

BRUNO SIQUEIRA SORRATINI

Família Lauraceae: Aspectos importantes na produção de metabolitos secundários com potenciais aplicações na sociedade.

Monografia apresentada no Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Bacharel em Química.

Orientador: Ian Castro-Gamboa

Araraquara

2021

FICHA CATALOGRÁFICA

S713f Sorratini, Bruno Siqueira
 Família Lauraceae: aspectos importantes na produção de
 metabólitos secundários com potenciais aplicações na sociedade /
 Bruno Siqueira Sorratini. – Araraquara : [s.n.], 2021
 46 f. : il.

 Trabalho de conclusão (bacharelado) – Universidade Estadual
 Paulista, Instituto de Química
 Orientador: Ian Castro-Gamboa

 1. *Lauraceae*. 2. Metabólitos. 3. Espectrometria de massa.
 4. Ressonância magnética nuclear. 5. Cromatografia líquida de
 alta eficiência. I. Título.

Bibliotecária Responsável: Ana Carolina Gonçalves Bet - CRB8/8315

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Ian Castro-Gamboa, pela dedicação, orientação, incentivo e paciência durante à minha trajetória.

Ao Instituto de Química e à Universidade Estadual Paulista, por toda a infraestrutura, auxílio indispensáveis à minha formação e à realização deste trabalho.

Ao corpo docente do Instituto de Química e toda sua compreensão e ajuda c

À FAPESP e ao CNPq, pelo apoio financeiro para da pesquisa.

À CAPES, pela manutenção do Portal de Periódicos.

Aos meus familiares, por toda a dedicação em me manter no caminho para que eu terminasse essa etapa.

Aos meus colegas, amigos e companheiros durante os anos de graduação, pela motivação e companhia.

Bruno Siqueira Sorratini

Família Lauraceae: Aspectos importantes na
produção de metabolitos secundários com potenciais
aplicações na sociedade.

Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) apresentado
como parte dos requisitos para obtenção do título de
Bacharelado em Química, junto ao Conselho de Curso
de Licenciatura [ou Bacharelado] em [nome do curso],
do Instituto de Química da Universidade Estadual
Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de
Araraquara.

Comissão Examinadora

Prof. Dr. Ian Castro-Gamboa
UNESP – Instituto de Química
Orientador

Profa. Dra. Cintia Duarte de Freitas Milagre
UNESP – Instituto de Química

Profa. Dra. Isabele Rodrigues Nascimento
UNESP – Instituto de Química

Araraquara
20 de Dezembro de 2021

Resumo

A área de produtos naturais cresce constantemente, devido a todas as opções de aplicações de plantas que podem ser estudadas e à quantidade de espécies cuja informação dos constituintes químicos, ainda não é conhecida. A família Lauraceae é um grupo de plantas contendo espécies presentes majoritariamente na América do Sul. Nesta família várias plantas populares como abacate e a canela estão inseridas, assim como outras com poucos estudos químicos. Nove extratos de cinco espécies diferentes desta família (*Ocotea odorífera*, *Ocotea megabotamica*, *Ocotea pulchella*, *Nectandra membranaceae* e *Endlicheria paniculata*) foram coletados em três reservas diferentes presentes no estado de São Paulo. Por meio de análises por CLAE (Cromatografia líquida de alta eficiência), RMN (Ressonância magnética nuclear) e EM (Espectrometria de massas) foram anotados compostos e construídos *clusters* comparando cada extrato. Os dados foram analisados tanto para identificar o efeito dos diferentes meios ambientais na produção de metabolitos dessas espécies, bem como compostos inéditos na família. Lauraceae possui diversos compostos com aplicações na medicina, agricultura e alimentação, alguns resultado das pressões ambientais onde a planta se encontra e outros que não possuem relatos na família.

Palavras-chave: Lauraceae, variações intraespecíficas, EM, RMN, CLAE

Abstract

The field of natural products is constantly growing, due to all the options of plant applications that can be studied and the number of species whose information on their chemical constituents is not yet known. The Lauraceae family is a group of plants containing species mostly present in South America. In this family several popular plants such as avocado and cinnamon are included, as well as others with few chemical studies. Nine extracts from five different species of this family (*Ocotea odorifera*, *Ocotea megabotamica*, *Ocotea pulchella*, *Nectandra membranacea* and *Endlicheria paniculata*) were collected from three different reserves present in the state of São Paulo. Through HPLC (High Performance Liquid Chromatography), NMR (Nuclear Magnetic Resonance) and EM (Mass Spectrometry) analysis, compounds were annotated and clusters were built comparing each extract. Data were analyzed both to identify the effect of different environmental media on the production of metabolites of these species, as well as new compounds in the family. Lauraceae has several compounds with applications in medicine, agriculture and food, some resulting from the environmental pressures where the plant is found and others that have no reports in the family.

Keywords: Lauraceae, intraspecific variations, MS, NMR, HPLC

Lista de figuras

Figura 1 – Exemplos de metabólitos Primários similares a Secundários

Figura 2 – Efeito da elevação em diversas características das plantas

Figura 3 – Constituintes de óleos essenciais de *Cinnamomum osmophloeum*, eles apresentam atividade inibitória, exceto benzaldeído e acetato de cinnaóla

Figura 4 – Espécies de Lauracea estudadas neste trabalho

Figura 5 – Mapa de localização das estações e parques no país, bem como a zona climática onde se encontram

Figura 6 – *Clusters* dos compostos anotados nos extratos

Lista de tabelas

Tabela 1 – Local de coleta dos extratos

Tabela 2 – Grupos de substâncias em comum por extrato

Sumário

Resumo	3
Abstract.....	6
Sumário.....	8
1. Introdução.....	9
2. Objetivo	14
3. Métodos:	14
3.1. Obtenção dos extratos.....	14
3.2. Cromatografias (métodos analíticos).....	15
3.2.1. Cromatografia gasosa com detector por ionização em chama (GC-FID – Gas Chromatography - Flame Ionization Detector)	15
3.2.2. Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de	16
massas (GC-MS – Gas Chromatography – Mass Spectrometry).....	16
3.2.3. Cromatografia líquida de ultra eficiência com detector por espectrometria de massas (UPLC-MS – Ultra Performance Liquid Chromatography).....	16
3.3. Análise e tratamento de dados	17
4. Discussão e resultados:	18
4.1.1. Locais de coleta	18
4.1.2.-Classificação de moléculas em grupos	21
4.1.3.-Grupos de interesse presentes em cada planta.....	39
4.2.1- Comparação de similaridades e diferenças entre os extratos de plantas.....	41
5. Conclusão	43
6. Referências	44

