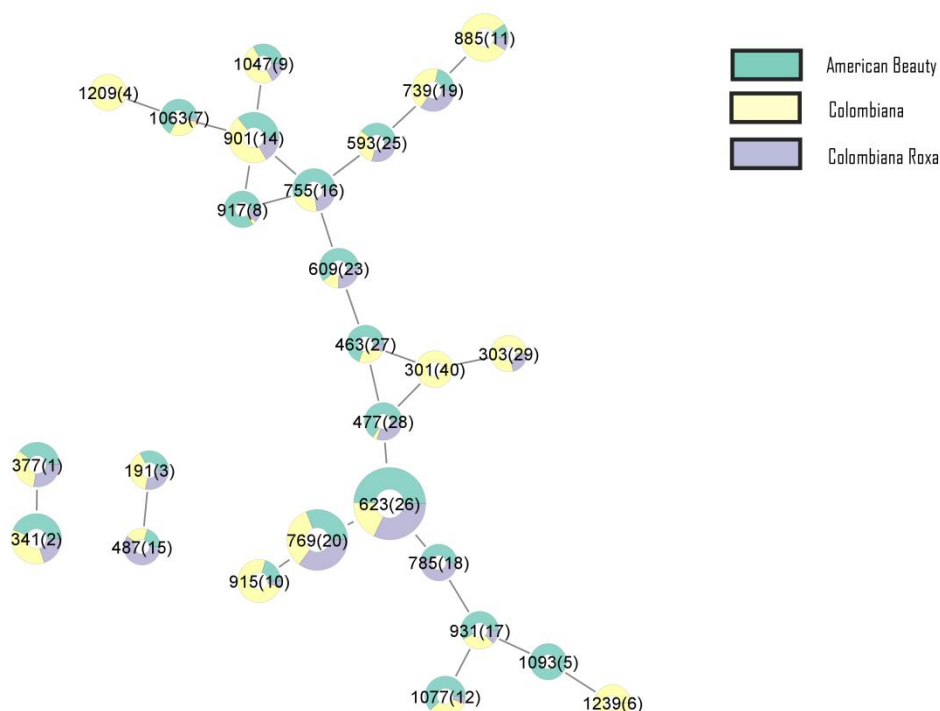


Figura 9: Rede molecular comparativa das substâncias encontradas nos extratos metanólicos da variedade híbrida Colombiana Roxa, gerada pelo cruzamento das espécies *S. megalanthus* (Colombiana) e *S. guatemalensis* (American Beauty).

Contrariamente à variedade anterior, a variedade Desert King, cujas progenitoras são as espécies *S. megalanthus* (Colombiana) e *S. monacanthus* (Orejona), possui todos os flavonoides de suas progenitoras e ainda possui o flavonoide pentaglicosilado 5, que não ocorre nas progenitoras (Fig. 10).

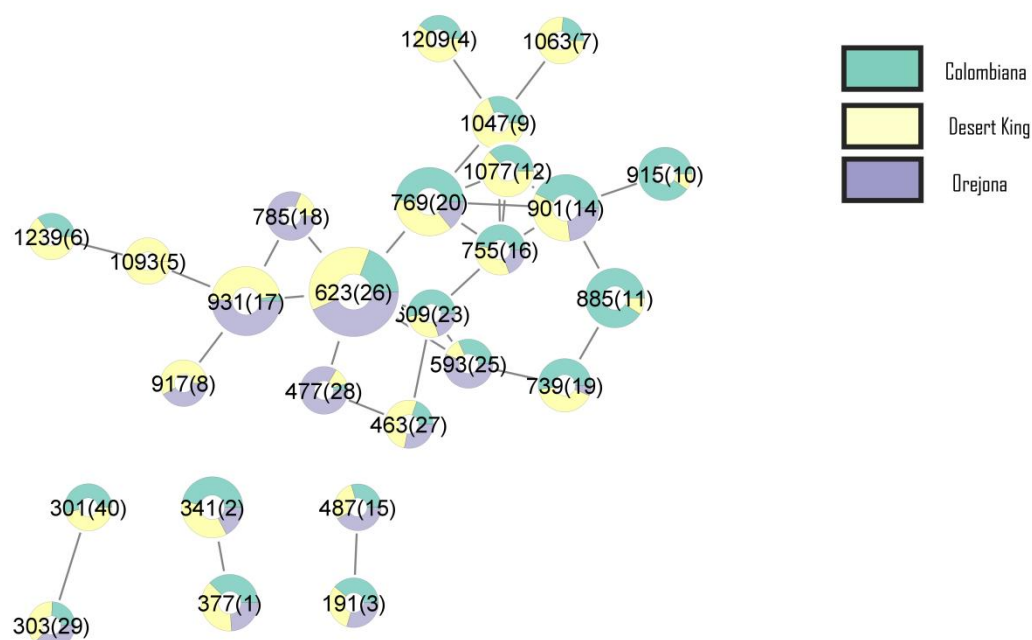


Figura 10: Rede molecular comparativa das substâncias encontradas nos extratos metanólicos da variedade híbrida Desert King, gerada pelo cruzamento das espécies *S. megalanthus* (Colombiana) e *S. monacanthus* (Orejona).

A variedade Zamorano é oriunda da hibridização entre as espécies *S. costaricensis* (Costa Rica) e *S. monacanthus* (Orejona). Podemos observar na rede molecular (Fig. 11) que a variedade Zamorano apresentou apenas flavonoides monoglicosilados (**28**, **27**), diglicosilados (**23**, **25**, **26**), triglicosilados (**16**, **18**, **19**, **20**) e tetraglicosilados (**8**, **14**). Por outro lado, a progenitora Costa Rica foi a única a exibir flavonoides pentaglicosilados (**7**, **9**).

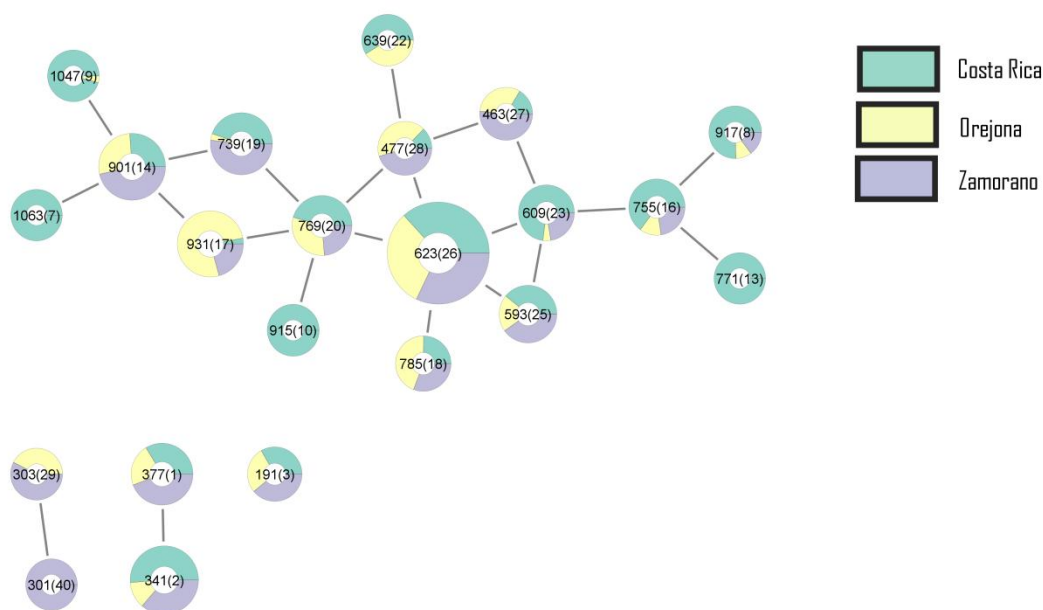


Figura 11: Rede molecular comparativa das substâncias encontradas nos extratos metanólicos da variedade híbrida Zamorano, gerada pelo cruzamento das espécies *S. costaricensis* (Costa Rica) e *S. monacanthus* (Orejona).

Ainda abordando os panoramas químicos intervariedades, foi possível observar que um mesmo progenitor pode dar origem a variedades com perfis químicos diferentes do seu. Isso ocorre com o progenitor *S. undatus*, que origina as variedades Branca e Golden, e também com o progenitor *S. setaceus*, que origina as variedades Cerrado e Thick King. Em ambos os casos as variedades apresentaram perfis químicos distintos daqueles de seus progenitores. Apesar de apresentarem flavonoides como substâncias majoritárias, esses ocorrem em diversidade e quantidade distintas ao longo do ano, demonstrando que tais variedades possuem características próprias.

A rede molecular da Figura 12 compara a diversidade e o teor das substâncias presentes nas variedades Branca e Golden provenientes de *S. undatus* (ver p. 13) evidenciando que elas não apresentam o mesmo perfil químico. O tamanho da área hachurada em amarelo ou azul representa o teor desse flavonoide nessa espécie. Por exemplo, o flavonoide **25** está mais presente na variedade Branca do que em Golden. A variedade Branca exibe maior diversidade, ocorrendo flavonoides desde agliconas (**40**), quanto glicosídeos com até cinco unidades glicosídicas (**9**, **12**, **14**), ou com substituições por ácidos fenólicos (**7**, **8**, **16**); na

variedade Golden foram anotados principalmente flavonoides diglicosilados (**23**, **25**, **26**) e triglicosilados (**16**, **19**, **20**), com poucos flavonoides tetraglicosilados (**17**) e pentaglicosilados (**12**), e maior teor da aglicona (**40**).

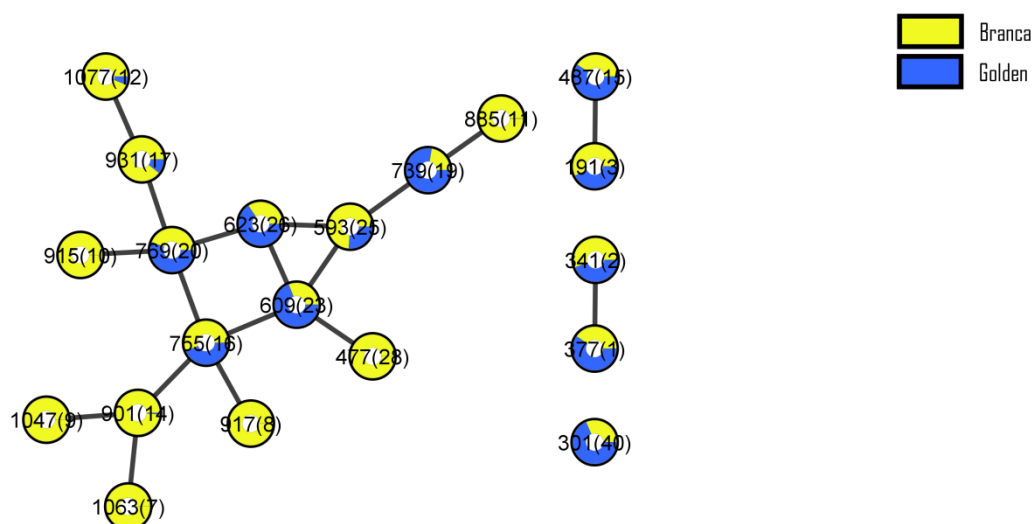


Figura 12: Rede molecular comparando das substâncias encontradas nos extratos metanólicos das variedades Branca e Golden, ambas provenientes da espécie *S. undatus*.

O panorama químico das variedades derivadas de *S. setaceus* foi ainda mais discrepante (Fig. 13). Enquanto a variedade Cerrado possui 18 flavonoides com uma ampla variedade [aglicona (**29**, **40**), monoglicosilados (**27**, **28**), diglicosilados (**23**, **25**, **26**), triglicosilados (**16**, **19**, **20**), tetraglicosilados (**8**, **10**, **11**, **14**, **17**) e pentaglicosilados (**7**, **9**, **12**), na variedade Thick King ocorreram apenas nove flavonoides sendo: diglicosilados (**23**, **26**) triglicosilados (**16**, **19**, **20**) e tetraglicosilados (**17**) com menor variedade e apenas uma aglicona (**29**).

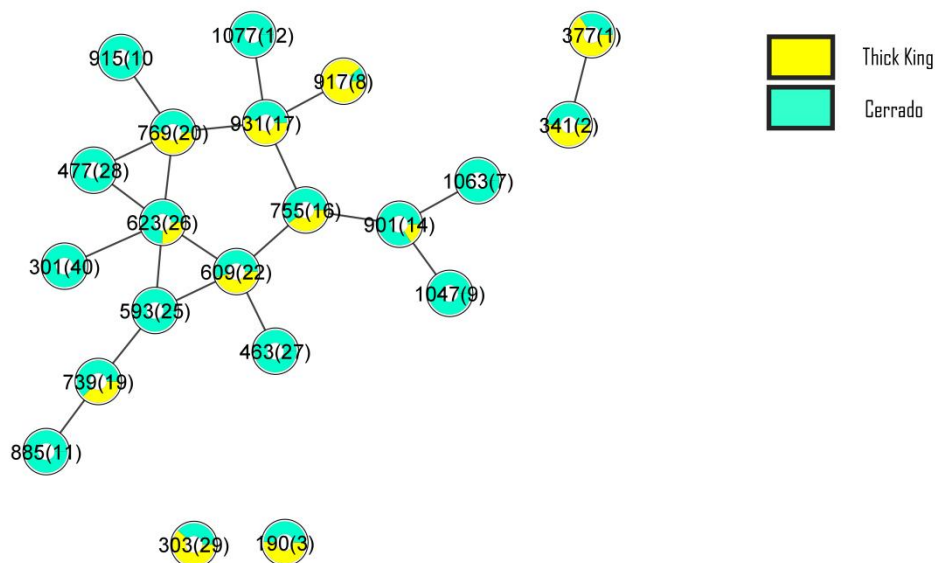


Figura 13: Rede molecular comparando das substâncias encontradas nos extratos metanólicos das variedades Cerrado e Thick King, ambas provenientes da espécie *S. setaceus*.

Diferenças químicas entre variedades são fenômenos comuns e que alteram as atividades biológicas dos extratos, como observado por Miladinovic *et al.* (2014) em estudo com quatro variedades de cassis (*Ribes nigrum*), que apresentaram características químicas únicas e atividades antimicrobianas distintas. Sadeh *et al.* (2019) avaliou 36 plantas de *Rosmarinus officinalis* de diferentes regiões e observou quatro genótipos/variedades as quais possuíam perfis químicos com características únicas em seus óleos essenciais. Pintac *et al.* (2019) avaliou a composição química de variedades de uva (*Vitis vinifera*), foram observadas diferenças qualitativas e quantitativas em cada uma das variedades, além de valores distintos de atividade antioxidante e citotóxica. Nesse último estudo, cabe ressaltar que, na atividade citotóxica, foram avaliadas linhagens tumorais e de células humanas saudáveis, e foram obtidos valores divergentes para cada uma das variedades, evidenciando a importância do fator variedade em estudos para elaboração de fitoterápicos.

As características únicas apresentadas pelas variedades estudadas sejam elas qualitativas ou quantitativas fornecem também subsídio para identificação botânica com maior acuidade. Como visto anteriormente, a própria identificação do gênero é debatida devido à sobreposição de características. Quando damos enfoque na identificação de espécies, essa sobreposição se torna ainda mais presente, fazendo-se necessária a identificação através de características morfoanatômicas das flores e frutos (BAUER, 2003). Entretanto, variedades apresentam mais

características compartilhadas por serem originadas da mesma espécie ou mesma hibridização, tornando difícil até mesmo a identificação pelo fruto (Fig. 14).

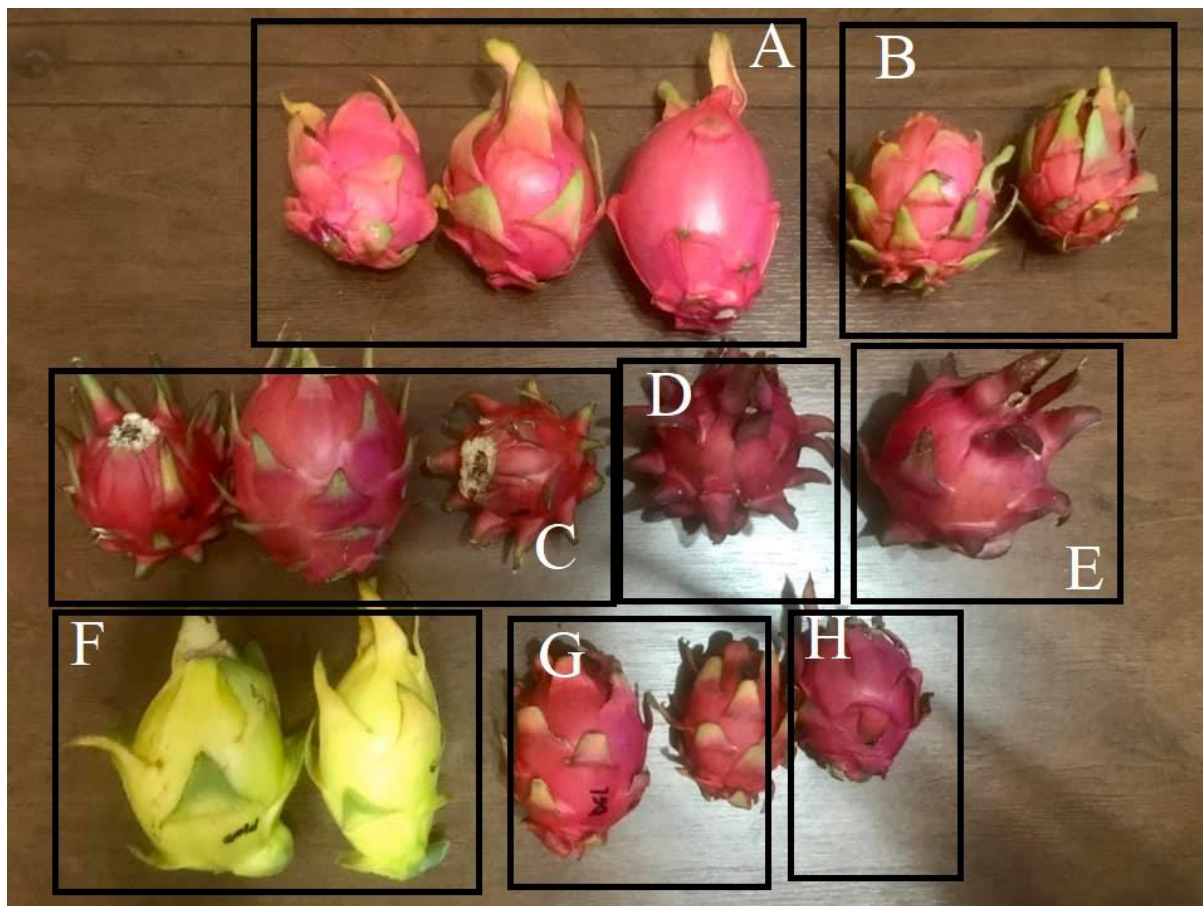


Figura 14: A) Branca (*S. undatus*), B) Costa Rica (*S. costaricensis*), C) Orejona (*S. monacanthus*), D) Pink (*S. purpusii*), E) Zamorano (*S. monacanthus* x *S. costaricensis*), F) Golden (*S. undatus*), G) Delight (*S. undatus* x *S. guatemalensis*), H) Makisupa (*S. undatus* x *S. monacanthus*).

Embora variedades de uma mesma espécie apresentem panoramas químicos únicos, os estudos publicados acerca da composição química e da atividade biológica envolvendo espécies do gênero *Selenicereus* não definem qual variedade estava sendo utilizada, além de utilizarem nomenclaturas ultrapassadas, e.g. *Selenicereus polyrhizus*. Nossos resultados demonstram a necessidade de se identificar corretamente as variedades utilizadas em cada estudo, tendo em vista que *Selenicereus* é um gênero comercial, que apresenta inúmeras variedades, e que a ocorrência de substâncias pode variar drasticamente entre elas, consequentemente, alterando a eficácia e a segurança de um possível fitopreparado, além da reprodutibilidade dos dados científicos publicados.

Adicionalmente, nos cladódios das variedades investigadas não foram detectadas as betalaínas, classe de metabólitos secundários bastante expressiva

nos frutos das pitayas (IBRAHIM *et al.* 2018). As betalaínas são pigmentos naturais principalmente responsáveis pela cor, que nos frutos das pitayas representa um aspecto muito importante para seu valor comercial. No entanto, os cladódios são desprovidos de cores aposemáticas, razão que pode, em parte, justificar a ausência das betalaínas nesses órgãos.

4.2 Efeito de variações climáticas em Selenicereus

Para avaliar a sazonalidade, usamos dois tipos de análise: 1) A avaliação da distribuição mês a mês dos diferentes flavonoides anotados nas pitayas, o que foi feito por meio de um histograma referente à variação mensal do teor dos tipos de flavonoides ao longo do ano e 2) Construção de gráficos de dispersão gerado pela PLS-DA através dos dados metabolômicos das quatro estações. Nesses gráficos, cada ponto representa um mês de coleta, enquanto que os círculos ovais representam a variância do perfil químico de cada estação.

Na primeira análise, os flavonoides anotados nas pitayas foram separados em quatro tipos: Q – derivados de Quercetina, IR – Isorhamnetina, K – derivados de Kaempferol e DQ – Diidroquercetina.

A análise sazonal buscou comparar os 12 meses do ano. Entretanto, para algumas variedades não foi possível a coleta em determinados meses por falta de material vegetal (exemplares juvenis, exemplares ainda não adquiridos pelo agricultor etc)

Tendo em vista que IR parece ser o componente principal de todas as variedades de pitaya (Tabela 1 e Figura 5) e a possibilidade de usar esses extratos em formulações farmacêuticas, é importante avaliar como o teor de flavonoides totais e o de IR se correlacionam (ou não) ao longo do ano, pois isso pode ter implicações nas atividades biológicas desses extratos.

Em American Beauty, o teor de flavonoides totais está diretamente relacionado ao teor de IR, observa-se expressiva flutuação dos teores de Q e K ao longo do ano, nessa variedade (Fig. 15a). O gráfico de dispersão gerado por PLS-DA (Fig. 15b) mostra, que apesar da flutuação, as quatro estações compartilham diversas características e suas distribuições são sobrepostas, não apresentando, portanto, diferenças químicas bem definidas.

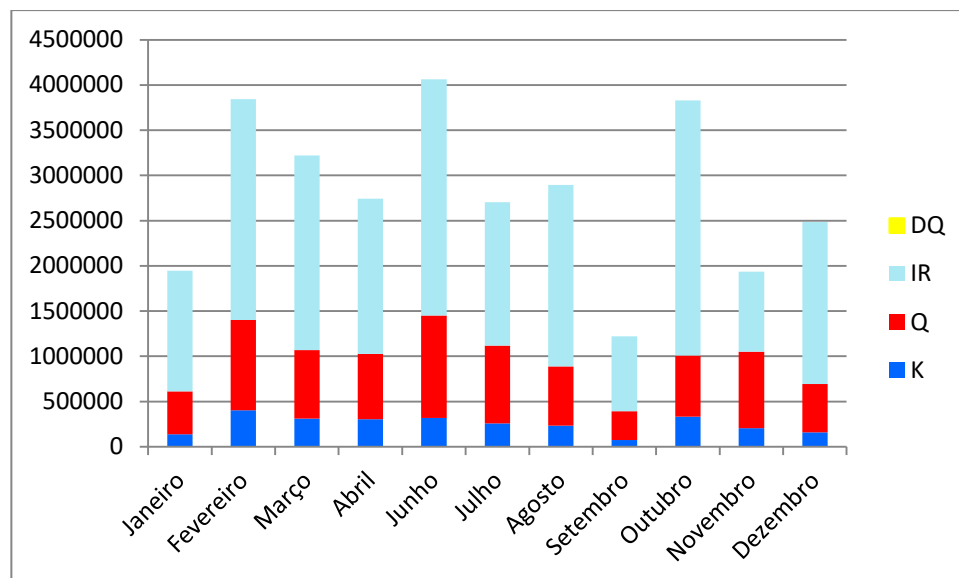


Figura 15a: Variação mensal do teor dos tipos de flavonoides ao longo do ano na variedade American Beauty.
(Q – derivados de Quercetina, IR- Isorhamnetina, K – derivados de Kaempferol e DQ– Diidroquercetina)

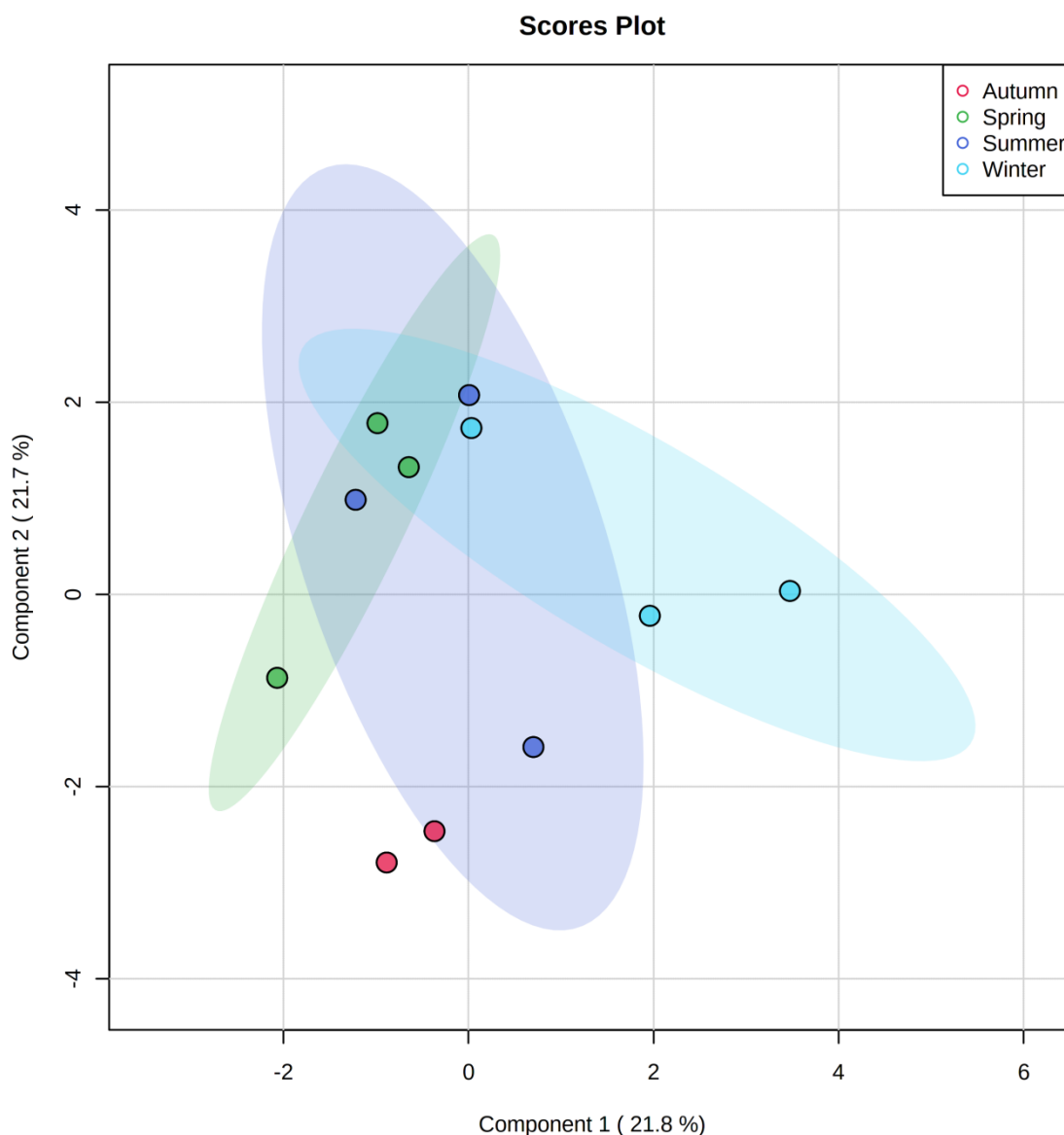


Figura 15b: Gráfico de dispersão gerado pela PLS-DA através dos dados metabolômicos das quatro estações da variedade American Beauty.

