

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

Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

**Estudo fitoquímico e potencial biológico de cactos
da Mata Atlântica do gênero *Rhipsalis* Gärtner
(Cactaceae)**

Renan Canute Kamikawachi

Orientador: Prof. Dr. Wagner Vilegas

Araraquara

2018

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

Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

**Estudo fitoquímico e potencial biológico de cactos
da Mata Atlântica do gênero *Rhipsalis* Gärtner
(Cactaceae)**

Renan Canute Kamikawachi

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

Orientador: Prof. Dr. Wagner Vilegas

Araraquara

2018

Ficha Catalográfica

Elaborada Por Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação Faculdade de
Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

K15e Kamikawachi, Renan Canute.
gênero Estudo fitoquímico e potencial biológico de cactos da Mata Atlântica do
Rhipsalis Gärtner (Cactaceae) / Renan Canute Kamikawachi. – Araraquara,
2019.
90 f. : il.

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

Orientador: Wagner Vilegas.

1. Espectrometria de massas. 2. Saponinas. 3. Fingerprints. 4. Anti-
inflamatória.

I. Vilegas, Wagner, orient. II. Título.

CAPES: 33004030078P6

Sumário

1. Introdução.....	1
2. Revisão da Literatura.....	6
3. Objetivo.....	10
3.1. Objetivo Geral.....	10
3.2. Objetivos Específicos.....	10
4. Material e Método.....	11
<i>Coleta.....</i>	11
<i>Secagem e moagem.....</i>	12
<i>Obtenção do extrato.....</i>	12
<i>Percolação.....</i>	13
<i>Maceração.....</i>	14
<i>Clean-up dos extratos.....</i>	14
<i>Perfil químico de Rhipsalis teres.....</i>	17
<i>Isolamento.....</i>	17
<i>Identificação.....</i>	18
<i>Panorama químico do gênero Rhipsalis.....</i>	19
<i>Análise de componentes principais (PCA).....</i>	20
<i>Avaliação das Atividades Biológicas.....</i>	21
<i>Avaliação da Atividade Antioxidante.....</i>	21
<i>Avaliação do potencial antifúngico in vitro.....</i>	22
<i><u>Determinação da concentração inibitória mínima (CIM).....</u></i>	22
<i><u>Determinação da concentração fungicida mínima (CFM).....</u></i>	23
<i><u>Identificação das atividades.....</u></i>	23

<i>Edema de orelha induzido por xilol</i>	23
5. Resultados e Discussão	24
6. Conclusão	62
Perspectivas	65
Referências	66

Lista de Figuras

Figura 1: 1. Vitexina; 2. Mescalina; 3. Pachanol I; 4. Ácido Oleanólico; 5. Gummosogenina

Figura 2: A – *Rhipsalis cereuscula*; B – *Rhipsalis clavata*; C – *Rhipsalis elliptica*; D – *Rhipsalis floccosa* ssp *floccosa*; E – *Rhipsalis floccosa* ssp *hohenauensis*; F – *Rhipsalis floccosa* ssp *pulvinigera*; G – *Rhipsalis paradoxa*; H – *Rhipsalis teres*

Figura 3: Fluxograma da extração pelo método de percolação exaustiva

Figura 4: Espectro de massas *full-scan* do extrato EtOH 70% de *R. teres*

Figura 5: Espectro de absorbância UV-Vis da substância 1

Figura 6: Espectro de absorbância UV-Vis da substância 1

Figura 7: Cromatograma da análise por *UPLC-MS* com as substâncias 1 e 2

Figura 8: padrão de fragmentação em *MSⁿ* das saponinas de *R. teres* (molécula exemplificada pelo calendulaglicosídeo C)

Figura 9: Substâncias identificadas no extrato EtOH 70% de *Rhipsalis teres*

Figura 10: Cromatograma da análise por HPLC das espécies do gênero *Rhipsalis* (λ 254 nm)

Figura 11: Cromatograma da análise por HPLC das espécies do gênero *Rhipsalis* (λ 360 nm)

Figura 12: Cromatograma da análise por HPLC das espécies do gênero *Rhipsalis* (detector ELSD)

Figura 13: Gráfico 3D da distribuição das espécies do gênero *Rhipsalis* por análise de componentes principais dos dados semi-quantitativos

Figura 14: Gráfico 3D da distribuição das espécies do gênero *Rhipsalis* por análise de componentes principais dos dados qualitativos

Figura 15: Dendrograma obtido por HCA dos dados qualitativos dos extratos MeOH das espécies do gênero *Rhipsalis*

Figura 16: Dendrograma obtido por HCA dos dados qualitativos dos extratos MeOH de *Rhipsalis* com os valores exatos da distância observada entre cada agrupamento

Figura 17: Dendrograma obtido por HCA dos dados quantitativos dos extratos MeOH de *Rhipsalis*

Figura 18: Dendrograma obtido por HCA dos dados quantitativos dos extratos MeOH de *Rhipsalis* com os valores exatos da distância observada entre cada agrupamento

Figura 19: Proposta filogenética para o gênero *Rhipsalis* com base em marcadores moleculares (Korotkova et al. 2011)

Figura 20: Cromatograma da análise por HPLC dos extratos EtOH 70% de *R. cereuscula*, *R. paradoxa* e *R. teres* (detector ELSD)

Figura 21: Cromatograma da análise por HPLC dos extratos EtOH 70% de *R. cereuscula*, *R. paradoxa* e *R. teres* (λ 254 nm)

Figura 22: Cromatograma da análise por HPLC nm dos extratos EtOH 70% de *R. cereuscula*, *R. paradoxa* e *R. teres* (λ 360 nm)

Figura 23: Curva da atividade antioxidante observada para o extrato EtOH 70% de *R. paradoxa*

Figura 24: Atividade anti-inflamatória dos extratos EtOH 70% de *Rhipsalis* spp.

Lista de Tabelas

Tabela 1: Espécies do gênero *Rhipsalis* estudadas seguidas das siglas referentes a cada espécie, voucher ou número de coletor e cadastro nº de acesso a patrimônio genético.

Tabela 2: Quantidades (g) de material vegetal fresco e úmido, volume de solventes utilizados e rendimento (%) para cada espécie de *Rhipsalis* submetida às duas extrações.

Tabela 3: Deslocamentos químicos de RMN ^{13}C da aglicona da substância 5.

Tabela 4: Deslocamentos químicos de RMN ^{13}C dos açúcares da substância 5.

Tabela 5: Substâncias sugeridas presentes em espécies do gênero *Rhipsalis*.

Tabela 6: *Fingerprint* sugerido para cada espécie do gênero *Rhipsalis* avaliada.

Tabela 7: A atividade antifúngica de extratos de *Rhipsalis* spp frente às espécies de *C. albicans*, *C. krusei*, *C. glabrata* e *C. parapsislosis*

Lista de Abreviaturas

TLC – Cromatografia em Camada Delgada

CC – Cromatografia em Coluna

MPLC – Cromatografia Líquida de Media Eficiência

HPLC-DAD-ELSD – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector de Fotodiodo e Detector de Espalhamento de Luz

HPLC-IR - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector de Índice de Refração

FIA-ESI-IT-MSⁿ - Infusão Direta com ionização por Electrospray e analisador de Íon Trap

UPLC-ESI-IT-MS - Cromatografia Líquida de ULtra Eficiência acoplada a espectrômetro de massas com ionização por Electrospray e analisador de Íon Trap

UPLC-DAD - Cromatografia Líquida de ULtra Eficiência com Detector de Fotodiodo

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

HMBC - Correlação Heteronuclear de Múltiplas Ligações

HMQC – Coerência Quântica Heteronuclear Múltipla

RCE – *Rhipsalis cereuscula* Haw.

RCL – *Rhipsalis clavata* F.A.C.Weber

RE – *Rhipsalis elliptica* G.Lindb

RFF – *Rhipsalis floccosa* subsp. *floccosa* Salm-Dyck

RFH – *Rhipsalis floccosa* subsp. *hohenauensis* Barthlott & N.P.Taylor

RFP – *Rhipsalis floccosa* subsp. *pulvinigera* Barthlott & N.P.Taylor

RP – *Rhipsalis paradoxa* Salm-Dyck

RT – *Rhipsalis teres* (Vell.) Steud

rt – tempo de retenção

Gli - Glicose

Gal - Galactose

GlcA – Ácido Glicurônico

Xil – Xilose

Resumo

Apesar dos diversos relatos do uso de *Rhipsalis* Gaërtn (Cactaceae) por populações tradicionais no tratamento de uma gama de enfermidades, há pouquíssimos estudos fitoquímicos com esse grupo de cactos e por vezes estes são superficiais, apenas indicando a possível presença de algumas classes de produtos naturais. Ademais, estudos avaliando a atividade biológica de *Rhipsalis* são escassos. Neste viés, este trabalho objetivou investigar a composição química do gênero *Rhipsalis* e avaliar possíveis atividades ligadas à sua composição, subsidiando desta forma seu uso popular. Esta dissertação foi dividida e organizada da seguinte forma: a primeira parte apresenta uma introdução geral sobre plantas medicinais e sua importância, assim como uma revisão sobre estudos fitoquímicos em Cactaceae. Em seguida, foram redigidas três seções: na primeira, investigamos a composição química de *Rhipsalis teres* (Vell.) Steud identificando 5 saponinas derivadas do ácido oleanólico, 2 flavonoides C-glicosilados derivados da apigenina e 2 ácidos fenólicos; na segunda, investigamos a composição química do gênero *Rhipsalis* identificando 28 saponinas cujo core é o ácido oleanólico e 8 flavonoides, também sugerimos *fingerprints* para cada espécie avaliada com base nas substâncias majoritárias, os resultados quantitativos obtidos por *UPLC-MS* foram eficientes na identificação das espécies com base na filogenia; na terceira, avaliamos as atividades antioxidante, antifúngica e anti-inflamatória de espécies de *Rhipsalis* destacando-se como espécies mais promissoras a *R. paradoxa* no ensaio antioxidante e *R. cereuscula* no ensaio de atividade anti-inflamatória.

Palavras-chave: **espectrometria de massas, saponinas, *fingerprints*, anti-inflamatória**

Abstract

Despite the several reports of the use of *Rhipsalis* Gaertn (Cactaceae) by traditional populations in the treatment of a range of diseases, there are very few phytochemical studies with this group and sometimes these are superficial, only indicating the possible presence of some classes of natural products. In addition, there are very few studies evaluating the biological activity of *Rhipsalis*. Therefore, this work aimed to investigate the chemical composition of the genus *Rhipsalis* and to evaluate possible activities related to its composition, thus subsidizing its popular use. This dissertation was divided and organized as follows: the first part presents a general introduction on medicinal plants and their importance as well as a review on phytochemical studies in Cactaceae. Then, three sections were written: in the first one, we investigated the chemical composition of *Rhipsalis teres*, identifying 5 saponins derived from oleanolic acid, 2 C-glycosylated flavonoids derived from apigenin and 2 phenolic acids; in the second section, we investigate the chemical composition of the genus *Rhipsalis* identifying 28 saponins whose core is oleanolic acid and 8 flavonoids, we also suggested fingerprints for each species evaluated on the basis of the majority compounds, the quantitative results obtained by UPLC-MS were efficient in the identification of the species based on the phylogeny; in the third, we evaluated the antioxidant, antifungal and anti-inflammatory activities of *Rhipsalis* species, with *R. paradoxa* being the most promising species in the antioxidant assay and *R. cereuscula* in the anti-inflammatory assay.

Keywords: mass spectrometry, saponins, fingerprint, anti-inflammatory

Agradecimentos

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

À Virginia Carrara por me acompanhar e dar suporte durante toda trajetória deste trabalho e nos momentos mais árduos.

Aos meus amigos de academia os quais levarei para a vida toda: Alexandre Luiz Arvigo, Juan Carlos Farias Pardo, Caio Akira Miyai e Murilo Zanetti Marochi.

Ao meu orientador Wagner Vilegas por todos os ensinamentos fitoquímicos e paciência ao transferir os conhecimentos químicos a um biólogo.

Ao Prof. Odair José Garcia de Almeida, por todo o acompanhamento botânico neste trabalho.

À Profa. Thais Maria Baub e à Profa. Clélia Akiko Hiruma-Lima, pela contribuição e realização das atividades biológicas.

Aos colegas do Laboratório de Bioprospecção de Produtos Naturais.

Ao Prof. Francisco Seikiguchi de Carvalho e Buchmann e ao Laboratório de Estratigrafia e Paleontologia, pela ajuda nas coletas.

À CAPES, pelo auxílio financeiro e pela bolsa concedida **88882.180443/2018-01**.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP.

1. Introdução

Plantas medicinais e seus usos no tratamento de enfermidades têm acompanhado a humanidade desde suas civilizações mais antigas até a Idade Contemporânea. Populações sumérias descreviam receitas para o preparo de medicamentos à base de plantas há mais de 5000 anos. O livro chinês "Pen T'Sao" datado de 2500 anos A.C. relata a utilização de mais de 350 espécies vegetais. As civilizações egípcias, gregas, assírias, árabes, romanas e da Idade Médias descreviam diversas espécies e a preparação de drogas vegetais aos quais recorriam para tratamento das mais diversas enfermidades. No decorrer do tempo, a utilização de plantas para cura de enfermidades se tornou ampla e intrínseca à cultura tradicional de cada povo (PETROVSKA, 2012).

A cultura tradicional de diversos povos faz uso de plantas medicinais para tratar suas moléstias. Segundo a Organização Mundial de Saúde, em 1995 nos países em desenvolvimento, cerca de 70% da população dependia exclusivamente dos fitoterápicos como forma de tratamento e prevenção de suas enfermidades. A Fitoterapia representa uma forma de terapia medicinal alternativa à medicina alopática, uma vez que esta última apresenta diversos obstáculos no acesso de populações carentes, seja por distância dos centros hospitalares ou pela dificuldade na realização de exames e na aquisição de medicamentos (AGRA et al, 2008).

O mercado mundial de fitoterápicos tem crescido significativamente nos últimos anos. Com base nestas informações era de se esperar que o Brasil, detentor de aproximadamente um terço da flora mundial, estivesse na vanguarda do desenvolvimento e uso de fitoterápicos. Entretanto, não é isto que ocorre apenas 5% do mercado de medicamentos brasileiros são derivados de origem natural. Isso acaba influenciando diretamente na pesquisa de diversos táxons da flora brasileira, como é o caso da família Cactaceae. Embora o Brasil represente o país com a terceira maior diversidade de cactos do mundo, pouco tem se aproveitado dessa grande diversidade vegetal (DUTRA et al, 2016; MEIADO, 2012).

Os cactos compreendem cerca de 1866 espécies e 139 gêneros (Stevens, 2001) as quais em sua maioria são encontradas apenas nas Américas, com excessão de *Rhipsalis baccifera* (Sol.) Stearn, que ocorre naturalmente na África e

Ásia (ANDERSON, 2001; BARTHLOTT; HUNT, 1993) são plantas com folhas modificadas em espinhos ou ausentes, caule suculento e geralmente habitam ambientes áridos ou semi-áridos (OCAMPO; COLUMBUS, 2010). Entretanto, mais ou menos 10% de sua diversidade está composta por linhagens epífitas e semi-epífitas que habitam o dossel das árvores em florestas neotropicais (BENZING, 2008; WALLACE; GIBSON, 2002) pertencendo às tribos Hylocereeae e Rhipsalideae (subfamília Cactoideae). A Mata Atlântica brasileira, um dos *hotspots* mundiais para conservação da biodiversidade (MYERS *et al.*, 2000; Amorim *et al.*, 2009), é o centro de diversidade para a tribo Rhipsalideae (BARTHLOTT; HUNT, 1993; ANDERSON, 2001). Entretanto, conforme discutido em Ramos *et al.* (*in press*) estudos de biodiversidade em comunidades vegetais tropicais estão, principalmente, voltados para estudo das árvores e outras formas de vida como lianas, ervas, arbustos e epífitas são frequentemente ignorados ou subestimados; contudo essas plantas são responsáveis pela riqueza de espécies e pela complexidade ecológica nos ambientes em que ocorrem (GENTRY; DOBSON, 1987 a,b). No Brasil, os membros desta família são principalmente utilizados como plantas ornamentais e com menor frequência como alimento e medicamento (XAVIER, 2010; VALENTE *et al.*, 2007). Apesar de os cactos estarem distribuídos por todo o território brasileiro, são pouco estudados do ponto de vista integrado, ou seja, que abranja suas composições químicas e atividades biológicas.

Família Cactaceae: aspectos químicos, etnobotânicos e farmacológicos

A família Cactaceae é classificada em cinco subfamílias de acordo com sua morfologia: Pereskioideae (cactos mais basais da América do Sul), Leuenbergioideae (cactos mais basais da América Central), Mahuenioideae (subfamília relativamente nova com apenas duas espécies que ocorrem no extremo sul da Argentina), Opuntioideae (cactos globulares) e Cactoideae (cactos em formas de arbusto ou colunares) (STEVEN, 2001; ANDERSON, 2001). Apesar da divisão entre Pereskioideae e Leuenbergioideae, neste trabalho iremos utilizar a classificação antiga em que as subfamílias eram agrupadas em Pereskioideae, pois os trabalhos citados utilizavam esta classificação e, portanto, as espécies eram citadas com a nomenclatura antiga.

A subfamília Pereskioideae (Pereskioideae e Leuenbergioideae) considerada o grupo mais basal por apresentar o maior número de caracteres primitivos da

família Cactaceae. Esse grupo tem sua incidência restrita a regiões de transição ou levemente áridas e apresentam como morfologia geral caules finos, sublenhosos ou lenhosos, dos quais emergem folhas largas com poucos espinhos na base e originam flores terminais solitárias ou em cimeiras curtas (DUARTE; HAYASHI 2005). Pereskioideae possui indivíduos com propriedades medicinais, dentre elas *Pereskia bleo* (Kunth) DC. Essa espécie nativa da América Central foi introduzida na Malásia, onde lhe são atribuídas atividades antitumoral, antirreumática, antiúlcera e anti-inflamatória (TURRA et al, 2007). Em estudo realizado por Tan et al (2005) observou-se a atividade citotóxica sobre células mamárias cancerígenas. Essa atividade foi conferida à presença de glicosídeos complexos e saponinas que ocorrem no gênero *Pereskia* e estão presentes no extrato metanólico de *P. bleo*. Em outro estudo foi constatada a atividade antinociceptiva moderada do extrato etanólico, além da presença de vitexina (Figura 1) (ABDUL-WAHAB et al, 2012). Outra espécie dessa subfamília com potencial medicinal é *P. grandifolia* Haw, nativa da América Latina e com ampla distribuição no Brasil. Popularmente, as folhas são utilizadas no tratamento de erupções cutâneas e aos frutos são atribuídas propriedades expectorante e antissifilítica (CORREA, 1984). Diversas pesquisas têm sido realizadas com essa espécie, a fim de elucidar seu potencial fitoterápico. Observou-se efeito sedativo, atividades analgésica e ansiolítica do extrato etanólico (TURRA et al, 2007). Ademais, estudos químicos utilizando diversas espécies de *Pereskia* constataram a presença de diferentes alcaloides, dentre eles a mescalina (alucinógeno) (DOESTCH et al, 1980).

Opuntideae é conhecida por seu caule achatado, frutos comestíveis, pequenos espinhos destacáveis em sua auréola (gloquídios), folhas rudimentares nos brotos e sementes com cobertura opaca. Apresenta significativa importância como recurso alimentar humano e animal, e está distribuída por diversas regiões áridas, semiáridas e temperadas do mundo (RUSSEL; FELKER, 1987). O gênero *Opuntia*, responsável pelo nome desta subfamília, é o mais amplamente distribuído e estudado do ponto de vista medicinal, além de também possuir um amplo uso na medicina tradicional de diversos países no tratamento de doenças do pulmão, pele e circulação sanguínea (CHEN et al, 2011), inflamação e dor (ZOU et al, 2005), gastrite, hiperglicemia, arteriosclerose, diabetes, hipertrofia da próstata (AGOZZINO et al, 2005) e como cicatrizante (SHEDBALKAR et al, 2010). Em revisão realizada por FEUGANG et al (2006) sobre as aplicações e usos de

Opuntia, foi relatado, além do alto valor nutritivo, diversas atividades biológicas importantes tais como: anticancerígena, antioxidante, antiviral (*Herpes simplex* tipo 2, vírus da pseudorraiva, *influenza*, HIV-1), anti-inflamatória, antidiabética tipo 2, e hipocolesterolêmica (redução dos níveis de colesterol no sangue e modificação da composição do LDL). Outros estudos mostraram propriedades cicatrizantes em sinergia dos extratos aquoso e etanólico de *O. dillenii* (Ker awl.) Haw. (CHEN et al, 2011), hepatoprotetoras do extrato aquoso de *O. ficus-india* (L.) Mill (BRAHMI et al, 2011) e atividade contra a hiperplasia da próstata do extrato das flores de *Opuntia* sp. (JONAS et al, 1998).

Os cactos pertencentes à subfamília Cactoideae possuem grande variabilidade morfológica, apresentando-se em formas arbustivas, arborícolas, epífitas e cespitosas. A grande variabilidade estende-se quanto à sua distribuição, ocupando desde regiões áridas (*Carnegiea gigantea* (Engelm.) Britton; Rose) até florestas tropicais úmidas (*Rhipsalis teres* (Vell.) Steud) (ZAPPI et al, 2007; ANDERSON, 2001). Além disto, Cactoideae contém a maior diversidade de organismos, assim como a maior ocorrência de endemismo (ORTEGA-BAES et al, 2010). Devido a esse amplo espectro de formas e habitat, essa subfamília é menos delimitada por sinapomorfias, provavelmente ocorre uma única característica compartilhada por todos os taxa deste grupo. Virtualmente, o caule é suculento e possui uma diminuta folha sustentando cada aréola (NOBEL, 2002). Essa grande diversidade é refletida na utilização de diversas espécies na medicina tradicional. Populações indígenas das Américas utilizam o extrato etanólico de *Ariocarpus bravoanus* H.M.Hern.; E.F.Anderson para tratar reumatismo e outros tipos de dores (ANDERSON, 2001), o cacto *Echinocereus coccineus* Engelm. como estimulante cardíaco (MOERMAN, 1998), a decocção de *Echinopsis pachanoi* (Britton; Rose) Friedich; G.D.Rowley contra a calvície (DUKE; VASQUEZ, 1994), o fruto e a semente de *Escobaria vivípara* (Nutt.) Buxb. no tratamento de disenteria e doenças oculares (MOERMAN, 1998), a decocção de *Mammillaria grahamii* Engelm. no tratamento de enfermidades auriculares (MOERMAN, 1998), o cacto *Pachycereus pringlei* (S.Watson) Britton; Rose como analgésico (ASHMANN, 1966), as raízes e caules de *Peniocereus greggii* (Engelm.) Britton; Rose como estimulante cardíaco, cura do diabetes e tristeza (MOERMAN, 1998) e *Selenicereus grandiflorus* (L.) Britton; Rose é utilizada na América Latina como remédio para doenças cardíacas, edema e dores (MOERMAN, 1998; MOORE, 1989; CURTIN, 1949). Além disso,

foram reportados os usos religiosos ligados principalmente ao peiote (*Lophophora williamsii* (Lem. Ex Salm-Dick) J.M.Coult.) e cacto São Pedro (*Echinopsis pachanoi* (Britton; Rose) Friedrich; G.D.Rowley) por possuírem um alcaloide alucinógeno denominado mescalina (Figura 1) (OGUNBODEDE et al, 2010; ANDERSON, 2001; SCHULTES, 1938). Estudos químicos com diversos cactos demonstraram a presença de uma variedade de saponinas, dentre elas, algumas que ainda não eram conhecidas (KATUTA et al, 2012). No mesmo estudo ainda foi observada atividade antialérgica do tipo I para algumas saponinas isoladas de cactos (Figura 1).