1. Introdução

As plantas constituem um reino muito explorado e estudado devido ao uso de diversas substâncias com aplicação nos campos de saúde, alimentício, energético, vestuário, agropecuário, dentre outros. Cada vez mais torna-se relevante o estudo de potenciais aplicações de espécies vegetais menos estudadas e de suas substâncias únicas havendo inúmeros grupos delas que foram alvos de poucos ou nenhum estudo. Devido à grande biodiversidade existente, principalmente no Brasil, é natural que haja essa ausência de informação, mas, ao mesmo tempo, estudos trazem à luz as aplicações de compostos de plantas em áreas de grande relevância como tratamento de doenças, o controle de pragas, dentre outros. Tais pesquisas confirmam a necessidade de explorar mais a fundo o potencial uso de grupos de plantas que permanecem menos estudados até o presente. (Kingston, 2008)

Os produtos naturais produzidos por plantas podem desempenhar funções essenciais para a sua sobrevivência, sendo divididos, respectivamente, entre metabolitos primários e secundários, os últimos são distribuídos de maneira única entre espécies e até mesmo indivíduos dependendo das condições ambientais onde se encontram. Tais metabólitos, originalmente catalogados sem nenhuma função aparente, podem desempenhar importantes funções nas plantas e com potencial aplicação na produção de diversos fármacos. (Croteau, 2000)

Como a vida pode se sustentar nos mais diversos ambientes, apesar das funções básicas permanecerem as mesmas, é observada uma grande variação nos metabólitos secundários produzidos por diversos indivíduos. Muitas vezes são encontrados flavonoides, alcaloides, fenóis e outros compostos, responsáveis por promover a proteção contra o meio ambiente aonde se encontram, seja contra o ataque de herbívoros, micro-organismos, radiação UV ou outros fatores que possam comprometer a sua sobrevivência. (Treutter, 2005; Close, McArthur, 2002; Wink, 1998)

Mais de metade dos produtos anticancerígenos desenvolvidos nas últimas décadas tem origem direta ou indiretamente relacionada a produtos naturais (Newman, Cragg, 2007). Compostos com potencial anti-leishmania e antiparasíticos em geral são encontrados em inúmeras espécies e apresentam alternativas menos tóxicas e com a vantagem de ter maior especificidade que poderiam ser estudados para o desenvolvimento de novos medicamentos, especialmente devido a dificuldade em se

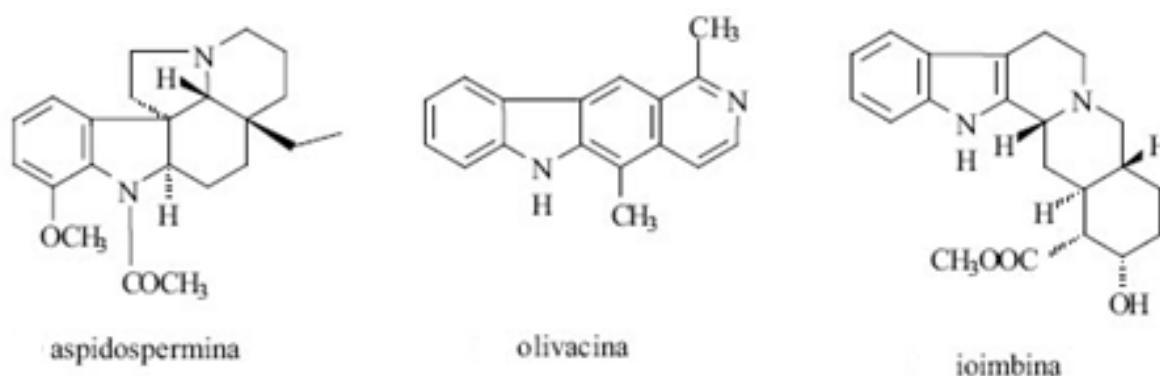
desenvolver drogas sintéticas com atividade para cada organismo diferente. (Hussain, Al-Harrasi, et al., 2014; Ndjonka, Rapado, et al., 2013).

Como plantas também produzem compostos que desempenham mecanismos de defesa, muitas vezes resultante da evolução de grupos específicos de plantas, biossintetizam compostos com atividades antifúngicas que protegem contra ataques de outros organismos presentes no ambiente. Por produzirem óleos essenciais, também servem como mecanismos de inibição de infecções tanto em humanos como em plantações. (Tabassum, 2013).

Variações intraespecíficas

Como descrito anteriormente, metabólitos primários apresentam poucas diferenças entre plantas, até em espécies distantes umas das outras, enquanto metabólitos secundários podem ter grandes variações até dentro de espécies, mesmo muitas vezes sendo substâncias similares que se originaram dos mesmos precursores (Figura 1). Diversos fatores podem contribuir para essa variação de características: enquanto a variabilidade interespecífica é bem explicada pela Hipótese da Disponibilidade de Recursos (RAH), que apresenta certas limitações quando se trata de apenas uma espécie. (Hahn, 2016)

Figura 1 – Exemplos de metabólitos secundários.