Na variedade Branca, o teor de flavonoides totais parece ter correlação positiva com o teor de IR e de K, enquanto o dos flavonoides minoritários Q flutua ao longo do ano (Fig. 16a). Foi possível observar uma prevalência maior de flavonoides nos meses de verão, iniciando em dezembro com quantidades similares de derivados de IR, K e Q. O pico de teor de flavonoides foi alcançado em janeiro, quando houve redução do teor de derivados de K e aumento do teor dos derivados de Q. Por fim, em fevereiro houve a diminuição de todos os 4 tipos de flavonoides, em especial dos derivados de K e Q. Apesar das variações marcantes e prevalência de maior quantidade de flavonoides no verão, não há diferenças químicas entre as

estações. No gráfico de dispersão (Fig. 16b) observa-se que as distribuições das quatro estações se sobrepõem e, portanto, não apresentam diferenças químicas significativas.

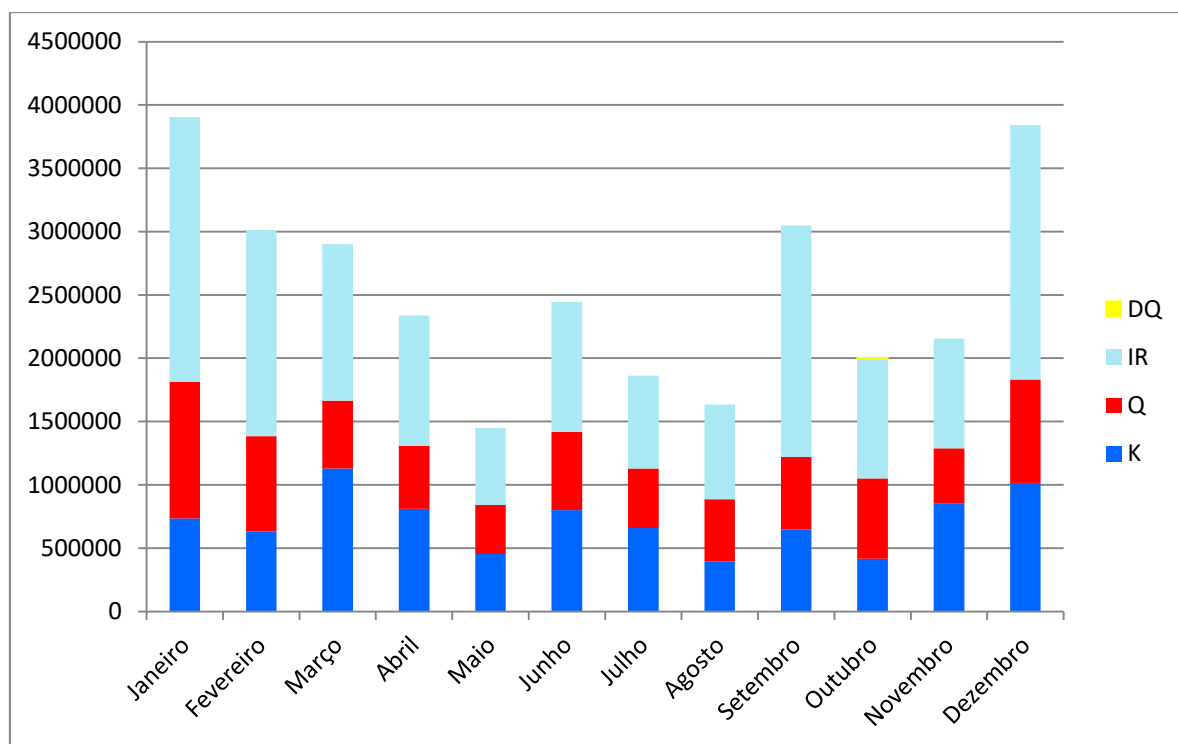


Figura 16a: Variação mensal do teor dos tipos de flavonoides ao longo do ano na variedade Branca. (Q – derivados de Quercetina, IR- Isorhamnetina, K – derivados de Kaempferol e DQ– Diidroquercetina)

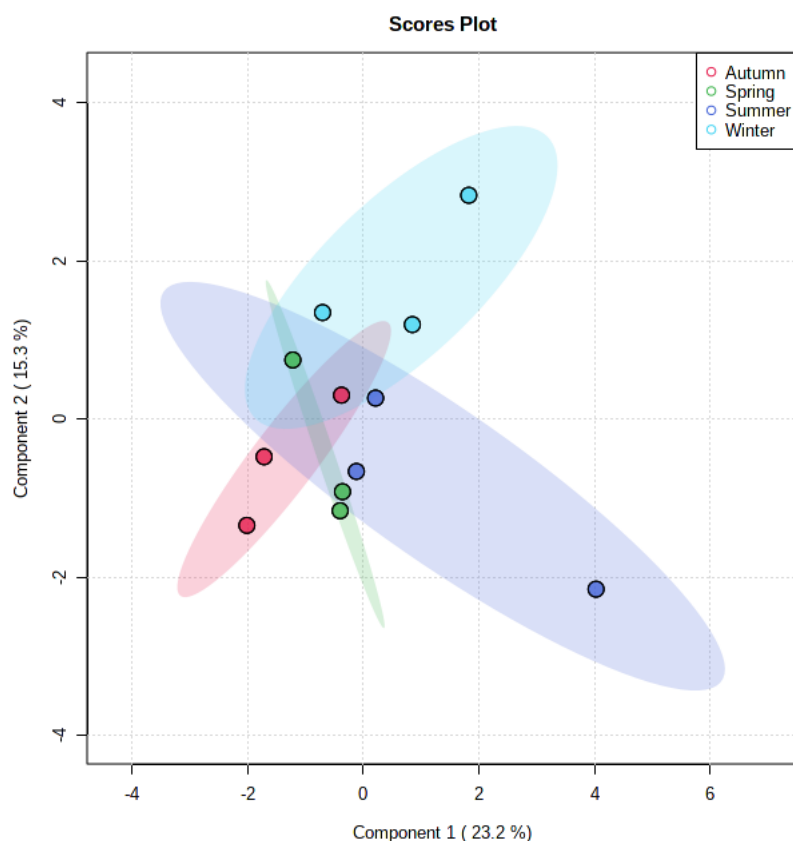


Figura 16b: Gráfico de dispersão gerado pela PLS-DA através dos dados metabolômicos das quatro estações da variedade Branca.

A variedade Cerrado apresenta comportamento similar ao de A. Beauty, pois o teor de flavonoides totais apresenta correlação com o de IR (Fig. 17a). Ela apresentou maior regularidade na produção de flavonoides, sendo que os flavonoides se concentraram nos meses de setembro a dezembro. Em dezembro, predominam os derivados de Q (**8** e **16**) e os IR monoglicosilados (**28**), diglicosilados (**26**) triglicosilados (**18** e **20**) tetraglicosilados (**10** e **17**) e pentaglicosilados (**12**). Em novembro, predominam os flavonoides com menor grau de glicosilação, como os derivados de K diglicosilados (**25**) triglicosilados (**19**) tetraglicosilado (**11** e **14**) e pentaglicosilados (**9**) e o derivado de Q monoglicosilado (**27**).

No que diz respeito a variância química, a PLS-DA (Fig. 17b) mostra novamente sobreposição das estações. Entretanto, no caso da variedade Cerrado, é possível observar uma clara distinção de outono e inverno, onde não há nenhuma intersecção entre suas distribuições, sugerindo ao menos dois grupos quimicamente diferentes entre si.

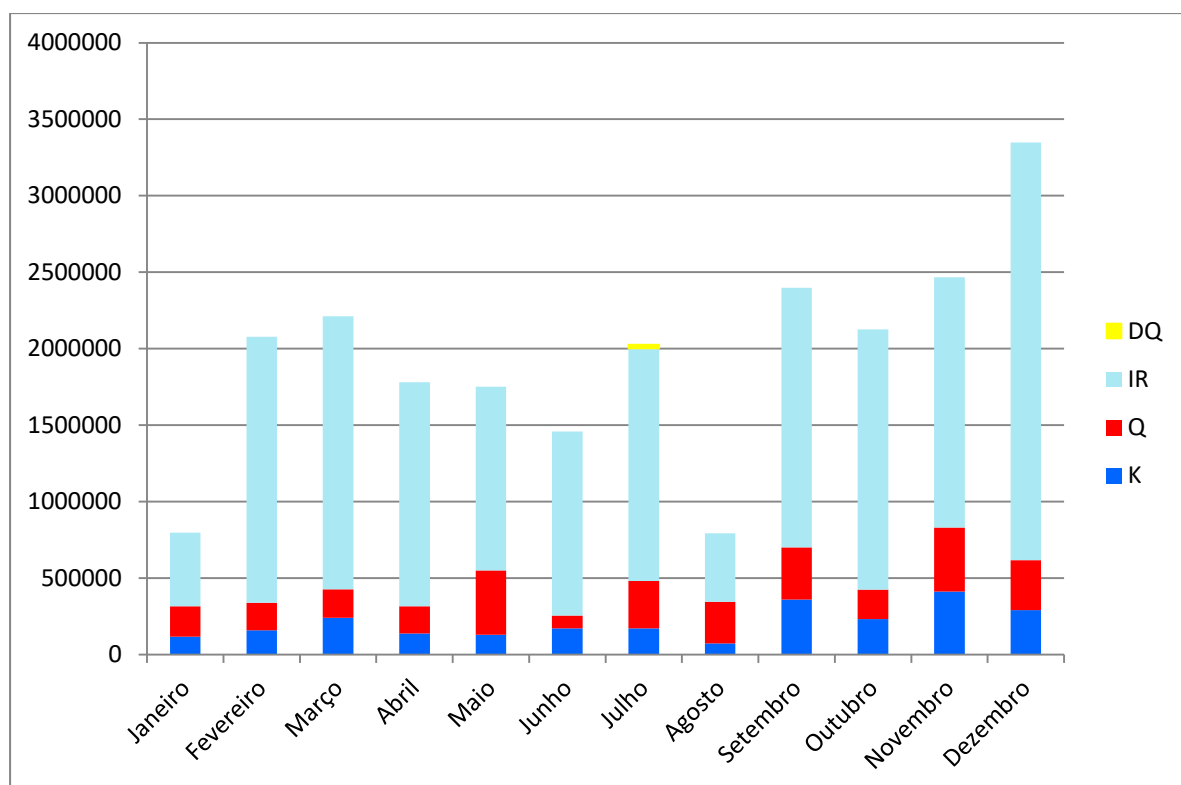


Figura 17a: Variação mensal do teor dos tipos de flavonoides ao longo do ano na variedade Cerrado. (Q – derivados de Quercetina, IR- Isorhamnetina, K – derivados de Kaempferol e DQ– Diidroquercetina)

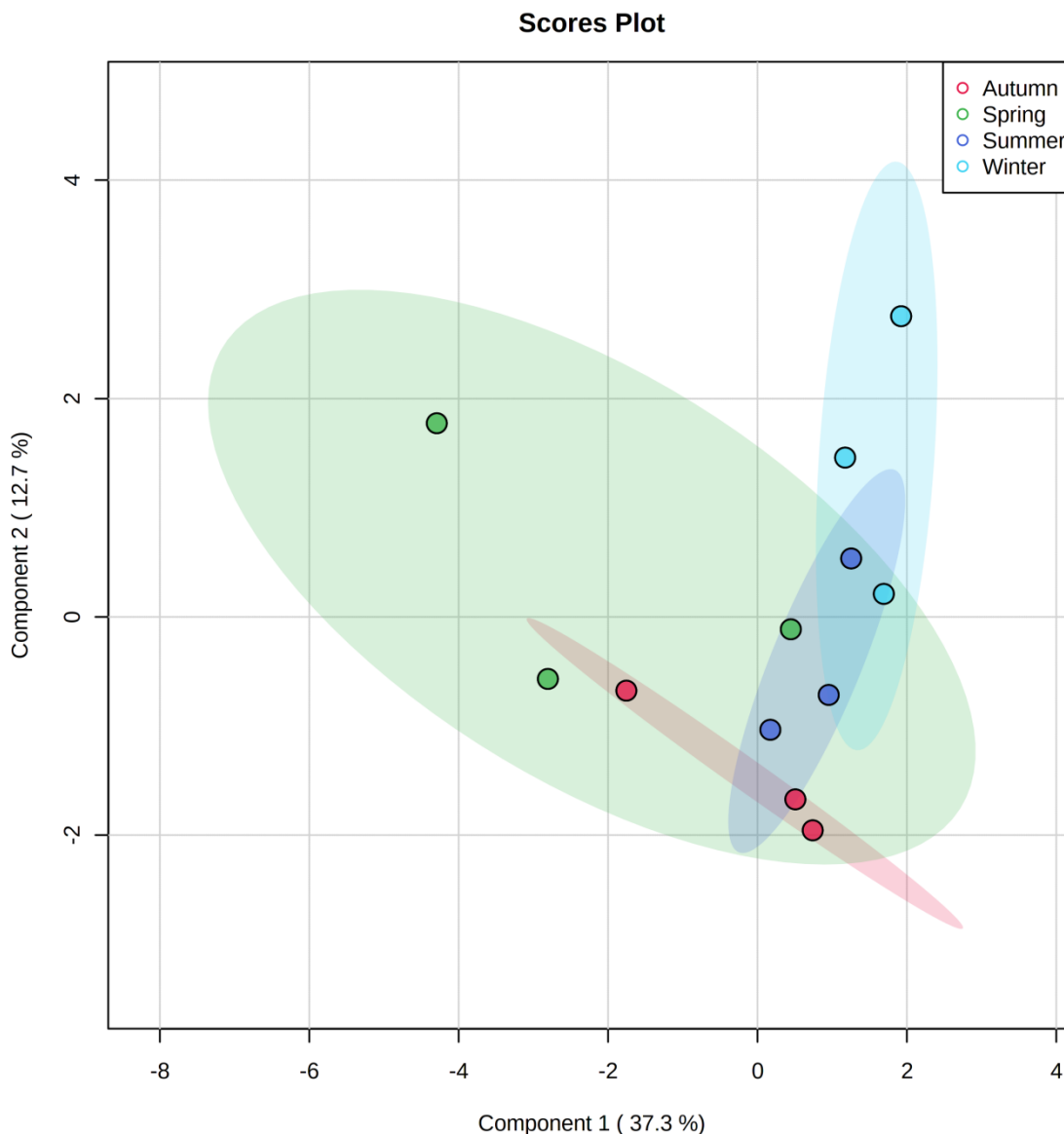


Figura 17b: Gráfico de dispersão gerado pela PLS-DA através dos dados metabolômicos das quatro estações da variedade Cerrado.

A variedade Chinesa mostra correlação positiva entre o teor de flavonoides totais e os teores de M, Q, AQ e K (Fig. 18a), revelando também correlação positiva também com os teores Q e AQ. Embora julho e agosto apresentem resultados similares no teor de flavonoides totais, observa-se que a produção de flavonoides derivados de Q monoglicosilados (27), diglicosilados (23), triglicosilados (16) e pentaglicosilados (8), de IR monoglicosilados (28), diglicmetilosilados (20), triglicosilados (20) e tetraglicosilados (17) e de K diglicosilados (25) e tetraglicosilados (14) são diferentes daqueles anotados em agosto, quando ocorrem os derivados da Q monoglicosilado (27), diglicosilado (23), triglicosilados (16) e pentaglicosilados (8) de IR monoglicosilados (28), triglicosilados (18) e

tetraglicosilados (**17**) além de K tetraglicosilados(**14**). No caso da produção de fitoterápicos, essa variação em tão curto espaço de tempo pode representar um obstáculo. Além disso, é digno de nota que no mês de setembro a produção de flavonoides é muito pequena, o que implicaria que o processo de coleta fosse bastante controlado. Ainda, a produção dos derivados de K é bastante expressiva em maio, correspondendo a quase 40% do teor dos flavonoides totais. Na variedade chinesa foi possível observar uma distinção na distribuição de outono e verão (Fig. 18b), as demais estações se sobrepuseram, sendo possível observar apenas estabelecer dois grupos quimicamente distintos entre si. Entretanto, nota-se que a estação do verão é um subgrupo do da primavera.

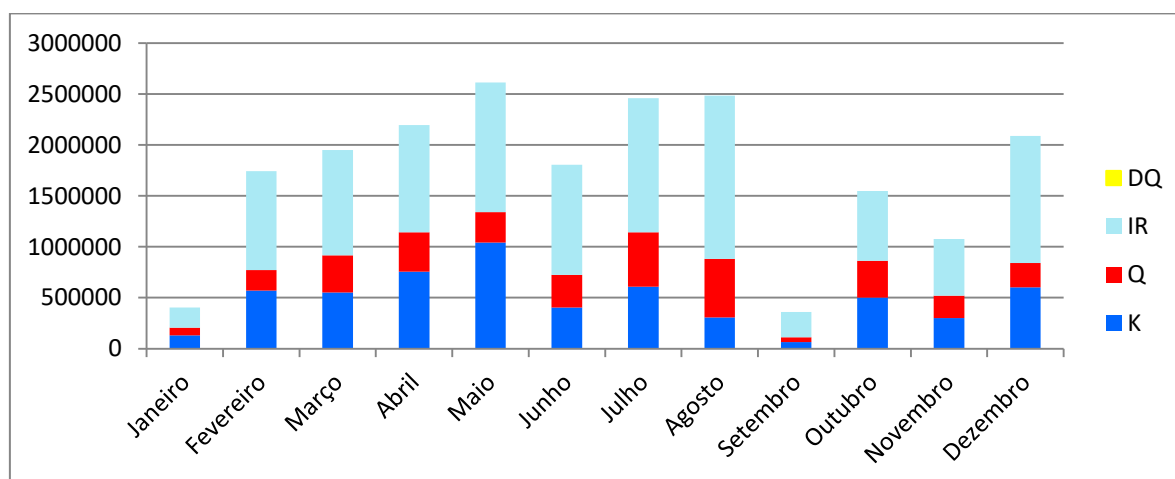


Figura 18a: Variação mensal do teor dos tipos de flavonoides ao longo do ano na variedade Chinesa. (Q – derivados de Quercetina, IR- Isorhamnetina, K – derivados de Kaempferol e DQ– Diidroquercetina)

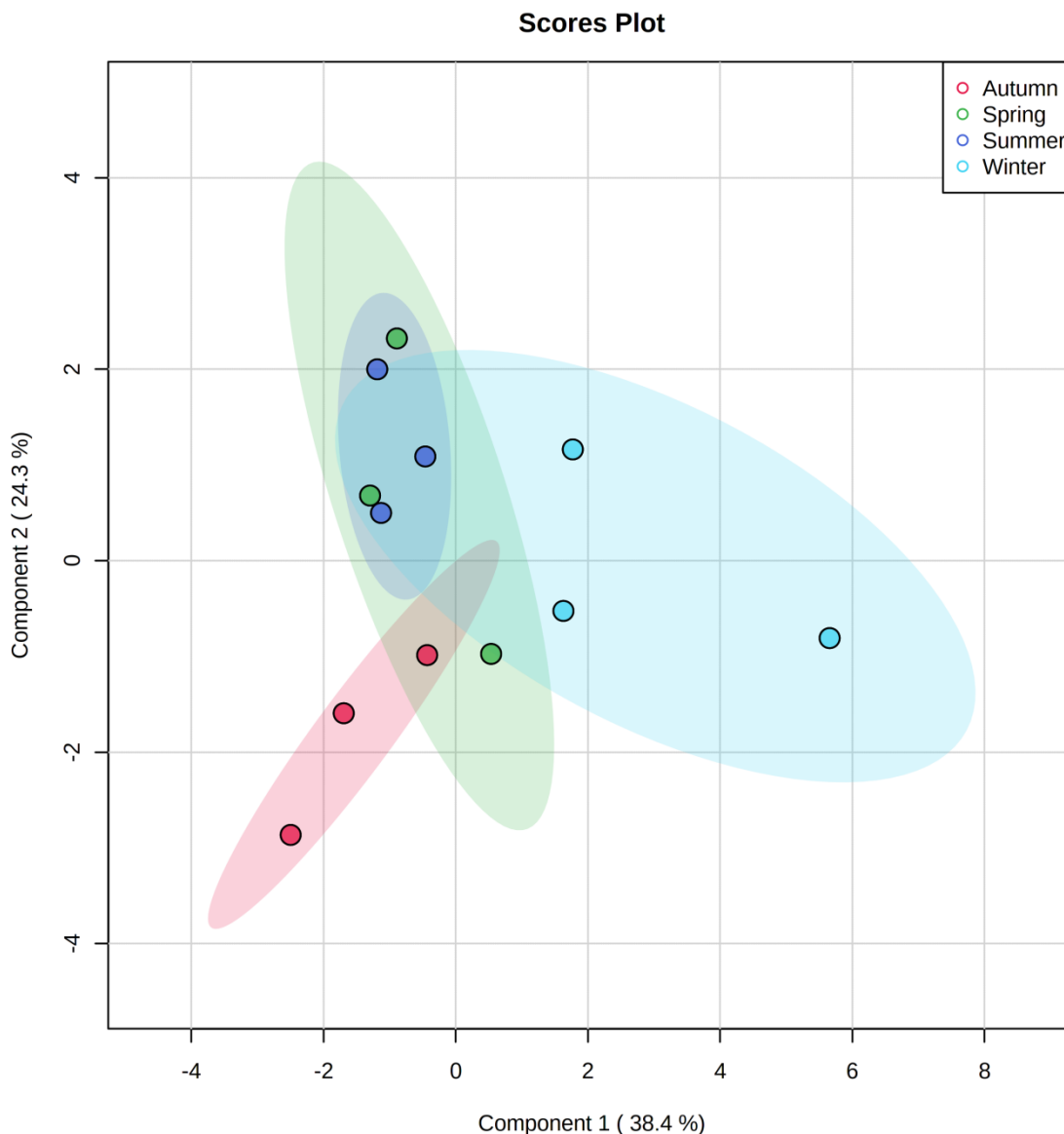


Figura 18b: Gráfico de dispersão gerado pela PLS-DA através dos dados metabolômicos das quatro estações da variedade Chinesa.

A variedade Colombiana mostra que o teor de flavonoides totais tem correlação positiva com o teor de IR (Fig. 19a). Contudo, ainda que em pequena quantidade, observa-se que quando há queda no teor de IR há aumento no teor de outros flavonoides, como em maio e agosto (aumento do teor de K) e setembro (aumento do teor de Q). Dezembro e janeiro apresentaram maior quantidade de flavonoides. Em janeiro ocorreram os flavonoides derivados de IR monoglicosilados (**28**), diglicosilados (**21** e **26**), triglicosilados (**20**) tetraglicosilados (**10** e **17**) e pentaglicosilados (**12**), de Q monoglicosilados (**27**) e diglicosilados (**23**), de Kaempferol diglicosilados (**25**) e tetraglicosilados (**11**), e T (**29**). Dezembro foi muito similar ao de janeiro, mas com menor teor de derivados de Q, M e K. Buscando-se

novas fontes de extratos bioativos, meses subsequentes que apresentam perfis químicos similares facilitam a elaboração de fitoterápicos, pois a constância da formulação é imprescindível para garantir a segurança da mesma. O gráfico de dispersão (Fig. 19b) demonstra uma clara distinção dos flavonoides presentes na estação de inverno com os presentes nas demais estações evidenciando variações do perfil químico com duas estações bem definidas.

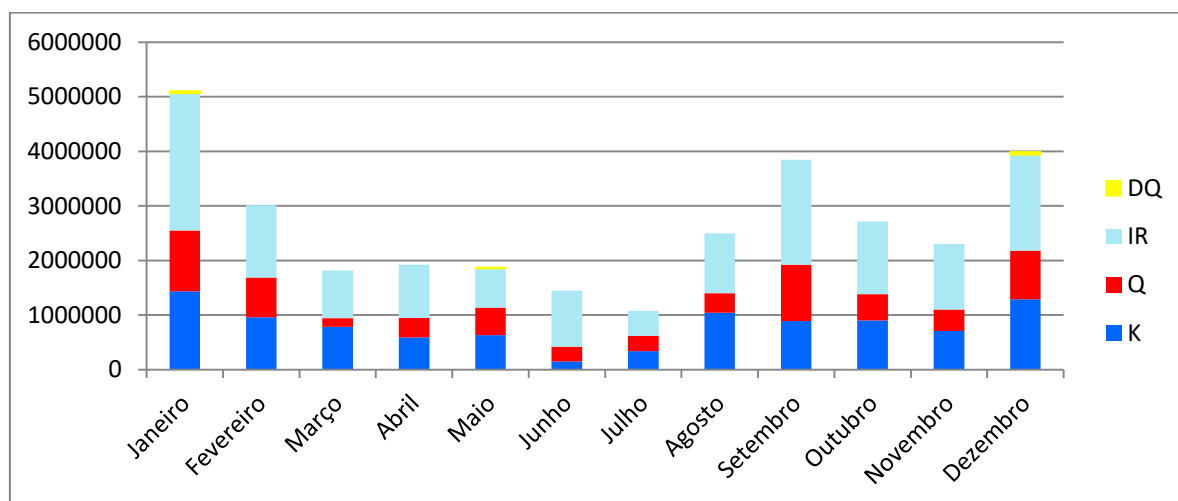


Figura 19a: Variação mensal do teor dos tipos de flavonoides ao longo do ano na variedade Colombiana. (Q – derivados de Quercetina, IR- Isorhamnetina, K – derivados de Kaempferol e DQ– Diidroquercetina)

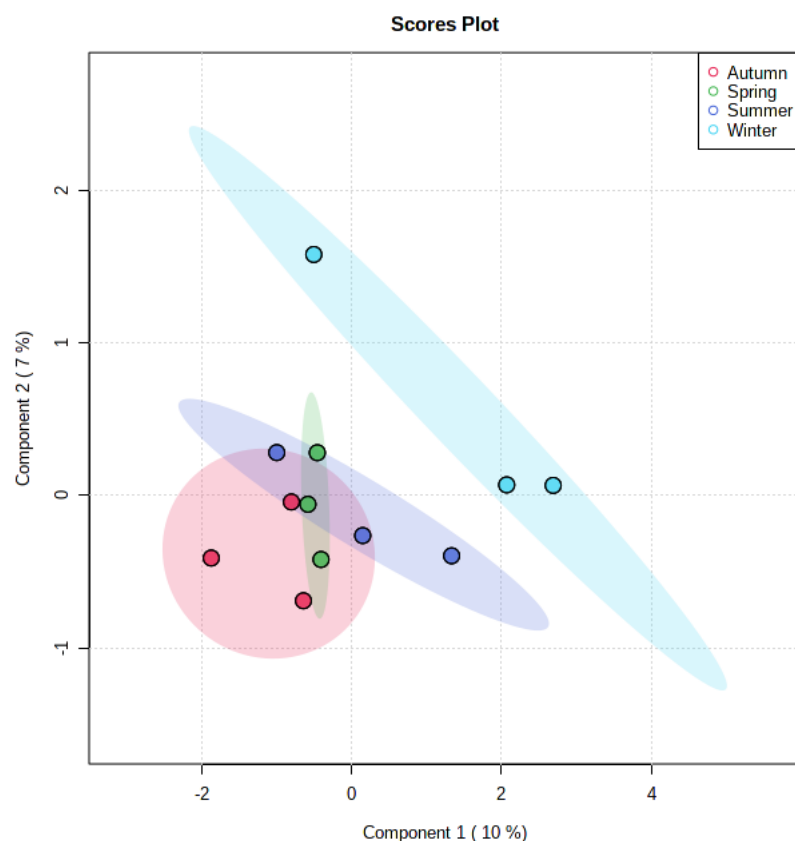


Figura 19b: Gráfico de dispersão gerado pela PLS-DA através dos dados metabolômicos das quatro estações da variedade Colombiana.