Inserida na subfamília Cactoideae, a tribo Rhipsalideae chama atenção por suas características fugirem do estereótipo de cactos. Suas particularidades consistem em serem indivíduos epífitos, sem espinhos e que habitam regiões úmidas de florestas. Sua morfologia versa em caules segmentados, aréolas emersas no caule, flores diurnas e laterais ao caule. Possuem ocorrência em sua grande maioria na América do Sul, porém, algumas espécies distribuem-se até a América do Norte, e uma única espécie (*Rhipsalis bacífera* (J.S.Muell.) Stearn) possui distribuição natural em outros continentes. Ademais este grupo possui alta taxa de endemismo e tem na Mata Atlântica um dos maiores centros de diversidade (KOROTKOVA et al, 2011; ORTEGA-BAES et al, 2010; ANDERSON, 2001).

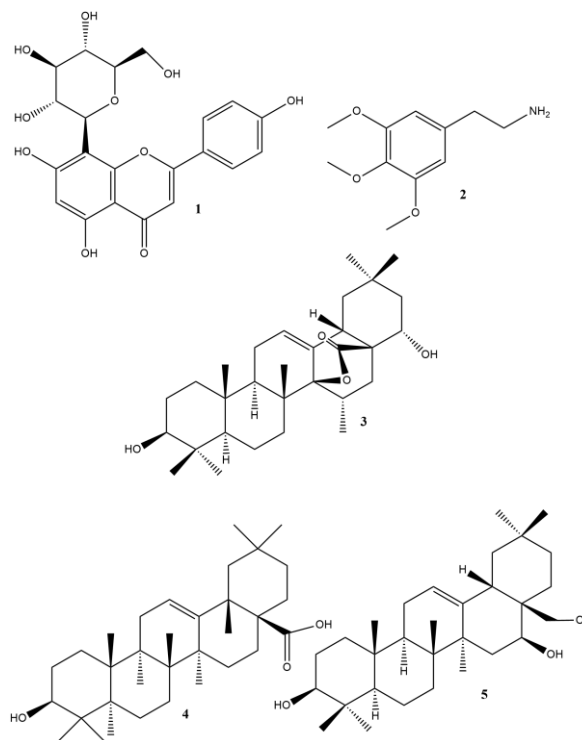


Figura 1: 1. Vitexina; 2. Mescalina; 3. Pachanol I; 4. Ácido Oleanólico; 5. Gummosogenina

2. Revisão da Literatura

Utilização na medicina popular

No gênero *Rhipsalis* ocorrem diversas espécies com uso medicinal por populações tradicionais em toda a América Latina. Estudos etnobotânicos relataram o uso de *Rhipsalis teres* (Vell.) Steud como medicamento para coração e pneumonia (VENDRUSCULO; MENTZ, 2006A; VENDRUSCULO; MENTZ, 2006B; VENDRUSCULO et al, 2005), a propriedade sedativa de *R. myosurus* (Salm.-Dyck) K.Schum. (MENTZ et al, 1997), o uso do emplastro de *Rhipsalis sp* no tratamento de ferimentos e queimaduras (STANISKI et al, 2014), o uso da infusão do caule e frutos de *R. lumbricoides* (Lem.) Lem. no tratamento de pressão alta e o uso da decocção dos caules para dores relacionadas ao músculo coronário, além do emprego do cataplasma do caule para tumores e inflamações (LUCENA et al, 2014; CARBONÓ-DELAHOZ; DIB-DIAZGRANADOS, 2013; CHIFA; RICCIARDI,

2002). Os estudos etnobotânicos relatam ainda o uso de *R. baccifera* para aliviar dores nos ossos e para varizes, sua cataplasma como anti-inflamatório, e da infusão para o tratamento de diabetes e pressão alta e da água do macerado no tratamento de hepatite (DOMÍNGUEZ-BARRADAS, et al, 2015; FUENTES, 2005).

Há poucos estudos que avaliem as atividades relatadas e a composição química de *Rhipsalis*. Akunne et al (2016) observaram atividade anti-inflamatória e anticancerígena do extrato metanólico de *R. neves-armondii* K. Schum. Do ponto de vista químico, foi observada a presença de alcaloides em *R. lumbricoides* através da reação de Dragendorff (CHIFA; RICCIARDI, 2002) e TURSCH et al (1965) e identificaram um triterpeno derivado do ácido oleanólico em *R. mesembryanthemoides* Haw.

Dificuldade de identificação taxônomica de plantas medicinais e do gênero *Rhipsalis*

O número de plantas medicinais e como usá-las aumentou significativamente ao longo dos anos. Das 250 espécies utilizadas pelos sumérios há 5.000 anos, atualmente apenas na medicina chinesa são reportadas mais de 5.000 espécies; globalmente este número sobe para aproximadamente 70.000 espécies utilizadas no tratamento e prevenção de enfermidades (CHEN et al, 2014; PETROVSKA 2012; HEUBL, 2010). Como consequência deste aumento de espécies, a identificação e modo correto de utilização de cada espécie apresenta uma importante preocupação para saúde pública uma vez que o uso incorreto pode causar quadros severos de intoxicação incluindo morte (HEUBL, 2010). No EUA aproximadamente 5% dos casos de envenenamento são atribuídos ao uso de plantas medicinais e 12% na África do Sul; este problema é mais significativo em

países em desenvolvimento onde a população é mais dependente da medicina tradicional e o uso de plantas medicinais não é bem regulamentado (KHARCHOUFA et al, 2018).

A identificação de plantas medicinais geralmente baseia-se em características morfológicas, anatômicas e químicas. No Brasil, o órgão regulamentador ANVISA na resolução RDC nº 10 de 9 de março de 2010 exige para identificação de drogas vegetais métodos cromatográficos, um laudo emitido por profissional habilitado e exsicatas que possam ser acessadas e comparadas com banco de dados. Uma grande deficiência apresentada por estas técnicas é falta de conhecimento e/ou ausência de características chaves na identificação de cada espécie e a necessidade de um *expert* para cada grupo, tendo em vista que espécies próximas tendem a apresentar características similares, o que torna certos táxons de plantas medicinais propensos à menor precisão em suas identificações (CHEN et al, 2014).

Apesar do uso popular difundido, a identificação taxonômica do gênero *Rhipsalis* está em constante debate entre os especialistas. A classificação de *Rhipsalis* tem sido constantemente alterada desde sua primeira descrição em 1753 até os dias atuais. (KOROTKOVA et al, 2011; CALVENTE 2012; CALVENTE et al, 2011). A dificuldade na definição de características chaves deste gênero está principalmente relacionada à intergradação da parte vegetativa (i.e. espécies diferentes compartilham as mesmas características), à plasticidade fenotípica e à uniformidade da parte reprodutiva (KOROTKOVA et al, 2011). Desta forma, as características morfológicas e anatômicas se tornam uma ferramenta de baixa precisão sendo necessárias outras abordagens para a identificação dessas espécies. Entretanto, ponto de vista químico, o gênero *Rhipsalis* é pouquíssimo

explorado havendo apenas alguns trabalhos que identificaram superficialmente algumas classes de produtos naturais (BAUTISTA-SAN et al, 2017; AKUNNE et al, 2016).

3. Objetivos

3.1. Objetivo Geral

✓ Investigar a composição química de 8 táxons (6 espécies e 2 subespécies) da Mata Atlântica pertencentes ao gênero *Rhipsalis* Gaërtn, através de análises por *TLC*, *HPLC-DAD-ELSD*, *FIA-ESI-IT-MSⁿ* e *UPLC-ESI-IT-MS* de forma a obter um panorama de sua composição química e avaliar seu potencial biológico.

3.2. Objetivos Específicos

3.2.1. Investigar o extrato *EtOH* 70% de *R. teres* por meio de análises por *TLC*, *HPLC-DAD-ELSD*, *FIA-ESI-IT-MSⁿ* e *UPLC-ESI-IT-MS*.

3.2.2. Isolar e identificar metabólitos secundários de *R. teres*

3.2.3. Avaliar a composição química de *Rhipsalis* spp. por *TLC*, *HPLC-DAD-ELSD*, *FIA-ESI-IT-MSⁿ* e *UPLC-ESI-IT-MS*.

3.2.4. Avaliar quimiotaxonomicamente a relação entre as composições químicas de cada espécies

3.2.5. Avaliar as atividades antioxidante, antifúngica e anti-inflamatória de *Rhipsalis cereuscula*, *Rhipsalis paradoxa* e *Rhipsalis teres*

4. Material e Método

Coleta

Foram investigadas 6 espécies e 2 subespécies do gênero *Rhipsalis* provenientes da coleção do Laboratório de Morfologia Vegetal do Instituto de Biociências – Campus do Litoral Paulista (UNESP – São Vicente) (Tabela 1). Todos os indivíduos foram coletados nos meses de inverno para evitar o elevado teor de água armazenado nos caules.

Rhipsalis cereuscula, *R. clavata*, *R. teres* e *R. floccosa* e suas subespécies apresentam caules cilíndricos diferenciando-se pela segmentação dos ramos, *R. elliptica* pertence ao grupo dos ramos achatados e *R. paradoxa* possui o ramo trilobado (Figura 2).

Tabela 1: Espécies do gênero *Rhipsalis* estudadas seguidas das siglas referentes a cada espécie, voucher ou número de coletor e cadastro nº de acesso a patrimônio genético.

Espécie	Sigla	Identificação botânica	Número de acesso ao patrimônio genético
<i>Rhipsalis cereuscula</i> Haw.	RCE	HUEM 18985	A79CEDA
<i>Rhipsalis clavata</i> F.A.C.Weber	RCL	HRCB 55377	A79CEDA
<i>Rhipsalis elliptica</i> G.Lindb	RE	O.J.G.ALmeida 051	A79CEDA
<i>Rhipsalis floccosa</i> ssp. <i>floccosa</i> Salm-Dyck	RFF	O.J.G.Almeida 056	A79CEDA
<i>Rhipsalis floccosa</i> ssp. <i>hohenauensis</i> Barthlott & N.P.Taylor	RFH	HUEM 18984	A79CEDA
<i>Rhipsalis floccosa</i> ssp. <i>pulvinigera</i> Barthlott & N.P.Taylor	RFP	O.J.G.Almeida 054	A79CEDA
<i>Rhipsalis paradoxa</i> Salm-Dyck	RP	O.J.G.Almeida 053	A79CEDA
<i>Rhipsalis teres</i> (Vell.) Steud	RT	HUSC 11437	A79CEDA



Figura 2: A - *Rhipsalis cereuscula*; B - *Rhipsalis clavata*; C - *Rhipsalis elliptica*; D - *Rhipsalis floccosa* ssp *floccosa*; E - *Rhipsalis floccosa* ssp *hohenuensis*; F - *Rhipsalis floccosa* ssp *pulvinigera*; G - *Rhipsalis paradoxa*; H - *Rhipsalis teres*

Secagem e Moagem

O material vegetal foi higienizado com água e pincel, e seco em estufa de ar circulante a 40°C durante 7 dias. Em seguida, o material seco foi pulverizado em moinho de facas para a obtenção do pó. Os dados de rendimento para cada espécie podem ser vistos na tabela 2.

Obtenção do extrato

Nesse trabalho foram utilizados dois métodos extrativos: a percolação exaustiva e a maceração.

O método de percolação exaustiva permite utilizar um solvente menos tóxico, como o etanol 70%, e ainda assim garante a extração total dos metabólitos

secundários. Entretanto é necessária uma quantidade grande de amostra (mínimo 50g) para que o percolador seja empacotado corretamente.

O método de maceração garante uma extração eficiente dos metabólitos secundários de forma rápida e com pouco volume de amostra, porém foi necessário utilizar metanol (solvente menos viscoso, mas mais tóxico) para garantir a eficácia da extração.

Percolação

O material vegetal pulverizado de *R. cereuscula*, *R. paradoxa* e *R. teres* foi extraído primeiramente com Hexano (HEX) para extração das graxas e, depois, com Etanol 70% (EtOH 70%), por meio de percolação exaustiva (Figura 2). Após a extração, os líquidos extratores foram rotoevaporados sob pressão reduzida, à temperatura 40 °C fornecendo os respectivos extratos (Tabela 2).

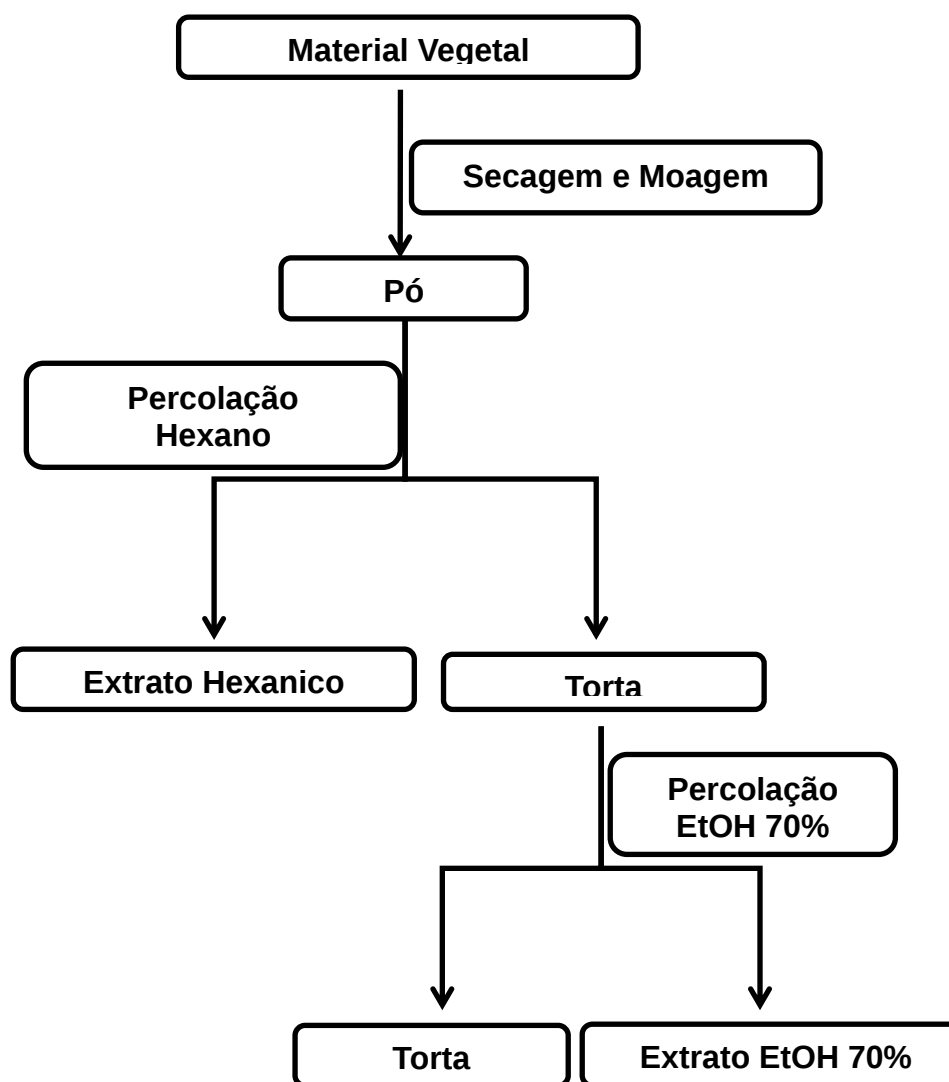


Figura 2: Fluxograma da extração pelo método de percolação exaustiva

Maceração

O pó (1 g) foi submerso, primeiramente, em 10 mL de hexano e extraído por maceração em banho ultrassônico por 30 min. Esta etapa foi realizada três vezes para a retirada de graxas vegetais. Em seguida, o mesmo pó foi submerso em 10 mL de metanol e extraído por maceração em banho ultrassônico por 30 min. Esta etapa também foi realizada três vezes e resultou na obtenção do extrato metanólico (MeOH) (Tabela 2).

Clean-up dos extratos

Uma alíquota (5 mg) de cada extrato foi pesada e ressuspendidas em 1 mL de metanol/H₂O (8:2) e submetidas ao *clean-up* utilizando-se cartuchos Sep-Pak

C18 de fase reversa tamanho da partícula 45 μ e diâmetro e poro 60 Å). O cartucho foi ativado com 450 uL de MeOH e equilibrado com 450 uL de MeOH/H₂O (8:2v/v). A amostra (5,0 mg) foi solubilizada em 1 mL e, posteriormente, submetida à extração em fase sólida, com 450 uL da mesma mistura de MeOH/H₂O. A solução obtida foi seca à temperatura ambiente, redissolvida em MeOH/H₂O (8:2 v/v), obtendo-se a solução estoque de concentração de 5,0 mg/mL e filtrada em filtro PTFE 0,22 μ m.

Tabela 2: Quantidades (g) de material vegetal fresco e úmido, volume de solventes utilizados e rendimento (%) para cada espécie de *Rhipsalis* submetida às duas extrações.

<i>Percolação</i>								
	RCE	RCL	RE	RFF	RFH	RFP	RP	RT
Material fresco	304	-	-	-	-	-	733	610
Material seco	61	-	-	-	-	-	132g	122
Volume (hexano, L)	1	-	-	-	-	-	1	1
Volume (etanol 70%, L)	1	-	-	-	-	-	1,5	1,5
Massa de extrato EtOH 70%	11,4	-	-	-	-	-	18,14	32
Rendimento (%)	19						13,7	26
<i>Maceração (1g de material vegetal seco)</i>								
	RCE	RCL	RE	RFF	RFH	RFP	RP	RT
Massa do extrato MeOH (mg)	49,3	39,5	45,9	35	36,6	83	45,2	44,4
Rendimento (%)	4.93	3.95	4.59	3.5	3.66	8.3	4.52	4.44

RCE - *Rhipsalis cereuscula*; RCL - *Rhipsalis clavata*; RE - *Rhipsalis elliptica*; RFF - *Rhipsalis floccosa* subsp. *floccosa*; RFH - *Rhipsalis floccosa* subsp. *hohenauensis*; *Rhipsalis floccosa* subsp. *pulvinigera*; RP - *Rhipsalis paradoxa*; RT - *Rhipsalis teres*

Perfil químico de Rhipsalis teres

De acordo com um criterioso levantamento bibliográfico observou-se insuficiência de estudos químicos envolvendo espécies de *Rhipsalis*. Sendo assim, primeiramente, foi necessário estabelecer uma base de dados químicos a qual subsidiaria os passos subsequentes a cerca do panorama químico do gênero. Nesse intuito, a espécie *R. teres* foi escolhida para o estabelecimento do perfil químico inicial devido a sua grande abundância na região da Baixa Santista onde este trabalho foi realizado.

Isolamento

Uma alíquota (3 g) do extrato EtOH 70% de *R. teres* foi ressuspensa em etanol 70% (30 mL) e submetida à cromatografia em coluna aberta (CC) (100 x 3 cm i.d) de permeação em gel (Sephadex LH-20) sob fluxo constante de 1 mL/min em sistema isocrático com metanol 70% (metanol/H₂O) e coletadas por coletor automático em frações de 10 mL. As frações obtidas foram analisadas por cromatografia em camada delgada (TLC) em placas de alumínio revestidas com sílica gel^{UV254} e fase móvel quaternária (clorofórmio/n-propanol/metanol/água 31:38:6:25 v:v) e reveladas com anisaldeído/H₂SO₄ e reagrupadas em 8 frações. Em seguida, foram avaliadas por UPLC-MS e foram identificadas as substâncias **1** (43,2 mg) e **2** (24,2 mg) que estavam isoladas.

Outra alíquota de (3 g) do extrato EtOH 70% foi ressuspensa em H₂O (300 mL) e adsorvida em resina Diaion HP-20 Merck (30 g). Em seguida, a solução foi agitada em placa magnética e, posteriormente, tratamentos subsequentes foram realizados lavando em funil de Buchner a resina com 100 mL de água e, em seguida, 100 mL de metanol 20%, 40%, 60%, 80%, 100%. Cada etapa foi repetida 3 vezes. As subfrações resultantes foram concentradas em rotoevaporador,

analisadas por *TLC* e reagrupadas em 3 frações: HP-H₂O, .HP-20%-80% e HP-100%.

A fração HP-20%-80%, enriquecida em saponina, fora submetida à cromatografia líquida de média eficiência (*MPLC*) com coluna C18 (15cmx3 cm d.i) em método gradiente 5%-100% (metanol/H₂O) sob fluxo de 10 mL/min. As subfrações foram coletadas a cada 10 min, analisadas por *TLC* e reagrupadas em 11 frações (*MP*).

As frações *MP*'s foram purificadas por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (Knauer Azura) acoplado a detector de índice de refração (Knauer *Smartline RI Detector*) (*HPLC-RI*) com coluna semipreparativa C18 (250x10mm 5 µm) em método isocrático 75% (metanol/H₂O) sob fluxo de 2mL/min. Esse fracionamento resultou no isolamento da substância **5** (45 mg).