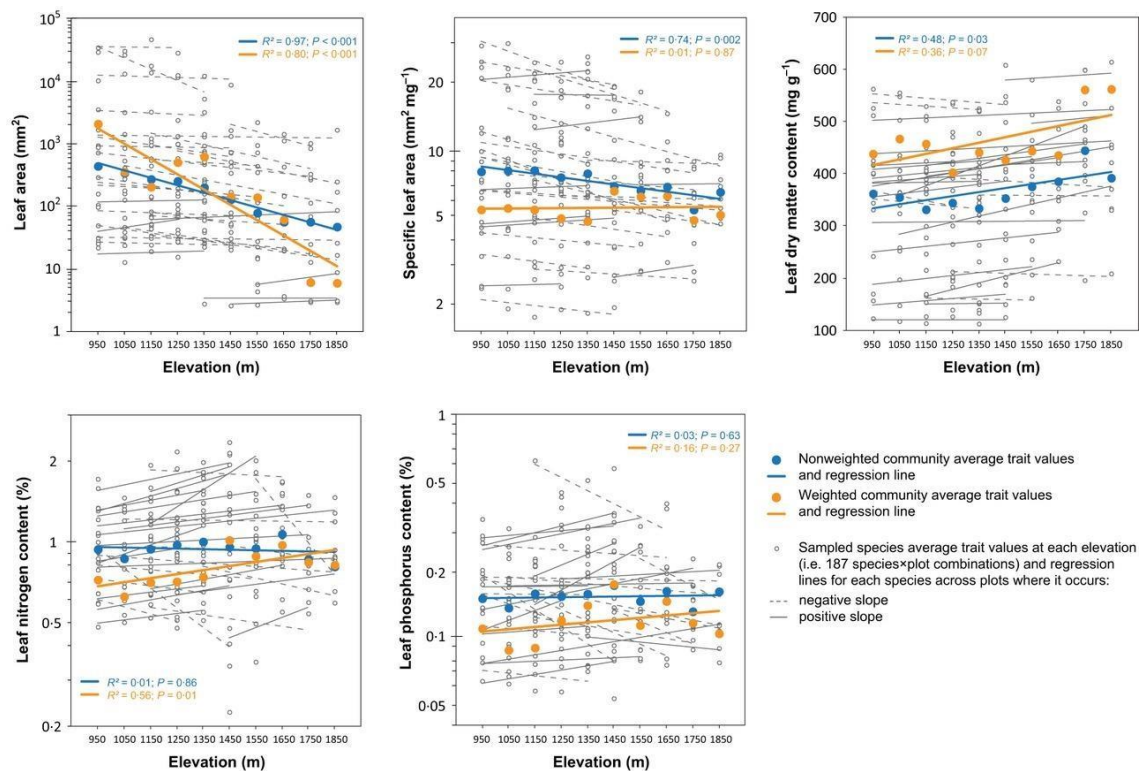


A combinação de diferentes fatores abióticos e bióticos contribuí para a variação observada em mesmas espécies em condições distintas: a temperatura,

umidade, suprimento de nutrientes básicos, competitividade com outras espécies, presença de herbívoros na cadeia alimentar em grande ou pequena escala são todos fatores capazes de alterar a produção de metabólitos secundários e influenciar na produção de compostos mais ou menos desejáveis. (Ravishankar, 2011; Gutbrodt, 2012)

Tais variações tem origem tanto genética quanto ambiental proporcionando diversos meios como se pode separar e identificar os indivíduos com características almejadas: alterando sua localização (de Moraes, 2004), com diferenças sendo notadas após cerca de 1 km ou em terrenos com diferentes altitudes (figura 2), por exemplo.

Figura 2 – Efeito da elevação em diversas características das plantas



Fonte: Kichenin, 2013

Na figura 2 podemos observar 5 gráficos demonstrando a variação de certo aspecto com a elevação:

- Área da folha: diminui à medida que aumenta a altitude.
- Área da folha específica (área por quantidade de massa): diminui com o aumento da altitude.
- Conteúdo de matéria seca da folha: Aumenta com o aumento da altitude.
- Conteúdo de nitrogênio da folha: Aumenta com o aumento da altitude

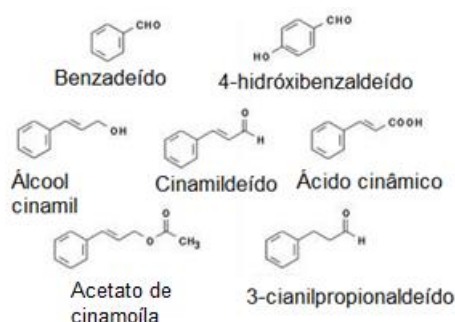
-Conteúdo de fósforo da folha: Aumenta com o aumento da altitude

Lauraceae

Lauraceae é uma importante família de espécies de plantas muito presente no território brasileiro, dentre as quais está inclusa a espécie cujo fruto é o abacate (*Persea americana*) e que já foi utilizada na medicina informal e conservação de alimentos por várias décadas. Apesar de existirem trabalhos contendo diversas abordagens de estudo sobre a família, de 1956 até 2018, menos de 100 artigos estudando potenciais aplicações foram publicados com repercussão, deixando uma grande quantidade de espécies e substâncias inexploradas. A própria família não tem classificações concretas e propostas de subdivisões feitas há décadas ainda são pontos de discussão entre pesquisadores. (Gottlieb, 1972; Werff, Richter, 1996)

Os óleos essenciais da família são popularmente usados não apenas para aromatizar alimentos e bebidas, mas também para sua conservação através de mecanismos que inibem micro-organismos. Com estruturas que tem atividade inibitória significativa identificadas nos seus óleos (figura 3), seu uso é considerado como opção para inibir bactérias em outras áreas como alimentação e medicina (Shang-Tzen, Pin-Fun, Shan-Chwen, 2001) bem como a adoção destes como pesticidas por apresentarem alternativas com alta taxa de mortalidade, eficientes e seguras. (Rozman, Kalinovic, Korunic, 2007)

Figura 3 – Constituintes de óleos essenciais de *Cinnamomum osmophloeum*, eles apresentam atividade inibitória, exceto benzaldeído e acetato de cinamoila



Como já citado para plantas em geral, a família Lauraceae naturalmente também é afetada por variações em seus metabólitos secundários devido ao ambiente em que se encontram. A espécie *Cryptocarya mandioccana* presente no estado da São Paulo, por exemplo, tem diferentes proporções de constituintes em seus óleos

essenciais, indicando certa adaptação química induzida ou por isolamento genético ou pelo ambiente. (Telascrea, Araújo, 2007)

Espécies da família *Lauraceae* tratadas neste trabalho



*Ocotea
megapotamica*
(1 amostra)



Ocotea Pulchella
(3 amostras)



Nectandra membranacea
(2 amostras)



Endlicheria paniculata
(2 amostras)



Ocotea odorifera
(1 amostras)

Figura 4 – Espécies de Lauracea estudadas neste trabalho

Ocotea odorifera

Espécie nativa de áreas com mata atlântica, também conhecida como sassafrás, canela-sassafrás e canela-do-mato, atualmente usada tanto na medicina como no ramo alimentício e recentemente tornou-se ameaçada de extinção. Compostos extraídos demonstraram atividades antifúngicas e larvicidas, em especial o óleo de sassafrás, comumente exportado. Seu óleo essencial também demonstra também ação antibacteriana e antioxidante potente, no entanto, ainda não foi feita uma caracterização extensiva capaz de identificar quais são os constituintes químicos responsáveis nem correlações sobre a sua bioatividade.