A variedade Colombiana Roxa exibe comportamento similar ao de outras, pois o teor de flavonoides totais se correlaciona positivamente com IR e K (Fig. 20), e, de maneira geral, também com o teor dos componentes minoritários Q. Janeiro apresentou maior quantidade de flavonoides nessa variedade. Nesse mês ocorreram principalmente os flavonoides derivados de K diglicosilados (**25**), triglicosilados (**19**), tetraglicosilados (**11** e **14**) e pentaglicosilados (**9**), os derivados de IR diglicosilados (**26**), triglicosilados (**20**) e pentaglicosilados (**12**), e os derivados de Q diglicosilado (**23**) e pentaglicosilado (**8**) e T (**29**). Embora janeiro tenha sido o mês com maior quantidade de flavonoides, fevereiro, julho e agosto apresentaram expressivo teor de flavonoides derivados de AQ, o que poderia trazer implicações para a produção de um fitopreparado. Nessa variedade não foi possível realizar a PLS-DA por falta de pontos de coleta em dois meses.

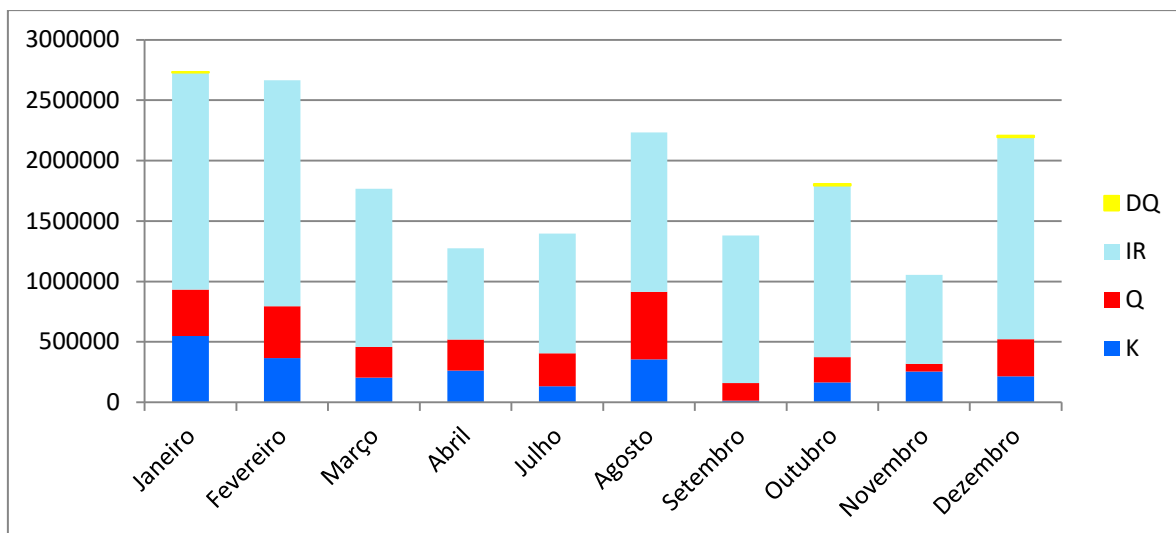


Figura 20: Variação mensal do teor dos tipos de flavonoides ao longo do ano na variedade Colombiana Roxa. (Q – derivados de Quercetina, IR- Isorhamnetina, K – derivados de Kaempferol e DQ– Diidroquercetina)

Na variedade Condor, há nítida correlação positiva entre o teor de IR e o dos flavonoides totais (Fig. 21a), o que também ocorre com os componentes minoritários ao longo do ano. Os meses com maior quantidade de flavonoides foram março e maio. Em março, predominaram os flavonoides derivados de IR monoglicosilados (**28**) diglicosilados (**26**), triglicosilados (**18** e **20**) e tetraglicosilados (**17**) e Q (**16** e **21**), enquanto que em maio houve aumento no teor de Q monoglicosilados (**27**), diglicosilados (**23**). Novamente, a PLS-DA (Fig. 21b) não demonstrou diferenças na distribuição dos flavonoides entre as quatro estações, porém observa-se diferenças químicas entre outono e inverno dado que não há intersecções entre esses dois grupos.

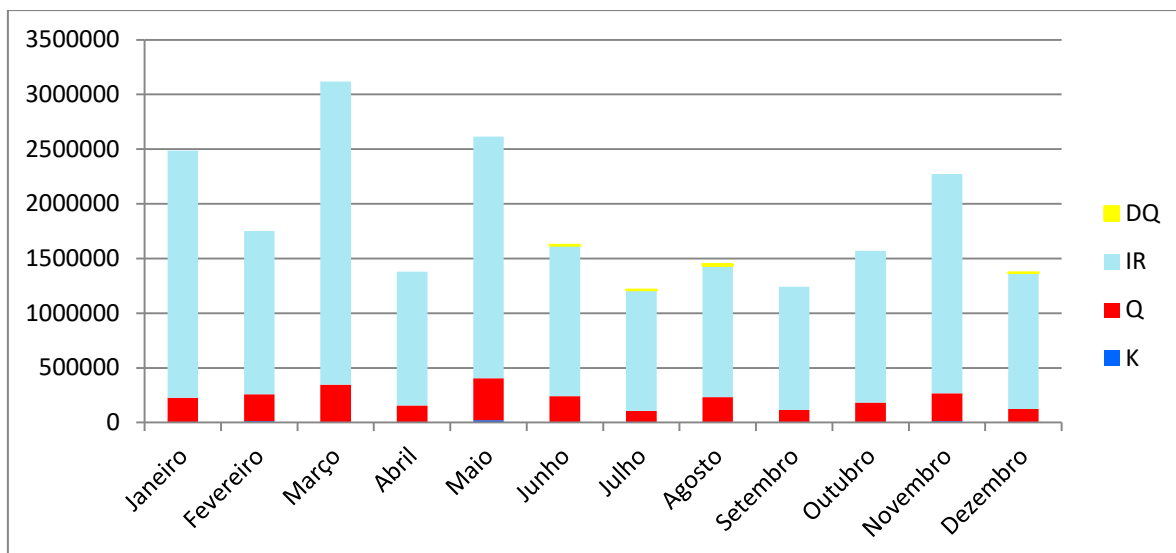


Figura 21a: Variação mensal do teor dos tipos de flavonoides ao longo do ano na variedade Condor. (Q – derivados de Quercetina, IR- Isorhamnetina, K – derivados de Kaempferol e DQ– Diidroquercetina)

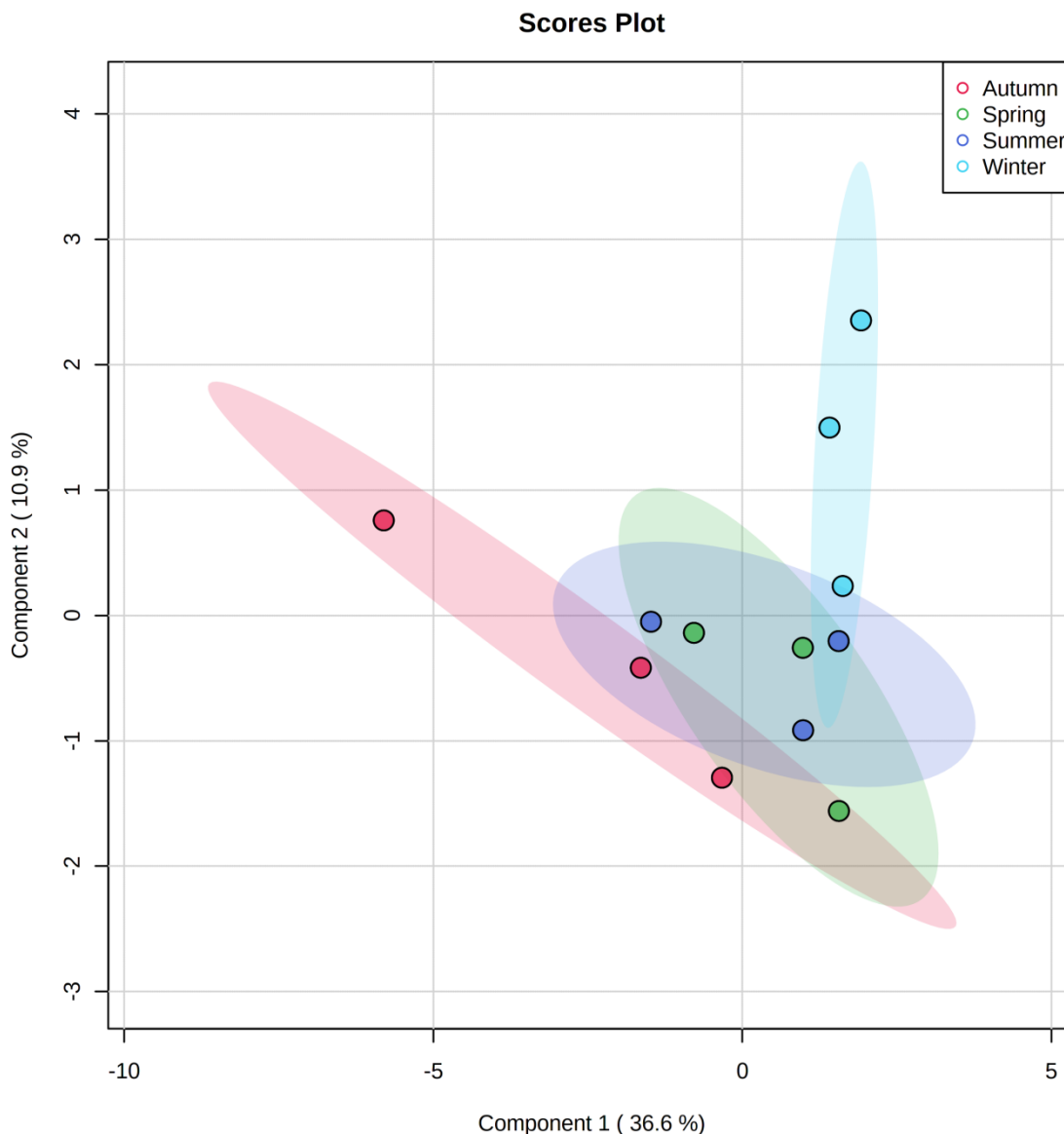


Figura 21b: Gráfico de dispersão gerado pela PLS-DA através dos dados metabolômicos das quatro estações da variedade Condor.

A variedade Conne Mayer apresentou maior teor de flavonoides no mês de julho (Fig. 22a). Em julho houve um aumento nos teores de K diglicosilados (**25**), triglicosilados (**19**), tetraglicosilados (**14**) e Q monoglicosilados (**27**), diglicosilados (**23**) ou com substituições por ácido fenólico (**13** e **16**). Nota-se também aumento dos teores dos derivados de K e Q em junho e julho e novembro. Nessa variedade, a PLS-DA (Fig. 22b) apontou duas estações distintas, uma composta pelo inverno e outra composta pelas demais estações. Ainda, o gráfico de dispersão sugere que as estações de verão e de outono sejam subgrupos da primavera.

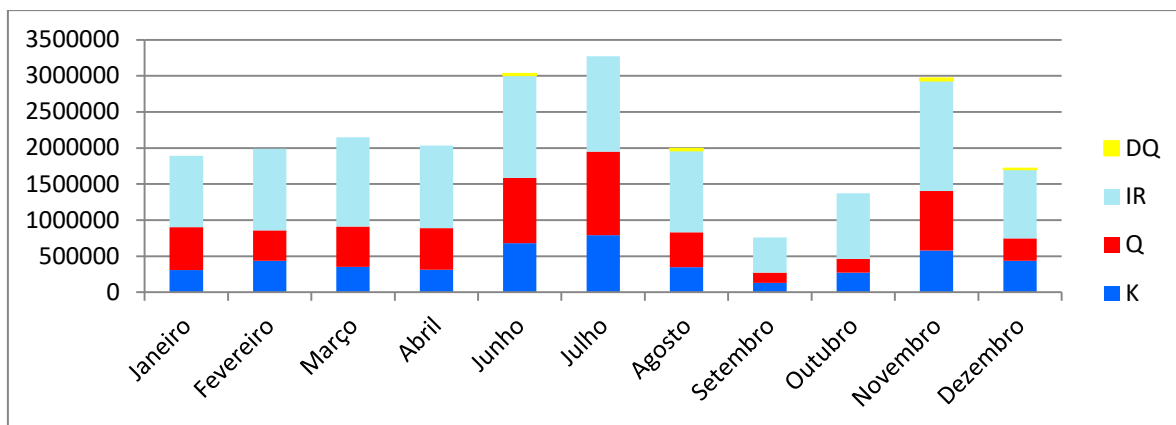


Figura 22a: Variação mensal do teor dos tipos de flavonoides ao longo do ano na variedade Conne Mayer. (Q – derivados de Quercetina, IR- Isorhamnetina, K – derivados de Kaempferol e DQ– Diidroquercetina)

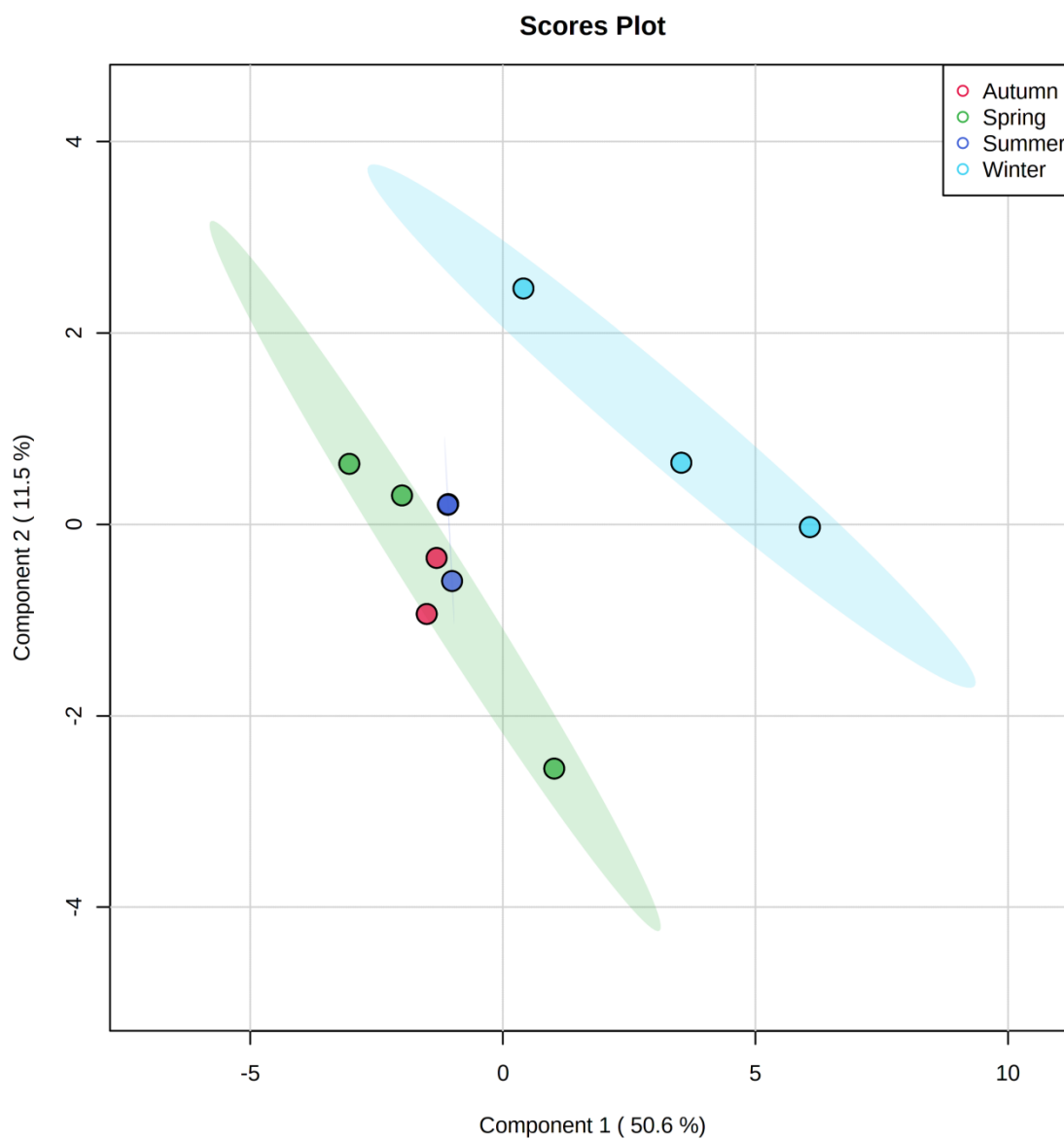


Figura 22b: Gráfico de dispersão gerado pela PLS-DA através dos dados metabolômicos das quatro estações

da variedade Conne Mayer.

Na variedade Costa Rica, o teor de flavonoides totais se correlaciona positivamente com IR e também com K e Q (Fig. 23a). Nessa variedade, o gráfico de dispersão (Fig. 23b) não demonstrou diferenças químicas entre as estações, visto que há intersecções entre primavera, verão e inverno. A estação de outono não permitiu estabelecer sua variância, pois faltou um ponto de coleta, entretanto os dois pontos coletados demonstram uma tendência de menor variância intra-estação e, conseqüentemente, maior homogeneidade.

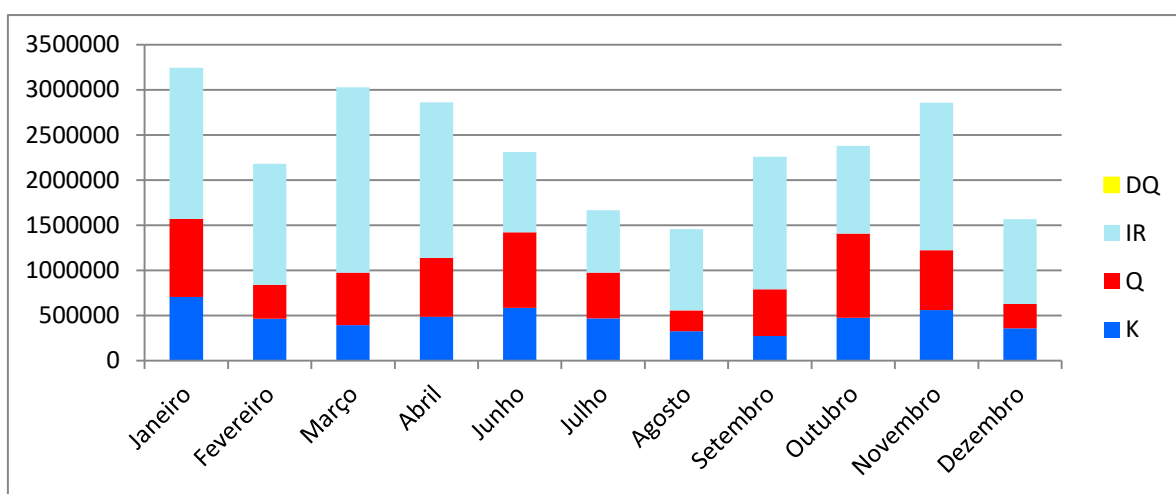


Figura 23a: Variação mensal do teor dos tipos de flavonoides ao longo do ano na variedade Costa Rica. (Q – derivados de Quercetina, IR- Isorhamnetina, K – derivados de Kaempferol e DQ– Diidroquercetina)

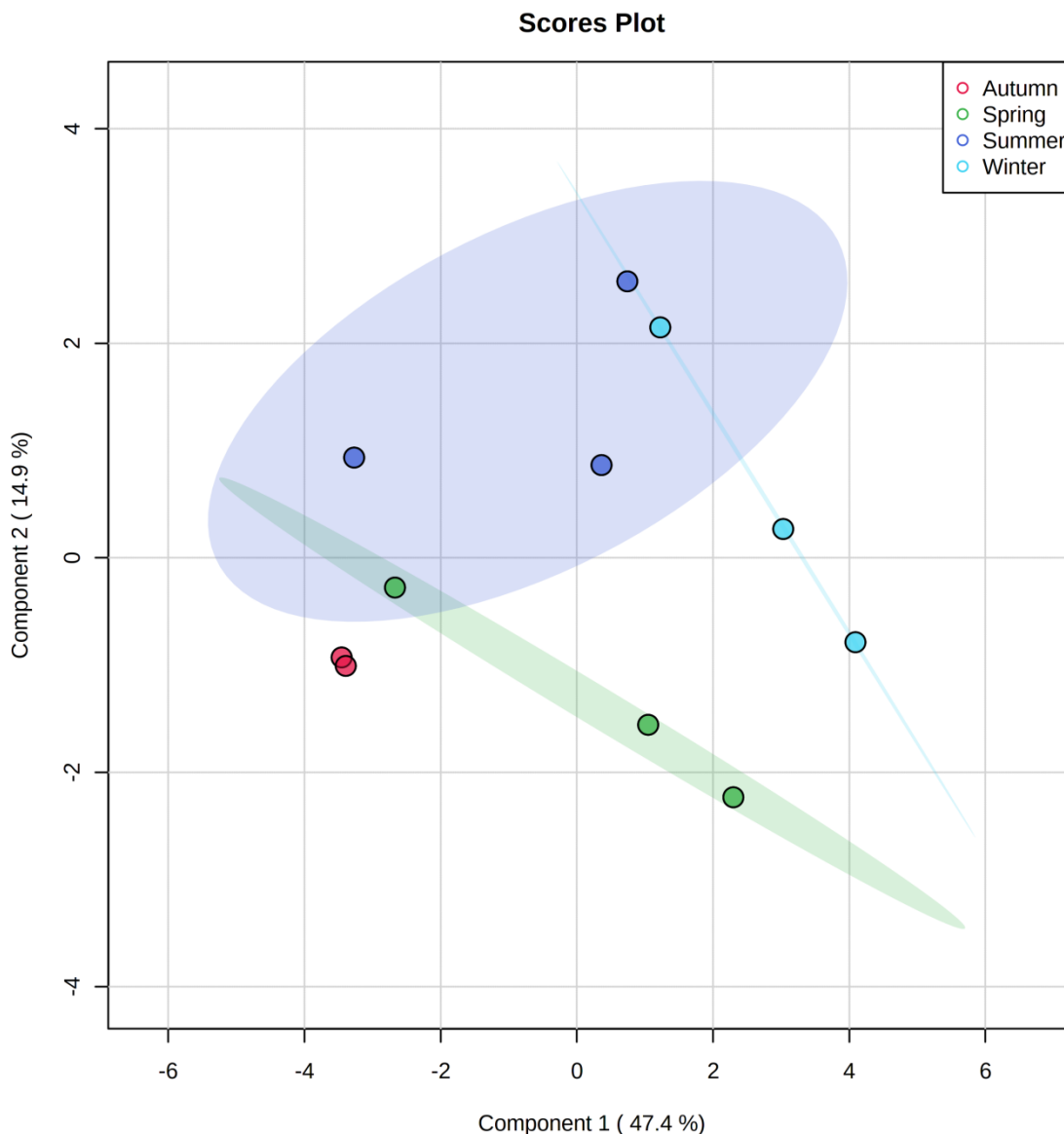


Figura 23b: Gráfico de dispersão gerado pela PLS-DA através dos dados metabolômicos das quatro estações da variedade Costa Rica.

Na variedade Desert King, há correlação positiva entre o teor de flavonoides totais e o de IR (Fig. 24a), com a expressiva participação de K ao longo do ano. O mês de outubro foi o que apresentou o maior teor de flavonoides, ocorrendo quantidades relevantes de todos os flavonoides presentes no panorama químico de Desert King. Entretanto, com exceção de maio, houve apreciável queda no teor de flavonoides, principalmente dos derivados de IR. Mudanças bruscas no teor de flavonoides, como a que ocorre em outubro e novembro, postam um obstáculo para produção de fitoterápicos, visto que haverá necessidade de criterioso monitoramento das quantidades do princípio ativo após as coletas. O gráfico de dispersão (Fig. 24b) da variedade Desert King demonstrou alta variância na estação de outono, tornando

todas as demais estações subgrupos do outono. Apesar disso, nota-se uma distinção entre primavera e o grupo verão-inverno.

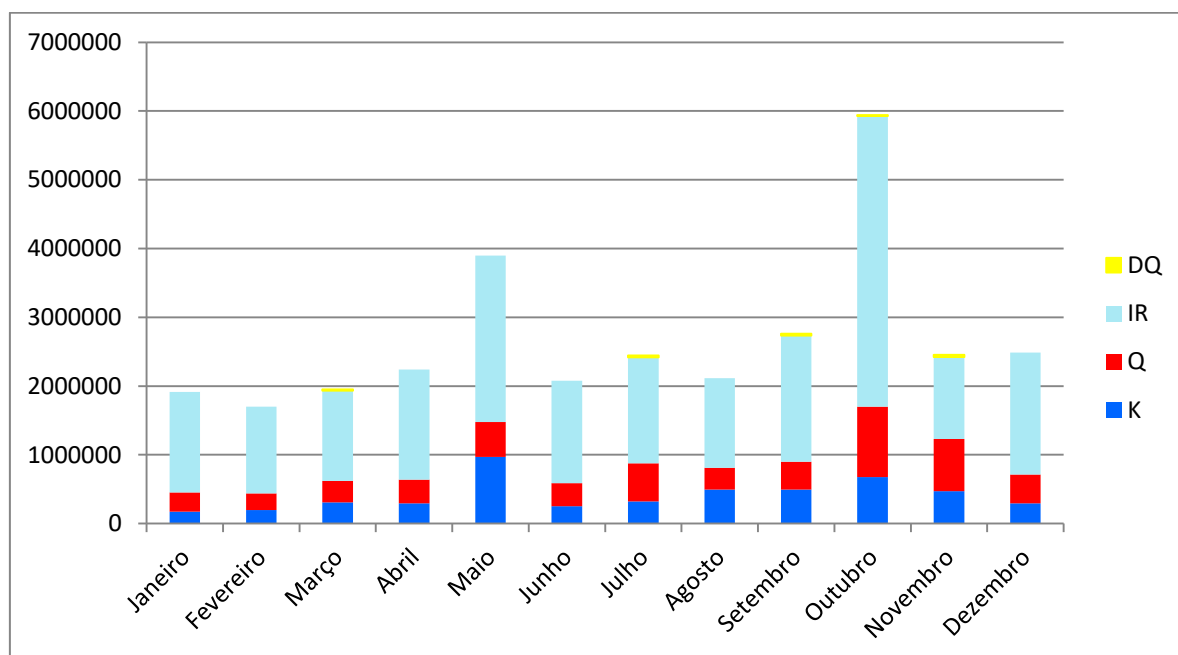


Figura 24a: Variação mensal do teor dos tipos de flavonoides ao longo do ano na variedade Desert King. (Q – derivados de Quercetina, IR- Isorhamnetina, K – derivados de Kaempferol e DQ– Diidroquercetina)

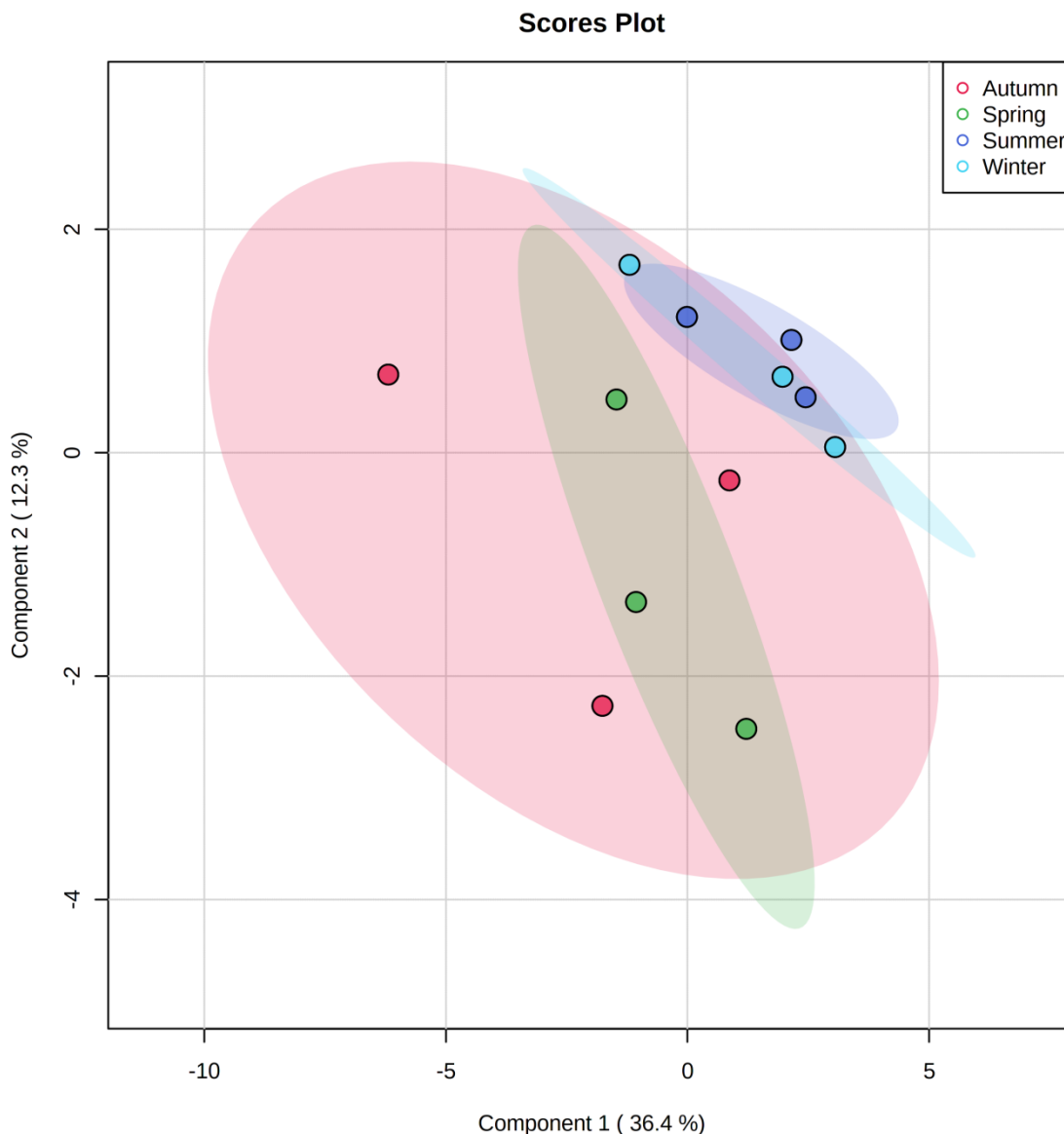


Figura 24b: Gráfico de dispersão gerado pela PLS-DA através dos dados metabolômicos das quatro estações da variedade Desert King.