Identificação

A identificação das substâncias isoladas foi realizada através de espectrometria de massas por infusão direta em modo negativo usando ionização por Electrospray e analisador de Íon Trap (*FIA-ESI-IT-MSⁿ*) e por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a detector de conjunto de fotodiodos (*UPLC-DAD*) e cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a espectrômetro de massas (*UPLC-MS*). O *FIA-ESI-IT-MSⁿ* foi desenvolvido sob as seguintes condições: gás de nebulização nitrogênio; temperatura do capilar fixada em 350°C; vácuo de 1,14 Torr. As análises por *UPLC-DAD* foram realizadas sob as seguintes especificações: coluna Acquity UPLC® BEH C18 (2,1 x 50 mm 1.7µm) e sistema gradiente: 0-7min (5-100% MeOH) sob fluxo de 0,350 mL/min. Os solventes utilizados foram água acidifica (0,1% ácido fórmico) e metanol acidificado (0,1%

ácido fórmico). As análises *UPLC-MS* foram realizadas sob as seguintes especificações: coluna Acquity UPLC® BEH C18 (2,1 x 50mm 1.7 µm) e sistema gradiente: 0-7 min (5-100% MeOH) sob fluxo de 0,350 mL/min e temperatura do capilar 280°C. Os solventes utilizados foram água acidificada (0,1% ácido fórmico) e metanol acidificado (0,1% ácido fórmico). O gás de nebulização foi de nitrogênio. A temperatura do capilar foi fixada em 350°C. O vácuo dentro do espectrômetro de massas foi de 1,14 Torr.

As análises por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) foram feitas por meio de espectros de ^1H (600MHz), de ^{13}C (150MHz) e de espectros 2D obtidos em aparelho Bruker Avance III 600 usando $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ como solvente e TMS como controle interno.

Panorama químico do gênero Rhipsalis

Para a obtenção do panorama químico de *Rhipsalis* foram utilizados os extratos MeOH obtidos através da maceração. Foram avaliadas 6 espécies e 2 subespécies buscando maior representatividade do gênero.

As espécies avaliadas neste trabalho foram coletadas em diferentes regiões, mas o material avaliado de cada espécie foi proveniente do cultivo da coleção do Laboratório de Morfologia Vegetal do Instituto de Biociências, sendo que cada espécie foi aclimatada por pelo menos 3 meses para reduzir possíveis influências de fatores abióticos. Após a aclimação, indivíduos da mesma espécie, porém de origens diferentes foram avaliados quanto a sua composição química. Não foram encontradas variações qualitativas nem quantitativas entre indivíduos da mesma espécie, porém origens diferentes. A partir disto o trabalho seguiu utilizando amostras com o *pool* de todos os indivíduos coletados da mesma espécie.

Para obtenção do panorama químico, as soluções estoque foram primeiramente submetidas à cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de fotodiodos em série com detector de espalhamento de luz (HPLC-DAD-ELSD) equipado com detector de conjunto de fotodiodos *UV-DAD* (MD-2018 Plus), modelo Jasco LC-Net III/ADC, em série com detector de Espalhamento de Luz (*ELSD*) (ELS-2040 Jasco Co.). O método utilizado foi gradiente 0-60 min (5%-100%) e os solventes utilizados foram metanol e H₂O, ambos acidificados com ácido fórmico 0,1%.

Em seguida, alíquotas (200 µL) das soluções estoque foram diluídas em 1mL de MeOH/H₂O (8:2 v/v) para a concentração de 1 mg/mL e submetidas à cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a espectrômetro de massas (UPLC-MS sob as seguintes especificações: coluna Acquity UPLC® BEH C18 (2,1 x 50 mm 1.7 µm) e sistema gradiente: 0-7 min (5-100% MeOH) sob fluxo de 0,350 mL/min e temperatura do capilar 280°C. Os solventes utilizados foram água acidificada (0,1% ácido fórmico) e metanol acidificado (0,1% ácido fórmico).

Alíquotas (1 µL) das soluções estoques foram diluídas em 1 mL MeOH/H₂O (8:2 v/v) para a concentração de 5 ppm. As soluções resultantes foram analisadas por espectrometria de massas por infusão direta em modo negativo usando ionização por Electrospray e analisador de Íon Trap (*FIA-ESI-IT-MSⁿ*) sob as seguintes condições: gás de nebulização nitrogênio; temperatura do capilar fixada em 350°C; vácuo de 1,14 Torr.

Análise de Componentes Principais (PCA)

As diferenças na composição química dos extratos foram avaliadas estatisticamente utilizando-se dos perfis obtidos por UPLC-ESI-IT-MS para cada

espécie de coleta, obtendo-se um panorama químico das espécies. As variáveis relativas à composição química dos extratos, tempo de retenção, m/z e área dos picos cromatográficos, foram sintetizadas utilizando a análise de Componentes Principais (PCA). Para caracterizar a variabilidade dos dados de cada espécie foram criadas duas matrizes, uma com dados semi-quantitativos e outra com os dados qualitativos (presença e ausência). A partir desses dados também foi realizada análise de agrupamento hierárquico a fim de avaliar o grau de variabilidade entre as espécies.

O processamento dos dados de LC-MS foi realizado no software MZmine 2 (Pluskal et al, 2010) e a análise estatística multivariada dos dados, no software SIMCA.

Avaliação das atividades biológicas

Avaliação da atividade antioxidante

Ensaio colorimétrico com 2,2- difenil-picrilhidrazila (DPPH)/detecção do potencial sequestrador de radicais livres padronizado por RUFINO et al, 2007 com adaptações. Em solução, o radical DPPH apresenta cor violeta intensa que é consequência do elétron desemparelhado. Esse radical absorve a 515 nm e um decréscimo nesse comprimento de onda ocorre pela estabilização do radical através do recebimento de um hidrogênio radicalar da espécie antioxidante, que é indicada pela mudança de cor. Foram aplicados 20 mL das amostras a serem testadas em diferentes concentrações (12,5/25/50/100/200 mg/mL) em placas Elisa 96 poços e, então, foram adicionados 280 mL de solução a 0,06 mM de DPPH a cada poço. Após 30 minutos de reação, realiza-se a leitura da absortividade molar destas soluções a 515 nm. O decréscimo na absortividade molar expressa o

potencial antioxidante da amostra teste que é representada por uma curva da concentração pela porcentagem da variação da absorvidade molar (A).

Avaliação do potencial antifúngico in vitro

A avaliação do potencial antifúngico foi realizada no Departamento de Ciências Biológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara-UNESP pelo grupo de pesquisa da Profa. Dra. Tais Maria Bauab.

Para a avaliação da atividade antifúngica dos extratos de *R. cereuscula*, *R. paradoxa* e *R. teres* foram empregados as seguintes linhagens de *Candida*: *C. albicans* (ATCC 10231), *C. krusei* (ATCC 6258), *C. glabrata* (ATCC 2001), *C. tropicalis* (ATCC 750) e *C. parapsislosis* (ATCC 22019). As cepas foram mantidas em Caldo Sabouraud dextrose (CSD) acrescido de 20% de glicerol e estocadas a -20°C. Para o uso, alíquotas foram cultivadas em 3 mL de CSD e incubadas à 37°C por 48 horas.

Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

A determinação da CIM dos extratos vegetais frente às cepas fúngicas foi realizada através da técnica de diluição em microplacas de acordo com as metodologias descritas nas normas do Clinical and Laboratory Standards Institute M27-A3 (CLSI, 2008) com modificações. Estes protocolos foram empregados para os ensaios com as cepas de levedura e a bactéria respectivamente. Para a realização destas análises, as amostras vegetais foram solubilizadas em DMSO (10%) na concentração inicial de 2000 µg/mL.

Os orifícios das microplacas (96 poços) foram preenchidos com 100 µL de meio de cultura RPMI 1640, ajustado ao pH7,0 com tampão MOPs (ácido 3-[N-

morfolino] propanossulfônico). Em seguida foram acrescentados 100 µL do das amostras vegetais e realizada a diluição seriada para que fosse estabelecida uma faixa de avaliação que variou de 1000 a 7,8 µg/mL. Adicionalmente foram distribuídos 100 µL das suspensões dos micro-organismos ($2,5 \times 10^3$ cel/mL) em cada orifício das microplacas. As microplacas foram incubadas a 37°C por 48 horas.

Como controles positivos de inibição foram utilizados os fármacos anfotericina B e fluconazol. Também foram realizados o controle do meio de cultura, o controle de crescimento leveduriforme, o controle de esterilidade das amostras vegetais e o controle negativo (solventes).

Determinação da concentração fungicida mínima (CFM)

Ao final do período de incubação, hastes de madeira estéreis foram utilizadas para repicar a mistura presente em cada um dos poços em placas contendo Ágar Sabouraud Dextrose (ASD) a 37°C por 24 horas. Após o período de incubação a CFM foi considerada como a menor concentração que capaz de impedir o crescimento do micro-organismo no meio de cultura.

Identificação das atividades

Para a revelação destes ensaios foram empregada uma solução de 2% de cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio – TTC (leveduras), sendo este um revelador indicativo de viabilidade celular (DUARTE et al, 2005). Os experimentos foram realizados em triplicata.

Edema de orelha induzido por xilol

A avaliação da atividade anti-inflamatória foi realizada no Departamento de Fisiologia do Instituto de Biociências de Botucatu-UNESP pelo grupo de pesquisa da Profa. Dra. Clelia Akiko Hiruma-Lima.

Para indução do edema 40 µL de xilol foram aplicados topicamente à orelha esquerda dos camundongos (20 µL na face anterior da orelha, 20 µL na face posterior). A orelha direita foi utilizada como controle. Os animais (n=8-9), foram submetidos a jejum por 2 horas, foram tratados 2 horas antes da indução com dexametasona (5 mg/kg, i.p.) e uma hora antes da indução do edema com os extratos nas doses 100, 200 e 400 mg/kg e o controle negativo (veículo) por via oral. Após uma hora de indução do edema, os camundongos foram eutanasiados e uma secção circular (8 mm de diâmetro) de suas orelhas esquerdas e direitas foram retiradas com o auxílio de um perfurador. Logo em seguida as orelhas foram pesadas. O edema é expresso através da diferença de massa (em miligramas) entre a orelha direita e orelha esquerda (SWINGLE *et al*, 1981). Os animais utilizados foram camundongos Swiss machos pesando 30-35g.

A análise estatística usada foi ANOVA de uma via seguida do teste de Dunnett, o valor mínimo para significância estatística foi de $P<0,05$.

5. Resultados e Discussão

Perfil químico de R. teres

A partir da cromatografia em coluna de permeação em gel, foram isoladas nas frações 4 e 5 as substâncias **1** e **2**, respectivamente. As separações por resina HP-20, MPLC e HPLC-RI resultaram no isolamento da substância **5**. As demais substâncias foram identificadas por *FIA-ESI-IT-MSⁿ* do extrato EtOH 70% (Figura

4).

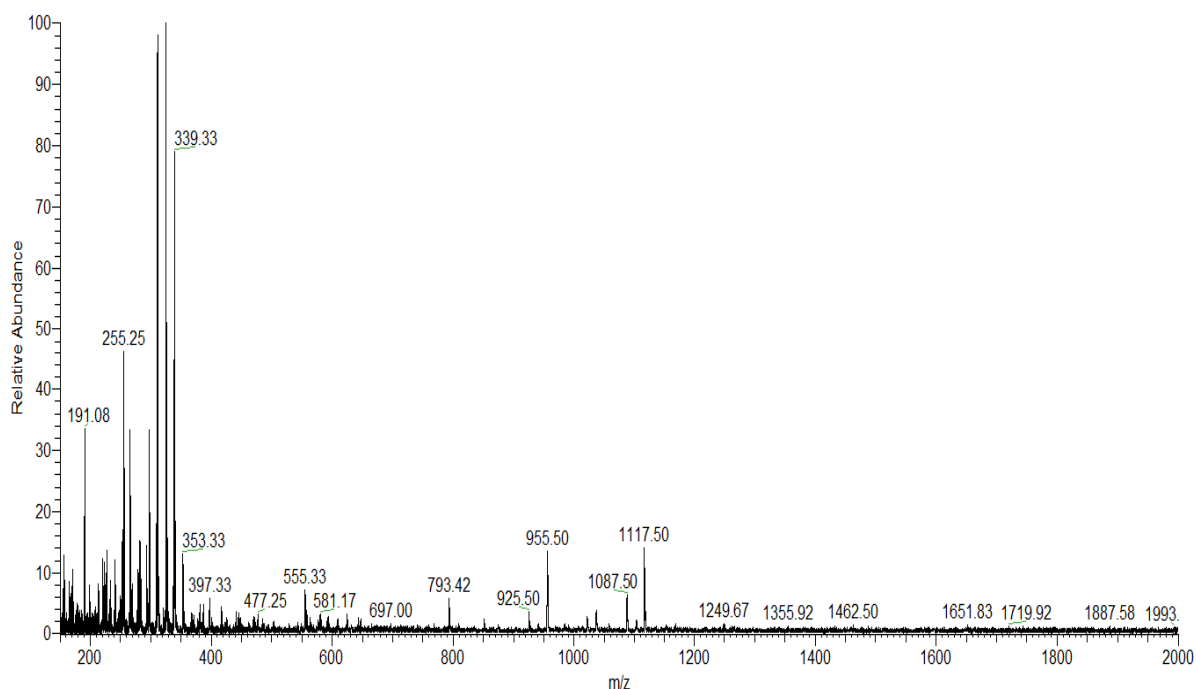


Figura 4: Espectro de massas *full-scan* do extrato EtOH 70% de *R. teres*

A substância **1** eluiu no tempo de retenção de 3,36 min (Figura 7). Apresentou o íon referente à molécula desprotonada de m/z 593 $[M-H]^-$ e absorvância máxima no UV em 271nm e 334 nm, característico de flavonas (RICE-EVANS et al, 1996) (Figura 5). Através da fragmentação MS2 do íon precursor m/z 593 foram observados dois íons produtos m/z 503 $[M-90-H]^-$ e m/z 473 $[M-120-H]^-$. Tais perdas condizem com o padrão de fragmentação de uma flavona C-glicosilada. A fragmentação MS3 do íon precursor m/z 503 gerou dois íons produtos de m/z 413 $[M-90-90-H]^-$ e m/z 383 $[M-90-120-H]^-$. O mesmo ocorreu para o íon precursor de m/z 473, que gerou os íons produtos de m/z 383 $[M-120-90-H]^-$ e m/z 353 $[M-120-120-H]^-$, e estes padrões sugerem a presença de uma hexose C-ligada a flavona (FERRERES et al, 2018; FERRERES et al, 2003). Sabendo-se que esta substância possui duas unidades de hexose, concluímos que a aglicona

apresentava íon de m/z 271 $[M-162-162-H]^-$. Através destas características identificamos a substância como a **vicenina II** (apigenina-6,8-di-C-glucopiranosídeo).

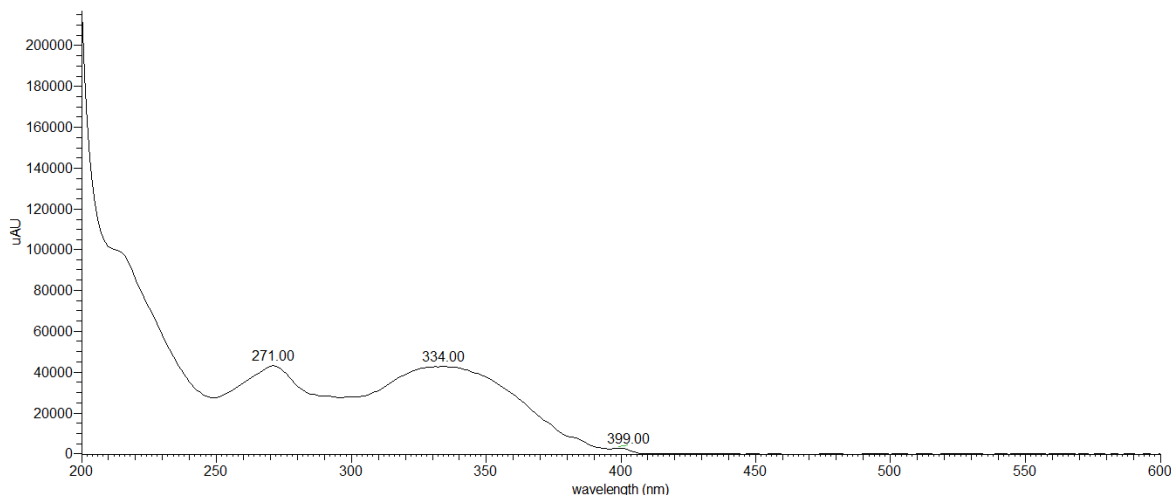


Figura 5: Espectro de absorvância UV-Vis da substância **1**

A substância **2** apresentou características similares à substância **1**, e tempo de retenção de 3,44 min (Figura 7), o íon referente à molécula desprotonada m/z 593 $[M-H]^-$ e absorvância máxima no UV em 271nm e 336nm, (RICE-EVANS et al, 1996) (Figura 6). Sua fragmentação MS2 seguiu padrão diferente da substância anterior, o íon precursor de m/z 593 originou apenas um íon produto de m/z 431 $[M-162-H]^-$ caracterizando a perda de uma hexose ligada em um oxigênio da flavona. Por sua vez, o íon precursor de m/z 431 originou dois íons produtos de m/z 341 $[M-162-90-H]^-$ e o íon de m/z 311 $[M-162-120-H]^-$, padrões que indicam a presença de uma hexose C-ligada. Dessa forma esta molécula também possuía duas unidades de glicose ligadas à flavona e, portanto, a aglicona também apresentava íon de m/z 271 $[M-162-162-H]^-$. Analisando as características dessa substância a identificamos como a **saponarina** (apigenina-6-C-glucosil-7-O-glucosídeo) (BRAUCH et al, 2018).

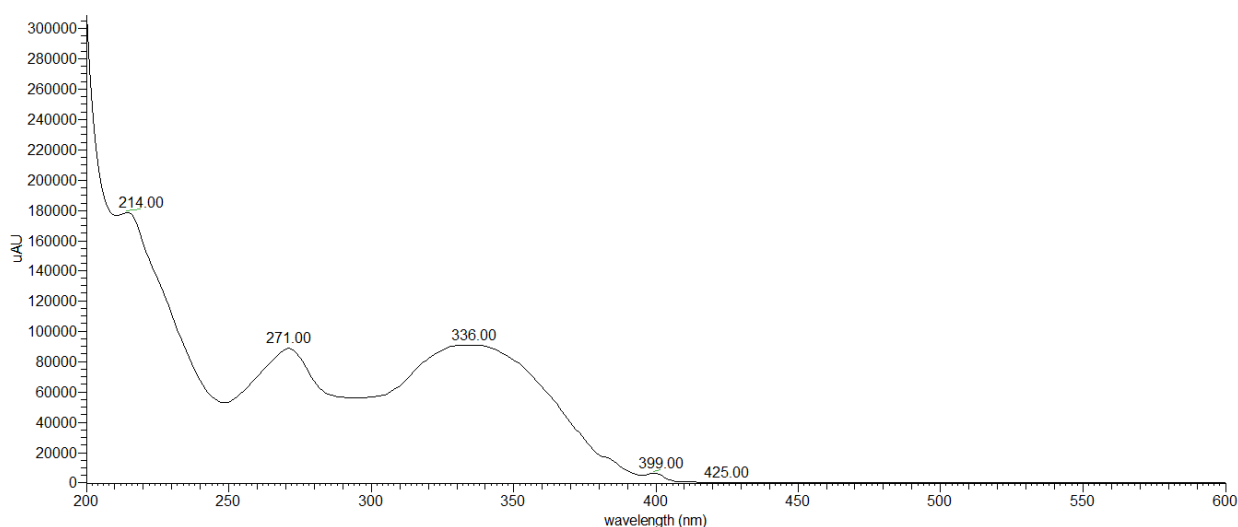


Figura 6: Espectro de absorvância UV-Vis da substância **2**

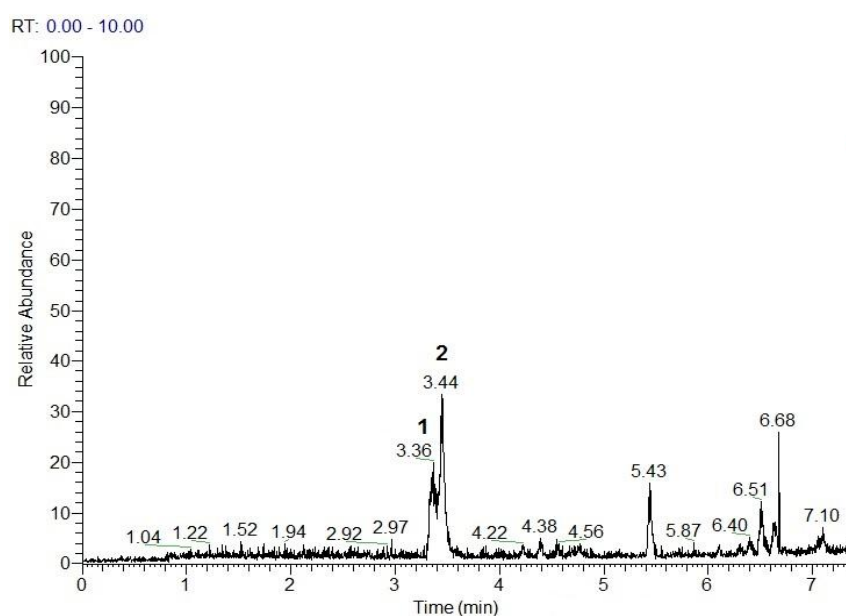


Figura 7: Cromatograma da análise por UPLC-MS com as substâncias **1** e **2**

A substância **3** apresentou íon referente à molécula desprotonada de m/z 191 $[M-H]^-$. A fragmentação MS2 do íon precursor de m/z 191 gerou os íon produtos de m/z 173 $[M-18-H]^-$, m/z 147 $[M-44-H]^-$ e de m/z 111 $[M-80-H]^-$, caracterizando a perda de uma molécula de H_2O , de uma unidade de CO_2 e de quatro hidroxilas, respectivamente. Tais características permitiram a identificação desta substancia como **ácido quínico** (HERNANDEZ et al, 2018).

A substância **4** apresentou características similares à anterior, e foi

identificada como **3-ácido cafeoilquínico**. Apresentou o íon referente à molécula desprotonada de m/z 353 $[M-H]^-$. A fragmentação MS2 do íon precursor de m/z 353 originou os íons de m/z 335 $[M-18-H]^-$ (perda de H_2O), m/z 309 $[M-44-H]^-$ (perda de CO_2), m/z 191 $[M-162-H]^-$ (perda de $C_9H_7O_3$), m/z 173 $[M-180-H]^-$ (perda completa do ácido cafeico) e m/z 135 $[M-218-H]^-$ (perda do ácido cafeico e de três moléculas de H_2O). Este padrão de fragmentação em que ocorre a perda de três unidades de H_2O após a cisão com o ácido cafeico é característico do isômero 3-ácido cafeoilquínico (HERNANDEZ et al, 2018; MARINA et al, 2004).