Nectandra membranacea

Espécie nativa de áreas da mata atlântica, conhecida como canela-caqui-branca ou canela-amarela, mais usada no reflorestamento e produção de móveis, não possui muitas pesquisas sobre seus compostos. A presença de certos metabolitos secundários como sesquiterpenos, fitosteróis, poli álcoois, derivados de ácido

arilpropiônico, flavonóis, arilpropanois, lignoides furfurânicos, neolignoides dihydrobenzofurânicos, alguns norlignoides, alcaloides taninos e diversos diterpenos.

Ocotea pulchella

Espécie nativa do cerrado, é usada tanto na medicina como na indústria madeireira . Diversos estudos com o gênero *Ocotea* indicam a presença de compostos como alcaloides aporfínicos, lignoides e neolignoides, taninos, esteroides, triterpenos e fenilpropanoides. Muitas propriedades larvicidas, citotóxicas e antioxidantes foram descritas em alguns produtos isolados, assim como extratos com atividades alelopáticas foram atribuídas ao espatuleol (5), salicilato de benzila (10), e benzoato de benzilam.

Endlicheria paniculata

Espécie nativa da mata atlântica, conhecida por diversos nomes em alusão à canela. Seus principais usos são na indústria madeireira pela sua boa qualidade e de seu rápido reflorestamento. Estudos envolvendo a espécie não chegam a ter bons resultados, indicando que a espécie apresenta baixa atividade antioxidante a antibactericida e baixo rendimento na extração de seus óleos essenciais.

2. Objetivo

Este trabalho tem como objetivo identificar e comparar a composição e metabólitos secundários predominantes em 5 diferentes espécies da família Lauraceae, coletadas em 3 reservas florestais, todas localizadas no estado de São Paulo, Sudeste do Brasil, mas com diferenças em suas características ambientais e de clima. As substâncias foram comparadas e as similaridades e diferenças relacionadas com seu local de coleta, espécie e órgão da planta, visando identificar se as diferenças ambientais são fatores no aparecimento de metabolitos iguais ou não.

3. Métodos:

3.1. Obtenção dos extratos

Os extratos utilizados neste trabalho estavam presentes na Extratoteca do Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais (NuBBE) de Araraquara, e foram coletados em 3 reservas florestais do estado entre os anos de 2000-

2002: no parque Estadual Ilha do Cardoso foram coletadas amostras de folhas de *Ocotea pulchella* e folhas e galhos de *Endlicheria paniculata* pela pesquisadora Rosaura Silva., na Estação Ecológica Mogi das Cruzes, amostras de folhas e galhos de *Ocotea megabomatica* e *Ocotea pulchella* pela botânica Inês Cordeiro e, finalmente na Estação Ecológica Jureia-Itatins Galhos de *Ocotea odorífera* e *Nectandra membracea*, também pela pesquisadora Inês Cordeiro.

Os extratos foram preparados seguindo o método de Willey Mill e Swedesboro: as plantas e galhos são secos a temperatura ambiente (25°C) e depois extraídos com Etanol 96% v/v a proporção de 1:20 de grama de material: litro de solvente, por extração por solvente convencional (EC) utilizando aparato Soxhlet presente no Instituto de Botânica de São Paulo (IB-SP). Para cada extrato, cerca de 15 mg do material vegetal seco foram utilizados para a preparação de no mínimo uma duplicada das amostras. Após processo de extração por 24h, foram filtrados a temperatura ambiente e, finalmente, o solvente foi removido com o auxílio de um rotoevaporador a 40°C. A eficiência da extração foi medida comparando a massa final com a massa da amostra seca inicial e descartada se fora dos limites aceitáveis pelo método acima.

O armazenamento foi feito em freezers no IB-USP e em seguida o transporte para Araraquara em containers refrigerados e catalogados. Os extratos permaneceram armazenados no freezer a -5°C (+2 °C) retardando a degradação de seus componentes.

PARTE EXPERIMENTAL

3.2. Cromatografia

3.2.1. Cromatografia gasosa com detector por ionização em chama (GC-FID – Gas Chromatography - Flame Ionization Detector)

As análises em GC-FID foram realizadas em cromatógrafo gasoso SHIMADZU GC-2010 Sistema GC14B Plus sob responsabilidade de NuBBE usando duas diferentes colunas RTX-5 e HYDRODEX β -3P.

Os extratos foram preparados para análise pesando 5 mg em balança analítica e essas massas diluídas em 10 mL de mistura metanol água 1:1. Da solução formada era retirado 1,0 μ L para análise em triplicata.

O injetor utilizado foi do tipo *Split* em razão 1:100 e o gás de arraste foi hidrogênio a 1,22 mL min⁻¹. A coluna RTX-5 possui as dimensões de 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm. Com relação a temperatura de extração foram aplicadas: inicial 30 °C (mantida por 5 minutos), velocidade de aquecimento 1 °C/min, temperatura final 80 °C (mantida por 5 minutos). As temperaturas do injetor e do detector foram de 70 °C e 80 °C, respectivamente, e as injeções foram de 1,0 µL na concentração de 0,5 mg de extrato mL⁻¹ de mistura metanol água 1:1.

A coluna HYDRODEX β-3P possui as dimensões de 25 m x 0,25 mm x 0,25 µm. Com relação a temperatura de extração foram aplicadas: inicial 30 °C (mantida por 5 minutos), velocidade de aquecimento 1 °C/min até temperatura de 50 °C (mantida por 5 minutos) e novo aquecimento a velocidade 2 °C/min até temperatura 80 °C (mantida por 10 minutos). As temperaturas do injetor e do detector foram de 60 °C e 80 °C, respectivamente. As injeções feitas foram de 1,0 µL em concentração 0,5 mg de extrato mL⁻¹ de mistura metanol água 1:1.