Por sua vez, a variedade Golden apresenta correlação positiva entre o teor de flavonoides totais e IR (Fig. 25a), mas agora com contribuição relevante de K. A variedade Golden possui maior ocorrência de flavonoides no mês de dezembro, quando ocorreram flavonoides derivados de K diglicosilado (**25**) e triglicosilado (**19**), IR diglicosilados (**26**) e triglicosilados (**20**), Q monoglicosilado (**27**) e diglicosilado (**23**) e triglicosilado (**16**). Os meses de fevereiro e março apresentaram tipos e teores de flavonoides similares a dezembro. A expressiva participação de K no teor de flavonoides totais é um aspecto importante a ser considerado na produção de um fitoterápico derivado dessa variedade. No gráfico de dispersão gerado pela PLS-DA (Fig. 25b), a distribuição das estações se sobrepõe, evidenciando que a variedade

Golden não apresenta diferenças químicas significativas. Apesar disso, observam-se diferenças entre primavera e verão.

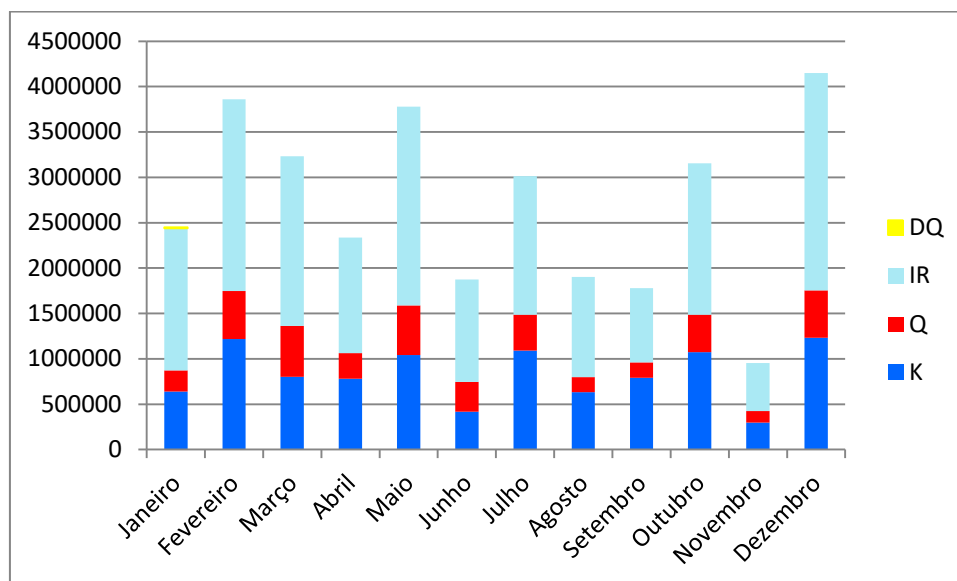


Figura 25a: Variação mensal do teor dos tipos de flavonoides ao longo do ano na variedade Golden. (Q – derivados de Quercetina, IR- Isorhamnetina, K – derivados de Kaempferol e DQ– Dihydroquercetina)

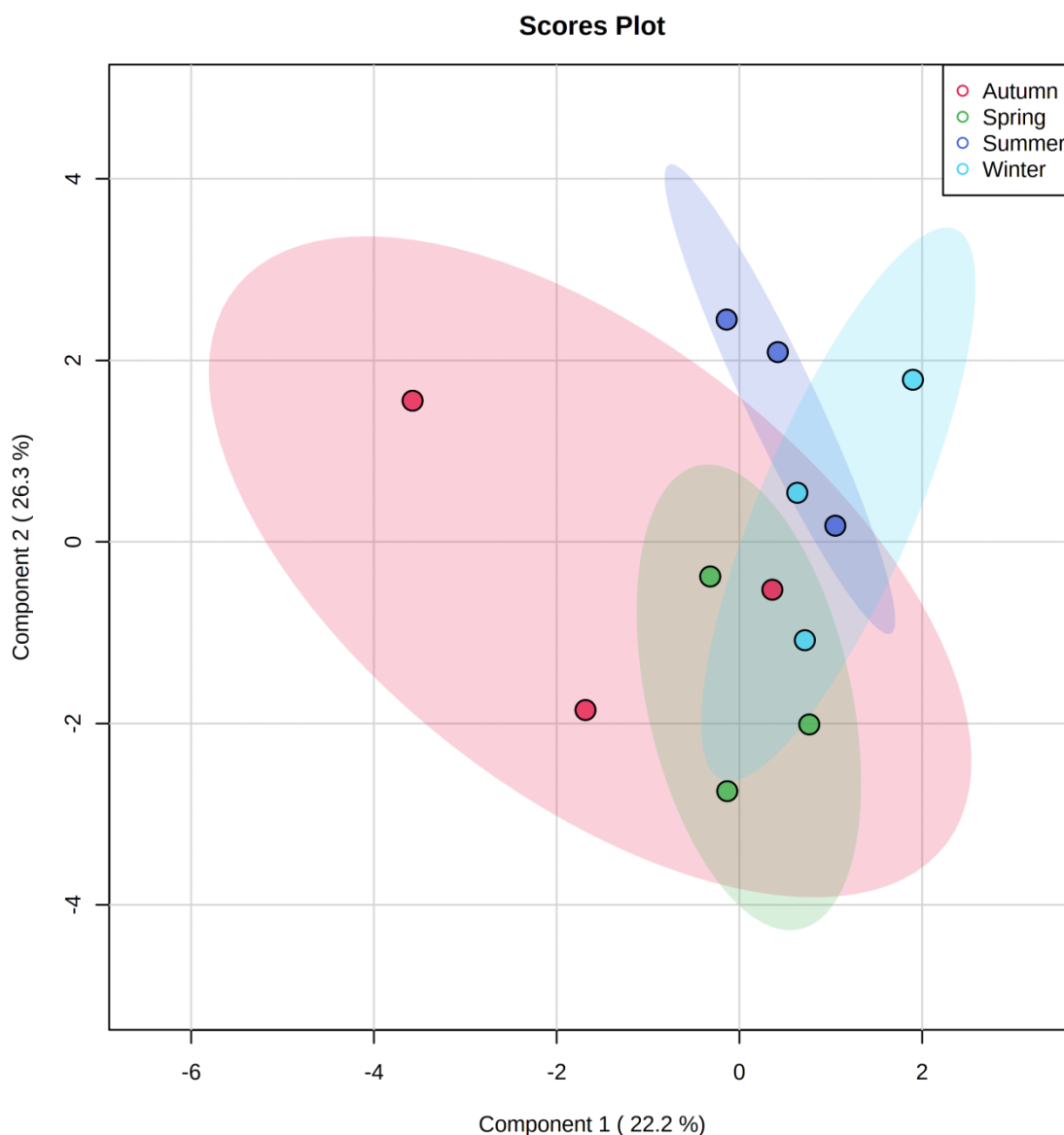


Figura 25b: Gráfico de dispersão gerado pela PLS-DA através dos dados metabolômicos das quatro estações da variedade Golden.

Na variedade Orejona, há correlação positiva entre o teor de flavonoides totais e o de IR (Fig. 26a), o que não ocorre com os componentes minoritários, cujos teores variam ao longo do ano. Essa inconstância ocorre também com Q, que é um dos componentes que merece atenção nesse extrato. O maior teor de flavonoides ocorreu no mês de março, quando foram observados flavonoides derivados de IR monoglicosilado (**28**), diglicosilado(**23**), triglicosilados (**18** e **20**), tetraglicosilado (**17**), Q monoglicosilado (**27**) diglicosilado (**23**) e triglicosilado (**16**), além do maior teor de T (**29**), dentre todos meses. A variedade Orejona também não apresentou diferenças químicas, visto que as estações se sobrepõem. Entretanto, há diferenças entre as

inverno e verão (Fig. 26b).

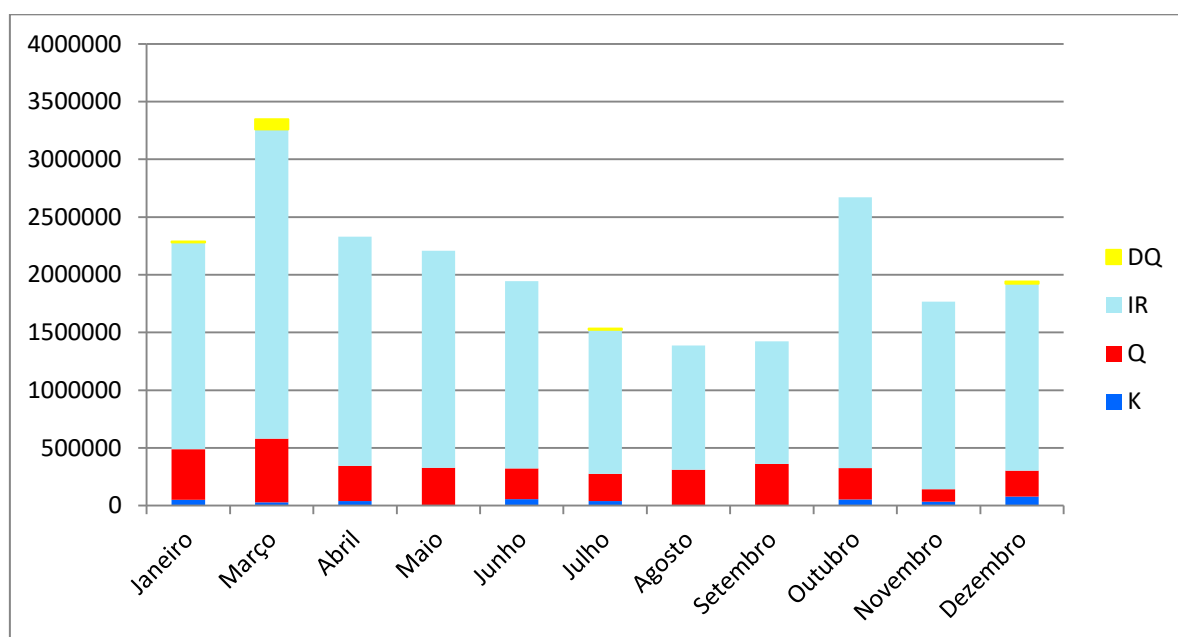


Figura 26a: Variação mensal do teor dos tipos de flavonoides ao longo do ano na variedade Orejona. (Q – derivados de Quercetina, IR- Isorhamnetina, K – derivados de Kaempferol e DQ– Diidroquercetina)

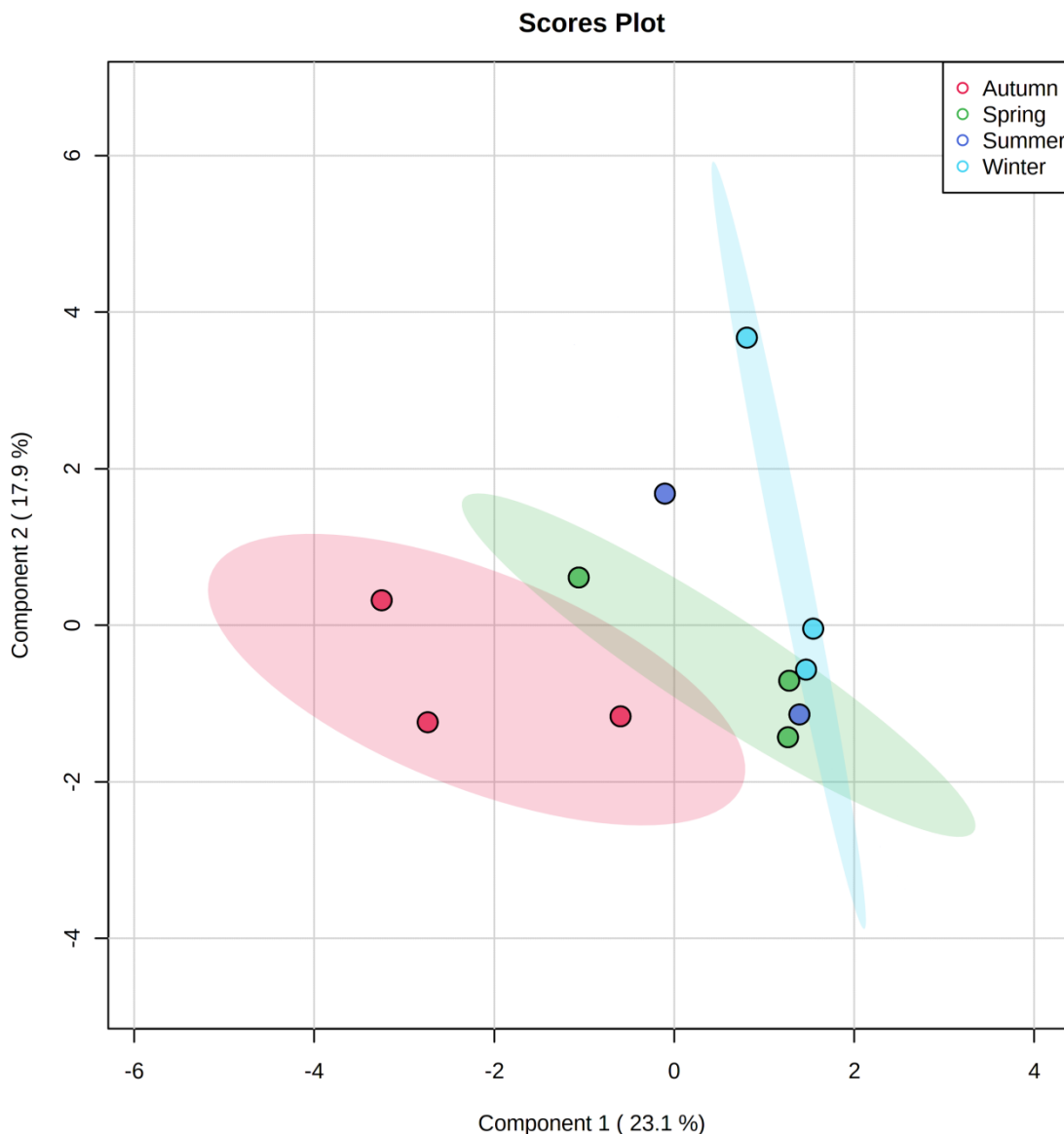


Figura 26b: Gráfico de dispersão gerado pela PLS-DA através dos dados metabolômicos das quatro estações da variedade Orejona.

A variedade Pink também apresenta correlação positiva entre o teor de flavonoides totais e o de IR (Fig. 27a). No entanto, apesar de o teor do componente K ser expressivo ao longo do ano, ele sofre variações que não encontram correlação com o teor dos flavonoides totais, o que pode ser um empecilho para a formulação de um fitoterápico. A variedade Pink apresentou maior teor de flavonoides no mês de abril, quando foram predominantes os flavonoides derivados da Q diglicosilados (**23**) e da IR monoglicosilados (**28**), diglicosilados (**26**), triglicosilados (**18**). A variedade Pink apresentou ao menos duas estações bem definidas (Fig. 27b), uma composta pelo inverno e outra composta pelas demais estações.

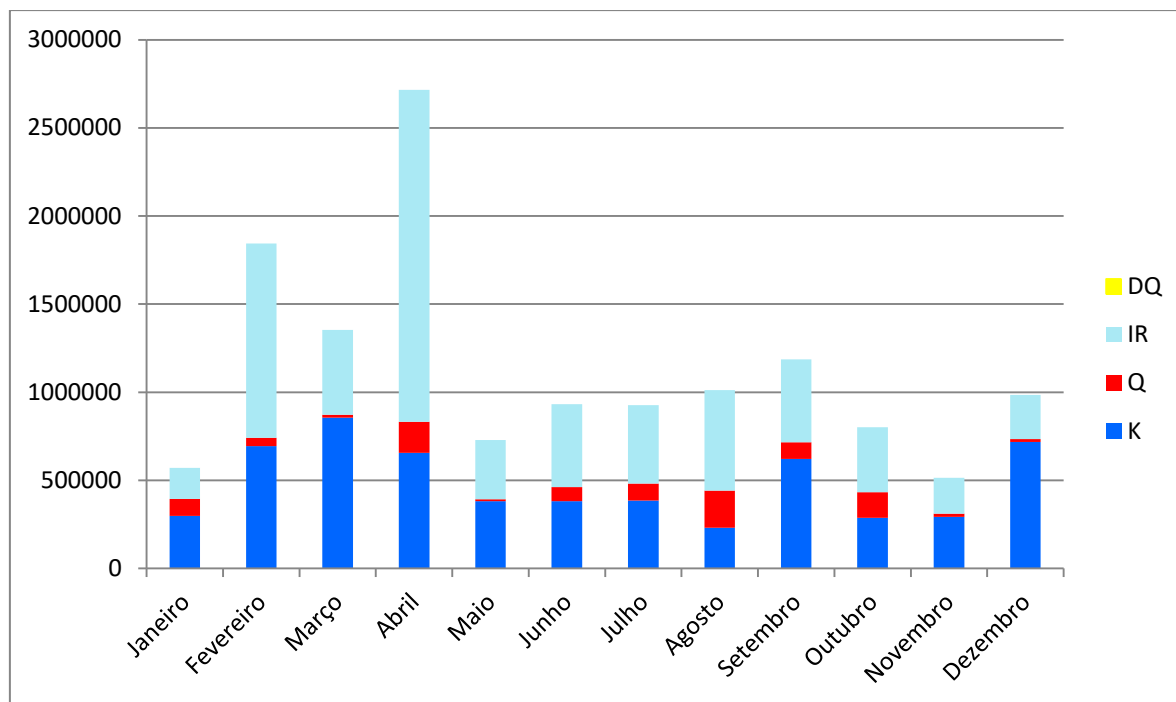


Figura 27a: Variação mensal do teor dos tipos de flavonoides ao longo do ano na variedade Pink. (Q – derivados de Quercetina, IR- Isorhamnetina, K – derivados de Kaempferol e DQ– Diidroquercetina)

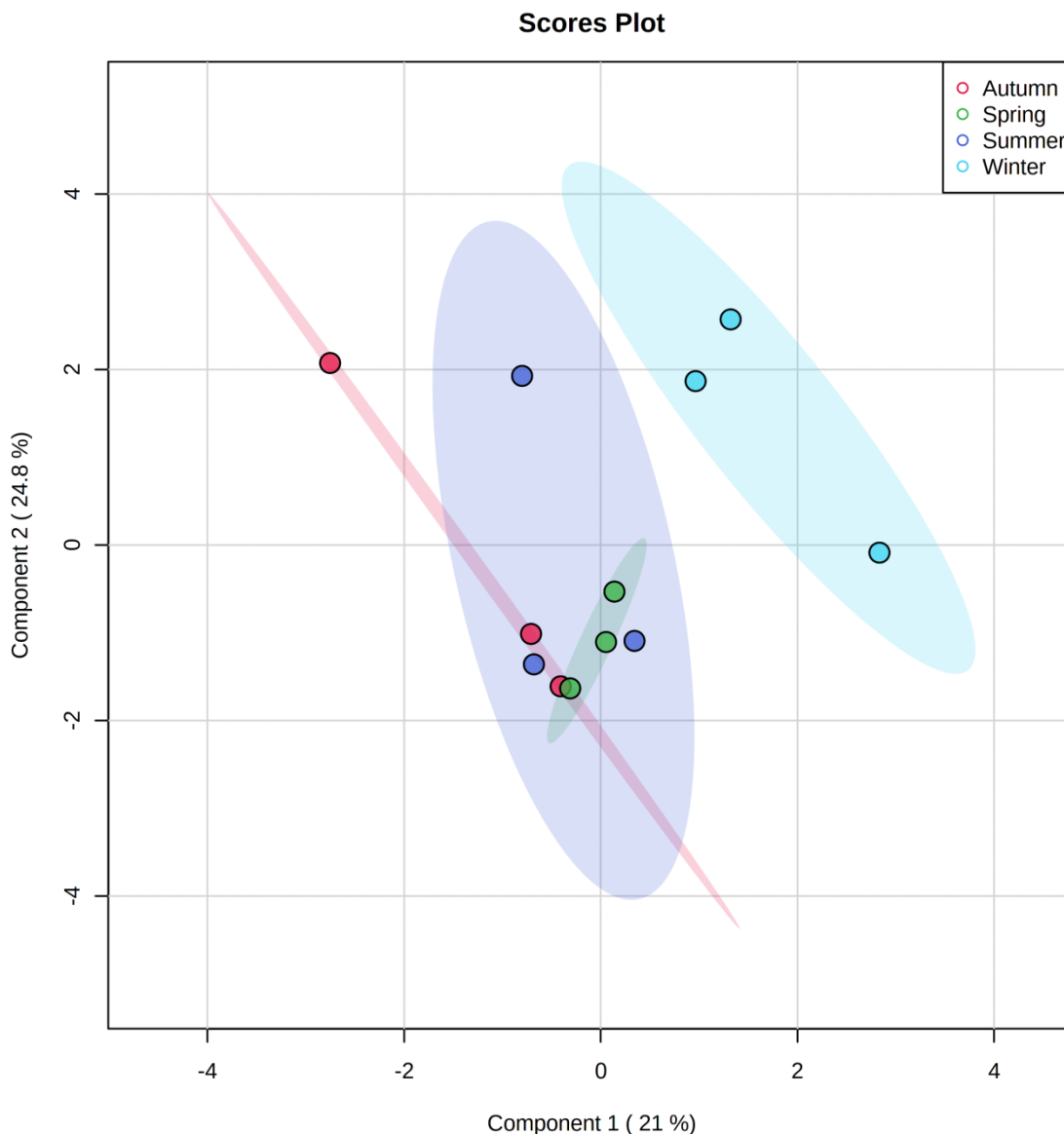


Figura 27b: Gráfico de dispersão gerado pela PLS-DA através dos dados metabolômicos das quatro estações da variedade Pink.

A variedade Purple Haze apresenta correlação entre o teor de flavonoides totais e o de IR em praticamente todos os meses do ano, com exceção de junho, que é quando aumentam os teores de K (Fig. 28a). Ainda, há relevante contribuição dos derivados de Q e de K ao longo de quase todo o ano. Dentre todas as variedades, Purple Haze foi a que apresentou diferenças químicas mais expressivas. Observa-se através do PLS-DA (Fig. 28b) que verão e inverno não apresentam intersecções, sendo quimicamente bem definidas, enquanto que as estações de outono e primavera apresentam apenas uma pequena intersecção, não havendo sobreposição. Assim sendo, Purple Haze apresenta 3 estações bem definidas.

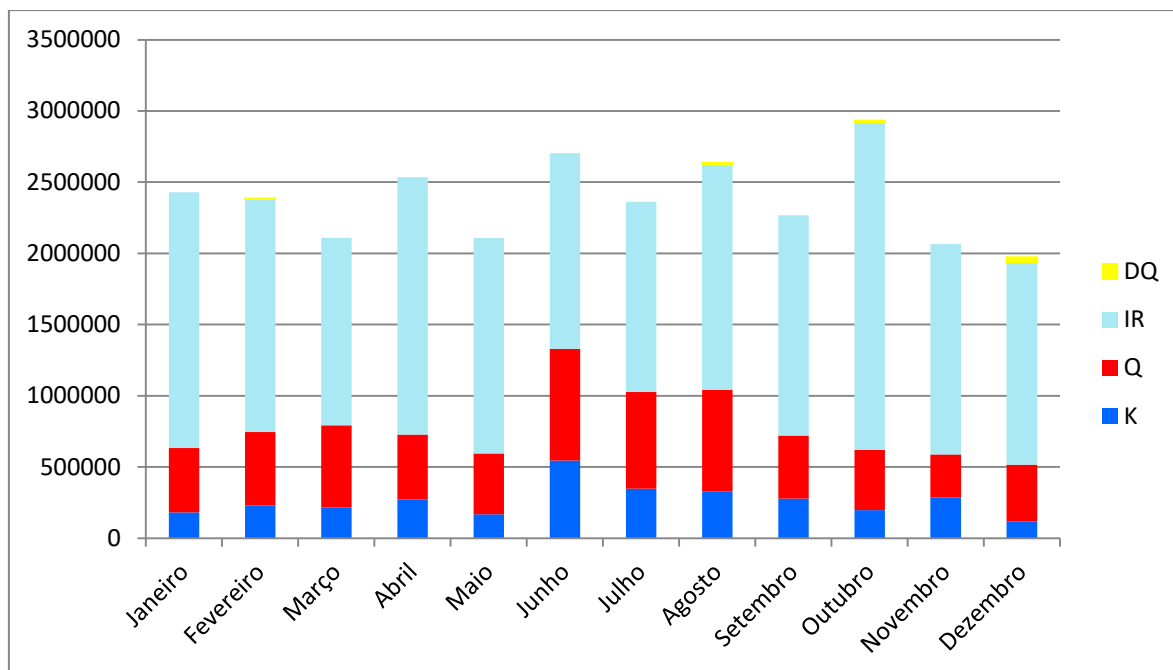


Figura 28a: Variação mensal do teor dos tipos de flavonoides ao longo do ano na variedade Purple Haze.