A substância **5** apresentou o íon referente à molécula desprotonada de m/z 955 $[M-H]^-$. A fragmentação MS2 do íon precursor de m/z 955 gerou o íon produto de m/z 793 $[M-162-H]^-$, caracterizando a perda de uma unidade de hexose. Por sua vez, o íon precursor de m/z 793 gerou, na fragmentação MS3, os íons produtos de m/z 631 $[M-162-162-H]^-$ referente à perda de duas unidades de hexose, m/z 595 $[M-162-162-36-H]^-$ à perda de duas moléculas de H_2O adicionais as duas unidades de hexose e de m/z 455 $[M-162-162-176-H]^-$, com a perda de duas unidades de hexose e uma unidade de ácido glicurônico. Esse conjunto de dados é coerente com uma unidade do ácido oleanólico ligada a uma sequencia sacarídica contendo 4 unidades de açúcares.

Essa substância foi isolada do extrato EtOH 70%. Quando analisada por RMN, foram observados sinais característicos do ácido oleanólico para a aglicona (Tabela 3) (ANDRADE et al, 2002). Os sinais e a posição dos açúcares foram determinados através de experimentos HMBC e HMQC. O espectro HMBC indicou correlação entre o sinal de 175,8 (C-28) com o sinal em 5,2 (H-1 glc), entre o sinal de 88,4 (C-3) com o sinal em 4,3 (H-1 glcA) e entre o sinal em 73,2 (C3'-glcA) com o sinal em 4,2 (H-1 glc), o que indica a presença de uma unidade de glicose na

posição 28, de uma unidade de ácido glicurônico na posição 3 do ácido oleanólico e de uma unidade de glicose conectada na posição 3' do ácido glicurônico (Tabela 4).

Tabela 3: Deslocamentos químicos de RMN ^{13}C da aglicona da substância **5**.

	Aglicona	Referência de ácido oleanólico (ANDRADE et al, 2002)
C1	39,2	39,7
C2	25,8	26,8
C3	88,4	90,0
C4	41,7	40,2
C5	55,4	56,9
C6	18,2	19,3
C7	32,7	32,6
C8	40,7	40,7
C9	47,5	48,0
C10	38,6	37,8
C11	23,5	24,5
C12	122,1	123,8
C13	143,8	144,7
C14	42,9	42,8
C15	30,7	28,9
C16	22,9	24,2
C17	46,3	47,1
C18	41,1	42,6
C19	45,9	47,2
C20	32,2	31,5
C21	33,6	34,9
C22	33,2	33,2
C23	28,1	28,0
C24	16,9	15,6
C25	16,2	16,4
C26	22,9	17,1
C27	25,8	25,2
C28	175,6	178,1
C29	33,1	33,3
C30	23,0	23,8

RMN ^{13}C (600 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) δ (ppm)

Tabela 4: Sinais obtidos por RMN ^{13}C e ^1H dos açúcares da substância **5**.

	28-Glc	3-GlcA	3'-Glc
C1'/H'	105,1/4,3	104,0/4,2	94,5/5,2
C2'	76,3	72,7	72,7
C3'	85,3	73,2	72,6
C4'	69,9	68,6	70,8
C5'	78,1	76,4	77,0
C6'	173,2	60,9	61,0

RMN ^{13}C e ^1H (600 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) δ (ppm)

Com base nos dados obtidos através dos experimentos supracitados, identificamos a substância **5** como **Calendulaglicosídeo C** (MULEY et al, 2009) (Figura 8).

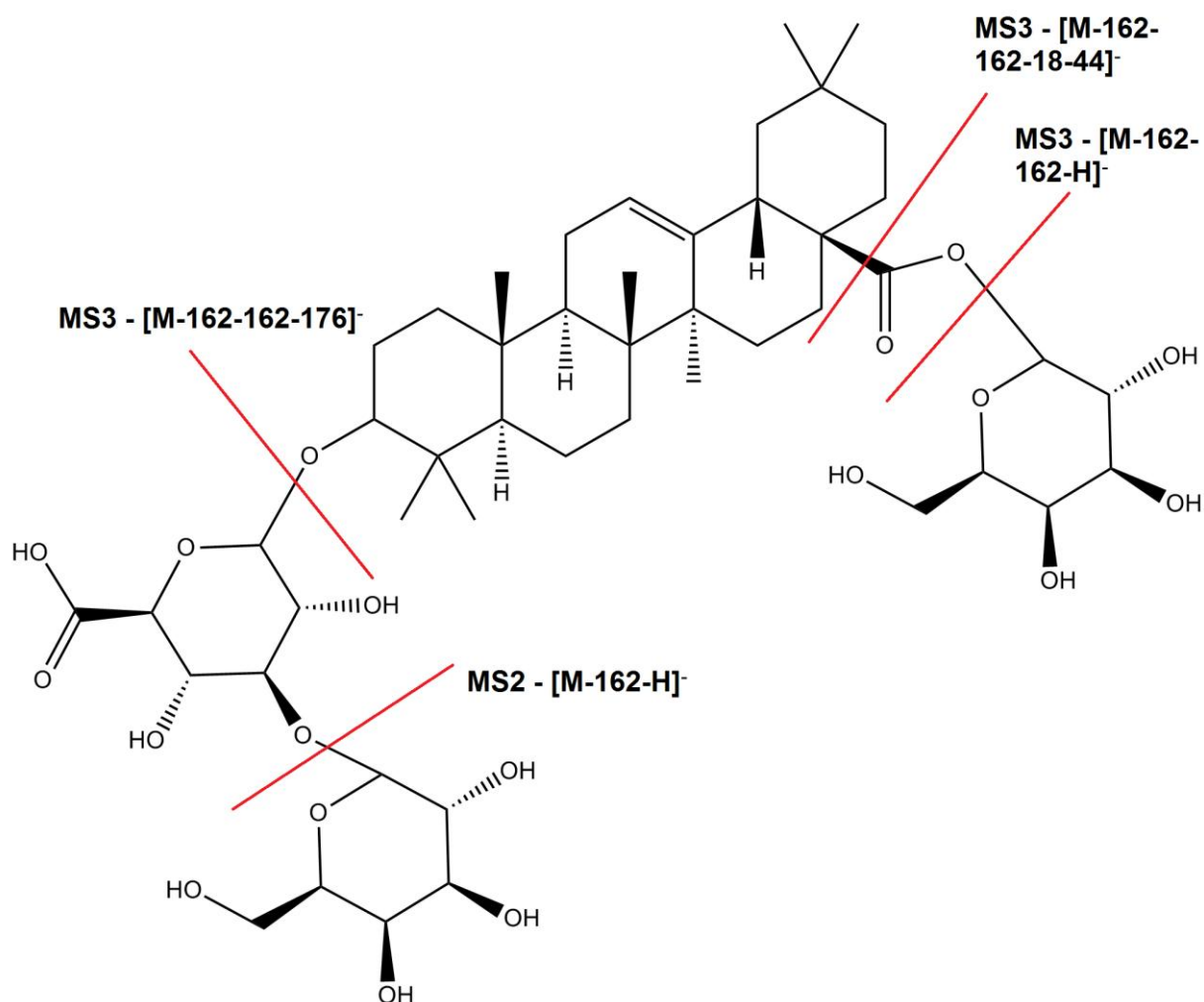


Figura 8: Padrão de fragmentação em MSⁿ das saponinas de *R. teres*

As demais saponinas identificadas neste trabalho foram identificadas com base na configuração estrutural obtida para o **Calendulaglicosídeo C**, pois apresentaram o mesmo padrão de fragmentação. Assim, o *core* das saponinas de *R. teres* corresponde a uma unidade de hexose ligada ao carbono 28 e uma unidade de ácido glicurônico ligado ao carbono 3 do ácido oleanólico.

A substância **6** foi identificada como a saponina **Calendulosídeo F** (CAO et al, 2017). Esta substância apresentou o íon referente à molécula desprotonada de m/z 793 [M-H]⁻, ao qual, ao ser fragmentado na fragmentação MS2 originou os íons

produtos de m/z 631 $[M-162-H]^-$ (perda de unidade hexose), m/z 613 $[M-162-18-H]^-$ (perda de unidade de hexose e uma molécula de água), m/z 569 $[M-18-44-H]^-$ (perda de CO_2) e de m/z 455 $[M-162-176H]^-$ referente ao ácido oleanólico. As fragmentações sugerem que perdas dos grupos hidroxila e carboxila ocorrem apenas após a perda de uma unidade de hexose, o que sugere que esta unidade de hexose está ligada ao C-28 do ácido oleanólico, protegendo o grupo carboxílico, evitando que este seja fragmentado.

A substância **7** apresentou padrão de fragmentação semelhante àquele das substâncias supracitadas. O íon referente à molécula desprotonada de m/z 1117 $[M-H]^-$, ao ser fragmentado na fragmentação MS2, originou o íon produto de m/z 955 $[M-162-H]^-$, evidenciando a perda de uma unidade de hexose. Na fragmentação MS3 o íon precursor de m/z 955 originou o íon produto de m/z 793 $[M-162-162-H]^-$ (perda de duas unidades de hexose). A fragmentação em MS4 do íon precursor de m/z 793 gerou os íons produtos m/z 631 $[M-162-162-162-H]^-$ (perda de três unidades de hexose), m/z 613 $[M-18-H]^-$ (perda de três unidades de hexose e uma molécula de água), m/z 569 $[M-18-44-H]^-$ (perda três uniade de hexose, uma molécula de água e de CO_2) e de m/z 455 $[M-162-176-H]^-$ referente ao ácido oleanólico. Com base nesses resultados sugerimos a substância **7** como a **Calendulaglicosídeo A** (UKIYA et al, 2006).

Através das sucessivas fragmentações em espectrômetro de massas sugerimos que a substância **8** seja a **Aralosídeo C** (WANG et al, 2017). Esta substância apresentou o íon referente à molécula desprotonada de m/z 1087 $[M-H]^-$ que ao ser fragmentado em MS2 originou o íon produto de m/z 925 $[M-162-H]^-$ (perda de uma unidade de hexose). O íon precursor de m/z 925 gerou os íons produtos de m/z 793 $[M-162-132-H]^-$ (perda de uma unidade de hexose e uma

unidade de pentose) e de m/z 763 $[M-162-162-H]^-$ (perda de duas unidades de hexose), na fragmentação MS3. Na fragmentação MS4 o íon de m/z 793 originou os íons de m/z 631 $[M-162-132-162-H]^-$ (perda de duas unidades de hexose e uma unidade de pentose), m/z 613 $[M-162-132-162-18-H]^-$ (perda de duas unidades de hexose, uma unidade de pentose e uma molécula de água), m/z 569 $[M-162-132-162-18-44-H]^-$ (perda de duas unidades de hexose, uma unidade de pentose, uma molécula de água e de CO_2) e de m/z 455 $[M-162-132-162-176H]^-$ referente ao ácido oleanólico, simultaneamente o íon precursor m/z 763 gerou os íons produtos m/z 631 $[M-162-162-132-H]^-$ (perda de duas unidades de hexose e uma unidade de pentose), m/z 613 $[M-162-162-132-18-H]^-$ (perda de duas unidades de hexose, uma unidade de pentose e uma molécula de água), m/z 569 $[M-162-162-132-18-44-H]^-$ (perda de duas unidades de hexose, uma unidade de pentose, uma molécula de água e de CO_2) e o de m/z 455 $[M-162-162-132-176H]^-$ referente ao ácido oleanólico.

No experimento *FIA-ESI-IT-MSⁿ* a substância **9** apresentou o íon referente à molécula desprotonada de m/z 1249 $[M-H]^-$. Ao ser fragmentado na fragmentação MS2 originou os íons de m/z 1087 $[M-162-H]^-$ (perda de uma unidade de hexose), m/z 955 $[M-162-132-H]^-$ (perda de uma unidade de hexose e uma unidade de pentose) e de m/z 925 $[M-162-162H]^-$ (perda de duas unidades de hexose). O MS3 do íon de m/z 1087 gerou o íon produtos de m/z 925 $[M-162-162-H]^-$, tal fragmentação sugere a perda de uma segunda unidade de glicose. Por sua vez, o MS3 do íon de m/z 955 $[M-162-132-H]^-$ gerou os íons produtos de m/z 793 $[M-162-162-132-H]^-$ caracterizando a perda de duas unidades de hexose e uma unidade de pentose, m/z 613 $[M-162-162-132-176-18-H]^-$ referente à perda de duas unidades de hexose, uma de pentose, do ácido glicurônico e uma molécula de água, o grupo de

íons de m/z 595 $[M-162-162-132-176-18-18-H]^-$ (perda de duas unidades de hexose, uma unidade de pentose, a perda do ácido glicurônico e duas molécula de água) e de m/z 551 $[M-162-162-132-176-18-18-44-H]^-$ (perda de duas unidades de hexose, uma unidade de pentose, a perda do ácido glicurônico, duas molécula de água e um CO_2) e o íon de m/z 455 $[M-162-162-132-180-158H]^-$ chegando ao *core* proposto para as saponinas desta espécie. Com base nessas fragmentações e no *core* de *R. teres* sugerimos a substância **9** como um derivado di-glicosilado da **Aralosídeo A** (WANG et al, 2018). Esta saponina ainda não havia sido descrita até o momento.

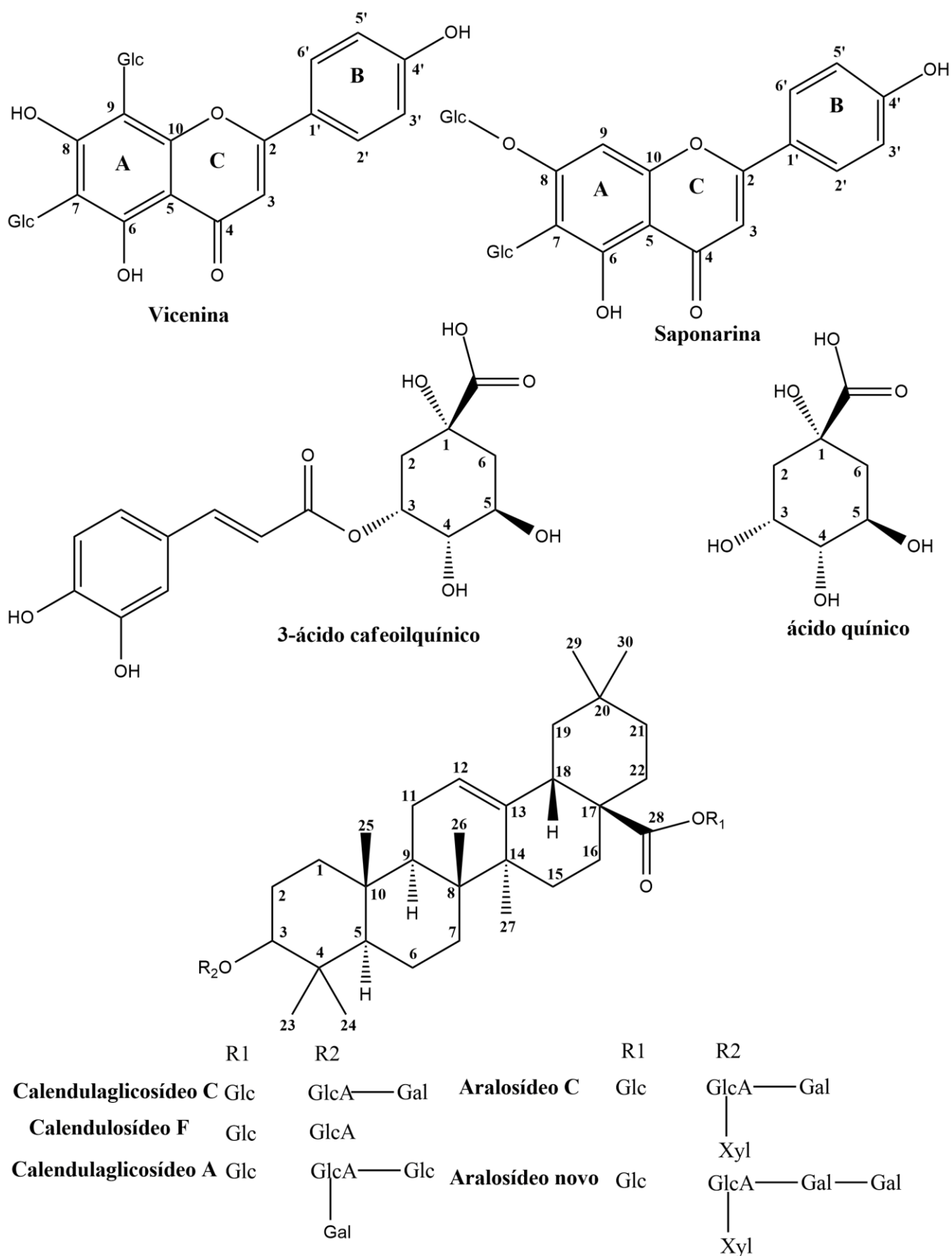


Figura 9: Substâncias identificadas no extrato EtOH 70% de *Rhipsalis teres*

As substâncias majoritárias encontradas no extrato EtOH 70% de *R. teres* sugerem que os usos populares empregados para esta espécie podem estar relacionados principalmente às saponinas. Dentre as diversas atividades relatadas para as saponinas, duas chamam atenção com relação ao tratamento de pneumonia e doenças coronárias, sendo essas a atividade anti-inflamatória e a propriedade de complexação com colesterol (LOPEZ-ROMERO et al, 2017; SIMÕES et al, 2010; FRANCIS et al, 2002). A pneumonia é uma doença infecciosa que induz a uma forte ação inflamatória podendo ser utilizada muitas vezes como diagnóstico (MÉNDEZ et al, 2018). Dessa forma, substâncias com propriedades anti-inflamatórias são constantemente utilizadas no tratamento desta doença. Assim como na pneumonia, doenças coronárias induzem reações inflamatórias provocadas pelo estresse oxidativo causado pelo acúmulo de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) (SUBIRANA et al, 2018). Portanto, o extrato EtOH 70% de *Rhipsalis teres* pode apresentar grande potencial terapêutico no tratamento de pneumonia e doenças cardíacas corroborando o uso popular dessa espécie.

Panorama químico do gênero Rhipsalis

Através dos cromatogramas obtidos por *HPLC-PDA-ELSD* observou-se três faixas distintas de tempos de retenção contendo grupos de substâncias similares.

O primeiro grupo foi detectado entre os tempos de retenção 0 a 26 min no comprimento de onda 254 nm (Figura 10). O segundo grupo foi observado entre os tempos de retenção 26 a 40 min nos comprimentos de onda de 254 nm e 360 nm (Figura 11). O terceiro grupo de substâncias foi detectado a partir dos 40min e não apresentou espectro de absorvância, sendo possível detectá-los apenas por *ELSD* (Figura 12).

Estes resultados sugeriram que o primeiro grupo pertencia à classe dos ácidos fenólicos por apresentarem alta polaridade e apenas um comprimento de onda em seu espectro de absorbância (NETO et al, 2018); observou-se também grande quantidade de açúcares que eluíram na faixa de *rt* 0-5 min. O segundo grupo apresentou características de flavonoides, uma vez que apresentou alta-média polaridade e espectro apresentava duas bandas de absorção máxima (254nm e 360nm) correspondendo aos anéis A e B (RICE-EVANS et al, 1996), enquanto o terceiro grupo não apresentou absorção em nenhum comprimento de onda e média-baixa polaridade indicando a classe das saponinas (YANG et al, 2018; LEBOT et al, 2018), descritas na seção anterior.