3.2.2. Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS – Gas Chromatography – Mass Spectrometry)

As análises foram feitas em cromatógrafo gasoso 7890B acoplado a espectrômetro de massas 5977A da marca Agilent, Sistema GC-MS 15M com fonte de ionização por elétrons a 70 eV sob responsabilidade do NuBBE. A coluna utilizada foi a HP-5MS Com relação a temperatura de extração inicial 30 °C (mantida por 5 minutos), velocidade de aquecimento de 1 °C/min até temperatura final de 80 °C (mantida por 5 minutos). As temperaturas do injetor e da linha de transferência foram de 70 °C e 80 °C, respectivamente, utilizando-se hidrogênio como gás de arraste a uma vazão de 1,22 mL min⁻¹. As 8 injeções foram feitas com volume de 1,0 µL em concentração próxima a 0,5 mg de amostra mL⁻¹ de mistura metanol água 1:1.

3.2.3. Cromatografia líquida de ultra eficiência com detector por espectrometria de massas (UPLC-MS – Ultra Performance Liquid Chromatography)

As análises em UPLC foram realizadas em cromatógrafo líquido ACQUITY UPLC M-Class System Plus sob responsabilidade do NuBBE utilizando uma coluna ACQUITY UPLC HSS.

Os extratos foram preparados para análise pesando 2 mg em balança analítica e essas massas diluídas em 4 mL de mistura metanol água 2:1. Da solução formada foi retirado 0,5 µL para análise em triplicata.

O injetor utilizado foi do tipo *Split* em razão 1:100. A coluna ACQUITY UPLC HSS T3 possui as dimensões de 2.1 x 100 mm x 1.8 µm. O detector era do tipo Xevo G2-S QToF MS com o modo de aquisição ESI+, ESIK+, ESINA+ e tolerância de 5 ppm de valor de massa.

A fase móvel foi de água (0,1%ácido fórmico): acetonitrila a 0,5 mL min⁻¹. O gradiente da fase móvel foi de 95% de água, diminuindo à taxa de 5% por minuto, até chegar a 5% de água (mantido por 5 minutos) e depois retornar a 95% de água, ainda na taxa de 5% por minuto. Com relação a temperatura de análise foram aplicadas: inicial 120 °C (mantida por 5 minutos), velocidade de aquecimento 10 °C/min, temperatura final 500 °C (mantida por 5 minutos). As temperaturas do injetor e do detector foram de 120 °C e 500 °C, respectivamente, e as injeções foram de 0,5 µL na concentração de 0,5 mg de extrato mL⁻¹ de mistura metanol água 1:1.

3.3. Análise e tratamento de dados

Os dados adquiridos das 10 amostras foram tratados com o software UNIFI de processamento de dados e identificação de componentes. O tratamento consiste na importação de um banco de dados de compostos encontrados comumente em membros da família Lauraceae e presentes na biblioteca do software, comparando-os com os compostos encontrados nas amostras com o índice de tolerância de 5ppm.

Foram gerados três grupos de compostos identificados: compostos em comum entre duas ou mais amostras, compostos com estruturas diferentes usando a mesma base estrutural entre duas ou mais amostras e compostos únicos a cada amostra. Todos foram identificados e catalogados com relação a sua resposta no software.

Quando aos componentes não identificados pelo banco de dados UNIFI, foram também avaliados comparativamente com um novo banco de dados de possíveis denominações com o auxílio da internet. Este banco continha compostos de famílias consideradas próximas à Lauraceae, bem como compostos mencionados na literatura em artigos de isolamento de substâncias da família, mas não presentes no banco de dados do software.

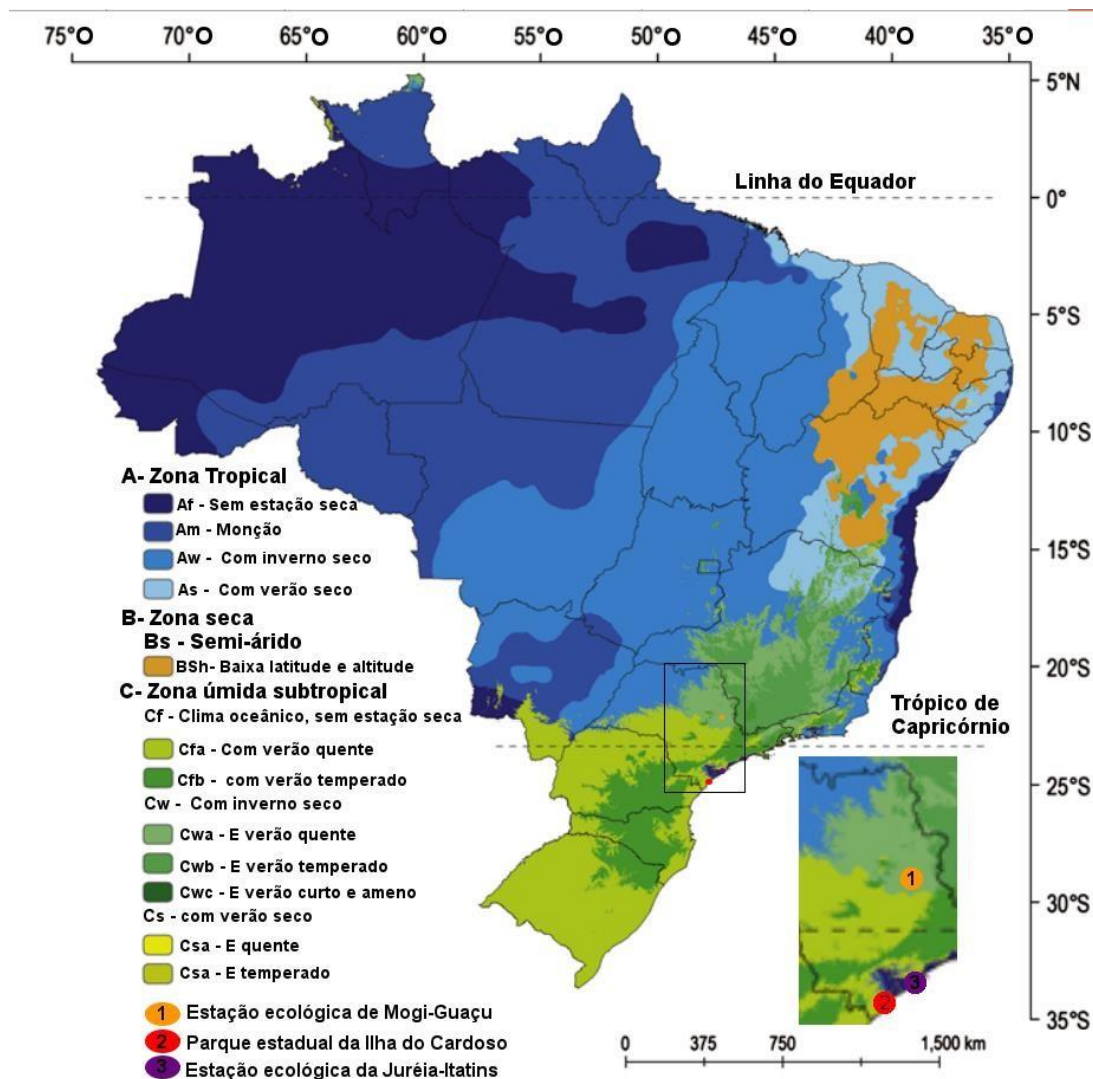
Após o levantamento de compostos, o software faz sua identificação através de fragmentos de massa MS. Finalmente as informações levantadas são usadas para gerar automaticamente um relatório com a listagem dos componentes encontrados por amostra. Neste trabalho estão as comparações entre as quantidades encontradas de cada composto em cada amostra bem como descrição de sua identificação por espectrometria de massas.