(Q – derivados de Quercetina, IR- Isorhamnetina, K – derivados de Kaempferol e DQ– Diidroquercetina)

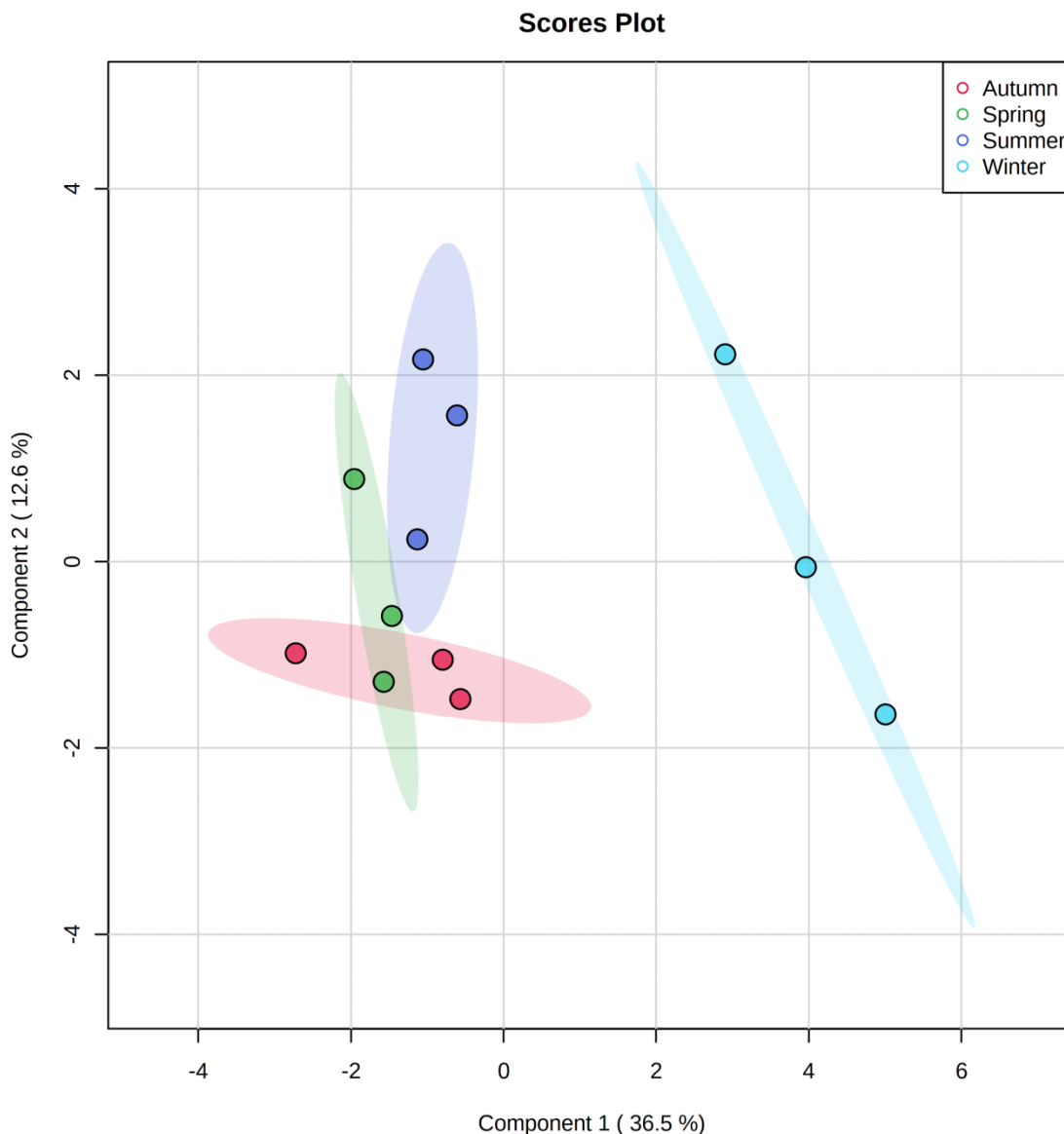


Figura 28b: Gráfico de dispersão gerado pela PLS-DA através dos dados metabolômicos das quatro estações da variedade Purple Haze.

Na variedade Thick King, o teor dos compostos minoritários é tão baixo que é clara a correlação positiva entre o teor de flavonoides e o de IR ao longo de todo o ano (Fig. 29a). Essa característica – constância da composição química – é um aspecto muito relevante para o desenho de um fitopreparado. O mês de dezembro apresentou maior teor de flavonoides, quando ocorreram os flavonoides triglicosilado (19) e tetraglicosilado (14) derivados de K, IR diglicosilado (26), triglicosilado (20), tetraglicosilado (17), Q diglicosilado (23) triglicosilado (16) e pentaglicosilado (8), além do maior teor de T (29). A PLS-DA não demonstrou diferenças químicas significativas em Thick King, visto que houve grande sobreposição entre as distribuições dos flavonoides de cada estação (Fig. 29b).

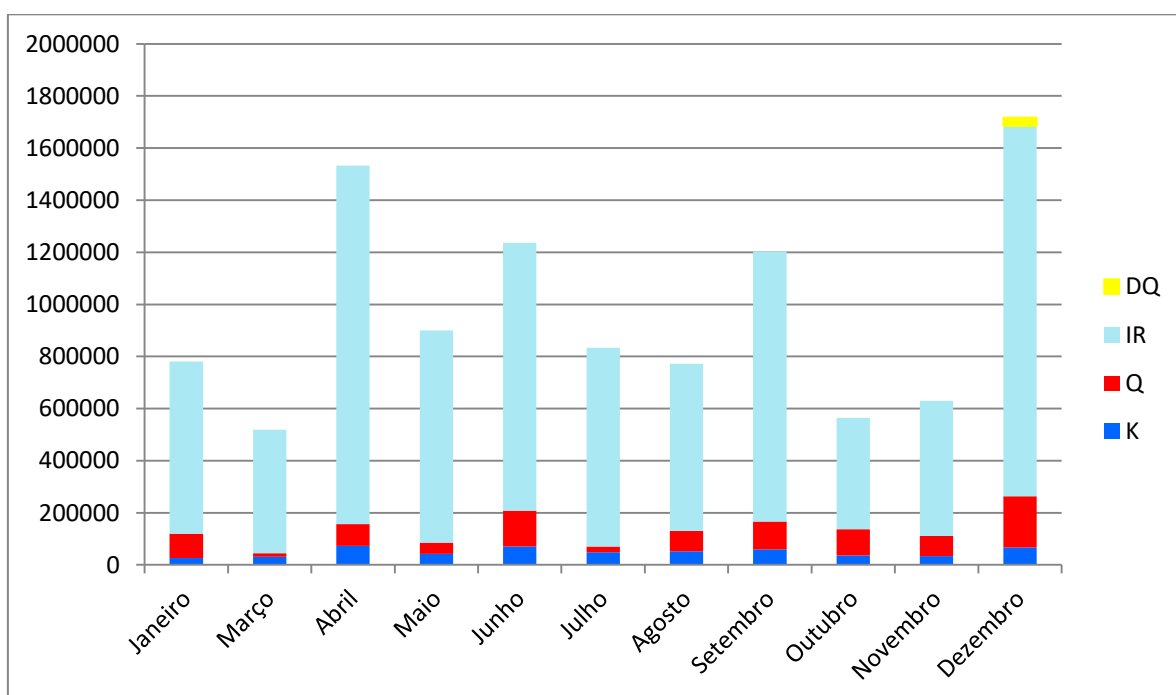


Figura 29a: Variação mensal do teor dos tipos de flavonoides ao longo do ano na variedade Thick King.

(Q – derivados de Quercetina, IR- Isorhamnetina, K – derivados de Kaempferol e DQ– Diidroquercetina)

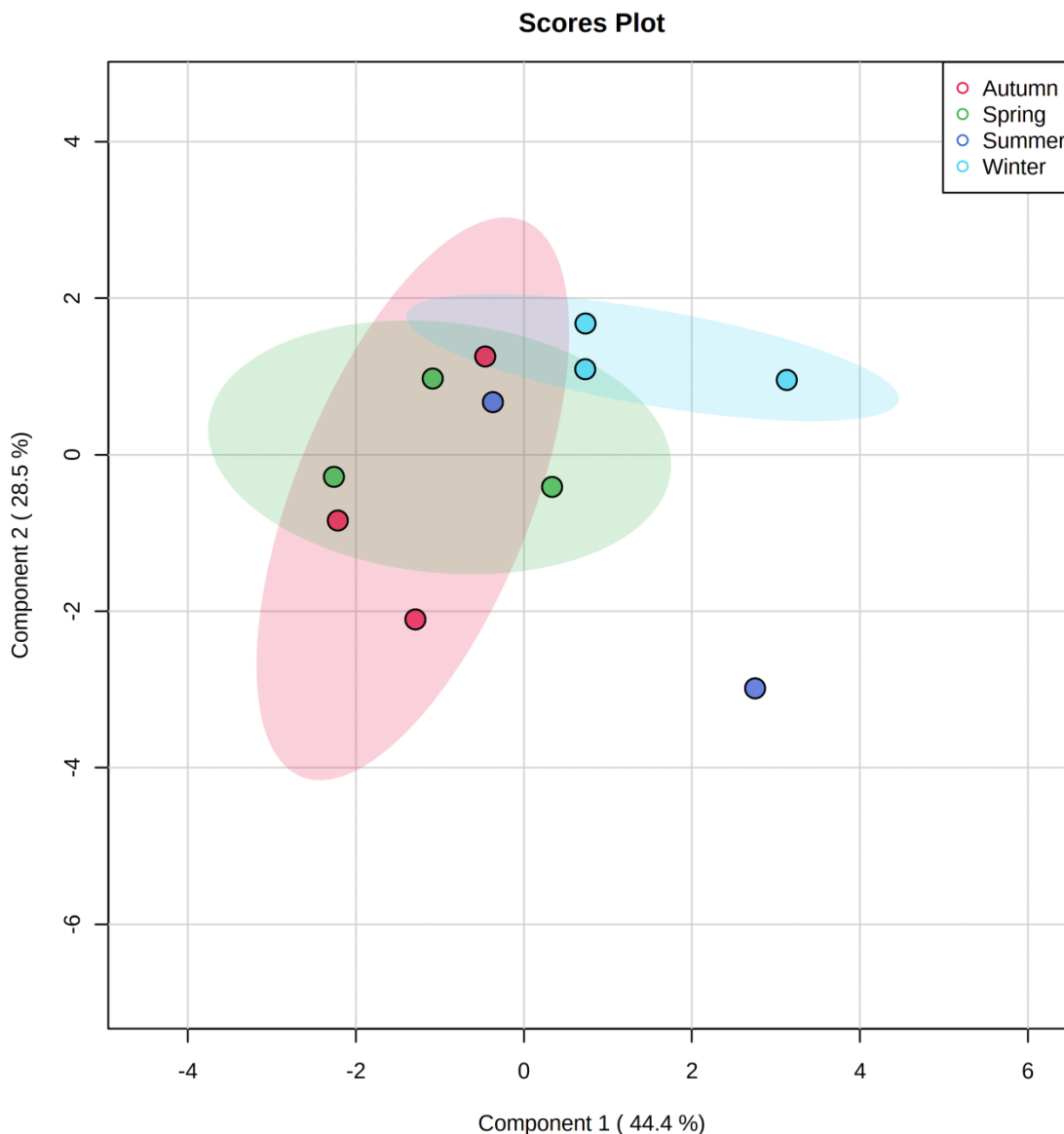


Figura 29b: Gráfico de dispersão gerado pela PLS-DA através dos dados metabolômicos das quatro estações da variedade Thick King.

A variedade Zamorano é a que aparenta ter a menor correlação entre o teor de flavonoides totais e o de IR (Fig. 30a). Nos meses de abril e maio se observam os maiores teores dos flavonoides totais, mas ocorre a diminuição de IR e o aumento dos flavonoides derivados de K diglicosilados (**25**), triglicosilados (**19**), tetraglicosilados (**14**) e de Q monoglicosilados (**27**), diglicosilados (**23**), e AQ (**8** e **16**). Em junho ocorre o inverso, com a diminuição dos flavonoides totais e de K, mas há aumento de IR e Diidroquercetina (**29**), o qual atingiu seu maior teor no mês de julho. No entanto, o teor de K não acompanha o dos flavonoides totais, pois quando esse volta a diminuir em agosto, ocorre aumento de K. Nota-se que o teor de K

também não apresenta nenhum tipo de correlação com o dos outros componentes ou o dos flavonoides totais. Apesar de a variedade Zamorano não apresentar diferenças químicas, pois o verão sobrepõe todas as demais estações (Fig. 30b), as estações de outono e inverno se distinguiram entre si, não havendo intersecções entre elas. Ainda, a estação de primavera apresentou maior homogeneidade com sua distribuição restrita, formando um subgrupo da estação de verão.

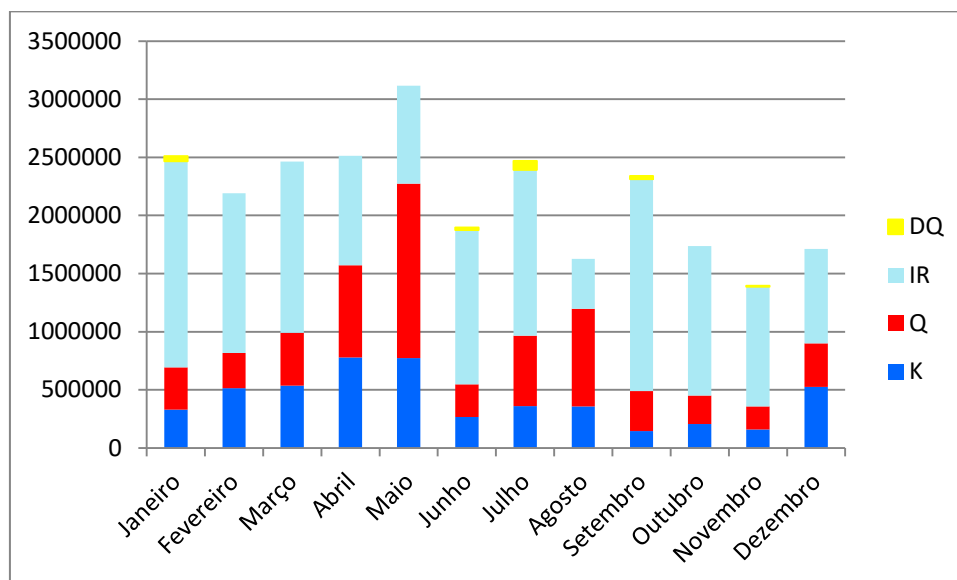


Figura 30a: Variação mensal do teor dos tipos de flavonoides ao longo do ano na variedade Zamorano. (Q – derivados de Quercetina, IR- Isorhamnetina, K – derivados de Kaempferol e DQ– Diidroquercetina)

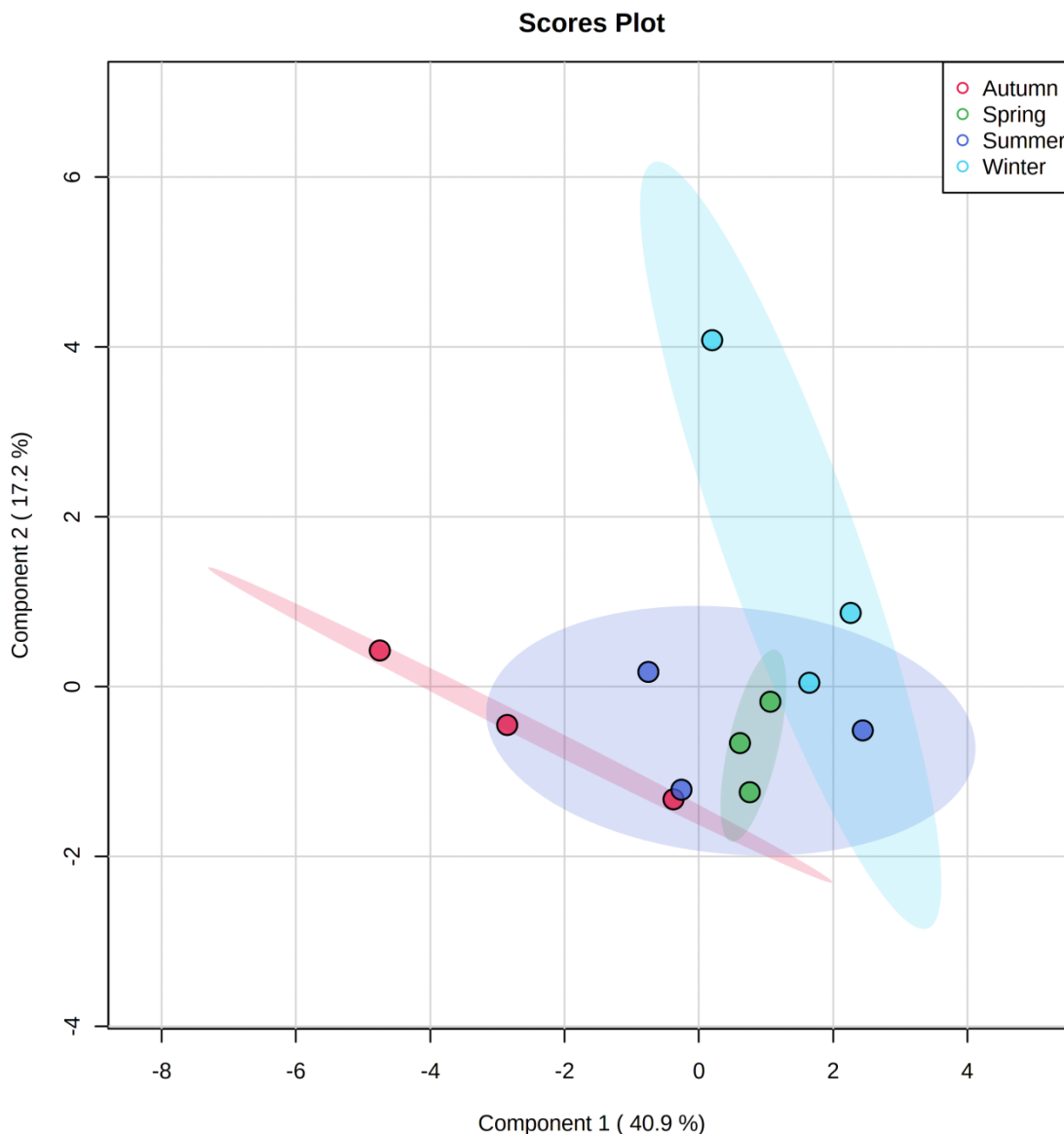


Figura 30b: Gráfico de dispersão gerado pela PLS-DA através dos dados metabolômicos das quatro estações da variedade Zamorano.

Nossos resultados mostram que as variedades de *Selenicereus* alteram seus perfis metabólicos de mês a mês, modificando quali e quantitativamente a ocorrência de flavonoides. Efeitos de sazonalidade são bem conhecidos em plantas, e podem refletir alterações nas atividades biológicas apresentadas por elas, como aponta Reyes-Vaqueiro *et al.* (2021), que observaram mudanças químicas nos extratos de *Ruta graveolens* entre os meses de janeiro, abril, junho e setembro, as quais implicaram em diferentes valores de inibição antifúngica. Luníc *et al.* (2022) também observaram variações sazonais no metaboloma do musgo *Hypnum crupressiforme*, que resultaram em diferentes inibições de EROs, ON, RNF- α e IL-6, componentes ligados à reação inflamatória de células micróglia e neural. Mudanças no teor de

ácido elágico e nas atividades antioxidante, inibição de α -glicosidase e acetilcolinesterase, resultantes de sazonalidade, foram observadas por Noriega *et al.* (2021) em extratos de *Fragaria chiloensis* ssp. *chiloensis* f. *chiloensis*.

Além disso, nossos resultados também mostraram alterações no grau de glicosilação dos flavonoides decorrentes da sazonalidade. Esse aspecto também pode ser relevante para a produção de fitoterápicos à base de pitaya, uma vez que o grau e o tipo de glicosilação de uma molécula pode estar diretamente associada à sua permeabilidade celular, solubilidade em água e estabilidade, e, consequentemente, alterar a biodisponibilidade das substâncias ativas (NAEEM *et al.* 2021).

Mudanças sazonais que implicam em alterações nas atividades biológicas são um fator relevante, visto que podem alterar a eficácia e segurança de um fitopreparado. Tais mudanças devem ser monitoradas e bem estabelecidas.

4.3 Atividade antioxidante de *Selenicereus*

Tendo em vista o grande número de coletas, a atividade antioxidante das variedades de *Selenicereus* foi ensaiada pelo método do DPPH.

As variedades submetidas ao ensaio de atividade antioxidante apresentaram grandes variações, e muitas revelaram baixa atividade, apesar de apresentarem flavonoides como substâncias majoritárias (Tab. 3). A variedade Green Night não foi submetida ao teste de DPPH visto que sua composição é essencialmente de saponinas, as quais não apresentam atividade antioxidante.

Tabela 3: Atividade antioxidante (500 ug/mL) das variedades de *Selenicereus* ao longo do ano.

Variedade	Atividade antioxidante (%)											
	meses											
	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12
I. Costa Rica	35	19	24	23	-	43	8	1	5	8	38	34
II. Pink	14	27	19	42	3	-	7	-	2	1	44	52
III. American Beauty	33	26	53	18	-	26	20	17	5	14	81	15

IV. Condor	39	35	12	27	13	18	30	3	10	27	35	58
V. Chinesa	7	18	6	40	6	33	29	7	3	15	34	17
VI. Purple Haze	31	48	17	35	10	-	28	42	6	34	17	34
VII. Branca	71	16	14	6	10	-	10	12	5	24	26	35
VII. Golden	22	40	8	8	35	-	27	12	14	14	35	11
IX. Colombiana	17	45	25	20	13	29	14	15	28	13	13	23
X. Colombiana Roxa	42	-	1	18	-	-	8	12	20	10	18	27
XI. Desert King	31	15	8	19	40	16	47	29	24	72	20	60
XII. Orejona	43	-	42	27	8	49	30	7	5	10	34	26
XII. Zamorano	78	24	48	58	65	81	80	16	11	17	40	30
XIV. Cerrado	12	24	26	11	44	22	8	3	8	37	12	12
XV. Thick King	11	13	9	43	3	42	13	3	-	1	73	36
XVI. Conne Mayer	24	11	21	4	-	14	13	27	7	13	69	27

Tendo em vista que o teor dos flavonoides foi apresentado em uma escala arbitrária da ordem de 10^7 , e que a atividade antioxidante foi apresentada numa escala que vai apenas de zero a cem, nos gráficos inferiores foi usado um artifício matemático para que o teor total de flavonoides e a atividade antioxidante pudessem constar do mesmo gráfico: multiplicou-se por 100.000 cada um dos valores de atividade antioxidante. É importante observar que esse artifício permite analisar a tendência mês a mês da atividade antioxidante quando comparada com o teor dos flavonoides totais.

Os gráficos apresentados (Figs 31 a 46) não nos permitiram estabelecer correlações positivas ou negativas entre os teores desses metabólitos, especialmente dos flavonoides, com as atividades antioxidantes observadas. Por exemplo, na variedade American Beauty há meses em que o teor de flavonoides é alto e a atividade antioxidante baixa (junho) e o inverso (novembro) (Fig. 31). Nos

casos em que foi possível estabelecer alguma correlação, inserimos sua discussão no parágrafo correspondente.

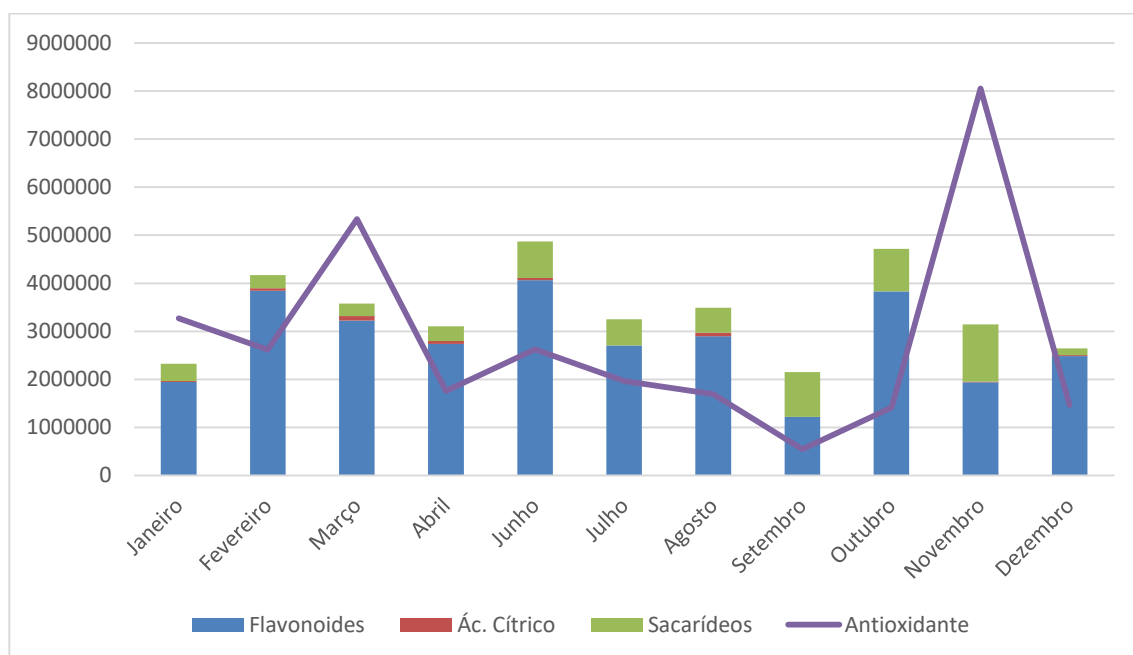


Figura 31: Comparação entre as classes de metabólitos e a atividade antioxidante da variedade American Beauty.

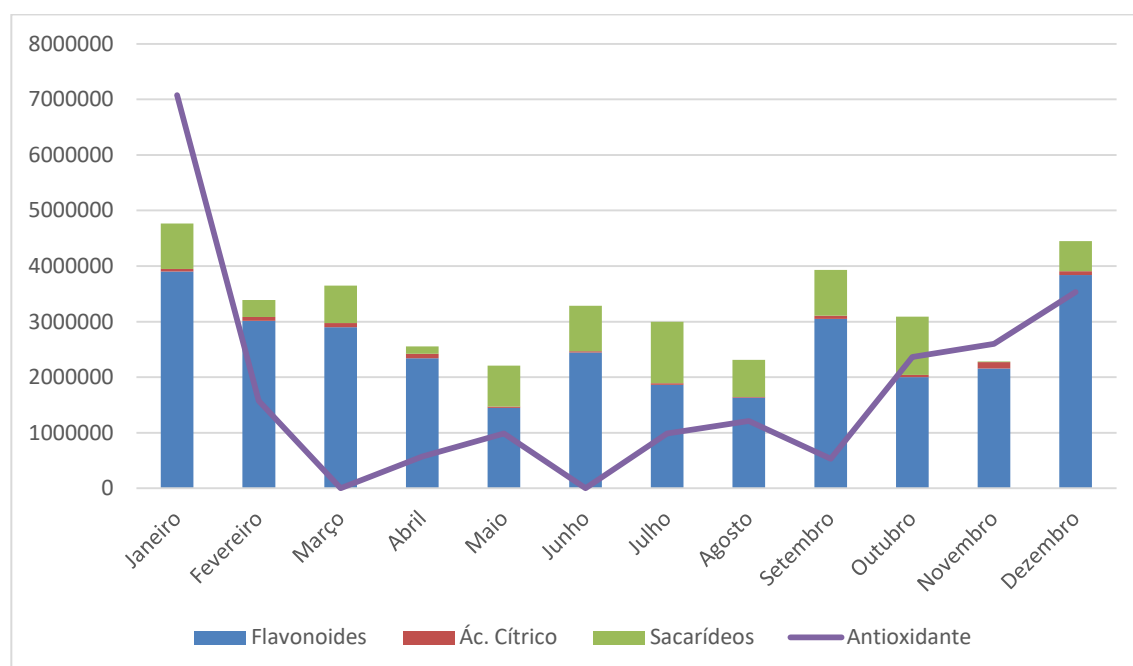


Figura 32: Comparação entre as classes de metabólitos e a atividade antioxidante da variedade Branca.