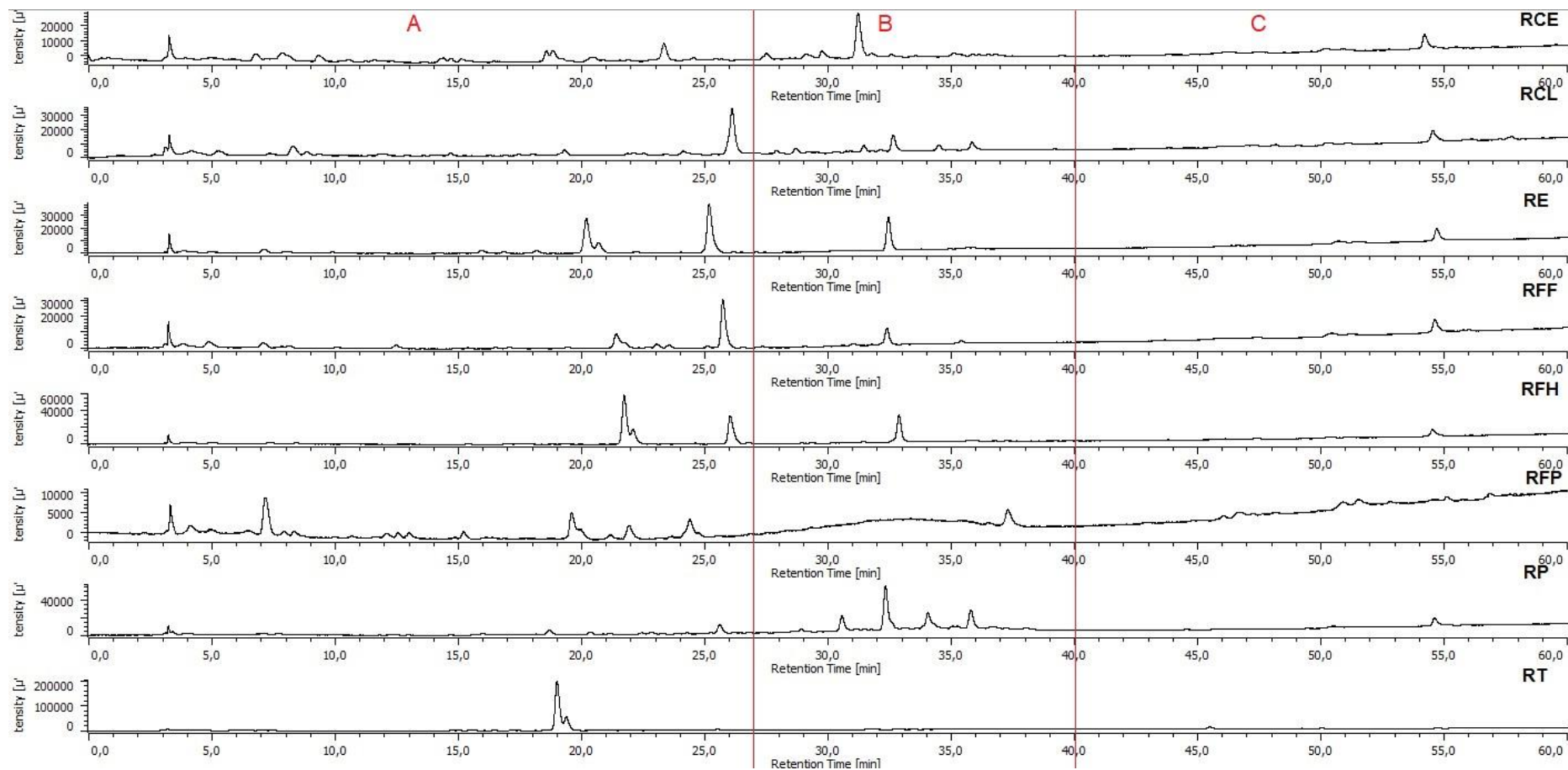


Figura 10: Cromatograma da análise por HPLC das espécies do gênero *Rhipsalis* (λ 254 nm)

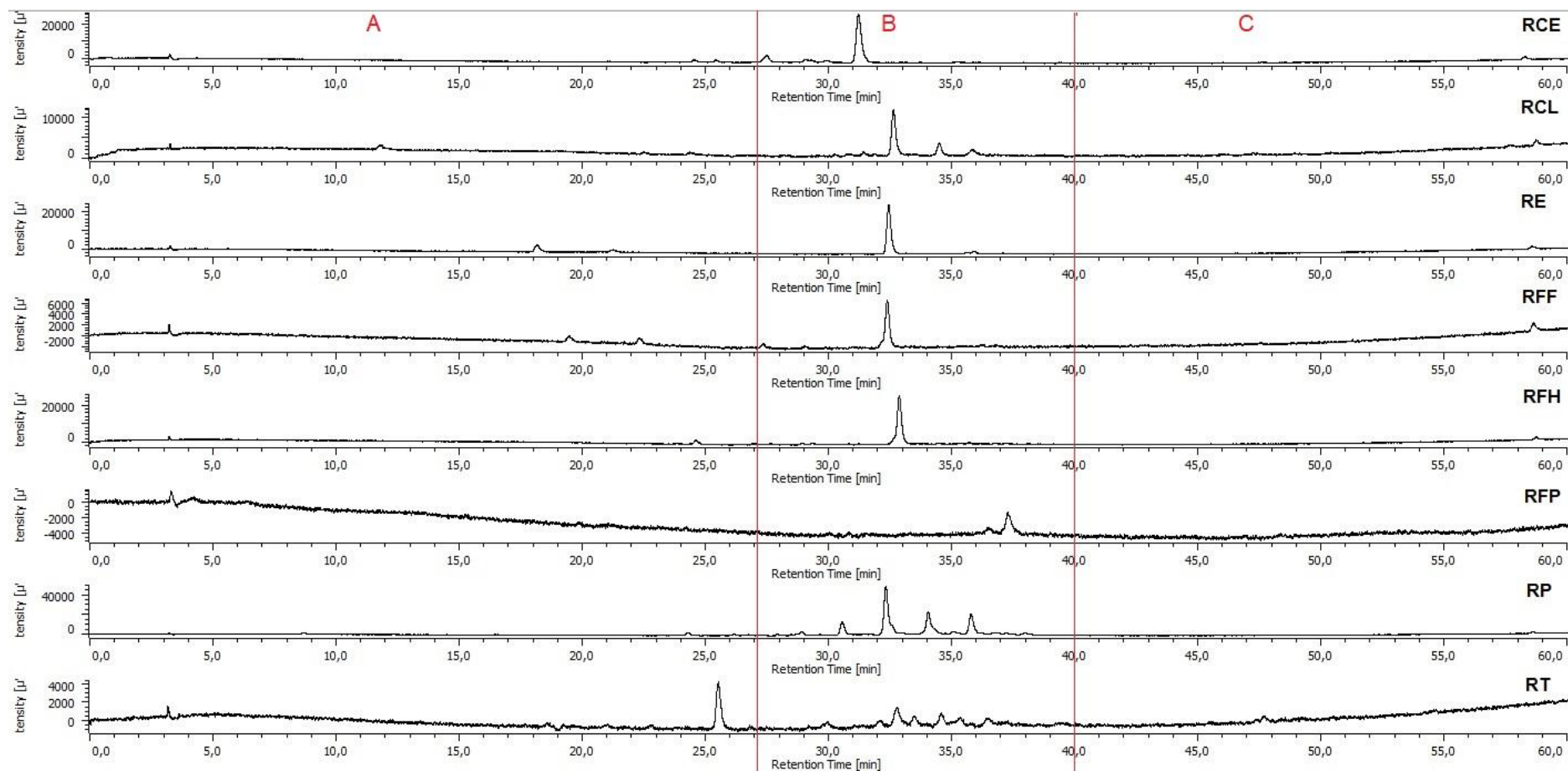


Figura 11: Cromatograma da análise por HPLC das espécies do gênero *Rhipsalis* (λ 360 nm)

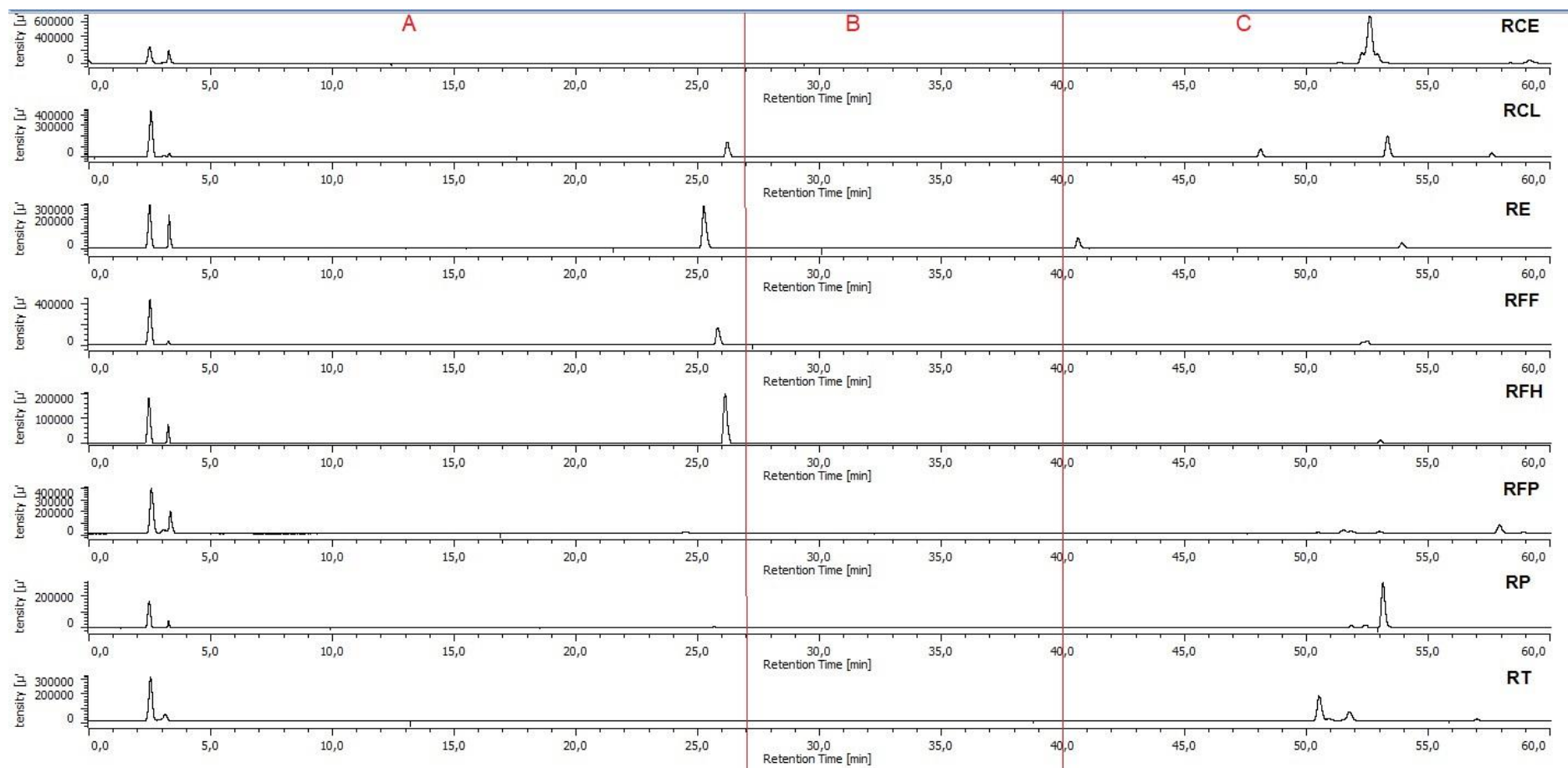


Figura 12: Cromatograma da análise por HPLC das espécies do gênero *Rhipsalis* (Detector ELSD)

O experimento *UPLC-MS* associado aos experimentos *UPLC-PDA* e *FIA-ESI-IT-MSⁿ* permitiu sugerir a presença de 36 substâncias, das quais 8 são pertencentes à classe dos flavonoides e 28 à classe das saponinas (tabela 5). Não foi possível detectar os compostos fenólicos presentes nos extratos, uma vez que o tempo de corrida cromatográfica foi reduzido, comprimindo o cromatograma; consequentemente, os compostos fenólicos foram aglutinados com os açúcares impossibilitando a análise.

Tabela 5: Substâncias sugeridas presentes no gênero *Rhipsalis*.

<i>rt</i> (min)	<i>m/z</i>	MS ⁿ [M-H] ⁺	espécies de ocorrência	absorbância máx(nm)	Substância
3.77	593	503/473-383/353-365-271	RT	270,330	apigenina-Chex-Chex
3.79	593	431-341/311	RT	270,331	apigenina-Ohex-Chex
3.99	755	609-301	RP	260,360	quercetina-hex-dhex-dhex
4.25	739	593 - 447 – 285	RCE, RE, RP	270,330	luteolina-hex-dhex-dhex
4.3	769	623-477-315	RFF, RFH	260,360	metil-quercetina-hex-dhex.dhex
4.34	901	739 - 593 - 447 – 285	RCL	270,330	luteolina-hex-dhex-dhex-hex
4.8	285	256 – 241	RP	270,330	Luteolina
4.93	985	823 - 661 – 485	RE		ác. metilidroxioleanólico-glicA-hex-hex
4.99	1133	971 - 809 - 647 – 471	RFF, RT		ác. hidroxioleanólico-glicA-hex-hex-hex
5.04	623	477-315	RFP	260,360	metil-quercetina-hex-dhex
5.16	1103	971-809 - 647 – 471	RCE, RFP		ác. hidroxioleanólico-glicA-hex-hex-pent
5.32	971	809 - 647 – 471	RFF		ác. hidroxioleanólico-glicA-hex-hex
5.32	985	823 - 661 – 485	RE, RFF		ác. metilidroxioleanólico-glicA-hex-hex
5.45	809	647 – 471	RFF, RFP RT		ác. hidroxioleanólico-glicA-hex
5.45	823	661 – 485	RE, RFF		ác. hidroxioleanólico-glicA-hex-hex
5.45	941	779 - 647 – 471	RCE, RFP		ác. hidroxioleanólico-glicA-hex-pent
5.67	985	823 - 661 – 485	RE		ác. metilidroxioleanólico-glicA-hex-hex
5.77	971	809 - 647 – 471	RT		ác. hidroxioleanólico-glicA-hex-hex
6.04	1249	1087 - 925 - 793 - 631 -455	RCE		ác. hidroxioleanólico-glicA-hex-hex
6.22	823	661 – 485	RE		ác. metilidroxioleanólico-glicA-hex
6.23	1249	1087 - 925 - 793 - 631 -455	RCE		ác. oleanólico-glicA-pent-hex-hex-hex
6.3	971	809 - 647 – 471	RCL		ác. hidroxioleanólico-glicA-hex-hex
6.37	661	485	RE		ác. metilidroxioleanólico-glicA
6.4	1249	1087 - 955/925 - 793/763 – 455	RT		ác. oleanólico-glicA-pent-hex-hex-hex
6.52	1117	955 - 793 -631 – 455	RP, RT		ác. oleanólico-glicA-hex-hex-hex

6.53	1087	925 - 763 -631 – 455	RCE,RFP	ác. oleanólico-glicA-hex-pent-hex
6.53	1219	1087-925 - 763 -631 – 455	RFP	ác. oleanólico-glicA-pent-hex-hex-pent
6.61	1087	925 - 763 -631 – 455	RCE, RP, RT	ác. oleanólico-glicA-hex-pent-hex
6.72	955	793 - 631 – 455	RE, RFF, RFP RP, RT	ác. oleanólico-glicA-hex-hex
6.79	1057	895 - 763 - 631 – 455	RCE, RFH, RFP, RP	ác. oleanólico-glicA-pent-pent-hex
6.84	925	763 - 631 – 455	RCE, RFF, RFH, RP, RT	ác. oleanólico-glicA-pent-hex
6.89	793	631 – 455	RE, RFF, RFP, RT	ác. oleanólico-glicA-hex
7.34	955	793 - 631 – 455	RCL, RT	ác. oleanólico-glicA-hex-hex
7.37	925	763 - 631 – 455	RP, RT	ác. oleanólico-glicA-pent-hex
7.55	763	631 – 455	RCE, RP	ác. oleanólico-á. glic-pent
7.55	793	631 – 455	RFP, RT	ác. oleanólico-glicA-hex

RCE - *Rhipsalis cereuscula*; RCL - *Rhipsalis clavata*; RE - *Rhipsalis elliptica*; RFF - *Rhipsalis floccosa floccosa*; RFH - *Rhipsalis floccosa hohenauensis*; *Rhipsalis floccosa pulvinigera*; RP - *Rhipsalis paradoxa*; RT - *Rhipsalis teres*; Pent - pentose; DHex - Desoxiexose; Hex - hexose; glicA - ácido glicurônico; Chex – hexose C-ligada; Ohex – hexose O-ligada

Com a elucidação das principais substâncias, observamos que as saponinas presentes no gênero *Rhipsalis* são predominantemente derivadas do ácido oleanólico. Entretanto, em algumas substâncias foi possível observar derivados hidroxilados (m/z 471) e metoxilados (m/z 485). Ao analisarmos as unidades sacarídicas das saponinas, foi observado que em todas as substâncias havia uma unidade de ácido glicurônico ligada diretamente à aglicona. Nos casos em que havia ocorrência de mais de uma unidade sacarídica ligada à aglicona, esta se apresentava seguindo o mesmo padrão observado no item anterior: uma unidade de ácido glicurônico ligada ao C-3 da aglicona e uma unidade de hexose ligada ao C-28 da aglicona, enquanto que os demais açúcares se ligavam em cadeia linear a partir do ácido glicurônico. Esta constatação foi possível através dos padrões de fragmentação em que em todas as moléculas sempre ocorria a perda de um grupo carboxila após a perda de uma hexose, sugerindo que esta hexose protege o grupamento carboxila situado no C-28 do ácido oleanólico.

Os flavonoides, apesar de menos abundantes, apresentaram maior variação estrutural. As agliconas apresentaram íons de m/z 271, m/z 285, m/z 301 e m/z 315 (SALIM et al, 2018; FERRERES et al, 2018; ROY et al, 2015) as quais foram identificadas por seus espectros de absorbância como apigenina, luteolina, quercetina e quercetina metilada (ZHANG et al, 2018; FERRERES et al, 2018), respectivamente. Os açúcares apresentavam-se, principalmente, O-ligados em cadeias de no máximo quatro açúcares. Entretanto, duas substâncias derivadas da apigenina apresentaram padrões diferentes nas ligações entre a aglicona e os açúcares. A **vicenina II** possui dois açúcares ligados diretamente aos carbonos da aglicona promovendo a fragmentação subsequente de m/z 120 e m/z 90

observados (FERRERES et al, 2018; FERRERES et al, 2003), diferentemente das hexoses ligadas ao oxigênio da aglicona, que mostram perdas de 162 Da (FERRERES et al, 2018). No caso da **Saponarina**, esta substância apresenta um dos açúcares ligados ao oxigênio da aglicona e outro ao carbono correspondendo à fragmentação observada da perda de m/z 162 referente a uma hexose e das perdas de m/z 120 e m/z 90 em sequência (BRAUCH et al, 2018).

Assim, com base nos resultados obtidos por *UPLC-PDA* e *FIA-ESI-IT-MSⁿ* foi possível à identificação do *fingerprint* de cada uma das espécies e subespécies analisadas (Tabela 6).

Tabela 6: *Fingerprint* sugerido para cada espécie do gênero *Rhipsalis* avaliada.

	<i>rt</i> (min)	<i>m/z</i> [M-H] ⁺	fragmentação <i>MS</i> ⁿ	Substância proposta
<i>Rhipsalis cereuscula</i>	6.6	1087	925 - 763 - 631 – 455	ác. oleanólico-glicA-hex-pent-hex
	6.78	925	763 - 631 – 455	ác. oleanólico-glicA-pent-hex
<i>Rhipsalis clavata</i>	4.34	901	739 - 593 - 447 – 285	luteolina-hex-dhex-dhex-hex
	6.26	971	809 - 647 – 471	ác. hidroxioleanólico-glicA-hex-hex
	6.8	1013	851 - 584 – 513	NI
	7.2	955	793 - 631 – 455	ác. oleanólico-glicA-hex-hex
<i>Rhipsalis elliptica</i>	4.32	739	593 - 447 – 285	luteolina-hex-dhex-dhex
	5.28	985	823 - 661 – 485	ác. metilhidroxioleanólico -glicA-hex-hex
	5.37	823	661 – 485	ác. metilhidroxioleanólico -glicA-hex-hex
	6.22	823	661 – 485	ác. metilhidroxioleanólico-glicA -glicA-hex-hex
	6.37	661	485	ác. metilhidroxioleanólico-glicA
	6.83	793	631 – 455	ác. oleanólico-glicA-hex
<i>Rhipsalis floccosa floccosa</i>	5.34	971	809 - 647 – 471	ác. hidroxioleanólico-glicA-hex-hex
	6	1013	851 - 584 – 513	NI
	6.68	955	793 - 631 – 455	ác. oleanólico-glicA-hex-hex
<i>Rhipsalis floccosa hohenauensis</i>	5.34	971	809 - 647 – 471	ác. hidroxioleanólico-glicA-hex-hex
	6.67	925	763 - 631 – 455	ác. oleanólico-glicA-pent-hex
<i>Rhipsalis floccosa pulvinigera</i>	6.69	955	793 - 631 – 455	ác. oleanólico-glicA-hex-hex
	6.83	793	631 – 455	ác. oleanólico-glicA-hex
	7.46	793	631 – 455	ác. oleanólico-glicA-hex
<i>Rhipsalis paradoxa</i>	3.99	755	609-301	quercetina-hex-dhex-dhex
	4.32	739	593 - 447 – 285	luteolina-hex-dhex-dhex
	4.8	285	256 – 241	luteolina
	6.61	1087	925 - 763 - 631 – 455	ác. oleanólico-glicA-hex-pent-hex
	6.69	1057	895 - 763 - 631 – 455	ác. oleanólico-glicA-pent-pent-hex
	6.78	925	763 - 631 – 455	ác. oleanólico-glicA-pent-hex
<i>Rhipsalis teres</i>	6.4	1249	1087 - 925 - 793 - 631 -455	ác. oleanólico-glicA-pent-hex-hex-hex
	6.57	1117	955 - 793 - 631 – 455	ác. oleanólico-glicA-hex-hex-hex
	6.72	955	793 - 631 – 455	ác. oleanólico-glicA-hex-hex
	6.87	793	631 – 455	ác. oleanólico-glicA-hex

ác. oleanólico = ácido oleanólico; glicA = ácido glicurônico; pent = pentose; dhex = desoxiexose; hex = hexose; NI = não identificada

Análise de componentes principais (PCA)

A análise por PCA dos dados obtidos por UPLC-MS das 6 espécies e 2 subespécies avaliadas de *Rhipsalis* sugeriu, tanto para os dados semi-quantitativos (figura 13) quanto para os dados qualitativos (presença e ausência) (Figura 14), a presença de um subgrupo **A** contendo as espécies *Rhipsalis clavata*, *Rhipsalis elliptica*, *Rhipsalis floccosa floccosa*, *Rhipsalis floccosa hohenauensis* e *Rhipsalis floccosa pulvinigera*. As outras espécies (*Rhipsalis cereuscula*, *Rhipsalis paradoxa* e *Rhipsalis teres*) não formaram grupos e situaram-se distantes entre si no espaço amostral. Entretanto, a análise dos dados semi-quantitativos apresentou maior distância entre as espécies quando comparada à análise dos dados qualitativos.