O relatório, com a lista gerada de componentes, permitiu a anotação, caracterização e comparação entre os 10 extratos, complementando as outras análises feitas em RMN e HPLC. Foi possível identificar a presença de grupos de acordo com a espécie, parte da planta ou local de coleta. Estes dados foram separados e organizados em tabelas que permitiram a análise final dos dados.

4. Discussão e resultados:

4.1.1. Locais de coleta

Figura 4 — Mapa de localização das estações e parques no país, bem como a zona climática onde se encontram



Fonte: Editado pelo Autor

As dez amostras foram coletadas em três locais diferentes em estações ecológicas e parques no estado de São Paulo, indicados no mapa acima. Cada um destes locais com clima e bioma que expõem as plantas a diferentes condições ambientais. Para verificação da significância das variações climáticas entre os diferentes locais de coleta utilizamos o critério de Köppen (adaptado de Alcarde, 2013) cuja classificação atribui termos de duas ou três letras para cada tipo de clima, cada uma indicando uma característica da localização: a primeira letra indica a temperatura e pluviosidade, a segunda a distribuição de chuvas por estação e a terceira a variação de temperatura por estações. Cada local de coleta está em uma zona diferente, cuja definição está indicada na legenda. A Estação Ecológica de Mogi-

Guaçu (EEMG) está na zona Cwa, a Estação ecológica da Juréia-Itatins (EEJI) está na zona Af e o Parque Estadual da Ilha do Cardoso (PEIC) está na zona Cfa.

a) EEMG está na zona de classificação Cwa, de características úmida subtropical com inverno seco e verão quente. As temperaturas médias anuais variam de 20,5°C a 22,5°C; as precipitações médias anuais variam de 1400 a 1600mm, sendo que no período chuvoso (outubro a março) a precipitação média acumulada varia de 1100 mm a 1250mm e no período seco (abril a setembro) de 250 a 300mm. Considera-se estar numa área de transição entre os biomas do Cerrado e da Mata Atlântica, com características partilhadas de ambos, em especial quanto a distância entre árvores.

b) EEJI está na zona de classificação Af, uma Zona Tropical sem estação Seca. A temperatura média anual varia de 19,6 a 21,4 °C e a pluviosidade média anual é registrada em 2277,8 mm, bem distribuída ao longo do ano todo. É uma área de conservação de Mata Atlântica apenas, densa e fechada.

c) Por fim, PEIC está na zona de classificação Cfa, úmida subtropical sem estação seca e com verão quente. A temperatura média anual varia de 20° e 22°C e as amplitudes térmicas anuais, com mínimos de 10°C no inverno e máximas de 37° a 40°C durante o verão. A média pluviométrica situa-se entre 1.750 e

2.250 mm anuais, levemente concentrada durante o verão. O bioma predominante é a Mata Atlântica, mas também há a presença de área de manguezais e dunas.

Na tabela abaixo indicamos onde foi coletada cada amostra:

Tabela 1: Local de coleta dos extratos

Número da amostra	Espécie e órgão	Local
1	<i>Ocotea odorifera</i> (galhos)	EEJI
2	<i>Nectandra</i> <i>Membracea</i> (folhas)	EEJI
3	<i>Ocotea Pulchella</i> (Folhas)	PEIC
4	<i>Endlicheria</i> <i>paniculata</i> (folhas)	EEMG
5	<i>Endlicheria</i> <i>paniculata</i> (galhos)	EEMG
6	<i>Ocotea</i> <i>megabotamica</i> (folhas)	PEIC
7	<i>Ocotea</i> <i>megabotamica</i> (galhos)	PEIC
8	<i>Ocotea pulchella</i> (folhas)	EEMG
9	<i>Ocotea pulchella</i> (galhos)	EEMG

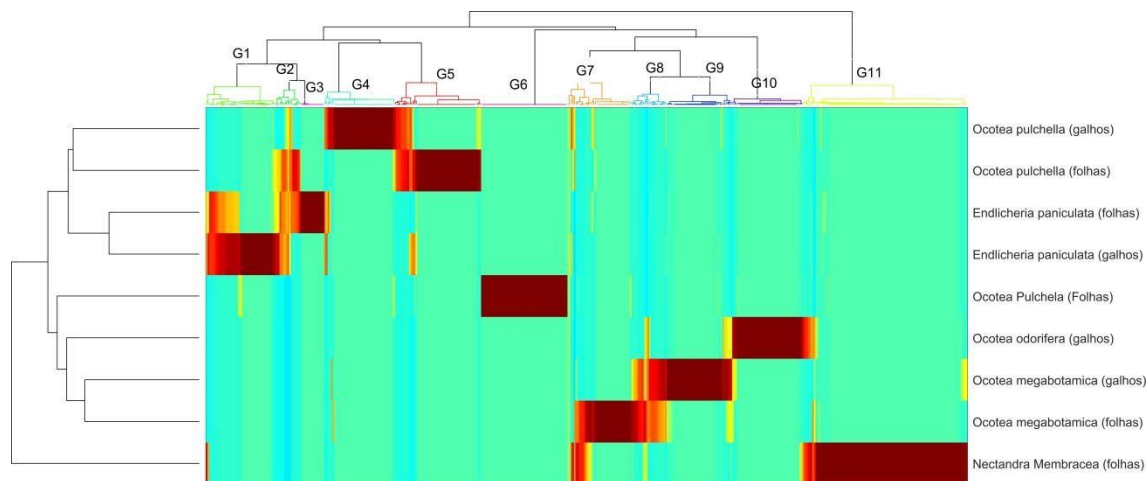
4.1.2.-Classificação de moléculas em grupos