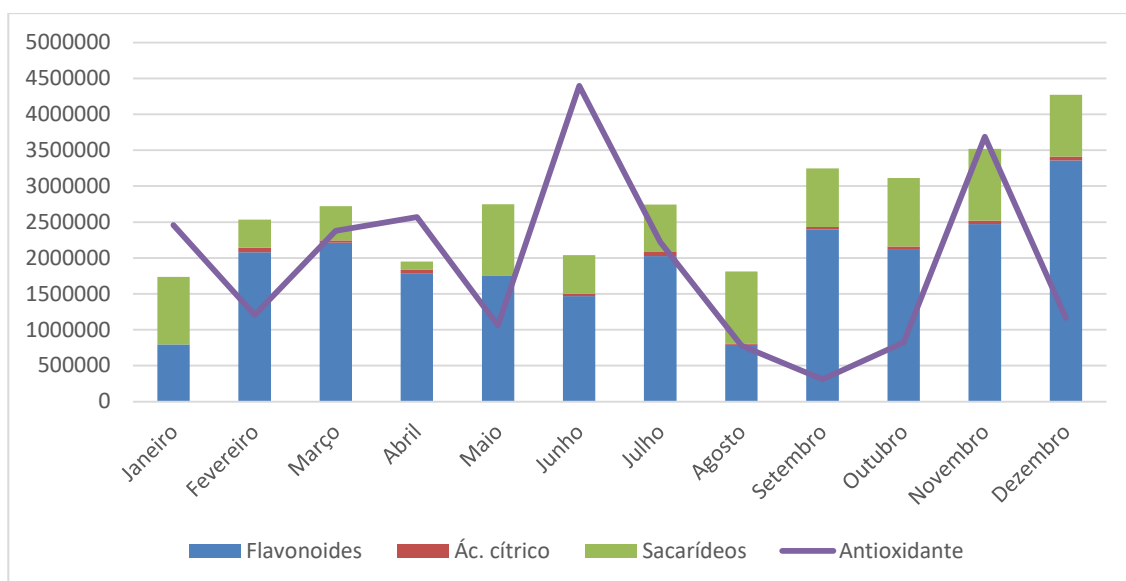


Figura 33: Comparação entre as classes de metabólitos e a atividade antioxidante da variedade Cerrado.

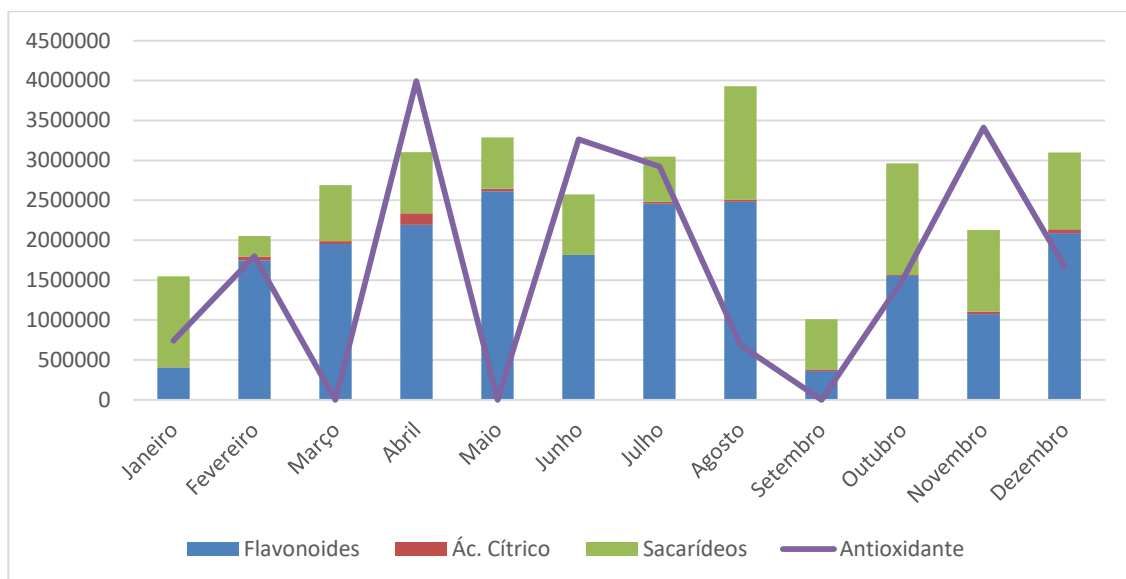


Figura 34: Comparação entre as classes de metabólitos e a atividade antioxidante da variedade Chinesa.

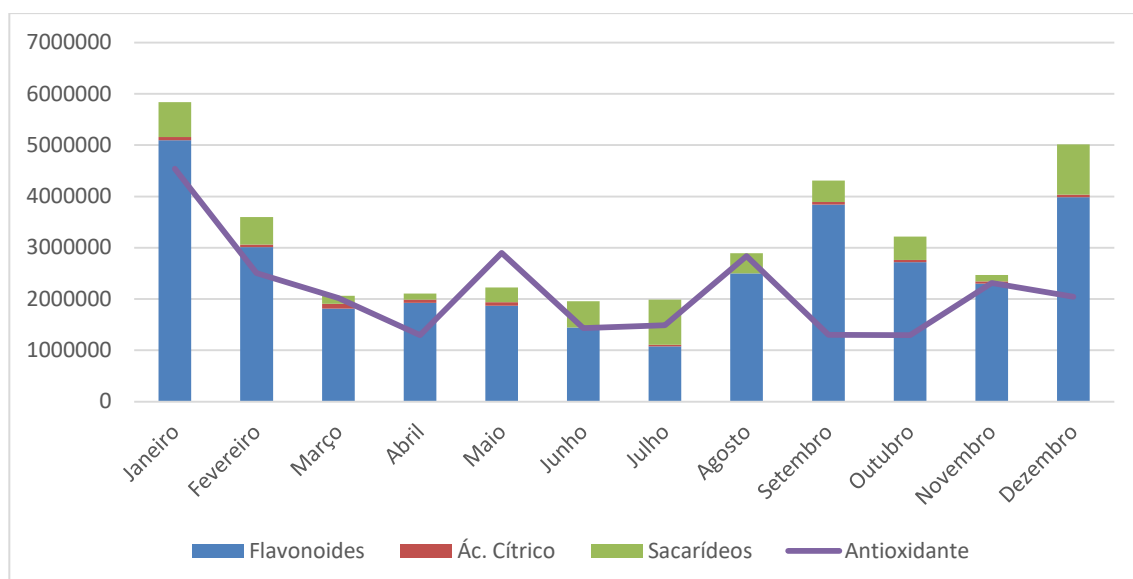


Figura 35: Comparação entre as classes de metabólitos e a atividade antioxidante da variedade Colombiana.

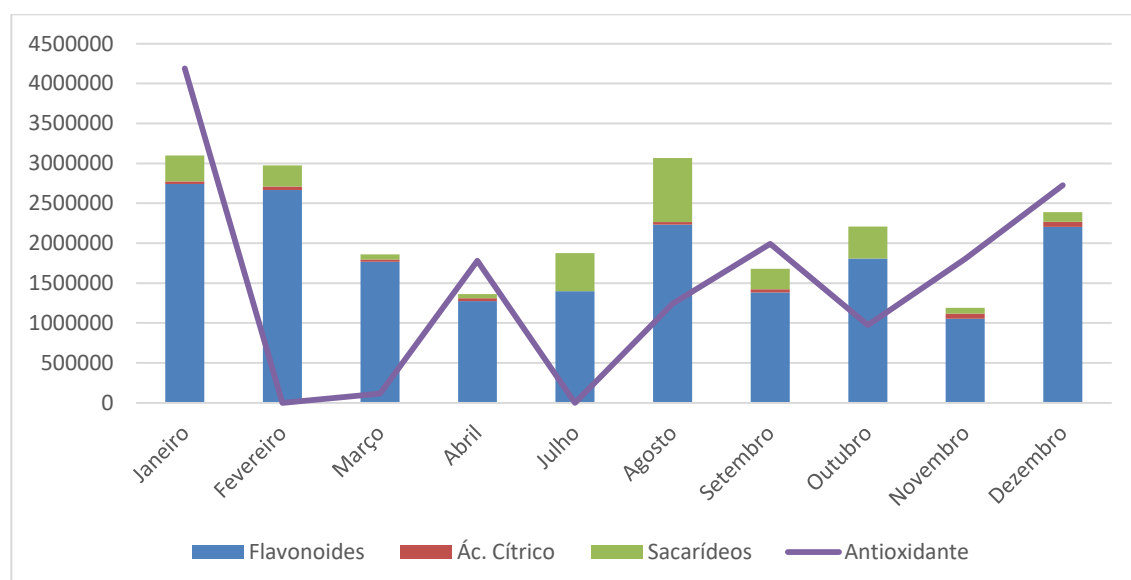


Figura 36: Comparação entre as classes de metabólitos e a atividade antioxidante da variedade Colombiana Roxa.

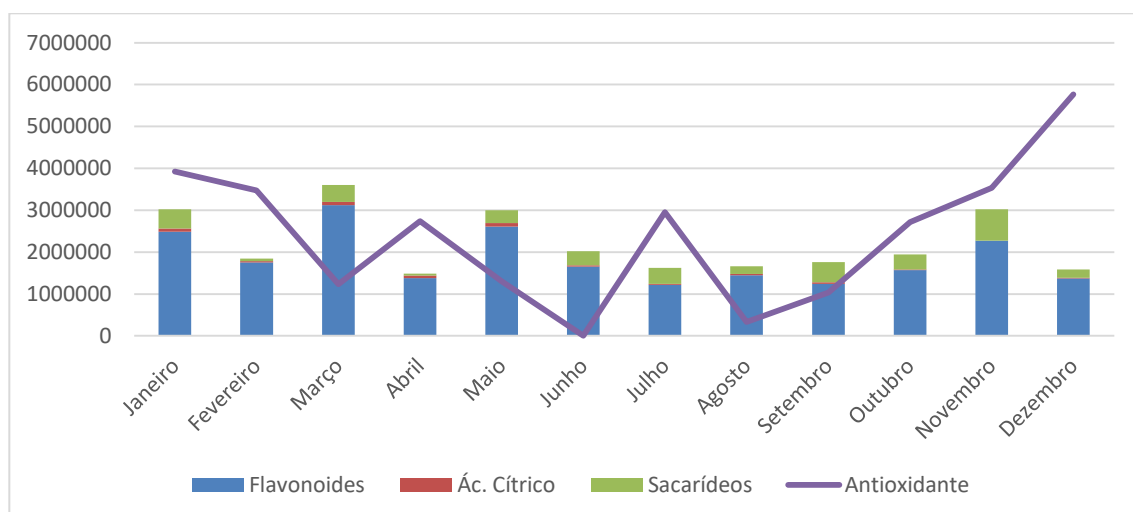


Figura 37: Comparação entre as classes de metabólitos e a atividade antioxidante da variedade Condor.

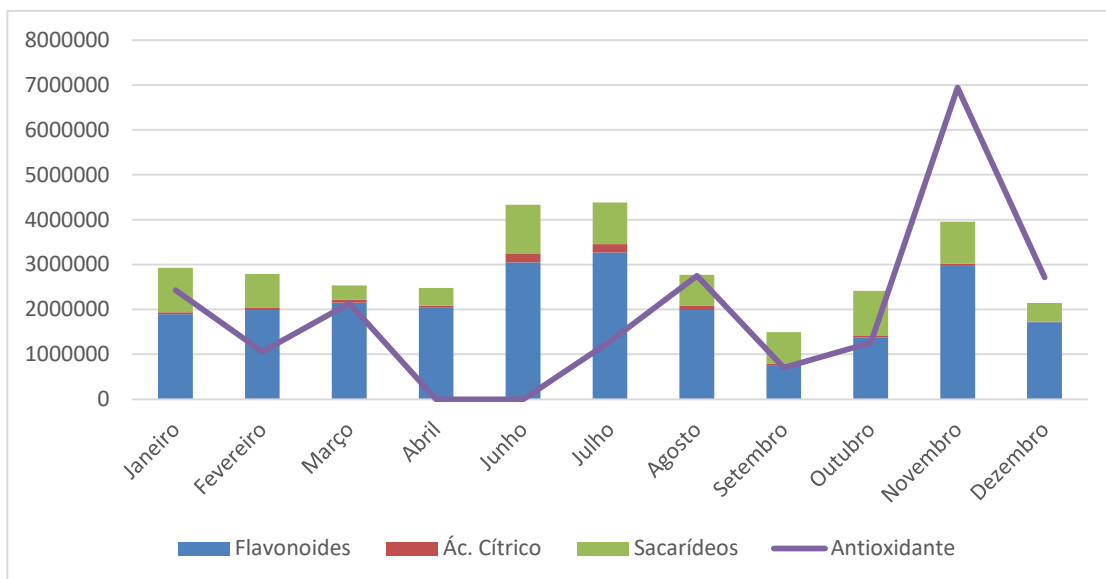


Figura 38: Comparação entre as classes de metabólitos e a atividade antioxidante da variedade Conne Mayer.

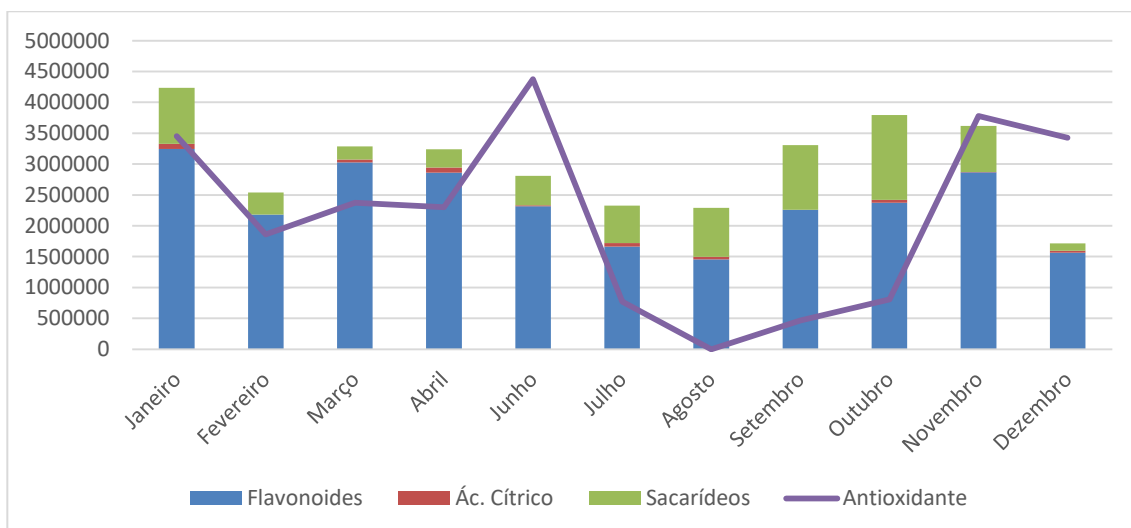


Figura 39: Comparação entre as classes de metabólitos e a atividade antioxidante da variedade Costa Rica.

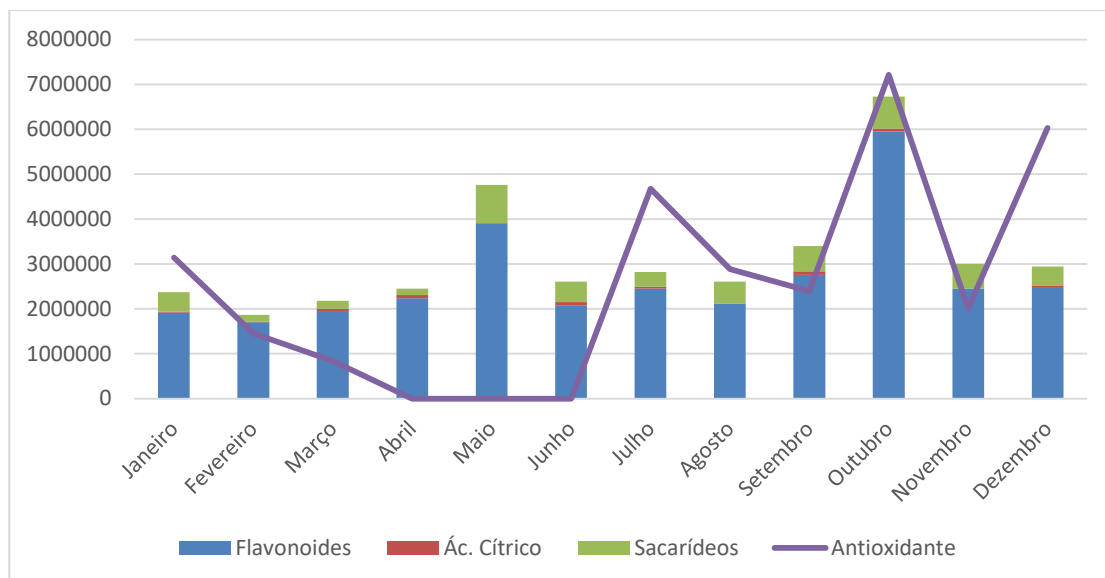


Figura 40: Comparação entre as classes de metabólitos e a atividade antioxidante da variedade Desert King.

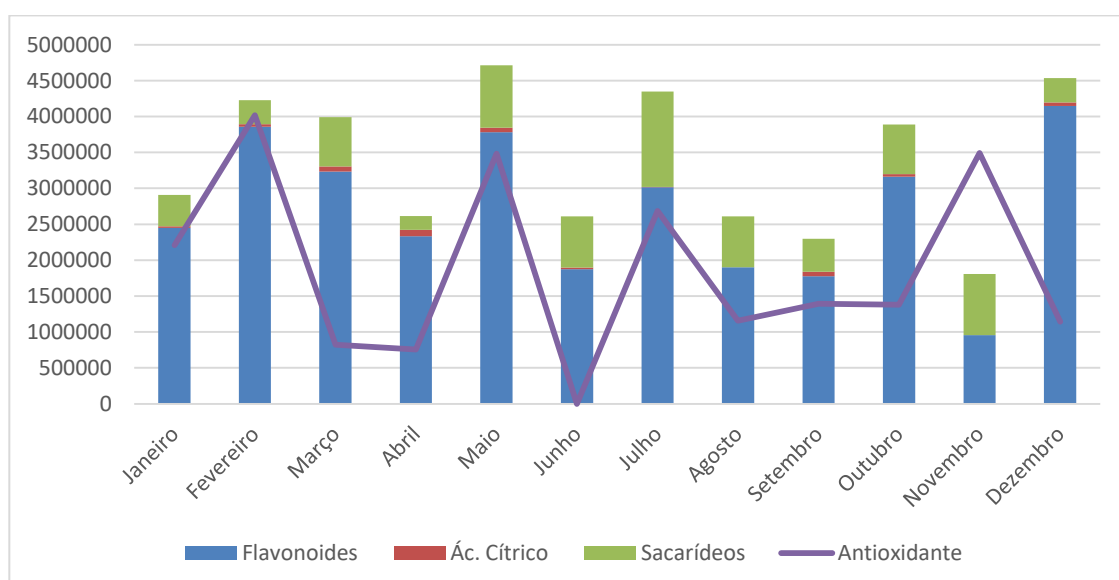


Figura 41: Comparação entre as classes de metabólitos e a atividade antioxidante da variedade Golden.

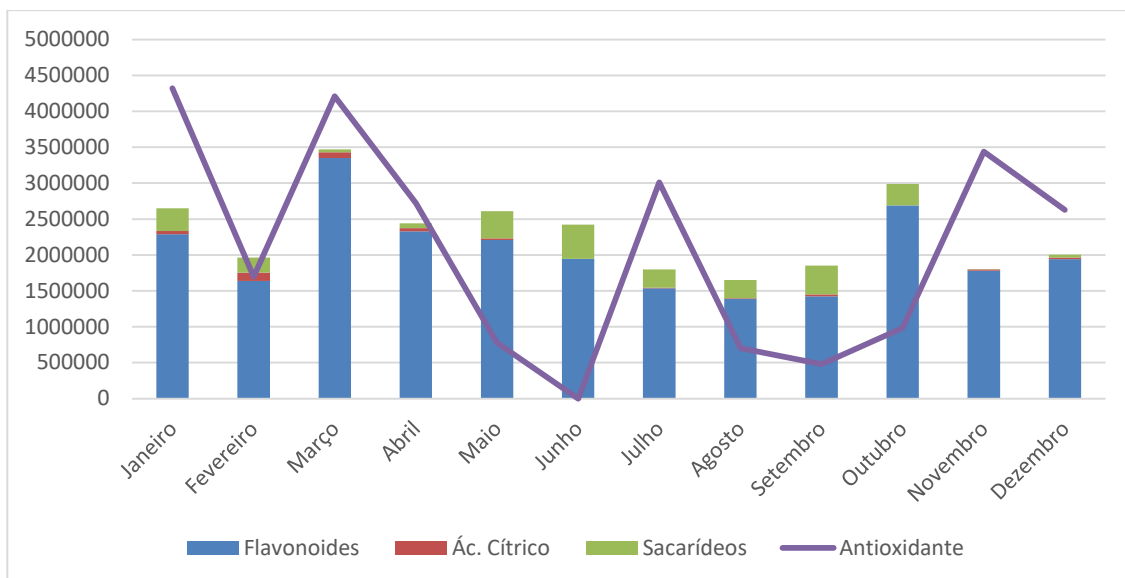


Figura 42: Comparação entre as classes de metabólitos e a atividade antioxidante da variedade Orejona.

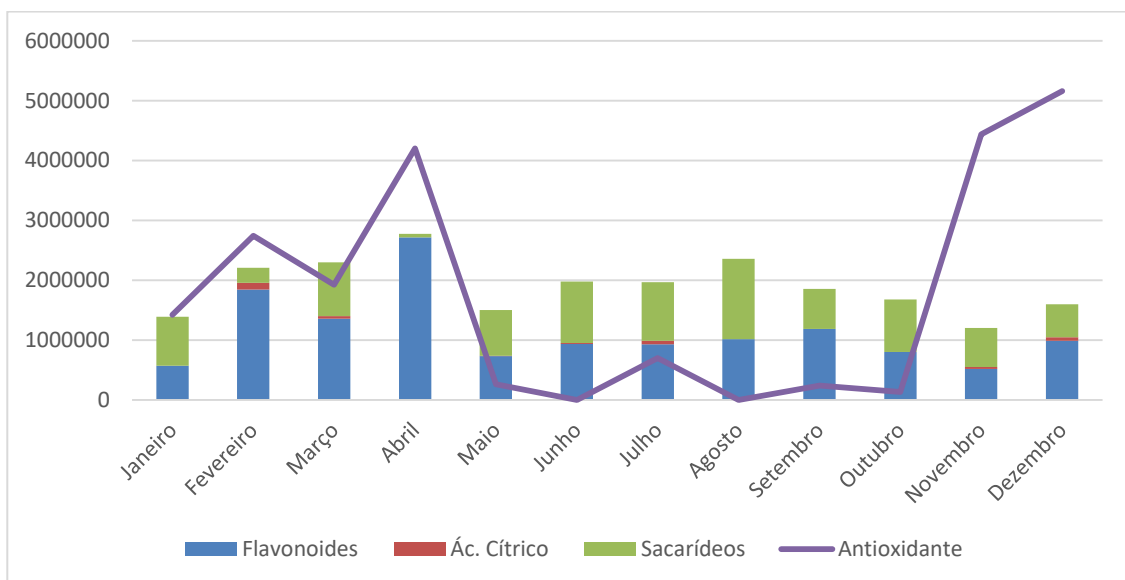


Figura 43: Comparação entre as classes de metabólitos e a atividade antioxidante da variedade Pink.

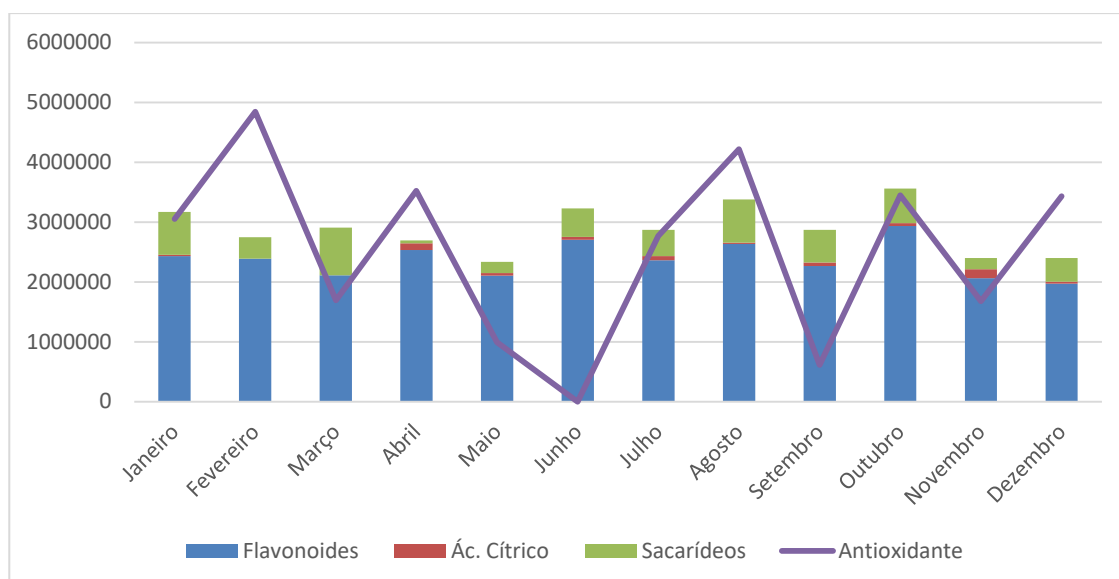


Figura 44: Comparação entre as classes de metabólitos e a atividade antioxidante da variedade Purple Haze.

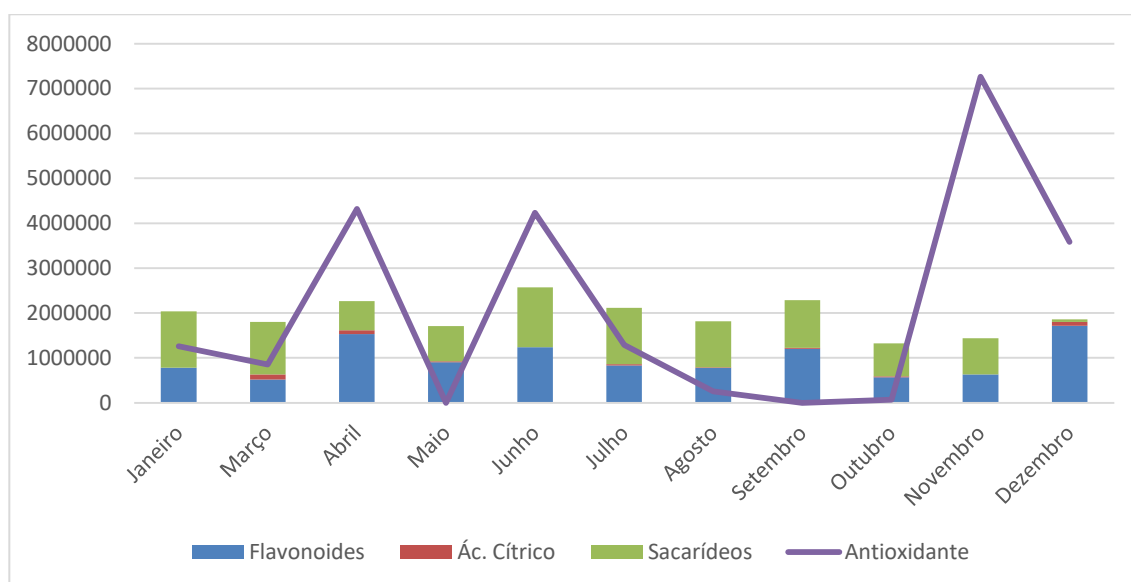


Figura 45: Comparação entre as classes de metabólitos e a atividade antioxidante de Thick King.

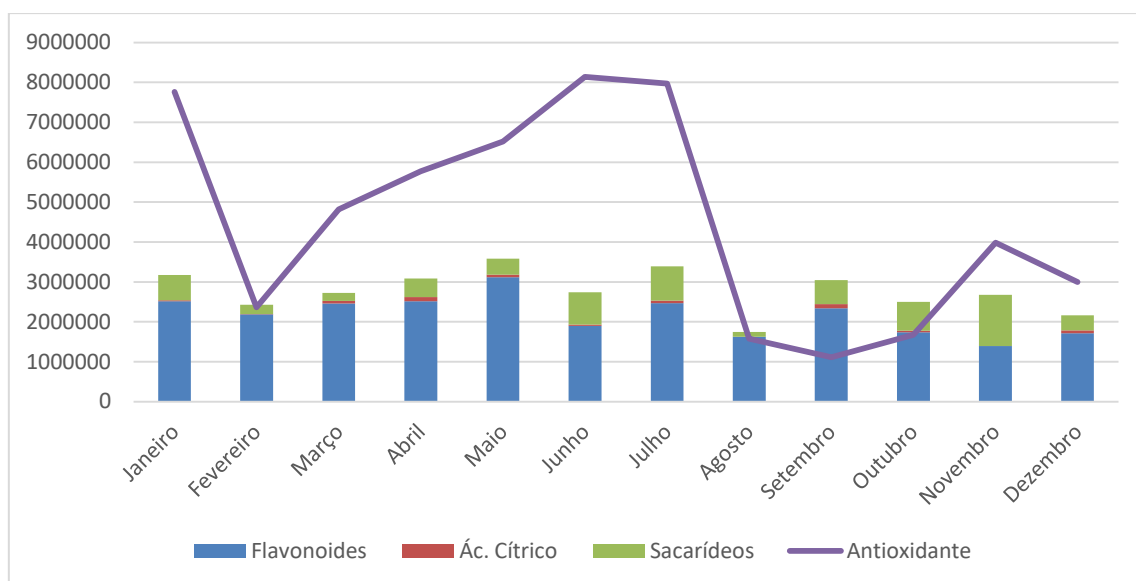


Figura 46: Comparação entre as classes de metabólitos e a atividade antioxidante de Zamorano.