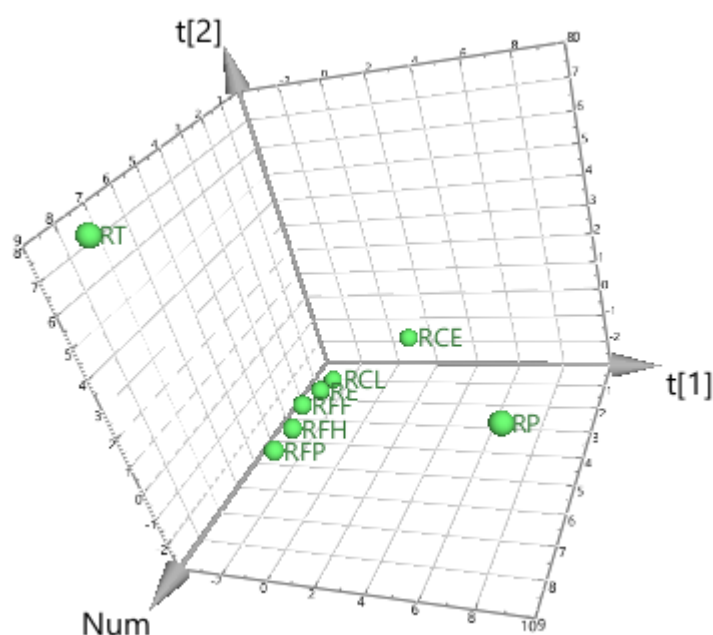


Figura 13: Gráfico 3D da distribuição das espécies de *Rhipsalis* por análise de componentes principais dos dados semi-quantitativos

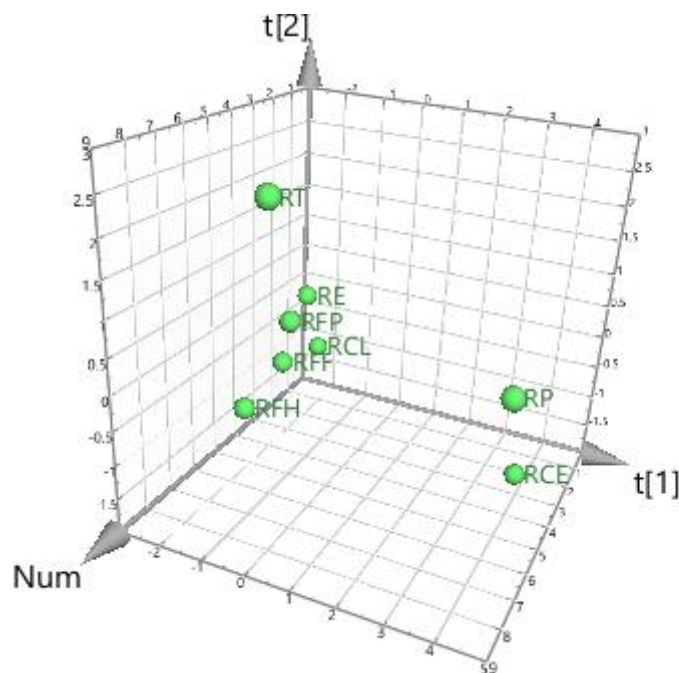


Figura 14: Gráfico 3D da distribuição das espécies de *Rhipsalis* por análise de componentes principais dos dados qualitativos

Este resultado é mais evidente quando avaliamos os dados semi-quantitativos e qualitativos por HCA. A HCA dos dados qualitativos também aponta um grupo principal composto pelas espécies *R. clavata*, *R. elliptica*, *R. floccosa floccosa*, *R. floccosa hohenauensis* e *R. floccosa pulvinigera*. Porém, *R. teres* ocorre em um grupo próximo do principal, enquanto *R. cereuscula* e *R. paradoxa* formam outro grupo hierárquico, no qual cada uma compõe um subgrupo deste (Figura 15), porém a diferença na similaridade entre os grupos é inferior a 5 (Figura 16). Para os dados semi-quantitativos, a HCA apontou a formação de um grupo principal composto pelas mesmas espécies das análises anteriores e simultaneamente evidenciou um subgrupo com as subespécies de *R. floccosa*, entretanto, as espécies *R. cereuscula*, *R. paradoxa* e *R. teres* formaram cada uma um grupo distinto (Figura 17) e apresentaram diferenças na similaridade que variaram entre 3 e 8,9 (Figura 18).

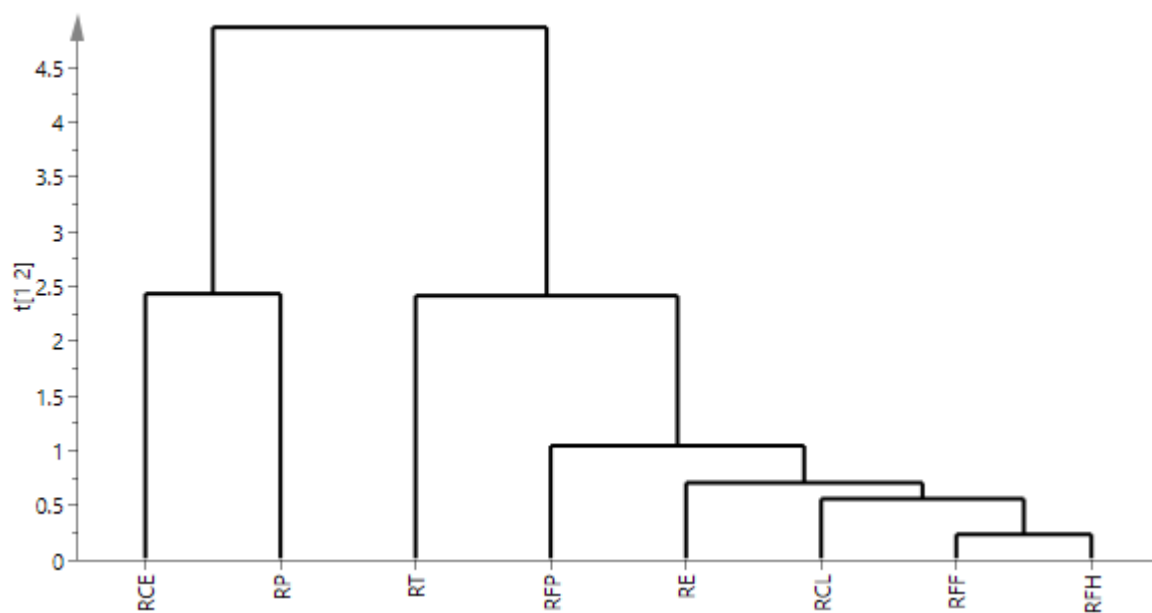


Figura 15: Dendrograma obtido por *HCA* dos dados qualitativos dos extratos MeOH

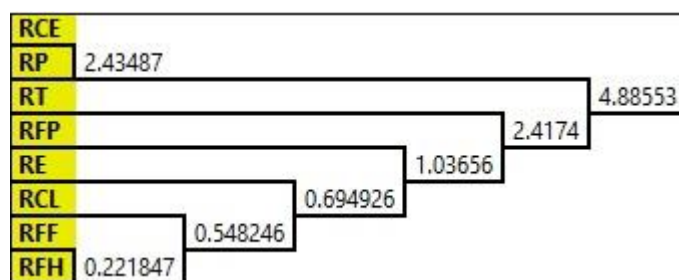


Figura 16: Dendrograma obtido por *HCA* dos dados qualitativos dos extratos MeOH com os valores exatos da distância observada entre cada agrupamento

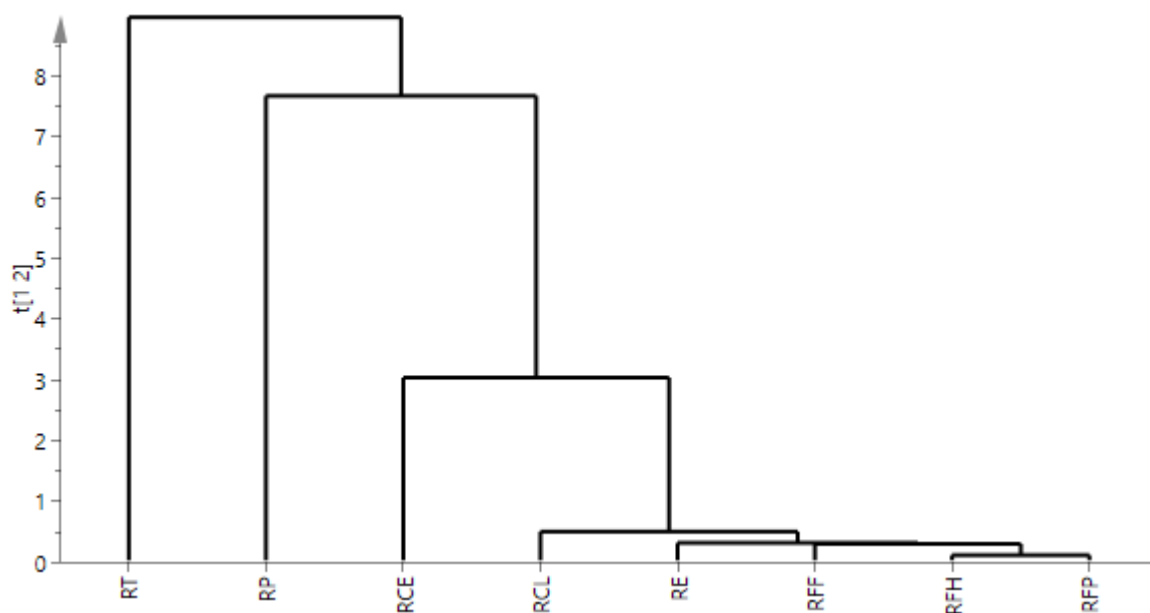


Figura 17: Dendrograma obtido por *HCA* dos dados quantitativos dos extratos MeOH

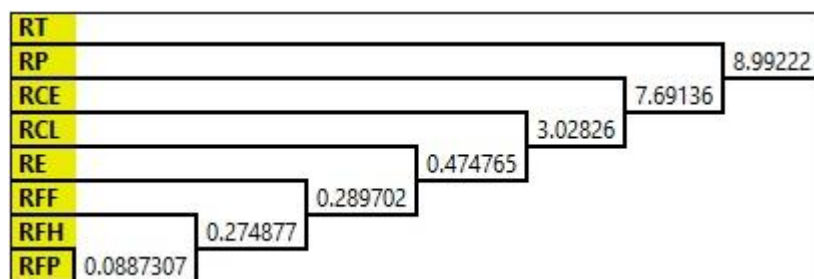


Figura 18: Dendrograma obtido por HCA dos dados quantitativos dos extratos MeOH com os valores exatos da distância observada entre cada agrupamento

Do ponto de vista dos resultados qualitativos, as substâncias avaliadas apresentaram pouca variação em sua diversidade. Desta forma, a análise de HCA apontou baixa diferença na similaridade entre as espécies sugerindo que, assim como as características morfológicas, há uma intergradação no perfil químico das espécies de *Rhipsalis* tornando os dados qualitativos ineficientes na identificação das espécies.

Com relação aos resultados quantitativos, foram observadas variações significativas no teor das substâncias avaliadas. Através da análise de HCA foi observada maior diferença na similaridade entre as espécies, indicando que as espécies de *Rhipsalis* apresentam pouca diversidade de substâncias entre elas, porém há grande variação na abundância dessas substâncias entre as espécies. Em vista disto, dados quantitativos são necessários para a identificação das espécies pertencentes à *Rhipsalis*.

No que diz respeito à filogenia, os dados semi-quantitativos se alinharam de maneira mais aproximada com a proposta filogenética de KOROTKOVA et al (2011). Ao analisarmos nossos resultados à luz das árvores filogenéticas de CALVENTE et al. (2011) e de KOROTKOVA et al. (2011) (figura 19), o dendrograma obtido por HCA dos dados semi-quantitativos se aproximou ao cladograma de KOROTKOVA et al. (2011) com exceção de *R. elliptica* a qual

representa o grupo *Phyllarthrorhipsalis* (*Rhipsalis* de ramos achatados) e se encontra como grupo mais derivado nessa proposta. Em adição, nossos resultados sugerem uma posição intermediária entre *R. floccosa* (*Calamorhipsalis*) e *R. clavata* (*Erythrorhipsalis*). Por outro lado, o dendrograma obtido com base nos dados qualitativos não se alinhou com nenhuma das duas propostas (CALVENTE *et al.* 2011; KOROTKOVA *et al.* 2011).

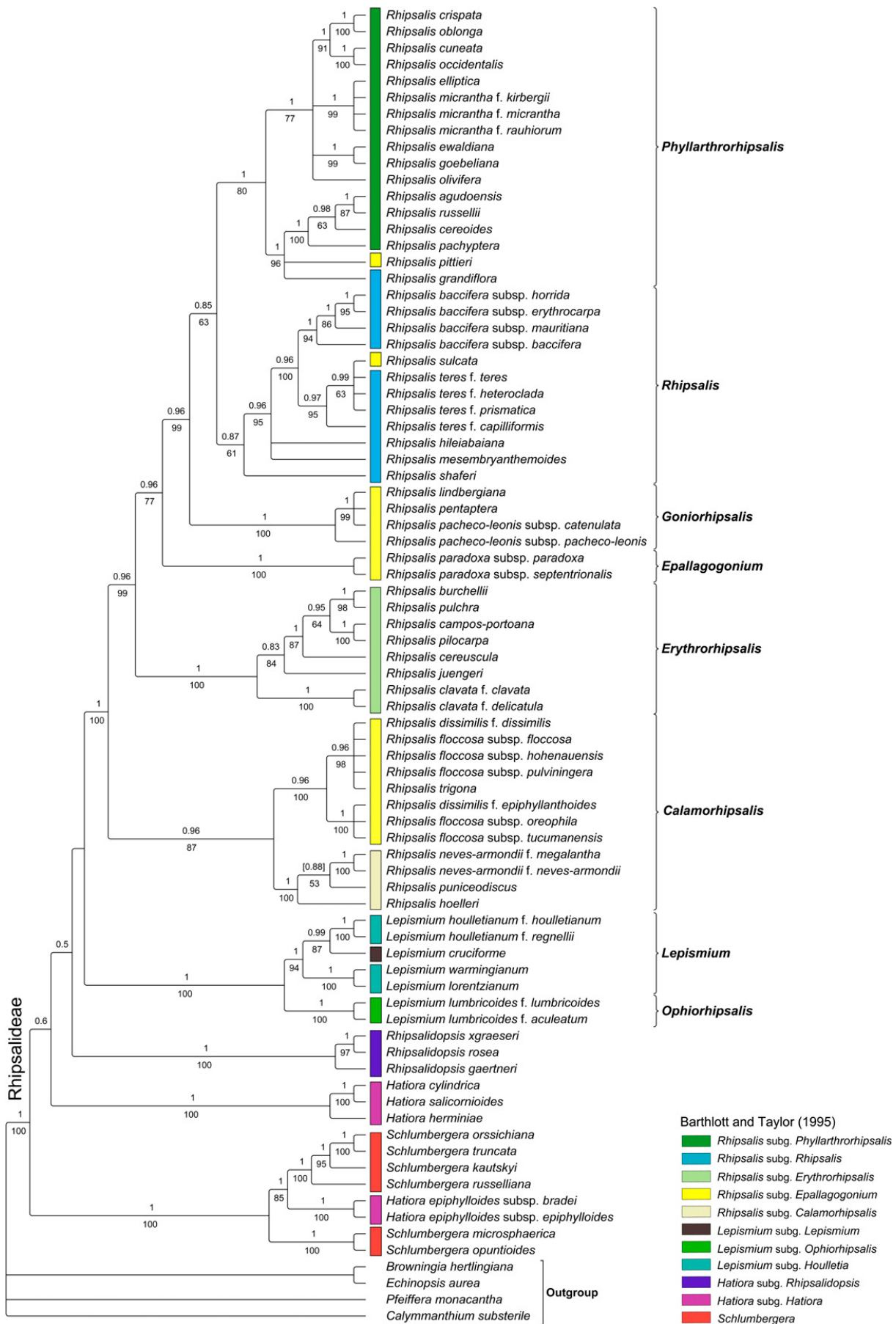


Figura 19: Proposta filogenética para o gênero *Rhipsalis* com base em marcadores moleculares (Korotkova et al. 2011)

Avaliação das atividades biológicas

A avaliação dos extratos EtOH 70% por *HPLC-DAD-ELSD* indicou a presença das mesmas substâncias identificadas nos extratos MeOH. Entretanto, nos cromatogramas obtidos por *light scattering* podemos observar que os picos majoritários são eluídos logo nos primeiros minutos indicando a elevada polaridade destas substâncias (Figura 20). Em contrapartida, nos cromatogramas obtidos por *DAD* os mesmo picos não foram detectados (Figura 21 e 22). Dadas as características obtidas para essas substâncias, as identificamos como sendo açúcares livres oriundos da hidrólise da mucilagem. Nos extratos EtOH 70%e foram observadas quantidades muito maiores desses açúcares quando comparados aos extratos MeOH.

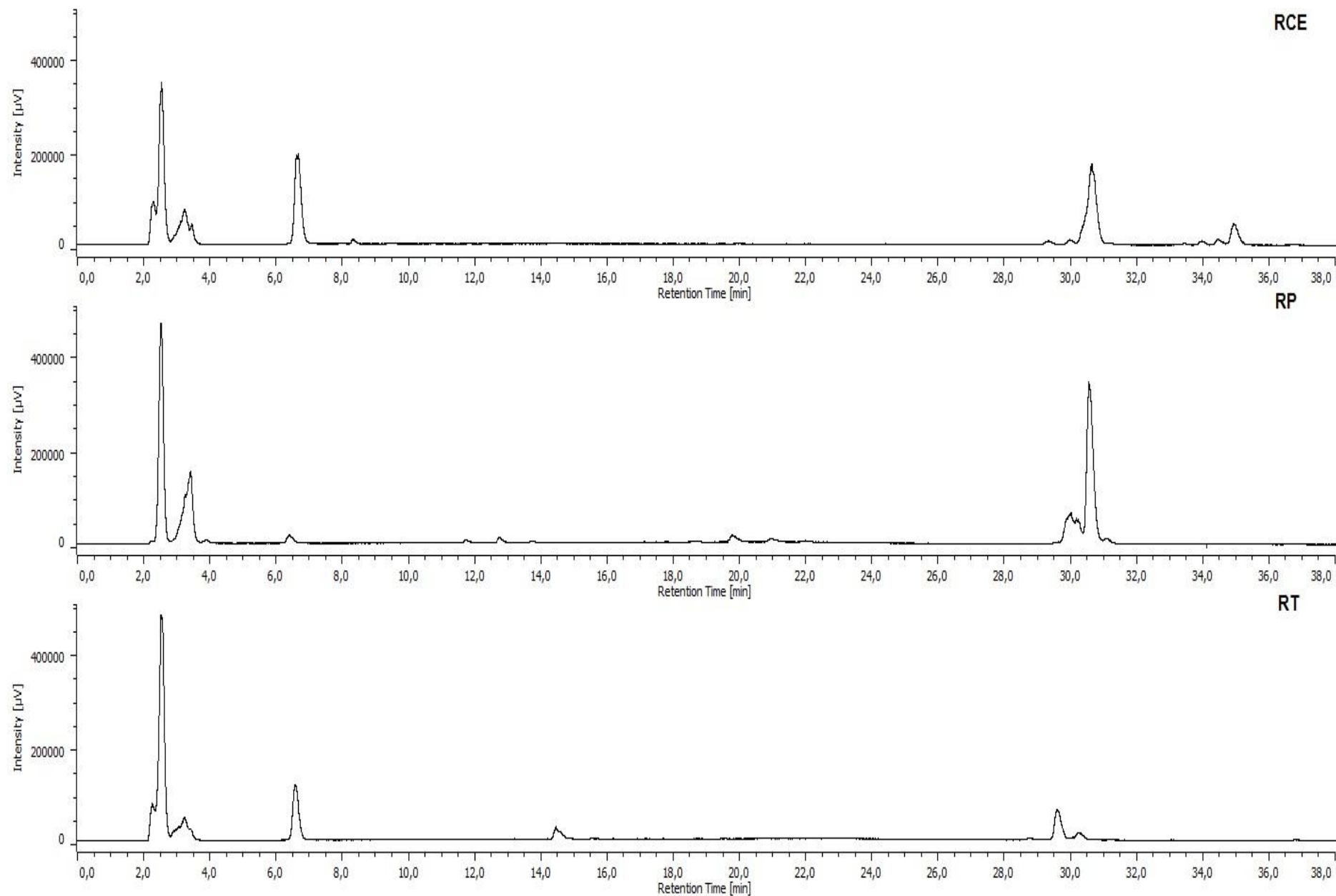


Figura 20: Cromatograma da análise por HPLC dos extratos EtOH 70% de *R. cereuscula*, *R. paradoxa* e *R. teres* (detector ELSD)

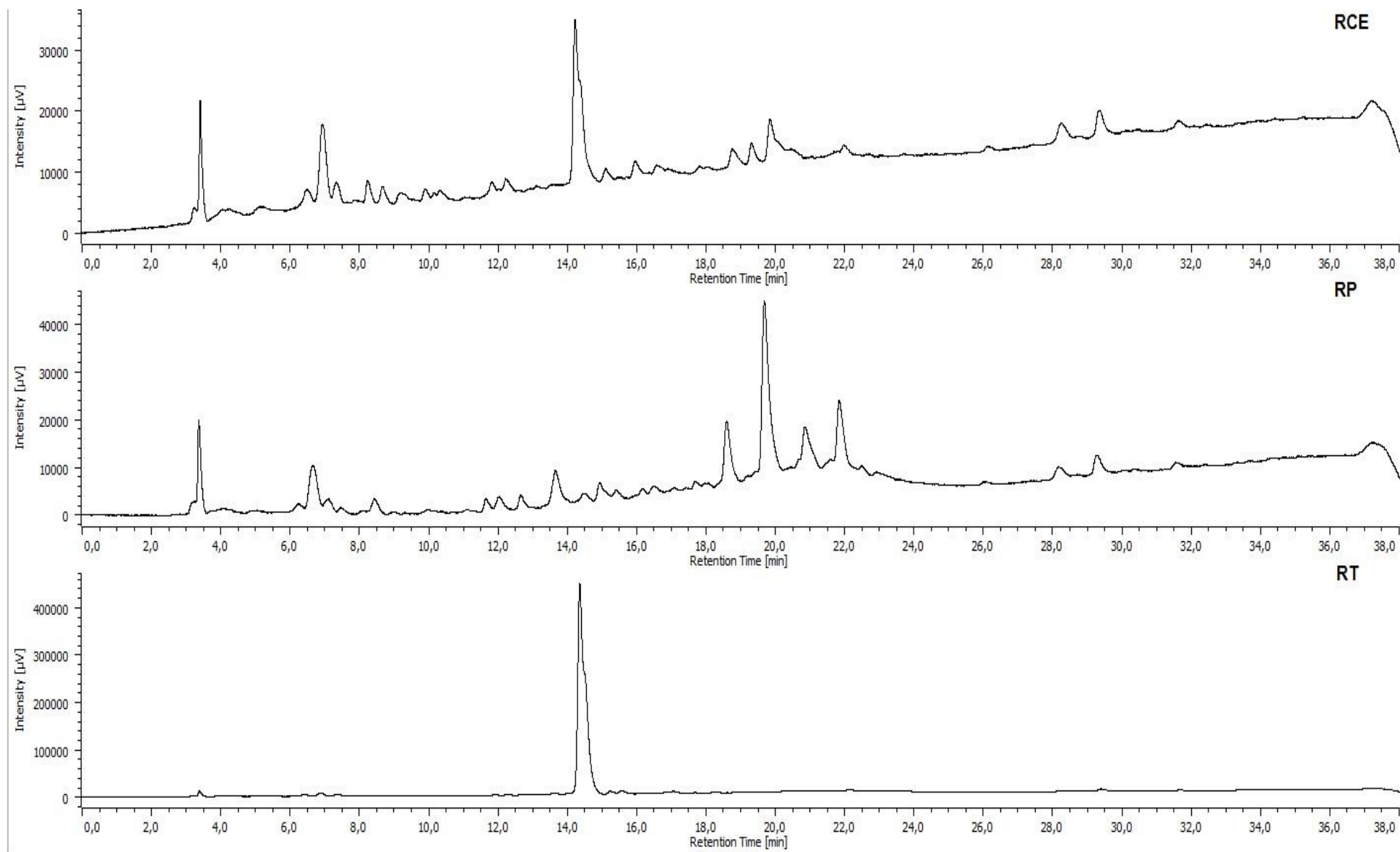


Figura 21: Cromatograma da análise por HPLC dos extratos EtOH 70% de *R. cereuscula*, *R. paradoxa* e *R. teres* (λ 254 nm)