Com os *clusters*, foram notados 11 grupos de substâncias com sobreposição:

Tabela 2: Grupos de substâncias em comum por extrato

Número do Grupo	Amostras no grupo	Características em comum	Características diferentes
G1	4 e 5	Espécie e local	Órgão de coleta
G2	4 e 8	Órgão de coleta e local	Espécie diferente
G3	4 (grupo isolado)	NA-	NA-
G4	9 (grupo isolado)	NA-	NA-
G5	8 e 9	Espécie e local	Órgão de coleta
G6	3 (grupo isolado)	NA-	NA-
G7	2 e 6	Órgão	Espécie e local de coleta
G8	6 e 7	Espécie e local	Órgão de coleta
G9	1 e 7	Órgão	Espécie e local de coleta
G10	1 e 7	Órgão	Espécie e local de coleta
G11	1 e 2	Local e órgão	Espécie diferentes

Figura 5: *Clusters* de compostos encontrados nos extratos



Fonte: Autor

O gráfico do software Matlab tem como aplicação verificar a coincidência de compostos entre duas ou mais amostras e identificar padrões de ocorrências entre as mesmas. O software consiste na adição e análise de uma tabela composta por diversos critérios (no caso, as substâncias) aos quais são atribuídos parâmetros (no caso, a resposta de cada substância) para determinados critérios (no caso, cada um dos extratos), com esses valores, cada célula contendo informação sobre os compostos pode ser agrupada com outros compostos de resultados parecidos. Quando uma quantidade de compostos grande o suficiente com resultados parecidos é identificado, o software determina o conjunto destes compostos como um grupo. Estes grupos formados são então relacionados por proximidade, determinando seu grau de proximidade (por exemplo, grupos contendo um critério diferente e outro igual) e então colocados em um gráfico formando clusters, ou agrupamentos onde foi observado comportamento parecido, como no caso da Figura 5, onde temos o resultado da aplicação do programa com os dados deste trabalho.

O gráfico apresenta a intensidade de resposta de cada composto encontrado por amostra, ou seja, sua concentração relativa em cada amostra analisada.

De acordo com sua presença em comum nos mesmos extratos, os compostos foram agrupados em 11 grupos diferentes, cada um correspondendo a um ou mais extratos que continham os compostos em quantidade significativa. As características em comum e diferentes entre estes extratos foram analisadas abaixo para tentar explicar essa sobreposição de substâncias entre cada um.

Para a análise não-supervisionada de HCA, as amostras foram agrupadas com base nos dados semiquantitativos de HPLC-DAD dos metabólitos identificados. Para tanto, a similaridade foi calculada usando a distância euclidiana entre a área total integrada destes compostos. Ward foi escolhido como o método de ligação devido à menor suscetibilidade a efeitos discrepantes. Todas as análises foram realizadas no software MATLAB R2017a® (MathWorks, USA).

As substâncias encontradas em cada grupo tiveram seus usos pesquisados e analisados, com as informações encontradas abaixo.

G1 - Endlicheria paniculata

Número do Grupo	Amostras no grupo	Características em comum	Características diferentes
G1	4 e 5	Espécie e local	Órgão de coleta

Cicloartenol Derivados de cicloartenol triterpeno

Precursor de outras substâncias

O papel de esteróis no crescimento e desenvolvimento de plantas

Daturametelina D Lactona esteroide

Antiinflamatório e antioxidante presente normalmente nessa espécie

Withanolídeos de *Datura Metel*

Forsythosideo E Catechol

Anticancerígeno

Diferenças em componentes químicos e atividade anticancerígena de frutos verdes e maduros de *Forsythiae*

Ácido ganoderico MA Triterpenoide

Metabólito de *Ganoderma lucidum* (reishi) fungo, não há plantas na literatura com esse ácido.

Reishe, Ganoderma lucidum e Ganoderma tsugae: Substâncias bioativas e efeitos medicinais

Rh4 Triterpenoides

Anticancerígeno, encontrado em gengibres

Ácido glicólico 12- hydroxyesteroides

Emulsificação e transporte de gorduras

Energização direta do transporte de ácido bilico em vacúolos de plantas

Tamarixinol Metoxifenois

Medicina chinesa, textos não traduzidos

Timosaponina A1 Saponinas estereoidais

Medicina herbal chinesa

Farmacocímica combinada com microdialise para observar componentes bioativos em potencial e seus metabólitos em extrato de saponina de *Anemarrhena asphodeloides* usando UPLC/espectrometria de massas com quadruplo do tempo de voo.

Bis-2-Etilexiftalato benzoico ésteres ácidos

Platicizador, melhorar as características de plásticos

Informação básica sobre Di(2-etilexil) ftalato in água potável

Nordracorubina Biflavonoides e poliflavonoides

Componente da resina sangue de dragão coagulante, além de pintura

Constituintes de Sangue de dragão. Part I. Estrutura e configuração absoluta de novos flavanos opticamente ativos

Cyclolaudenona Derivados de Cicloartanols triterpene

Precursor de síntese

Obtusifoliol Ergosterols e derivados

Intermediário do colesterol

Diversidade molecular de substratos esterol 12-alfa-demetilase em plantas, fungos e humanos

Vitamina K1 Naftoquinonas

Atividade anti-hemorrágica e prothrombogenic

Picrasinosideo C Quassinoides

Atividade anti insetos e anti alimentação

Atividade antialimentícia e inseticida de quassinoides contra mariposa de asas de diamante *Plutella xylostella*

Sipeimina imperialina Quinolizidina alcaloide

Atividade inibidora de inflamações

Imperialina e verticinona de brotos de *Fritillaria wabuensis* inibem mediadores pro-inflamatórios em Macrófagos estimulados por LPS RAW 2647

Estigmasterol Stigmatanos e derivativos

Inibe tireoide e estimula insulina, sugerindo propriedades antiperoxidativas e antidiabéticas, também presente em *Ocotea*, parte da família.