A análise de componentes principais (PCA) não indicou nenhuma tendência na distribuição química em American Beauty ao longo do ano (Fig. 47), mesmo novembro apresentando elevada capacidade antioxidante. Isso indica que a atividade antioxidante referente ao mês de novembro está provavelmente ligada a uma única ou um pequeno conjunto de substâncias presentes em maior teor neste mês do que nos demais.

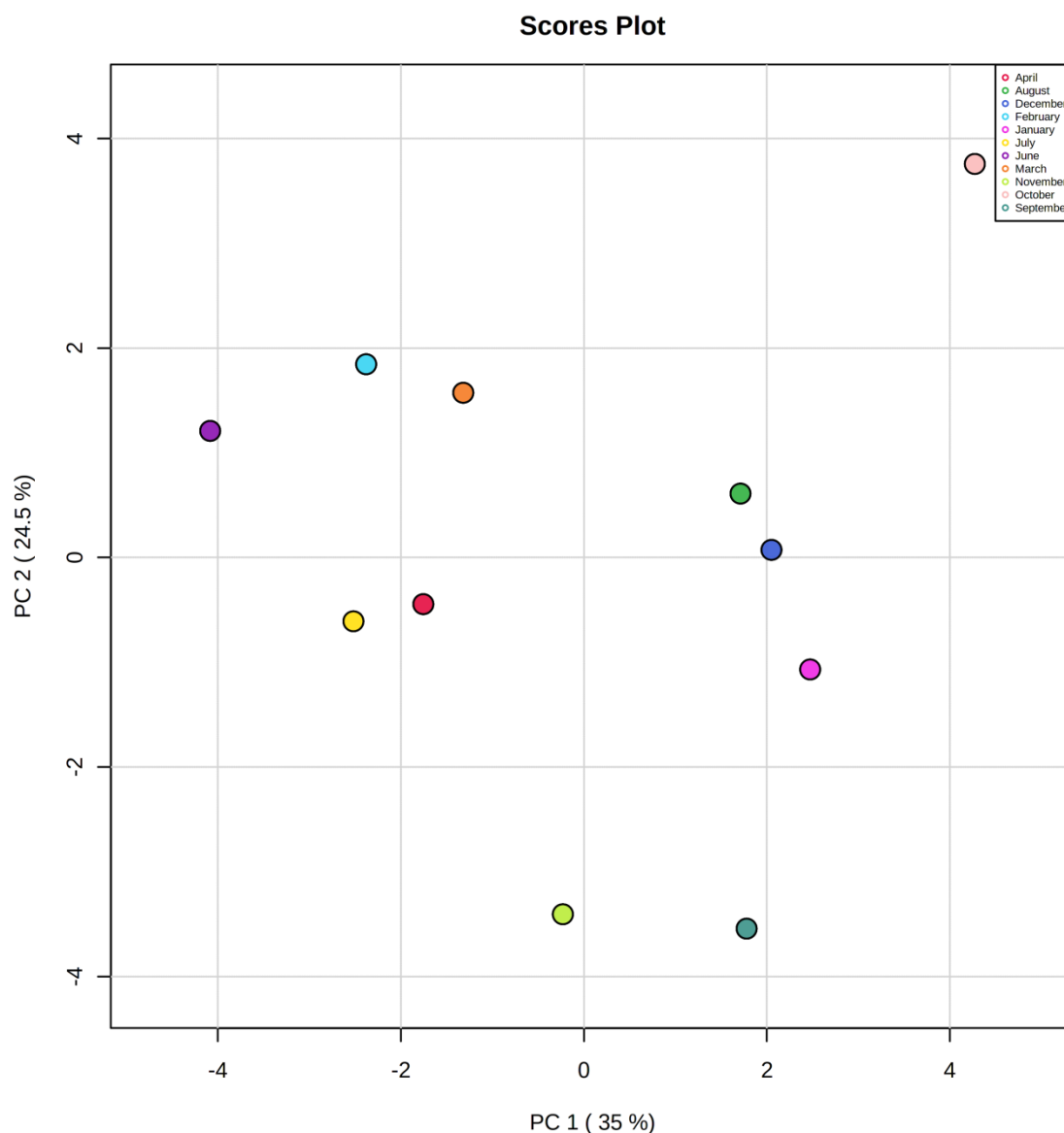


Figura 47: Gráfico de dispersão gerado com dos dados metabólicos anuais de American Beauty

Na variedade Branca ocorre variação da atividade antioxidante ao longo do ano (Fig. 32). No entanto, há coincidência entre os meses com os maiores teores flavonoides e os de maior atividade antioxidante (janeiro e dezembro). A PCA em Branca (Fig. 48) evidenciou diferenças químicas em janeiro, dado que esse mês se distanciou dos demais no gráfico de distribuição. Esse distanciamento na distribuição ocorreu devido aos dados utilizados para a elaboração do Componente 1 (eixo x) e, portanto, um conjunto de substâncias é responsável pelas características de janeiro, consequentemente, a atividade antioxidante promissora deve estar ligada a esse conjunto.

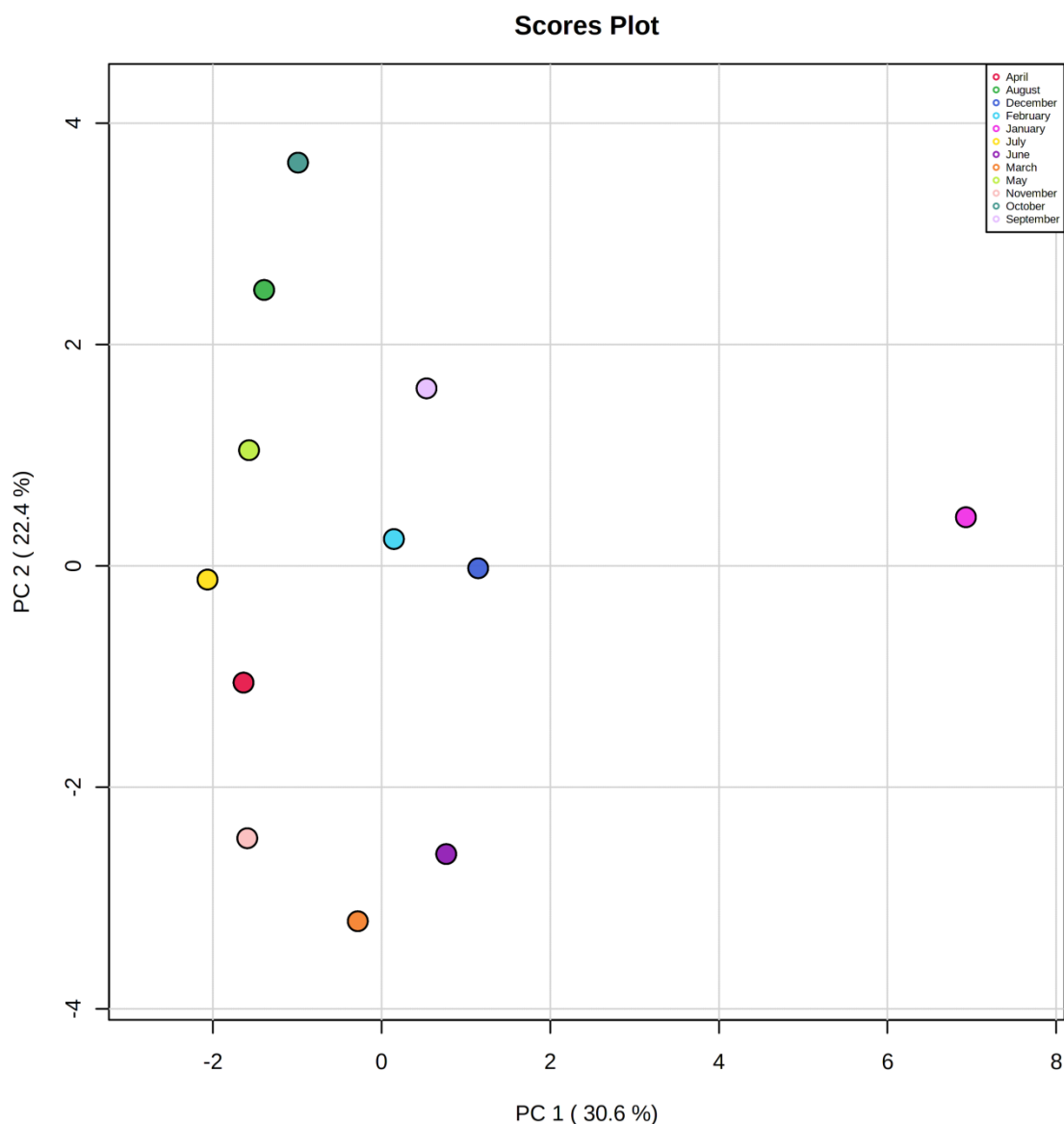


Figura 48: Gráfico de dispersão gerado com dos dados metabólicos anuais de Branca

A variedade Desert King apresentou correlação positiva entre a atividade antioxidante e o teor de flavonoides apenas em outubro (Fig. 40), mas não nos demais meses do ano. A PCA (Fig. 49) destacou outubro com maior diferença química dos demais meses, essa diferença ocorreu principalmente no Componente 1 (eixo x), que evidencia que essa diferença se deve a um conjunto de substâncias e não apenas uma e, conseqüentemente, a atividade antioxidante provavelmente está ligada a esse conjunto.

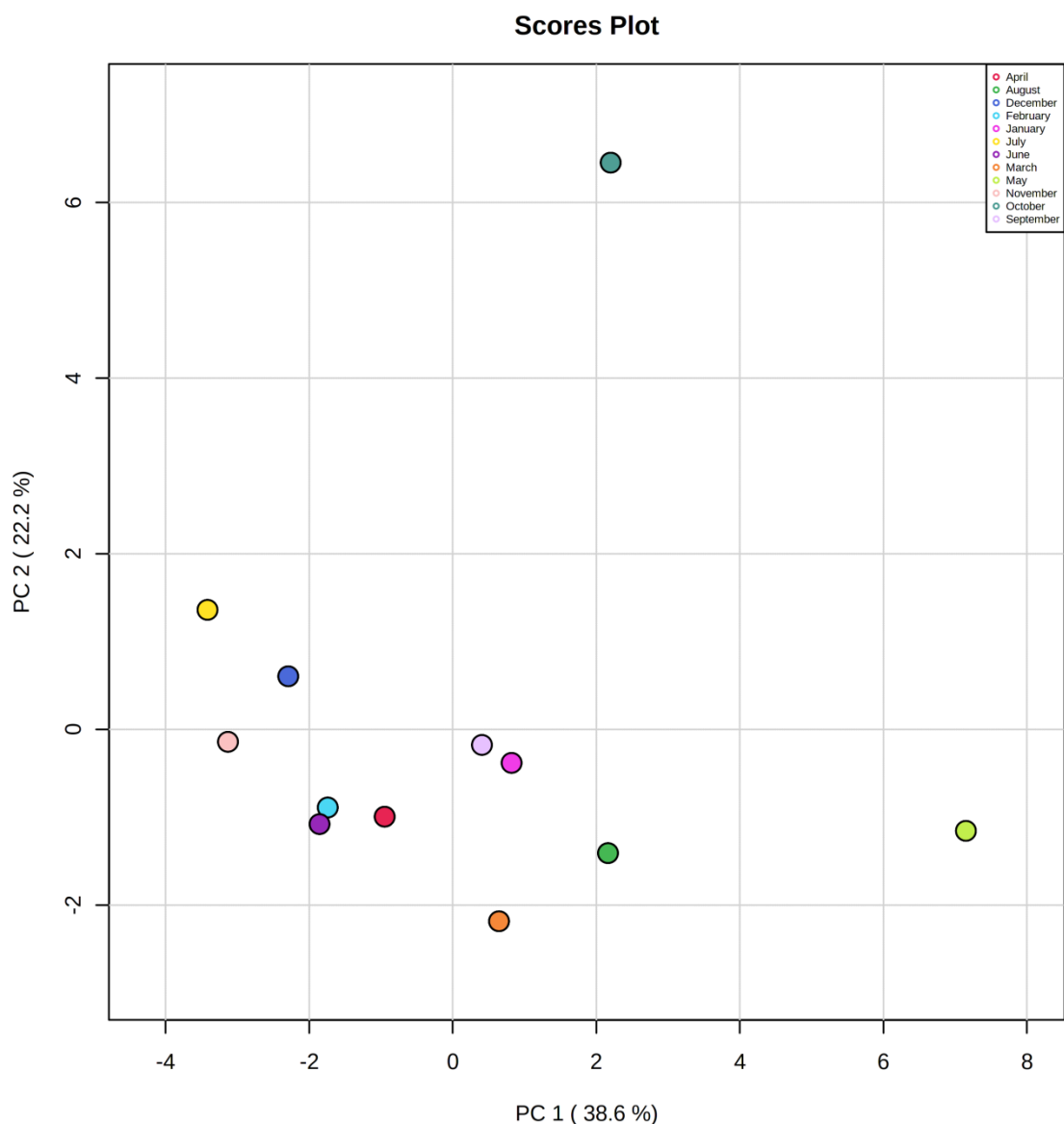


Figura 49: Gráfico de dispersão gerado com dos dados metabólicos anuais de Desert King

A atividade antioxidante na variedade Thick King foi baixa. Entretanto, em novembro apresentou uma das atividades mais alta dentre todas as variedades. Também observou-se que ao longo de todo o ano o teor de sacarídeos é alto, comparável em muitos meses com a dos flavonoides (Fig. 45), o que também deve ser levado em conta numa formulação farmacêutica. A PCA (Fig.50) destacou Outubro e Novembro dos demais meses. O destaque de outubro está correlacionado ao Componente 2 (eixo y), enquanto novembro está correlacionado ao Componente 1 (eixo x), isso indica que o conjunto de substâncias responsável pela atividade antioxidante é o formado pelo Componente 1, enquanto o conjunto de substâncias composto pelo Componente 2 não promove atividade.

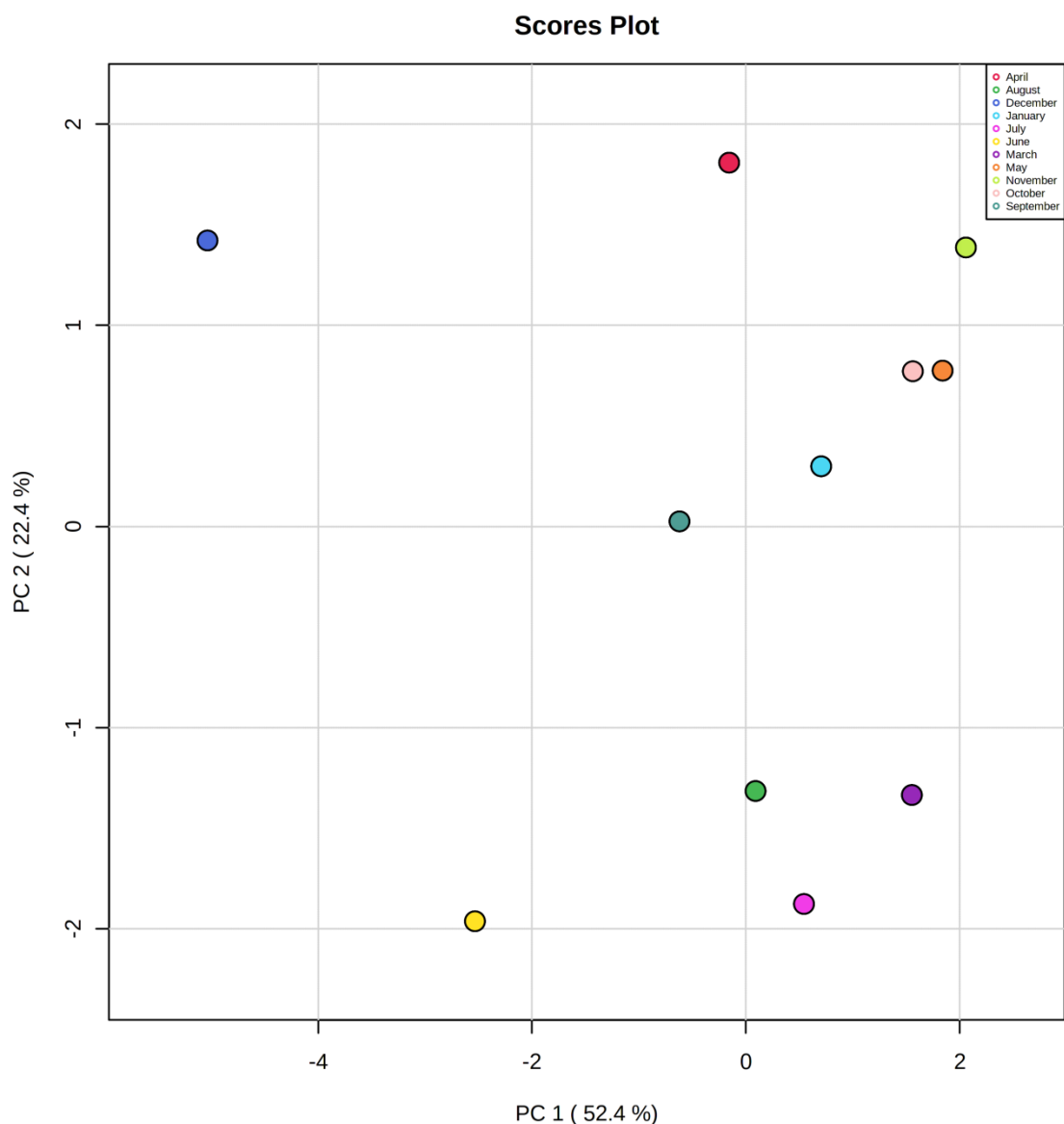


Figura 50: Gráfico de dispersão gerado com dos dados metabólicos anuais de Thick King

Na variedade Zamorano, ainda que o teor de flavonoides totais não apresente expressiva alteração ao longo do ano (Fig. 46), a atividade antioxidante mostra ampla variação. Todas essas variações podem ser problemáticas no caso da elaboração de um fitopreparado, pois o controle de qualidade tornar-se-ia bastante complexo. A análise de PCA (Fig. 51) apontou ampla dispersão das amostras, isso indica que a atividade antioxidante observada em alguns meses não está correlacionada a um conjunto de substâncias e sim por uma única ou algumas substâncias .

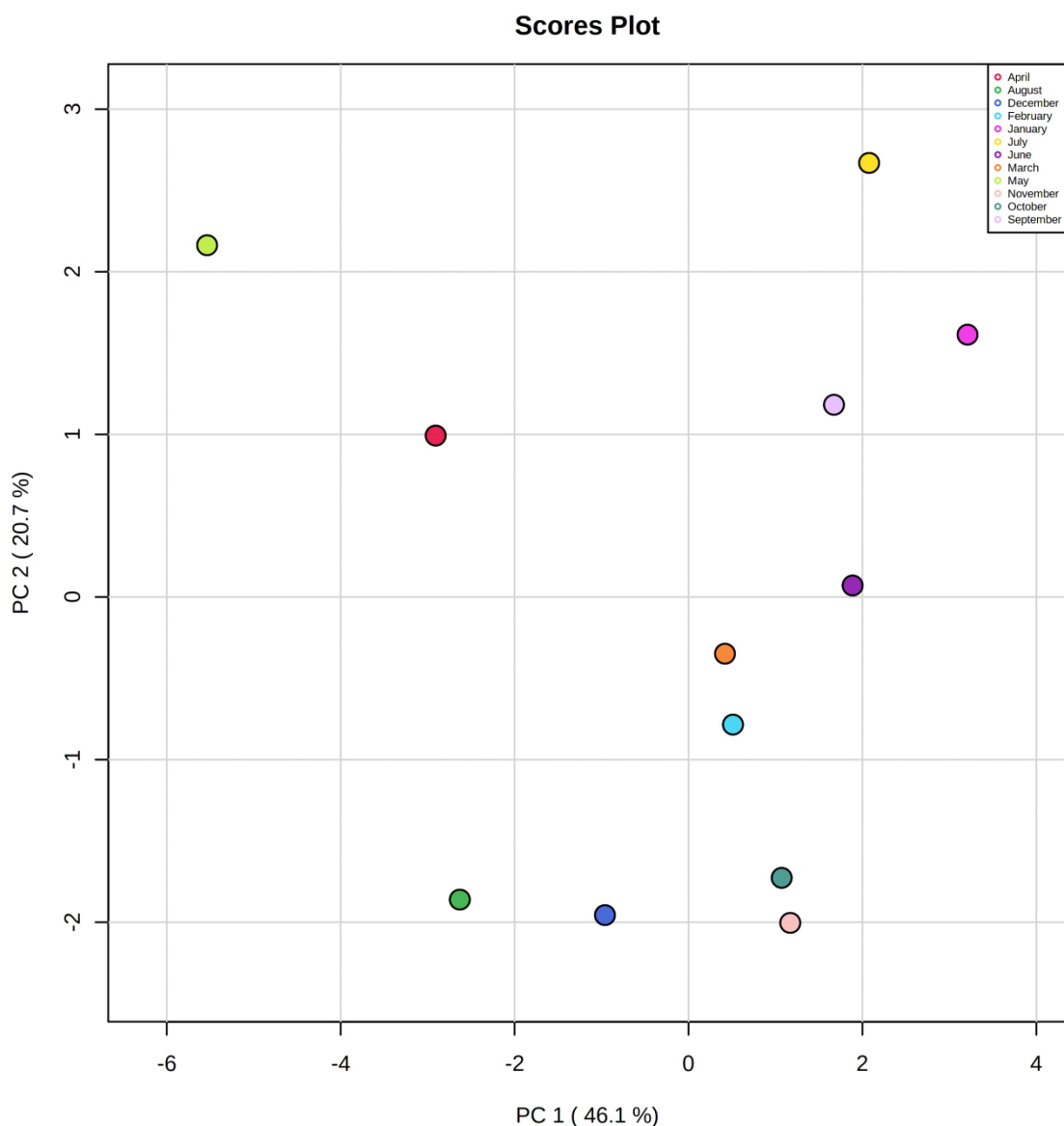


Figura 51: Gráfico de dispersão gerado com dos dados metabólicos anuais de Zamorano

A atividade antioxidante pode ser influenciada não apenas pelo teor dos flavonoides totais, mas também pelo de outras moléculas detectadas nos extratos das pitayas, como o ácido cítrico, que possui expressiva atividade antioxidante e é muito utilizado como conservante alimentício (XIA *et al.* 2022). Além disso, apesar de que os sacarídeos não apresentam atividade antioxidante, ele a altera indiretamente no teste do DPPH, pois ele interfere na massa total de extrato que está sendo ensaiada, que é a soma de todas as moléculas presentes no extrato. Dessa forma, a massa de flavonoides seria proporcionalmente menor nas variedades mais ricas em sacarídeos. De acordo Bujor *et al.* (2018), extratos de *Vaccinium vitis-idaea* que possuem alto teor de açúcares apresentaram menor atividade antioxidante quando comparados aos extratos que possuem menor teor de

açúcares.

Outro fator de relevância na atividade antioxidante apresentada por flavonoides são as estruturas destes. De acordo com Zheng *et al.* (2010), a atividade antioxidante dos flavonoides está associada ao grupo catecólico e à posição e substituição das hidroxilas: quanto maior a presença de hidroxilas formando grupos catecólicos, maior será a atividade apresentada. Os autores ainda demonstram que metilações reduzem consideravelmente a atividade antioxidante, enquanto as glicosilações dependendo da posição e do nível de glicosilação podem ou não afetar a atividade antioxidante. Por isso, dado que as moléculas presentes nos extratos de *Selenicereus* apresentam essas duas características (metilação dos grupos catecólicos e alta glicosilação), será necessário aprofundar o estudo para melhor entender os mecanismos da atividade antioxidante.

4.4 Avaliação da atividade antiproliferativa em células de câncer de colo uterino (HeLa)

Para investigar a atividade antiproliferativa, selecionamos apenas os cinco extratos com maior atividade antioxidante, dentre todas as variedades e meses ensaiados. Assim, realizamos experimentos com os extratos American Beauty 11 Branca 01 Desert King 10 Thick King 11 e Zamorano 06.

Dentre os cinco extratos analisados, apenas Zamorano 06 apresentou atividade significativa, com EC₅₀ de 278 µg/mL (Tabela 4). Esse resultado demonstra, mais uma vez, que diferentes variedades podem promover diferentes atividades biológicas, ressaltando que, em estudos com pitayas, é imprescindível que sejam identificadas as variedades que estão sendo utilizadas, e não apenas a espécie.

Ainda, observa-se maior potencial antiproliferativo do caule quando comparado ao fruto. Estudos que avaliaram a atividade antiproliferativa de extratos do fruto de pitayas frente a células HeLa observaram baixo potencial quando foram utilizadas concentrações de até 4 mg/mL, obtendo inibições abaixo de 50% (PUTTHAWAN *et al.*, 2021). Outros autores reportaram EC₅₀ variando entre 621 a 3523 µg/mL (KIM *et al.*, 2011), e outros ainda não observaram atividade

antiproliferativa (HENDRA *et al.*, 2021). Paško e colaboradores (2021) verificaram que o teor total de flavonoides em frutos de pitaya não apresenta correlação com a atividade antiproliferativa, o que corrobora com nossos resultados, visto que o extrato Desert King 10 apresentou maior teor de flavonoides, mas não promoveu atividade antiproliferativa. Isso indica que, provavelmente, a atividade de Zamorano 06 está relacionada a uma ou algumas substâncias que estão presentes somente ou em maior quantidade nesse extrato. Diferenças na atividade antiproliferativa promovida por flavonoides de uma mesma espécie também foram observadas em *Hypericum elodeoides*, em que foram avaliados dez flavonoides isolados frente a células HeLa e apenas três apresentaram citotoxicidade acima de 50% na concentração de 50 μ M (QIU *et al.*, 2019).

Comparado a outros extratos vegetais, Zamorano 06 demonstrou potencial antiproliferativo relativamente alto. Silva-Mares e colaboradores (2018) conduziram uma triagem com oito plantas nativas do México em busca de extratos com potencial antiproliferativo contra células HeLa e observaram o menor EC₅₀ de 189 μ g/mL para *Salvia balloriflora* seguida pelo EC₅₀ de 837 μ g/mL para *Juglans mollis*. Outro estudo avaliou o extrato metanólico de *Rosa damascena* e encontrou o EC₅₀ de 198 μ g/mL (AL-QAIL *et al.*, 2021). Ainda, foi avaliado a citotoxicidade em células HeLa promovida pelo extrato de folhas de *Chlorophytum comosum* observando EC₅₀ de 120 μ g/mL. Comparativamente a outros cactos, Zamorano 06 apresentou elevado potencial antiproliferativo contra células HeLa, tendo em vista que *Opuntia monacantha*, um dos cactos mais estudados farmacologicamente e que apresenta diversas atividades biológicas, não atingiu a inibição de 50% nem nas concentrações mais altas testadas (400 μ g/mL) (Abid *et al.*, 2020).