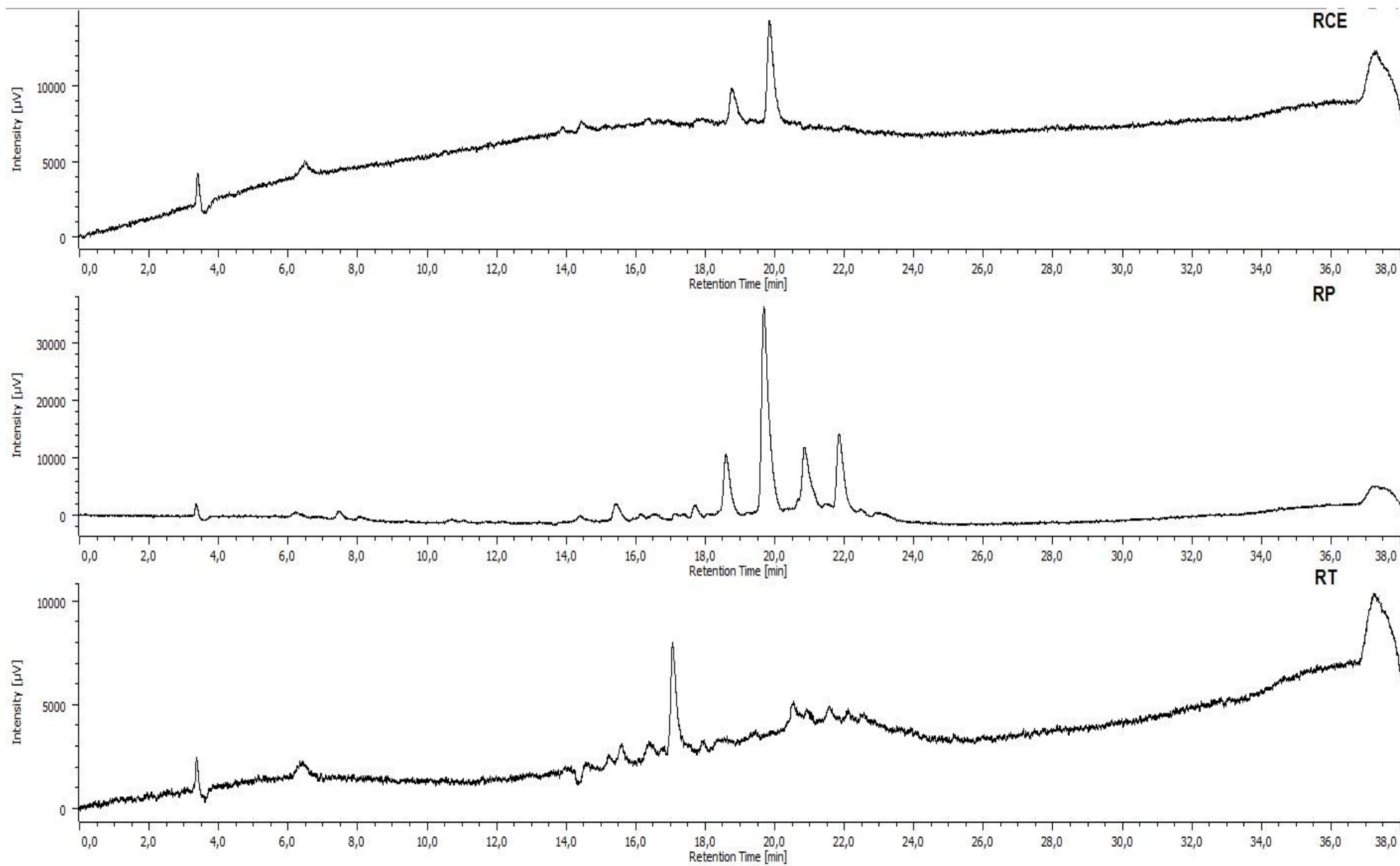


Figura 22: Cromatograma da análise por HPLC dos extratos EtOH 70% de *R. cereuscula*, *R. paradoxa* e *R. teres* (λ 360 nm)

Avaliação da atividade antioxidante

Das três espécies avaliadas apenas *R. paradoxa* apresentou atividade antioxidante significativa. Apesar disto, a atividade antioxidante apresentada foi relativamente baixa apresentando Atividade Antioxidante Total (AAT) de 4,1g/g (g de extrato/g de DPPH), concentração que induz metade do efeito máximo (EC₅₀) 576 µg/mL e atividade antioxidante equivalente a ácido gálico (EqAc.Gal) de 28,3 g/g (g de extrato/g de ácido gálico) (Figura 23).

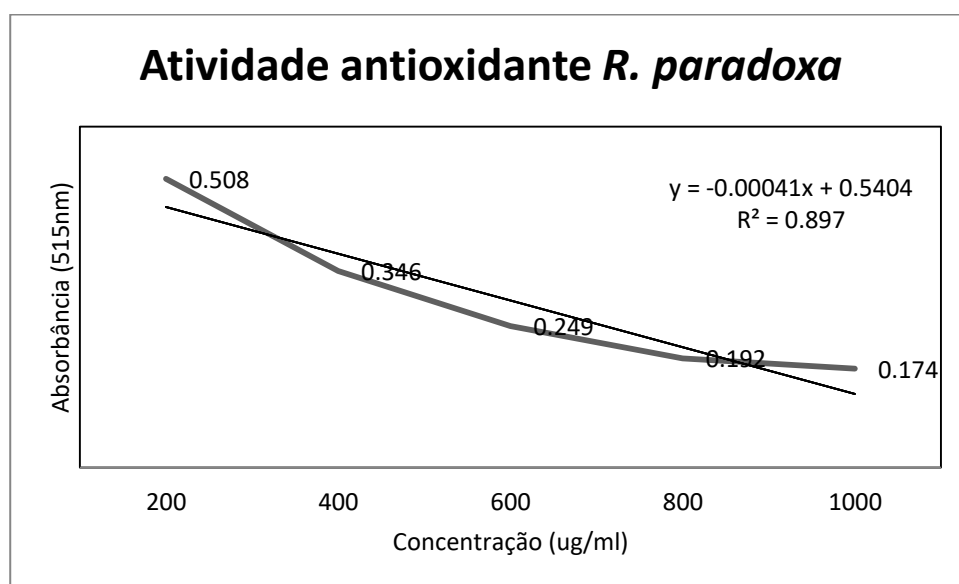


Figura 23: Curva da atividade antioxidante observada para o extrato EtOH 70% de *R. paradoxa*

Apesar da composição química de *Rhipsalis* spp e principalmente *R. paradoxa* indicar grande potencial antioxidante por apresentarem diversos compostos fenólicos como visto anteriormente, nossos resultados não corroboram este potencial. Diversos estudos afirmam que a atividade antioxidante está diretamente ligada ao teor de compostos fenólicos do extrato (IBRAHIM et al, 2017; MANIHURUK et al, 2016; NURLIRYANA et al, 2010). Um fator que pode estar influenciando os resultados foi o período de coleta das espécies. A estação escolhida foi o inverno com o intuito de diminuir o teor de água no material vegetal. Entretanto, diversos estudos apontam que com a redução de água em períodos de

seca, as porcentagens de açúcares livres e mucilagem aumentam nos tecidos vegetais, dado que a mucilagem é basicamente um polissacarídeo com função de armazenamento de água (ANDERSON, 2011; ARRUDA et al, 2005; NERD; NOBEL 1991; SUTTON et al, 1981). O estudo realizado por BUJOR et al (2018) sugere que extratos de mirtilo-vermelho (*Vaccinium vitis-idaea* L.), que contêm elevada concentração de açúcares, apresentam menor teor de compostos fenólicos e, conseqüentemente, menor atividade antioxidante. Portanto, provavelmente a baixa a moderada atividade apresentada pelo extrato de *R. paradoxa* é consequência da alta quantidade de açúcares na forma livre os quais sobrepõe claramente o teor dos compostos bioativos; dessa forma, a dosagem do extrato bruto não representa o valor real da dosagem das substâncias com potencial biológico diminuindo a eficiência do extrato.

Avaliação do potencial antifúngico in vitro

A Tabela 7 apresenta os resultados da determinação do potencial antifúngico dos extratos de *Rhipsalis* spp. elucidando os valores de CIM e CFM sobre as cepas de *Candida albicans*, *C. krusei*, *C. glabrata* e *C. parapsislosis*.

Tabela 7: A atividade antifúngica de extratos de *Rhipsalis* spp frente às espécies de *C. albicans*, *C. krusei*, *C. glabrata* e *C. parapsislosis*

Amostras	CIM / CFM (µg/mL)				
	<i>C. albicans</i> ATCC 10231	<i>C. krusei</i> ATCC 6258	<i>C. glabrata</i> ATCC 2001	<i>C. tropicalis</i> ATCC 750	<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019
<i>R. cereuscula</i>	1000/-	-/-	500/1000	1000/-	1000/-
<i>R. paradoxa</i>	1000/-	-/-	500/500	1000/-	1000/-
<i>R. teres</i>	1000/-	1000/1000	1000/-	1000/-	1000/-
DMSO	-	-	-	-	-

CIM= concentração inibitória mínima; CFM= concentração fungicida mínima; (-)= sem inibição

De acordo com os dados apresentados na Tabela 7 nota-se que as amostras vegetais exerceram padrões inibitórios distintos, entretanto, destacam-se os valores de inibição contra a espécie *C. glabrata*, sendo esta a espécie que mostrou maior suscetibilidade aos derivados vegetais empregados na investigação.

A pesquisa científica voltada à busca de novas substâncias bioativas com potencialidade antimicrobiana não apresenta uma classificação consensual em relação aos valores de CIM obtidos por derivados vegetais frente à micro-organismos patogênicos. Em um estudo realizado por ALIGIANNIS et al. (2001), foram considerados como inibidores potentes os extratos que apresentaram valores de CIM iguais ou menores que 500 µg/mL; valores entre 600 e 1500 µg/mL como inibidores moderados e acima de 1600 µg/mL como inibidores fracos. O estudo desenvolvido por GALUCCI et al (2014) considerou como promissores compostos inibitórios de cepa de *Candida* spp. com concentrações que apresentaram CIM inferiores a 1000 µg/mL. Neste sentido, os resultados reportados nesta investigação mostram-se promissores especialmente em investigações que visam buscar uma nova alternativa terapêutica de infecções causadas por *C. glabrata*.

Provavelmente, a atividade observada está relacionada às saponinas. Essas substâncias apresentam capacidade de alterar a membrana plasmática que indiretamente pode apresentar atividade antifúngica (SIMÕES et al. 2010).

Entretanto, para se obter resultados condizentes com as substâncias bioativas dos extratos, se faz necessário um *clean-up* que reduza o teor de açúcares dos extratos de *Rhipsalis* ssp.

Atividade anti-inflamatória

Os extratos de *Rhipsalis teres* e *Rhipsalis paradoxa* apresentaram baixa atividade anti-inflamatória sendo significativa apenas nas concentrações de 400 mg/kg. Por outro lado, para o extrato de *Rhipsalis cereuscula* foi observada atividade significativa na menor concentração (100 mg/kg) e na maior concentração (400 mg/kg); na concentração intermediária a atividade anti-inflamatória não demonstrou diferença estatística com o controle (Figura 24).

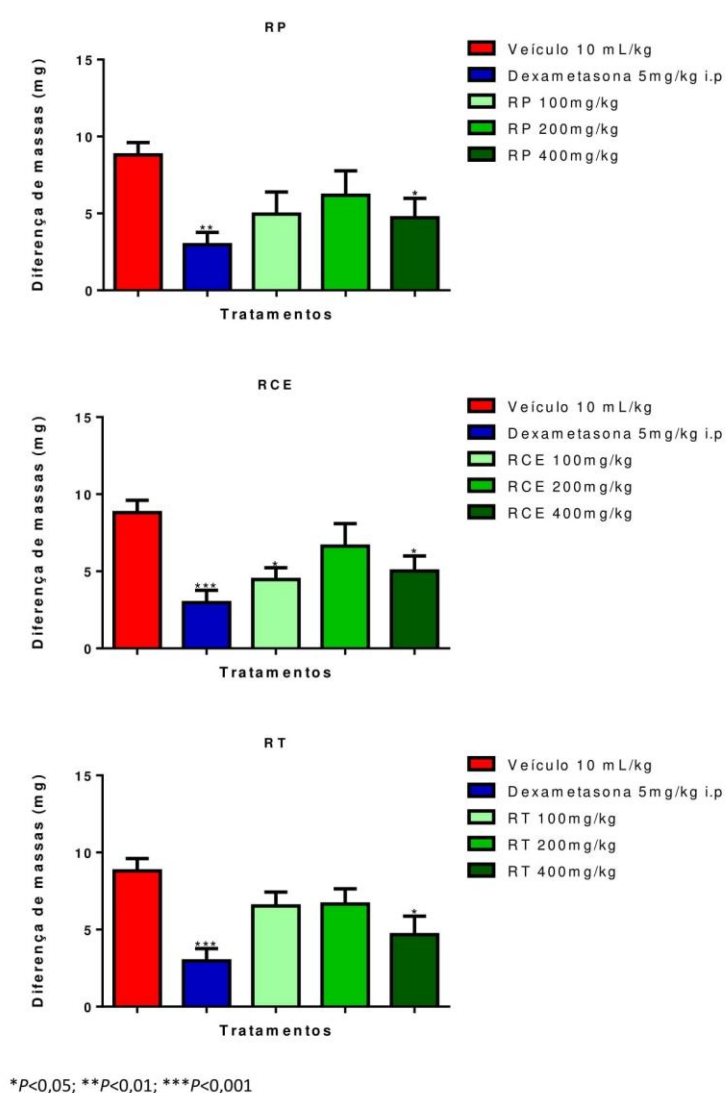


Figura 24: Atividade anti-inflamatória do extratos EtOH 70% de *Rhipsalis* spp.

A atividade anti-inflamatória apresentada pelas espécies avaliadas pode

estar associada a duas principais classes de metabólitos secundários presentes nos extratos EtOH 70% : as saponinas e os flavonoides. Segundo Simões et al (2010), a propriedade anti-inflamatória de saponinas é conhecida há muito tempo tendo sido descrita para saponinas de diversas espécies vegetais. Em revisão feita por OSBOURN et al (2011), saponinas de 50 plantas foram isoladas e sua atividade anti-inflamatória foram testadas e comprovadas, dentre estas, haviam saponinas cuja aglicona possuía esqueletos de ácido oleanólico assim como *Rhipsalis* spp. No que concerne aos flavonoides, NIJVELDT et al, (2001) apontam diversos estudos que comprovam a atividade anti-inflamatória desta classe e seus mecanismos de ação. Uma revisão mais recente realizada por KUMAR; PANDEY (2013) também relata múltiplos mecanismos de ação anti-inflamatória apresentada pela classe dos flavonoides.

Entretanto, assim como na atividade antioxidante, o elevado teor de açúcares resulta em um menor teor de substâncias bioativas e, conseqüentemente, em uma menor atividade biológica apresentada pelos extratos. Apesar disto, o extrato de *Rhipsalis cereuscula* mostrou-se eficaz. Provavelmente, esta atividade elevada esta relacionada à maior concentração de saponinas encontradas nesse extrato.

6. Conclusão

A composição química de *Rhipsalis teres* consiste principalmente em saponinas triterpênicas derivadas do ácido oleanólico, as quais possuem unidades sacarídicas ligadas tanto no carbono 3, quanto no carbono 28. Também há a ocorrência, em menor quantidade, de ácidos fenólicos e flavonoides. Essas classes de substâncias, geralmente, apresentam atividades anti-inflamatória e

hipocolesterômica, as quais que podem estar relacionadas ao uso popular no tratamento de pneumonia e doenças coronárias.

Os cactos do gênero *Rhipsalis* apresentaram três classes principais de metabólitos secundários: compostos fenólicos, flavonoides e saponinas. Os flavonoides apresentaram diferentes agliconas como apigenina, luteolina e quercetina quase sempre ligadas a unidades de desoxiexose, hexose ou ácido glicurônico. As ligações entre o açúcar e a aglicona eram majoritariamente O-ligadas. Entretanto, na espécie *Rhipsalis teres* ocorreram duas substâncias C-glicosiladas. As saponinas consistiram em substâncias derivadas do ácido oleanólico associadas a uma ou até cinco unidades sacarídicas. Os açúcares apresentaram-se ligados tanto ao C-3 quanto ao C-28 e variavam entre pentose, desoxiexose, hexose e ácido glicurônico. Esse último, quando presente, sempre estava ligado diretamente à aglicona. Estas moléculas, ao serem analisadas por PCA e HCA, mostraram-se importantes na identificação das espécies, quando avaliadas quantitativamente.

As atividades biológicas apresentadas pelas espécies *R. cereuscula*, *R. paradoxa* e *R. teres*, condizem com seus perfis químicos. *Rhipsalis paradoxa* foi a única que apresentou atividade antioxidante dentre as espécies testadas, refletindo seu teor mais elevado de composto fenólicos. Por outro lado, *R. cereuscula* apresentou maior atividade anti-inflamatória condizendo com o teor mais elevado de saponinas. Quanto à atividade antifúngica, todos os extratos apresentaram atividade baixa a moderada, porém *R. teres* foi a única espécie que demonstrou atividade contra todas as cepas testadas. De forma geral, as espécies testadas apresentaram potencial terapêutico, entretanto, é necessária uma filtração dos extratos para que se reduza a quantidade de açúcar oriunda da mucilagem e

aumente o teor de substâncias bioativas resultando em valores mais representativos do potencial biológico destas substâncias.

Este foi o primeiro trabalho a investigar estruturalmente os metabólitos secundários do gênero *Rhipsalis* e a identificar o *core* de ácido oleanólico presente em todas saponinas desse gênero.

Referências

1. ABDUL-WAHAB, I. R.; GUILHON, C. C.; FERNANDES, P. D.; BOYLAN, F. Anti-nociceptive activity of *Pereskia bleo* Kunth. (Cactaceae) leaves extracts. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 144, n. 3, p. 741-746, 2012.
2. AGOZZINO, P.; AVELLONE, G.; CERAULO, L.; FERRUGIA, M.; FILIZZOLA, F. Volatile profiles of sicilian prickly pear (*Opuntia ficus-indica*) by SPME-GC/MS analysis. **Italian Journal of Food Science**, v. 17, n. 3, p. 341-348, 2005.
3. AGRA M. F.; SILVA, K. N.; BASÍLIO, I. J. L. D.; FREITAS, P. F.; BARBOSA-FILHO, J. M. Survey of medicinal plants use in the region of Northeast of Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 3, p. 472-508, 2008.
4. AKUNNE, T.C.; AKAH, P. A.; NWABUNIKE, I. A.; NWORU, C. S.; OKEREKE, E. K.; OKEREKE, N. C.; OKEREKE, F. C. Anti-inflammatory and anticancer activities of extract and fractions of *Rhipsalis neves-armondii* (Cactaceae) aerial parts. **Cogent Biology**, v. 2, 2016.
5. ALIGIANNIS, N.; KALPOUTZAKIS, E.; MITAKU, S.; CHINOU, I. B. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 9, p. 4168–4170, 2001.
6. AMORIM, A. M., JARDIM, J. G., LOPES, M. M. M., FIASCHI, P, BORGES, R. A. X. PERDIZ, R. O.; THOMAS, W. W. **Biota Neotropica**, v. 9, n. 3, p. 313-348, (2009). Disponível em: <<http://www.biotaneotropica.org.br/v9n3/pt/fullpaper?bn02909032009+pt>>.
7. ANDERSON, F. E. **The Cactus family**. Portland, Oregon: Timber Press,

2001.