Tabela 4: Atividade antiproliferativa dos cinco extratos selecionados de *Selenicereus*

Extratos	American Beauty 11	Branca 01	Desert King 10	Thick King 11	Zamorano 06
EC ₅₀	>400 μ g/mL	>400 μ g/mL	>400 μ g/mL	>400 μ g/mL	278 μ g/mL

4.5 Avaliação genotoxicidade por ensaio de Cometa

Os cinco extratos que apresentaram maior atividade antioxidante foram ensaiados com relação à genotoxicidade, tendo em vista que seriam, em princípio, os mais adequados para formulações farmacêuticas. Em nenhum dos cinco extratos testados foi observada genotoxicidade (Fig. 52). Esse resultado sugere que extratos brutos de pitaya são seguros para a formulação de preparações farmacêuticas. A ausência de genotoxicidade e a presença de atividade antiproliferativa são características importantes na busca por extratos vegetais para tratamento de carcinomas. Ahmadi e colaboradores (2021) observaram efeitos citotóxico e genotóxico do extrato etanólico de *Ziziphora clinopodioides*, concluindo que o extrato possui potencial para tratamento de linfócitos, mas que é necessário avaliar o custo-benefício de utilizar esse extrato. Outro estudo buscou avaliar a segurança de plantas etíopes medicinais, e observou o efeito genotóxico do extrato de *Pterolobium stellatum*, indicando a necessidade de estudos que avaliem a segurança de extratos vegetais (KAHALIW *et al.*, 2018).

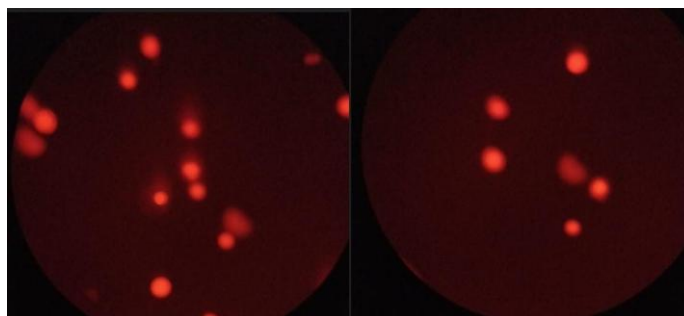


Figura 52: Exemplo demonstrado a ausência de cauda no DNA das células, ou seja, ausência de genotoxicidade dos extratos testados de *Selenicereus*

4.6 Toxicidade aguda em zebrafish de variedades selecionadas de *Selenicereus*

Os resultados apresentados até o momento resultaram na seleção de cinco amostras para os estudos *in vivo*: American Beauty (novembro), Branca (janeiro), Thick King (novembro), Desert King (outubro) e Zamorano (junho). Essas amostras foram selecionadas principalmente com base na atividade antioxidante apresentada por elas (acima de 70%), e também por apresentarem perfis químicos distintos, seja por tipos de flavonoides (Q, K, IR, DQ), níveis de glicosilação (monossacarídeos, dissacarídeos, etc) ou como é constituída a cadeia sacarídica (Ex: Hex-dHex-Hex-Pent ou Hex-Hex-dHex-Pent). Nota-se que os níveis de glicosilação e os tipos de sacarídeos que estão ligados à aglicona são de extrema importância em estudos *in*

vivo, visto que a absorção intestinal depende diretamente da posição, do tipo e do número de sacarídeos que se ligam à aglicona (MANACH; DONAVA, 2004).

Dentre as cinco amostras testadas, nenhuma apresentou toxicidade aguda em adultos de *Danio rerio*, sugerindo que o uso desses extratos como fonte de moléculas bioativas para elaboração de fitoterápicos é seguro. Esses resultados corroboram com estudos que avaliaram a toxicidade de extratos ricos com flavonoides em adultos de *Danio rerio* e não foi observada letalidade nas dose testadas (5mg/mL e 10mg/mL) (DA SILVA *et. al.*, 2021; BATISTA *et. al.*, 2018), inclusive em concentrações mais altas que neste trabalho. Ademais, nossos resultados demonstram que os extrato dos caule de pitaya não apresentam toxicidade, assim como o extrato do fruto (LIRA *et. al.*, 2020), representando uma alternativa como fonte moléculas bioativas com potencial antioxidante e antiproliferativo.

4.7 Desreplicação de flavonoides bioativos e variedades com potencial antiproliferativo

Foram analisados os dados metabólicos dos flavonoides presentes nas cinco amostras utilizadas no ensaio antiproliferativo frente a células HeLa para comparação. A partir da rede metabolômica gerada (Fig. 53), foram selecionadas substâncias que estão presentes e também proporcionalmente em maior quantidade em Zamorano 06, visto que esta amostra foi a única que apresentou atividade antiproliferativa e, portanto, substâncias que promovem essa atividade devem ocorrer de unicamente ou em maior quantidade nessa amostra. Essas análises conduziram aos flavonoides **(29)** dihidroquercetina (m/z 303), **(28)** isorhamnetina-3-O-glicosídeo (m/z 479), **(27)** quercetina-3-O-glicosídeo (m/z 463) e **(18)** isorhamnetina 3-(4Rha-galactosilrobinobiosídeo) (m/z 785).

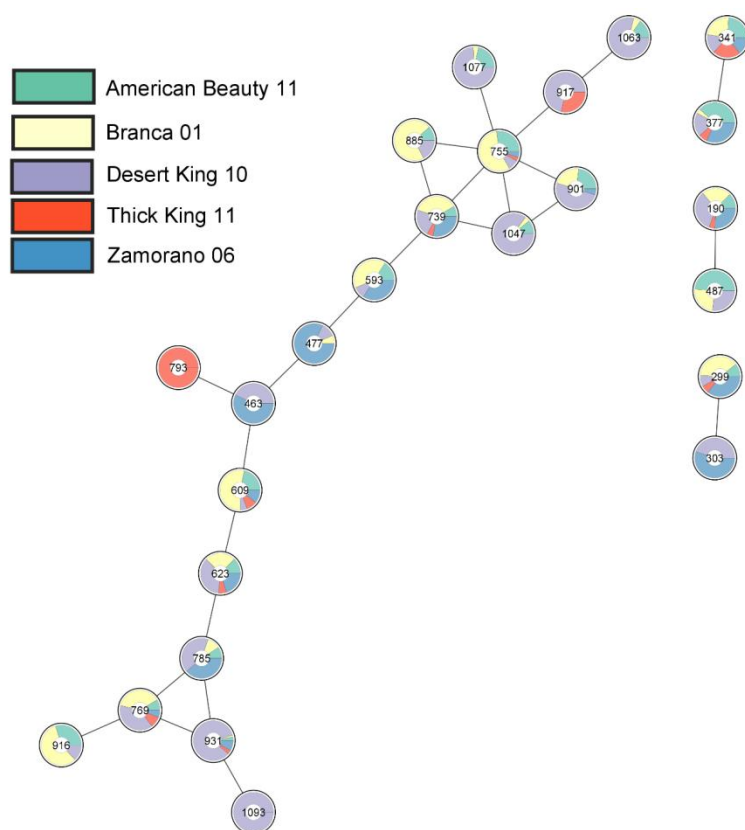


Figura 54: Rede metabólica comparando os cinco extratos avaliados quanto a suas atividades antiproliferativas de *Selenicereus*

Tendo em vista que realizamos ensaios de atividade antiproliferativa apenas com cinco extratos selecionados de pitaya, e que foi possível determinar as substâncias eventualmente responsáveis por essa atividade, a próxima etapa deste trabalho consistiu no caminho inverso, ou seja, verificar quais extratos de pitaya possuem essas substâncias, com potencial atividade antiproliferativa. Para isso, construímos um dendograma dos extratos de todas as variedades de pitaya, utilizando apenas os dados metabólicos dessas quatro substâncias (Fig. 55). A partir dessa análise, pudemos observar que as amostras Desert King 07, Desert King 09, Desert King 11, Zamorano 01, Zamorano 07, Zamorano 09, Colombiana 01, Colombiana 12 e Orejona 03 localizam-se no mesmo *cluster* que Zamorano 06, o que indica que essas amostras possivelmente também apresentam atividade antiproliferativa contra células HeLa. Esse procedimento visa diminuir o número de experimentos necessários, quando se dispõe de um grande número de amostras, como no caso deste trabalho.

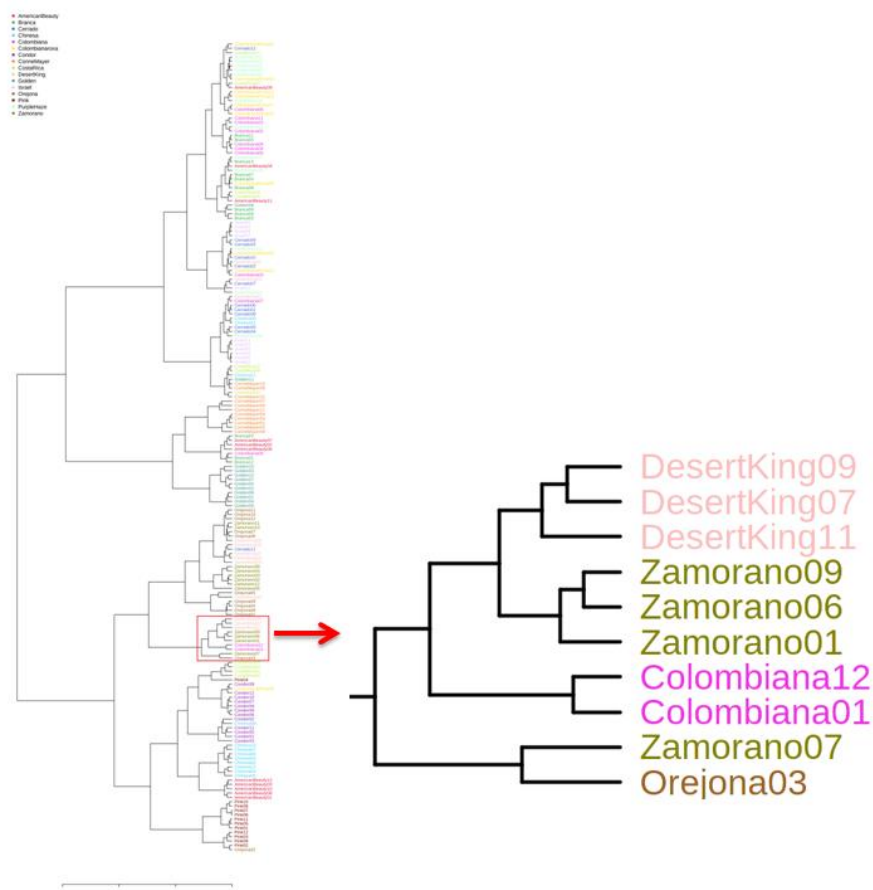


Figura 55: Dendrograma gerado dos dados metabolômicos anuais de todas as variedades, ressaltando o *cluster* em que está presente o extrato Zamorano 06

De acordo com Chen e colaboradores (2018), a taxifolina é uma diidroquercetina que apresenta atividade anticâncer *in vitro* contra diversas linhagens de carcinoma, agindo em diversos mecanismo de oncogênese, tais como aumentando a parada mitótica e apoptose, inibição de proteínas denominadas chaperonas, inibição da glicoproteína-p e reversão de linhagens cancerígenas resistentes a drogas. Rokaitytė e colaboradores (2018) avaliaram a atividade antiproliferativa da taxifolina, e observaram que a viabilidade das células HeLa apresentou correlação inversamente proporcional à concentração de taxifolina.

No que diz respeito à quercetina-3-O-glicosídeo, You e colaboradores (2010) investigaram a atividade antiproliferativa dessa substância frente às linhagens de células cancerígenas HT-29, HCT 116, Caco-2, MCF-7, HepG2, e A549, encontrando efeitos mais promissores que a quercetina e a rutina, dois dos flavonoides encontrados mais comumente em plantas. Ainda no mesmo estudo, foi observado que a quercetina-3-O-glicosídeo é mais facilmente absorvida que a quercetina e a rutina, aumentando sua biodisponibilidade.

Em relação à isorhamnetina-3-O-glicosídeo, há poucos estudos. Entretanto, um estudo conduzido por Salem e colaboradores (2011) comparou a atividade antiproliferativa dessa substância com demais flavonoides como quercetina, rutina e quercetina-3-O-glicosídeo, encontrando atividade mais elevada da primeira.

As atividades presentes na literatura apresentadas pelas substâncias selecionadas corroboram com nossos resultados provenientes da desreplicação, sugerindo que de fato essas substâncias são as responsáveis por promover a atividade antiproliferativa contra células HeLa apresentada pela amostra Zamorano 06.

5. CONCLUSÕES

Nossos resultados mostraram que o extrato metanólico de *Selenicereus* é constituído essencialmente por flavonoides derivados de Kaempferol, Quercetina e Isorhamnetina, podendo apresentar de uma a seis unidades glicosídicas. Entretanto, observamos que esse gênero possui espécies que apresentam perfil químico distinto das demais, como é o caso de *S. spinulosus* (Green Night). Isso pode ser um indício de que há necessidade de estudos multidisciplinares que envolvam diversas abordagens para a classificação taxonômica correta desse gênero. Do ponto de vista farmacológico, essa diferença observada pode implicar em um problema de segurança e eficácia na produção de fitoterápicos. As demais variedades de pitayas apresentaram diversas variações decorrentes da sazonalidade que, apesar de dificultar o controle de qualidade de um fitoterápico, não impede a produção do mesmo. Assim como ocorreram variações no panorama químico, também houve grande divergência nas atividades antioxidantes mensais de cada variedade. Entretanto, pelo menos cinco amostras promoveram a inibição de DPPH acima de 70%. Dentre as cinco amostras selecionadas, apenas Zamorano 06 promoveu atividade antiproliferativa e apresentou EC_{50} de 278 $\mu\text{g/mL}$. As amostras selecionadas não apresentaram genotoxicidade em nenhuma concentração testada e também não toxicidade aguda em peixes da espécie *Danio rerio*, sendo uma característica importante para um futuro fitoterápico. Através da desreplicação, sugerimos que a atividade apresentada por Zamorano 06 está relacionada às substâncias dihidroquercetina, isorhamnetina-3-O-glicosídeo, quercetina-3-O-glicosídeo e isorhamnetina 3-(4Rha-galactosilrobinobiosídeo) e também sugerimos que as amostras Desert King 07, Desert King 09, Desert King 11, Zamorano 01,

Zamorano 07, Zamorano 09, Colombiana 01, Colombiana 12 e Orejona 03 possam apresentar atividade antiproliferativa, pois estão no mesmo *cluster* que Zamorano 06.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABID, Farah et al. Anti-proliferative and apoptosis-inducing activity of Acacia Modesta and Opuntia Monocantha extracts on HeLa cells. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention: APJCP**, v. 21, n. 10, p. 3125, 2020.

ACQUAVIA, Maria Assunta et al. Analytical methods for extraction and identification of primary and secondary metabolites of apple (Malus domestica) fruits: A review. **Separations**, v. 8, n. 7, p. 91, 2021.

ADNAN, Liana; OSMAN, Azizah; ABDUL HAMID, Azizah. Antioxidant activity of different extracts of red pitaya (Hylocereus polyrhizus) seed. **International Journal of Food Properties**, v. 14, n. 6, p. 1171-1181, 2011.

AHMADI, Asal et al. Phytochemical composition and in vitro safety evaluation of Ziziphora clinopodioides Lam. ethanolic extract: Cytotoxicity, genotoxicity and mutagenicity assessment. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 266, p. 113428, 2021.

AL-OQAIL, Mai M. et al. Oxidative stress mediated cytotoxicity, cell cycle arrest, and apoptosis induced by Rosa damascena in human cervical cancer HeLa cells. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2021, p. 1-11, 2021.

ALSOHAILI, Sohail. Seasonal variation in the chemical composition and antimicrobial activity of essential oil extracted from Achillea fragrantissima grown in northern-eastern Jordanian desert. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v. 21, n. 1, p. 139-145, 2018.

ANDERSON, Edward F. **The cactus family**. Timber Press (OR), 2001.

BARTHLOTT, Wilhelm et al. **Seed-diversity in the Cactaceae**. D. Hunt, 2000.

BATISTA, Francisco Lucas A. et al. Antinociceptive activity of ethanolic extract of *Azadirachta indica* A. Juss (Neem, Meliaceae) fruit through opioid, glutamatergic and acid-sensitive ion pathways in adult zebrafish (*Danio rerio*). **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 108, p. 408-416, 2018.

BAUER, Ralf. **A synopsis of the tribe Hylocereeae F. Buxb.** Hunt, 2003.

BENZING, David H. **Vascular epiphytes: general biology and related biota.** Cambridge University Press, 2008.

BUJOR, Oana-Crina et al. Phenolic compounds and antioxidant activity of lingonberry (*Vaccinium vitis-idaea* L.) leaf, stem and fruit at different harvest periods. **Food chemistry**, v. 252, p. 356-365, 2018.

CHAGAS, E.A. et al. Pitaya. In: Pasqual; M.; Chagas, E.A. (Org.). **Cultura de Tecidos em Espécies Frutíferas.** 1.ed. Boa Vista: 2014, cap.3, p.237

CHEN, Hsiu-Ju et al. Taxifolin resensitizes multidrug resistance cancer cells via uncompetitive inhibition of P-glycoprotein function. **Molecules**, v. 23, n. 12, p. 3055, 2018.

CRANE, Jonathan H.; BALERDI, Carlos F. Preparation for and recovery from hurricanes and windstorms for tropical fruit trees in the South Florida home landscape. In: **Proceedings of the Florida State Horticultural Society.** 2006. p. 45-49.

DUTRA, Rafael C. et al. Medicinal plants in Brazil: Pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. **Pharmacological research**, v. 112, p. 4-29, 2016.

EKA, Y. P.; Hendarto, H. Widjiati. Effect of *Selenicereus polyrhizus* rind extract toward interleukin-1b, vascular endothelial growth factor expression, endometriosis implant area. **International Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, v. 9, p. 617–62, 2017.

HENDRA, Rudi et al. Cytotoxicity and antiplasmodial properties of different hylocereus polyrhizus peel extracts. **Medical Science Monitor Basic Research**, v. 27, p. e931118-1, 2021.

HUSSAIN, Mubasher et al. Role of saponins in plant defense against specialist herbivores. **Molecules**, v. 24, n. 11, p. 2067, 2019.

IBRAHIM, Sabrin Ragab Mohamed et al. Genus Hylocereus: Beneficial phytochemicals, nutritional importance, and biological relevance—A review. **Journal of Food Biochemistry**, v. 42, n. 2, p. e12491, 2018.

JACOBSON, Nicholas C.; BHATTACHARYA, Sukanya. Digital biomarkers of anxiety disorder symptom changes: Personalized deep learning models using smartphone sensors accurately predict anxiety symptoms from ecological momentary assessments. **Behaviour Research and Therapy**, v. 149, p. 104013, 2022.

KAHALIW, Wubayehu; HELLMAN, Bjorn; ENGIDAWORK, Ephrem. Genotoxicity study of Ethiopian medicinal plant extracts on HepG2 cells. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 18, n. 1, p. 1-8, 2018.

KIM, Hyoenji et al. Comparative antioxidant and antiproliferative activities of red and white pitayas and their correlation with flavonoid and polyphenol content. **Journal of food science**, v. 76, n. 1, p. C38-C45, 2011.

KOROTKOVA, Nadja et al. A phylogenetic framework for the Hylocereeae (Cactaceae) and implications for the circumscription of the genera. **Phytotaxa**, v. 327, n. 1, p. 1-46, 2017.

LIRA, Sandra Machado et al. Metabolic profile of pitaya (Hylocereus polyrhizus (FAC Weber) Britton & Rose) by UPLC-QTOF-MSE and assessment of its toxicity and anxiolytic-like effect in adult zebrafish. **Food Research International**, v. 127, p. 108701, 2020.

LU, Yanxin; LIU, Yang; YANG, Chunzhang. Evaluating in vitro DNA damage using comet assay. **JoVE (Journal of Visualized Experiments)**, n. 128, p. e56450, 2017.

LUNIĆ, Tanja M. et al. The influence of seasonality on secondary metabolite profiles and neuroprotective activities of moss *Hypnum cupressiforme* extracts: in vitro and in silico study. **Plants**, v. 11, n. 1, p. 123, 2022.

LUO, Hui et al. Chemical composition and in vitro evaluation of the cytotoxic and antioxidant activities of supercritical carbon dioxide extracts of pitaya (dragon fruit) peel. **Chemistry Central Journal**, v. 8, n. 1, p. 1-7, 2014.

MANACH, Claudine; DONOVAN, Jennifer L. Pharmacokinetics and metabolism of dietary flavonoids in humans. **Free radical research**, v. 38, n. 8, p. 771-786, 2004.

MEIADO, Marcos Vinicius. Germinação de sementes de cactos do Brasil: fotoblastismo e temperaturas cardeais. **Informativo Abrates**, v. 22, n. 5, p. 20-23, 2012.

MILADINOVIC, Bojana et al. Antispasmodic effect of blackcurrant (*Ribes nigrum* L.) juice and its potential use as functional food in gastrointestinal disorders. **Medical Principles and Practice**, v. 27, n. 2, p. 179-185, 2018.

NAEEM, Abid et al. The fate of flavonoids after oral administration: a comprehensive overview of its bioavailability. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 62, n. 22, p. 6169-6186, 2022.

NORIEGA, Felipe et al. Seasonal changes in white strawberry: Effect on aroma, phenolic compounds and its biological activity. **Journal of Berry Research**, v. 11, n. 1, p. 103-118, 2021.

NURCHOLIS, Waras et al. Total flavonoid content and antioxidant activity of ethanol and ethyl acetate extracts from accessions of *Amomum compactum* fruits. **Annals of Agricultural Sciences**, v. 66, n. 1, p. 58-62, 2021.

NURMAHANI, M. M.; Osman et al. Antibacterial property of *Selenicereus polyrhizus* and *Selenicereus undatus* peel extracts. **International Food Research Journal**, v. 19, p. 77–84, 2012.

OCAMPO, Gilberto; COLUMBUS, J. Travis. Molecular phylogenetics of suborder Cactineae (Caryophyllales), including insights into photosynthetic diversification and historical biogeography. **American Journal of Botany**, v. 97, n. 11, p. 1827-1847, 2010

OECD (ORGANIZATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT). Guideline for Testing of Chemicals: Acute Oral Toxicity–Acute Toxic Class Method. **Guideline**, p. 423-423, 2019.

OMIDIZADEH, A.; Yusof et al. Anti-diabetic activity of red pitaya (*Selenicereus polyrhizus*) fruit. **RSC Advances**, v. 4, n. 108, p. 62978–62986, 2014.

OYENIHI, A. B.; SMITH, C. Are polyphenol antioxidants at the root of medicinal plant anti-cancer success?. **Journal of ethnopharmacology**, v. 229, p. 54-72, 2019.

.

PANG, Zhiqiang et al. MetaboAnalyst 5.0: narrowing the gap between raw spectra and functional insights. **Nucleic acids research**, v. 49, n. W1, p. W388-W396, 2021.

PAŚKO, Paweł et al. Bioactivity and cytotoxicity of different species of pitaya fruits–A comparative study with advanced chemometric analysis. **Food Bioscience**, v. 40, p. 100888, 2021.

PEREZ G, R. M.; VARGAS S, R.; ORTIZ H, Y. D. Wound healing properties of *Hylocereus undatus* on diabetic rats. **Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives**, v. 19, n. 8, p. 665-668, 2005.

PETROVSKA, Biljana Bauer. Historical review of medicinal plants' usage. **Pharmacognosy reviews**, v. 6, n. 11, p. 1, 2012.

PINTAĆ, Diandra et al. Investigation of the chemical composition and biological activity of edible grapevine (*Vitis vinifera* L.) leaf varieties. **Food chemistry**, v. 286, p. 686-695, 2019.

PUTTHAWAN, Pornhathai; PROMPANYA, Burimnat; PROMNET, Suthasinee. Extraction, biological activities and stability of *Hylocereus polyrhizus* peel extract as a functional food colorant and nutraceutical. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 20, n. 8, p. 1683-1690, 2021.

QIU, Daren et al. Cytotoxic components from *hypericum elodeoides* targeting RXR α and inducing HeLa cell apoptosis through caspase-8 activation and PARP cleavage. **Journal of natural products**, v. 82, n. 5, p. 1072-1080, 2019.

REYES-VAQUERO, Lorena et al. Seasonal variation of chemical profile of *Ruta graveolens* extracts and biological activity against *Fusarium oxysporum*, *Fusarium proliferatum* and *Stemphylium vesicarium*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 95, p. 104223, 2021.

ROKAITYTĖ, Anita et al. Cytotoxicity of carnosine, taxifolin, linalool and their combinations with acids to the cells of human cervical carcinoma (HeLa). **Biologija**, v. 64, n. 4, 2018.

SADEH, Dganit et al. Interactive effects of genotype, seasonality and extraction method on chemical compositions and yield of essential oil from rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). **Industrial Crops and Products**, v. 138, p. 111419, 2019.

SAHOO, Niharika; MANCHIKANTI, Padmavati; DEY, Satyahari. Herbal drugs: standards and regulation. **Fitoterapia**, v. 81, n. 6, p. 462-471, 2010.

SILVA-MARES, David et al. Screening of north-east Mexico medicinal plants with activities against herpes simplex virus and human cancer cell line. **Natural product research**, v. 33, n. 10, p. 1531-1534, 2019.

SPINELLI, Raffaele; PICCHI, Gianni. Industrial harvesting of olive tree pruning

residue for energy biomass. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 2, p. 730-735, 2010.

STEIN, Murray B.; SAREEN, Jitender. Generalized anxiety disorder. **New England Journal of Medicine**, v. 373, n. 21, p. 2059-2068, 2015.

STEVENS, P. F. Angiosperm Phylogeny Website 2017. In: Version 14. July 2017. Disponível em: <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/welcome.html>>. Acesso em: 25 fev 19.

TSAI, Yu et al. Evaluation of the antioxidant and wound-healing properties of extracts from different parts of *Hylocereus polyrhizus*. **Agronomy**, v. 9, n. 1, p. 27, 2019.

VAN DE LOOSDRECHT, Arjan A. et al. Cell mediated cytotoxicity against U 937 cells by human monocytes and macrophages in a modified colorimetric MTT assay: A methodological study. **Journal of immunological methods**, v. 141, n. 1, p. 15-22, 1991.

WALLACE, Robert S.; GIBSON, Arthur C. Evolution and systematics. **Cacti: biology and uses. University of California Press, Berkeley**, p. 1-21, 2002.

WANG, Mingxun et al. Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking. **Nature biotechnology**, v. 34, n. 8, p. 828-837, 2016.

XIA, Wei et al. A Novel Stilbene Analogue: Antioxidant Activity and Application in Controlling the Quality and Bacterial Growth of Shrimp Refrigerated at 4°C. **Journal of Aquatic Food Product Technology**, v. 31, n. 2, p. 214-225, 2022.

YI, Yan et al. Simultaneous quantification of major flavonoids in “Bawanghua”, the edible flower of *Hylocereus undatus* using pressurised liquid extraction and high performance liquid chromatography. **Food chemistry**, v. 135, n. 2, p. 528-533, 2012.

YOU, Hyun Ju; AHN, Hyung Jin; JI, Geun Eog. Transformation of rutin to

antiproliferative quercetin-3-glucoside by *Aspergillus niger*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 20, p. 10886-10892, 2010.

ZAPPI, D.; AONA, L. Y. S.; TAYLOR, N. CACTACEAE IN: MELHEM, T. S., WANDERLEY, M. G. L., MARTIS, S. E., JUNG-MENDAÇOLI, S. L., SHEPHERD, G. J., KIRIZAWA, M. (eds.) Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo. São Paulo: Instituto de Botânica, v. 5, p. 189, 2007.

ZAR KALAI, Feten et al. Phenolic compounds and biological activities of different organs from aerial part of *Nitraria retusa* (Forssk.) Asch.: effects of solvents. **International Journal of Food Properties**, v. 25, n. 1, p. 1524-1538, 2022.

ZHENG, Cheng-Dong et al. DPPH-scavenging activities and structure-activity relationships of phenolic compounds. **Natural product communications**, v. 5, n. 11, p. 1934578X1000501112, 2010.

ZIMMERMAN, Thomas W. et al. Evaluation of 25 Pitaya Varieties in the United States Virgin Islands. **Agricultural Experiment Station**, v. 20, 2017.