8. ANDRADE, F. D. P.; PIACENTE, S.; PIZZA, C.; VILEGAS, W. Studies in constituents of brazilian folk infusion, isolation and structure elucidation of new triterpene saponins from *Ilex amara* leaves. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 50, p. 255-261, 2002.
9. ARRUDA, E.; MELO-DE-PINNA, G. F.; ALVES, M. Anatomia dos órgãos vegetativos de Cactaceae da caatinga pernambucana. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 28, n. 3, p. 589-601, 2005.
10. ASHMANN, H. (Ed.) **The natural & human history of Baja California from manuscripts by jesuit missionaries**. Los Angeles: Dawson's Book Shop, 1966. (Baja California travels series, 7).
11. BAUTISTA-SAN, A. J.; CIBRIÁN-TOVAR, J.; SALOMÉ-ABARCA, L.; SOTO-HERNÁNDEZ, R. M.; MARCOS, DE LA CRUZ-DE LA CRUZ, E. Composición química del aroma de tallos y frutos de *Rhipsalis baccifera* (J. Miller) Stearn. **Revista Fitotecnia Mexicana**, v. 40, n. 1, p. 45-54, 2017.
12. BENZING D. H. **Vascular Epiphytes: General Biology and Related Biota**. Nova York: Cambridge University Press, 2008.
13. BRAHMI, D.; AYED, C.; BOUAZIZ, C.; ZOURGUI, L.; HASSEN, W. Hepatoprotective effect of cactus extract against carcinogenicity of benzo(a)pyrene on live of Balb/C mice. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 5, n. 18, p. 4627-4639, 2011.
14. BRAUCH, D.; PROZEL, A.; SCHUMANN, E.; PILLEN, K.; MOCK, H. Changes in isovitexin-O-glycosilation during the development of young barley plants. **Phytochemistry**, v. 148, p. 11-20, 2018.
15. BUJOR, O.; GINIES, C.; POPA, V. I.; DUFOUR, C. Phenolic compounds and

- antioxidant activity of lignonberry (*Vaccinium vitis-idaea* L.) leaf, stem and fruit at different harvest periods. **Food Chemistry**, v. 252, p. 356-365, 2018.
- 16.CALVENTE, A. A new subgeneric classification of *Rhipsalis* (Cactoideae, Cactaceae). **Systematic Botany**, v. 37, n. 4, p. 983-988, 2012.
- 17.CALVENTE, A.; ZAPPI, D. C.; FOREST, F.; LOHMANN, L. G. Molecular phylogeny of tribe Rhipsalideae (Cactaceae) and taxonomic implications for *Schlumbergera* and *Hatiora*. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 58, p. 456-468, 2011.
- 18.CARBONÓ-DELAHOZ, E.; DIB-DIAZGRANADOS, J. C. Plantas medicinales usadas por los Cogui en el río Palomino, Sierra Nevada de Santa Marta (Colombia). **Caldasia**, n. 35, p. 333-350, 2013.
- 19.CAO, D.; WANG, Q.; JIN, J.; QIU, M.; ZHOU, L.; ZHOU, X.; LI, H.; ZHAO, Z. Simultaneous qualitative and quantitative analyses of triterpenoids in *Ilex pubescens* by ULtra-High-Performance Liquid Chromatography couple with Quadrupole Time-of-Flight mass spectrometry. **Phytochemical Analysis**, 2017.
- 20.CHEN, S.; PANG, X.; SONG, J.; SHI, L.; YAO, H.; HAN, J.; LEON, C. A renaissance in herbal medicine identification: From morphology to DNA. **Biotechnology Advances**, v. 32, p. 1237- 1244, 2014.
- 21.CHEN, S.; SUN, M.; WANG, B; HAO,L.; ZHANG, C.; XIN, Y. Wound healing effects of cactus extracts on second degree superficial burned mice. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 5, n. 6, p. 973-978, 2011.
- 22.CHIFA, C.; RICCIARDI, A. Cactáceas medicinales en la flora chaqueña de Argentina usadas por las comunidades aborígenes Toba y Wichi. In: **Reunión de Comunicaciones Científicas y Tecnológicas de la UNNE**, 8.,

- 2002, Corrientes. Anais. Chaco, Corrientes, Argentina: Universidad Nacional del Nordeste, 2002. Disponível em: <http://www.unne.edu.ar/unnevieja/Web/cyt/cyt/2002/cyt.htm>. Acesso em: 20 set. 2016.
23. CLSI. **Manual Clinical and Laboratory Standards Institute**. Reference methods for broth dilution antifungal susceptibility tests for yeasts; approved standards, CLSI document M27-A3, Wayne, PA.: CLSI, 2008.
24. CORREA, M. P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: IBDF, 1984, v. 1, p. 379.
25. CURTIN, L. S. M. **By the prophet of the earth: ethnobotany of the Pina**. Santa Fe, New Mexico: San Vicente Foundation, 1949.
26. DUARTE, M.R.; HAYASHI, S.S. Estudo anatômico de folha e caule de *Pereskia aculeata* Mill. (Cactaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.15, n.2, p.103-109, 2005.
27. DUKE, J. A.; VASQUEZ, R. **Amazonian Ethnobotanical dictionary**. Boca Raton, Florida: CRC Press, 1994.
28. DOETSCH, P.W.; CASSADY, J. M.; McLAUGHLIN, J. L. Identification of mescaline and other betafenethylamines in *Pereskia*, *Pereskopsis* and *Islaya* by use of fluorescamine conjugates. **Journal of Chromatography**, v. 189, n. 1, p. 79-85, 1980.
29. DOMINGUEZ-BARRADAS, C.; CRUZ-MORALES, G. E.; GONZALEZ-GANDARA, C. Medicinal plants of the Ecological Reserve "Sierra of Otontepec" Township Chontla, Veracruz, Mexico. **CienciaUAT**, v. 9, n. 2, p.41-52.
30. DUARTE, M. C. T.; FIGUEIRA, G. M.; SARTORATTO, A.; REHDER, V. L.

- G.; DELARMELINA, C. Anti-*Candida* activity of Brazilian medicinal plants. **J. Ethnopharmacol.**, v. 97, n. 2, p. 305-311, 2005.
- 31.DUTRA, R. C.; CAMPOS, M. M.; SANTOS, A. R.; CALIXTO, J. B. Medicinal plants in Brazil: Pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. **Pharmacological research**, v. 112, p. 4-29, 2016.
- 32.FERRERES, F.; GOMES, N. G. M.; VALENTÃO, P.; PEREIRA, D. M.; GIL-IZQUIERDO, A.; ARAÚJO, L.; SILVA, T. C.; ANDRADE, P. B. Leaves and stem bark from *Allophylus africanus* P. Beauv.: An approach to anti-inflammatory properties and characterization of their flavonoid profile. **Food and Chemical Toxicology**, 2018.
- 33.FERRERES, F.; SILVA, B. M.; ANDRADE, P. B.; SEABRA, R. M.; FERREIRA, M. A. Approach to the study of C-glycosyl flavones by Ion Trap HPLC-PAD-ESI/MS/MS: Application to seeds of quince (*Cydonia oblonga*). **Phytochemical Analysis**, v. 14, p. 352-359, 2003.
- 34.FEUGANG, J. M.; KONARSKI, P.; ZOU, D.; STINTZING, F. C.; ZOU, C. Nutritional and medicinal use of Cactus pear (*Opuntia* spp.) cladodes and fruits. **Frontiers in Bioscience**, v. 11, p. 2574-2589, 2006.
- 35.FRANCIS, G.; KEREM, Z.; MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K. The biological action of saponins in animal systems: a review. **British Journal of Nutrition**, v. 88, p. 587-605, 2002.
- 36.FUENTES, V. R. **Etnobotánica de cactaceae en Cuba**. In: GONZÁLEZ TORRES, L. R.; PALMADORA, A.; RODRÍGUEZ, A. (Ed.). Memorias del taller conservación de cactus Cubanos. La Habana: Jardim Botánico Nacional, Universidad de La Habana, p. 15-24, 2005.
- 37.GALLUCCI, M. N.; CAREZZANO, M. E.; OLIVA, M. M.; DEMO, M. S.;

- PIZZOLITTO, R. P.; ZUNINO, M. P.; ZYGADLO, J. A.; DAMBOLENA, J. S.
In vitro activity of natural phenolic compounds against fluconazole-resistant *Candida* species: A quantitative structure-activity relationship analysis. **Journal of Applied Microbiology**, v. 116, n. 4, p. 795–804, 2014.
38. GENTRY, A. H., AND C. DODSON. Contribution of Nontrees to Species Richness of a Tropical Rain Forest. **Biotropica**, v. 19, p. 149, 1987a.
39. GENTRY, A. H., AND C. H. DODSON. Diversity and Biogeography of Neotropical Vascular Epiphytes. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 74, p. 205 1987b.
40. HERNANDEZ, J.; MULLER, A.; JAISWAL, R.; DAVALOS, J. Z.; KUHNERT, N. Energy resolved mass spectrometry of chlorogenic acids and its application to isomer quantification by direct infusion tandem mass spectrometry. **Phytochemical Analysis**, p. 1-7, 2018.
41. HEUBL, G. New aspects of DNA-based authentication of chinese medicinal plants by molecular biological techniques. **Planta Medica**, v. 76, p. 1963-1974, 2010.
42. IBRAHIM, S. R. M.; MOHAMED, G. A.; KHEDR, A. I. M.; ZAYED, M. F.; EL-KHOLY, A. A. S. Genus *Hylocereus*: beneficial phytochemicals, nutritional importance, and biological relevance-A review. **Journal of Food Biochemistry**, n. 42, p. 1-29, 2018.
43. JONAS, A.; ROSENBLAT, G.; KRAPP, D.; BITTERMAN, W.; NEEMAN, I. Cactus flower extracts may prove beneficial in benign prostatic hyperplasia due to inhibition of 5 α reductase activity, aromatase activity and lipid peroxidation. **Urology Research**, n. 26, p. 265-270, 1998.
44. JUNIOR, V. F. V. & PINTO, A. C. Plantas medicinais: cura segura?. **Química**

- Nova**, v. 28, n. 3, p. 519-528, 2005.
- 45.KAKUTA, K.; BABA, M.; ITO, S.; KINOSHITA, K.; KOYAMA, K.; TAKAHASHI, K. New triterpenoid saponin from cacti and anti-type I allergy activity of saponins from cactus. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.22, p. 4793-4800, 2012.
- 46.KHARCHOUFA, L.; MERROUNI, I. A.; YAMANI, A.; ELACHOURI, M. Profile on medicinal plants used by people of North Eastern Morocco: Toxicity concern. **Toxicon**, v. 154, p. 90-113, 2018.
- 47.KROTKOVA, N.; BORSCH, T.; QUANDT, D.; TAYLOR, N. P.; MULLER, K. F.; BARTHLOT, W. What does it takes to resolve relationships and identify species with molecular markers? An example from the epiphytic Rhipsalideae (Cactaceae). **American Journal of Botany**, v. 98, n. 9, p. 1549-1572, 2011.
- 48.KUMAR, S.; PANDEY, A. K. Chemistry and biological activities of flavonoids: An overview. **Scientific World Journal**, v. 2013, 2012.
- 49.LEBLOT, V.; MALAPA, R.; MOLISALÉ, T. Development of HP-TLC method for rapid quantification of sugars, catechins, phenolic acids and saponins to asses Yam (*Dioscorea* spp.) tuber flour quality. **Plant Genetic Resources**, p. 1-11, 2018.
- 50.LOPEZ-ROMERO, J. C.; AYALA-ZAVALA, J. F.; GONZÁLEZ-AGUILAR, G. A.; PEÑA-RAMOS, E. A.; GONZÁLEZ-RIOS, H. Biological activities of *Agave* by-products and their posible applications in food and pharmaceuticals. **Science of Food and Agriculture**, v. 55, n. 11, p. 4413-4423, 2018.
- 51.LUCENA, C. M.; CARVALHO, T. K. N.; MARIN, E. A.; NUNES, E. N.; OLIVEIRA, R. S.; MELO, J. G.; CASAS, A.; LUCENA, R. F. P. Medicinal

- potential of cacti in the semiarid region of Northeastern Brazil. **Gaia Scientia**, n. 36, 2014.
52. MANIHURUK, F. M.; SURYATI, T.; ARIEF, I. I. Effectiveness of the red dragon fruit (*Hylocereus polyrhizus*) peel extract as the colorant, antioxidant, and antimicrobial on beef sausage. **Media Peternakan**, v. 40, n. 1, p. 47-54, 2016.
53. MARINA, C.A. B.; MOREIRA, R. F. A. Método para análise de ácido clorogênico. **Química Nova**, v. 27, n. 4, p. 586-592, 2004.
54. MEIADO, M. V. Germinação de sementes de cactos do Brasil: fotoblastismo e temperaturas cardeais. **Abrates**, v. 22, n. 3, p. 20-23, 2012.
55. MÉNDEZ, R.; MENÉNDEZ, R.; CILLÓNIZ, C.; AMARA-ELORI, I.; AMARO, R.; GONZÁLEZ, P.; POSADAS, T.; GIMENO, A.; ESPAÑA, P. P.; ALMIRALL, J.; TORRES, A. Initial inflammatory profile in community-acquired pneumonia depends on time since onset of symptoms. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 198, n. 3, 2018.
56. MENTZ, L. A.; LUTZEMBERGER, L. C.; SCHENKEL, E. P. Da Flora Medicinal do Rio Grande do Sul: Notas Sobre a Obra de D'Ávilla (1910). **Caderno de Farmácia**, v. 13, n. 1, p. 25-48, 1997.
57. MOERMAN, D. E. **Native american ethnobotany**. Portland, Oregon: Timber Press, 1998.
58. MOORE, M. **Medicinal plants of the desert and canyon west**. Santa Fé, New Mexico: Museum of New Mexico Press, 1989.
59. MYERS, N., MITTERMEIER, R. A., MITTERMEIER, C. G., FONSECA, G. A. B.; KENT, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature** v. 403, p. 853-858, 2000.
60. MULEY, B.P.; KHADABADI, S. S.; BANARASE, N. B. Phytochemical

- constituents and phamacological activities of *Calendula officinalis* Linn (Asteraceae): A review. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 8, n. 5, p. 455-465, 2009.
- 61.NOBEL, P. S. **Cacti: biology and uses**. London, England: University of California Press, 2002.
- 62.NERD, A. & NOBEL, P. S. Effects of drought on wáter relations and non structural carbohydrates in cladodes of *Opuntia ficus-indica*. **Physiologia Plantarum**, v. 81, p. 495-500, 1991.
- 63.NETO, M.L.; AGRA, K. L.; FILHO, J. S.; JORGE, F.E. TDDFT calculations and photoacoustic spectroscopy experiments used to indetify phenolic acid functional biomolecules in Brazilian tropical fruits *in natura*. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 193, p. 249-257, 2018.
- 64.NIJVELDT, R. J.; NOOD, E.; HOORN, D. E. C.; BOELEN, P. G.; NORREN, K.; LEEUWEN, P. A. M. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 71, p. 418-425, 2001.
- 65.NURLIYANA, R.; ZAHIR, I. S.; SULEIMAN, K. M.; AISYAH, M. R.; RAHIM, K. K. Antioxidant study of pulps and peles of dragon fruits: a comparative study. **International Food Research Journal**, v. 17, p. 367-375, 2010.
- 66.OCAMPO, G.; COLUMBUS, J. T. 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.
- 67.OGUNBODEDE, O.; MCCOMBS, D.; TROUT, K.; DALEY, TERRY, M. New

- mescaline concentrations from 14 taxa/cultivars of *Echinopsis* spp. (Cactaceae) ("San Pedro") and their relevance to shamanic practice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 131, p. 356-362, 2010.
68. ORTEGA-BAES, P.; SUHRING, S.; SAJAMA, J.; SOTOLA, E.; ALONSO-PEDANO, M.; BRAVO, S.; GODÍNEZ-ALVAREZ, H. Diversity and conservation in the cactus family. In: RAMAWAT, K. G. **Desert plants**. Berlin: Springer, 2010.
69. OSBOURN, A.; GOSS, R. J. M.; FIELD, R. A. The saponins – polar isoprenoids with important and diverse biological activities. **Natural Product Reports**, v. 28, n. 9, p. 1261-1268.
70. PEREIRA, S. R. et al. Avaliação da atividade ansiolítica do extrato hidoroalcoólico da *Pereskia grandifolia* Haworth (Cactaceae). In: REUNIÃO ANUAL DA FEDERAÇÃO DE SOCIEDADES DE BIOLOGIA EXPERIMENTAL, 20, 2005, Águas de Lindóia (SP). **Resumos...** Águas de Lindóia: FESBE, 2005. p. 44.202.
71. PETROVSKA, B. B. Historical review of medicinal plants' usage. **Pharmacognosy Reviews**, v. 6, n. 11, p. 1-5, 2012.
72. RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 20, n. 7, p. 993-956, 1996.
73. ROY, S.; MALLICK, S.; CHAKRABORTY, T.; GOSH, N.; SINGH, A. K.; MANNA, S.; MAJUMDAR, S. Synthesis, characterization and antioxidant activity of luteolin-vanadium (II) complex. **Food Chemistry**, v. 173, p. 1172-1178, 2015.
74. RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; MORAIS, S. M.; SAMPAIO,

- C. G.; JIMÉNEZ, J. P.; CALIXTO, F. D. S. Metodologia Científica: Determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH. **Comunicado Técnico Metodologia Científica**, EMBRAPA, 2017.
75. RUSSEL, C. E.; FELKER, P. The Prickly-pears (*Opuntia* spp., Cactaceae): A Source of Human and Animal Food in Semiarid Regions. **Economic Botany**, v.41, n. 3, p. 433-455, 1987.
76. SALIM, V.; JONES, A. D.; DELLAPENNA, D. *Camptotheca acuminata* 10-hydroxycamptothecin O-methyltransferase: an alkaloid biosynthetic enzyme coopted from flavonoid metabolism. **Plant Journal**, v. 95, n. 1, p. 112-125, 2018.
77. SCHULTES, R. E. The appeal of peyote (*Lophophora wiliamsii*) as a medicine. **American Anthropologist**, n. 40, p. 698-715, 1938.
78. SHEDBALKAR, U.U.; ADKI, V. S.; JADHAV, J. P.; BAPAT, V. A. *Opuntia* and Other Cacti: Applications and Biotechnological Insights. **Tropical Plants Biology**, v. 3, p. 136-150, 2010.
79. SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. chap. 27. In: SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; ATHAYDE, M. L. eds. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. Porto Alegre: Editora da FURG; Editora da UFSC, 2010.
80. STANISKI, A.; FLORIANI, N.; STRACHULSKI, J. Ethnobotanical study of medicinal plants in the *faxinal* community Sete Saltos de Baixo, Ponta Grossa, PR. **Terr@ Plural**, v. 8, n. 2, p. 321-340, 2014.
81. STEVENS P. F. Angiosperm Phylogeny Website 2001. In: Version 14. July 2017. Disponível em: <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/welcome.html>>.

Acesso em: 18 dez 18

- 82.SUBIRANA, I.; FITÓ, M.; DIAZ, O.; VILA, J.; FRANCÉS, A.; DELPON, E.; SANCHIS, J.; ELOSUA, R.; MUÑOS-AGUAYO, D.; DÉGANO, I. R.; MARRUGAT, J. Prediction of coronary disease incidence by biomarkers of inflammation, oxidation, and metabolism. **Scientific Reports**, n. 8, p. 3191, 2018.
- 83.SUTTON, B. G.; TING, I. P.; SUTTON, R. Carbohydrate metabolism of cactus in a desert environment. **Plant Physiology**, v. 68, pp. 784-787, 1981.
- 84.SWINGLE, K.F.; REITER, M.J.; SCHWARTZMILLER, D.H.; Comparison of croton oil and cantharidin induced inflammations of the mouse ear and their modification by topically applied drugs., **Arch. Int. Pharmacodyn.**, v.254, p.168-76, 1981.
- 85.TAN, M.L.; SULAIMAN, S.F.; SAMIAN, M. R.; MUHAMMAD, T. S. T. Methanolic extract of *Pereskia bleo* (Kunth) DC. (Cactaceae) induces apoptosis in breast carcinoma, T47- D cell line. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 96, n. 1-2, p. 297-294, 2005.
- 86.TURRA, A. F.; MARÇAL, F. J. B.; BARETTA, I. P.; TAKEMURA, O. S.; JUNIOR, A. L.Avaliação das propriedades antioxidantes e susceptibilidade antimicrobiana de *Pereskia grandifolia* Haworth (Cactaceae). **Arquivos de Ciências da Saúde da Unipar**, v.11, n.1, p.9-14, 2007.
- 87.TURSCH, S.; LECLERQ, J.; CHIOURDOGLU, G. Structure de l'acide mesembryanthemoidigenique, triterpene nouveau des cactacees. **Tetrahedron Letters**, n. 47, pp. 4161-4166, 1965.
- 88.UKIYA, M.; AKIHISA, T.; YASUKAWA, K.; TOKUDA, H.; SUZUKI, T.; KIMURA, Y. Anti-inflammatory, anti-tumor-promoting and cytotoxic activities

- of constituents of Margigold (*Calendula officinalis*) flowers. **Journal of Natural Products**, v. 69, p. 1692-1696, 2006.
89. VALENTE, L. M. M.; SCHEINVAR, L. A.; DA SILVA, G. C.; ANTUNES, A. P.; DOS SANTOS, F. A. L.; OLIVEIRA, T. F.; TAPPIN, M. R. R.; AQUINO NETO, F. R.; PEREIRA, A. S.; CARVALHAES, S. F.; SIANI, A. C.; DOS SANTOS, R. R.; SOARES, R. O. A.; FERREIRA, E. F.; BOZZA, M.; STUTZ, C.; GIBALDI, D. Evaluation of the antitumor and trypanocidal activities and alkaloid profile in species of Brazilian Cactaceae. **Pharmacognosy Magazine**, v. 3, n. 11, p. 167-172, 2007.
90. XAVIER, P. B. **Germinação e aclimatização de Hamatocactus setispinus (CACTACEAE)**. Dissertação (Mestrado) - Universidade do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Brasil, 2010.
91. VENDRUSCULO, G. S.; MENTZ, L. A. Levantamento etnobotânico das plantas utilizadas como medicinais por moradores do bairro Ponta Grossa, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. **Iheringia**, v. 61, n. 1-2. pp. 83-103, 2006a.
92. VENDRUSCULO, G. S.; MENTZ, L. A. Estudo da concordância de citações de uso e importância das espécies e famílias utilizadas como medicinais pela comunidade do bairro Ponta Grossa, Porto Alegre, RS, Brasil. **Acta Botânica Brasilica**, v. 20, n. 2. p. 367-382, 2006b.
93. VENDRUSCULO, G. S.; SIMÕES, C. M. O.; MENTZ, L. A. Etnobotânica no Rio Grande do Sul: comparativa entre o conhecimento original e atual sobre as plantas medicinais nativas. **Botânica**, n. 56, p. 285-321, 2005.
94. WALLACE R. S., GIBSON C. **Evolution and Systematics**. In: Cacti: Biology and Uses. Berkeley: University of California Press, p 1-21, 2002.

95. WANG, R.; YANG, M.; WANG, M.; LIU, X.; XU, H.; XU, X.; SUN, G.; SUN, X.
Total saponins of *Aralia elata* (Miq) seem alleviate calcium homeostasis imbalance and endoplasmic reticulum stress-related apoptosis induced by myocardial ischemia/reperfusion injury. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 50, p. 28-40, 2018.
96. WANG, M.; TIAN, Y.; DU, Y.; SUN, G.; XU, X.; JIANG, H.; XU, H.; MENG, X.; ZHANG, J.; DING, S.; ZHANG, M.; YANG, M.; SUN, X. Protective effects of Araloside C against myocardial ischaemia/reperfusion injury: potential involvement of heat shock protein 90. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 21, n. 9, p. 1870-1880, 2017.
97. YANG, H.; ZHAI, B.; FAN, Y. WANG, J.; SUN, J.; SHI, Y.; GUO, D. Intestinal absorption mechanisms of araloside A in situ single-pass intestinal perfusion and in vitro Caco-2 cell model. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 106, p. 1563-1569, 2018.
98. 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.
99. ZHANG, L.; LIU, Y.; WANG, Y.; XU, M.; HU, X. UV-Vis spectroscopy combined with chemometric study on the interactions of three dietary flavonoids with copper ions. **Food Chemistry**, v. 263, p. 208-215, 2018.
100. ZOU, D.M.; BREWER, M.; GARCIA, F.; FEUGANG, J. M.; WANG, J.; ZANG, R.; LIU, H.; ZOU, C. Cactus Pear: A Natural Product in Cancer Chemoprevention. **Nutrition Journal**, v.4, n. 25, 2005.