Identificação de compostos fenólicos e atividades biologicamente relacionadas de estratos aquosos de *Ocotea odorifera*

Leonticina Stilbenos

Nenhum estudo desde 1956

Trillina Triterpenoides

Funções anti apoptóticas e anti oxidantes

Diosgenina glucosidea protege contra danos a coluna espinal ao regular a autofagia e aliviar Apoptose

Ácido montanico Ácidos graxos com cadeias muito longas

Ácido graxo, reduz tempo de cristalização de nano partículas.

Efeito da presença de um éster de ácidos montanicos com álcoois multifuncionais nos compostos de nanopartículas de dióxido de titânio com Poly (etileno tereftalato) em sua cristalização não isotérmica

Este grupo contém compostos do mesmo local de coleta e espécie, sendo que a única diferença entre as amostras é o órgão da planta coletado (neste caso, caule e folhas).

Neste caso as substâncias em destaque que vamos descrever abaixo devem fazer parte do metabolismo da planta.

Substâncias em destaque:

Ácido Ganoderico MA **(1)**, não foram encontrados relatos na literatura onde foi isolado esse composto em plantas, só encontrado em fungos na Ásia. É comumente utilizado na medicina oriental, mas há muitos poucos relatos do mesmo no ocidente.

Bis-2-ftalato de etilexila **(2)**, composto já utilizado comercialmente, mas é produzido artificialmente, funciona como *platicizador*. No entanto, sua concentração em todas as espécies foi muito baixa para que extração em massa para uso comercial seja considerada.

Estigmasterol **(3)** com propriedades antidiabéticas. Conhecido por ser encontrado em espécies do gênero *Ocotea*, mas com poucos estudos de sua presença em *Endlicheria*.

Timosaponina A1 **(4)**, usado mais na medicina oriental, pouco estudado na América do Sul. É um composto do grupo saponina que é pouco utilizado se comparado ao leste do globo.

G2 - Endlicheria paniculata e Ocotea pulchella

Número do Grupo	Amostras no grupo	Características em comum	Características diferentes
G2	4 e 8	Órgão de coleta e local	Espécie diferente

Cicloartanol Derivados de cicloartanol triterpeno

Precursor de outras substâncias

Daturametelina D Lactonaes Esteroides

Anti-inflamatório e antioxidante presente normalmente nessa espécie

Withanolidos de *Datura metel*

Forsithoside E Catechols

Anticancerígeno

Diferenças em composição química e atividade anticancerígena de frutos verdes e maduros de *Forsythiae*

Ácido Ganoderico Triterpenoides

Metabólito de *Ganoderma lucidum* (reishi) fungo, não há plantas na literatura com esse ácido.

***Reishi, Ganoderma lucidum e Ganoderma tsugae*: Substâncias bioativas e efeitos medicinais**

Ginsenosideo Rh4 Triterpenoides

Anticancerígeno, encontrado em gengibres

Ácido glicoholic 12-hidroxyesteroides

Emulsificação e transporte de gorduras

Energização direta do transporte de ácido bilico em vacúolos de plantas

Timosapnina A1 Saponina Estereoidal

Medicina herbal chinesa

Farmacocímica de plasma combinada com microdialise para observar componentes bioativos em potencial e seus metabólitos em extrato de saponina de *Anemarrhena asphodeloides* usando UPLC/espectrometria de massas com quadruplo do tempo de voo.

3-alfa-dihydrocadamdina Alcaloides beta-carbonílicos

delta-Caroteno Carotenos

Pigmentação das plantas, ambas possuem coloração alaranjada

Picrasinosideo G Quassinoides

Atividade anti insetos e anti alimentação (traduzir nomes)

Atividade antialimentícia e anti inseticida de quassinoides contra mariposa de asas de diamante *Plutella xylostella*

Schizandrina A Taninas Deoxyschizandrinas hidrolisáveis

Atividade cardioprotetora, hepatoproteção

Papel protetor de deoxyschizandrina e Schisantherina A contra *Myocardial Ischemia* – Danos de reperfusão em ratos

Este grupo contém compostos do mesmo local de coleta e órgão, no caso, folhas, sendo que a diferença entre as amostras é a espécie de planta onde foram coletadas. Isto acaba indicando metabolitos cuja presença foi ou induzida pelo meio, ou já é comum nas folhas desta família.

Pode-se notar isso com o composto picrasinosídeo G (5), com características fagoinibidoras e inseticidas. Por estarem na mesma estação ecológica, isso pode indicar que as espécies possuem os mesmos mecanismos de defesa contra a mesma fauna.

O ácido glicólico (6) é um importante componente do transporte de bile ácida, algo que se torna mais importante em climas com menor disponibilidade de água, como é o caso na EEMG.

No entanto, ainda há estações do ano úmidas no local, explicando a presença de timosaponina A1 (7), uma saponina responsável por proteger plantas de ataques de fungos parasitas na região.

G3 Endlicheria paniculata

Número do Grupo	Amostras no grupo	Características em comum	Características diferentes
G3	4 (grupo isolado)	NA-	NA-

Tenacigenina A Oxapanos

Presente em Marsdenia tenacissima, efeito antitumoral

As propriedades citotóxicas e quinase tirosina inibitórias de esteroides C21 e iridoides do vacúolos de *Alocasia cucullata*

Vomicina Quinolidinas

Tóxico, próprio para defesa da planta

Novos derivados antimalariais e sungucina citotóxica de raízes de *Strychnos icaia*

Beta Ecdysterona Esteróide

Este grupo contém os compostos encontrados apenas nas folhas da desta espécie. A maioria apenas uma variação dos mesmos precursores de outras espécies do mesmo gênero, mas há um composto que se destaca, a molécula de nome vomicídeo (8). Este composto tem de toxicidade extremamente alta. Junto com os outros compostos encontrados que também possuem característica fago inibidora, a espécie deve possuir um sistema de defesa exclusivo

em suas folhas. Como a *Endlicheria paniculata* já é comumente utilizada para reflorestamento, sua resistência a pragas, devido a presença destes compostos é outra qualidade que torna a espécie uma boa escolha.

G4 *Ocotea pulchella*

Número do Grupo	Amostras no grupo	Características em comum	Características diferentes
G4	9 (grupo isolado)	NA-	NA-

Marinobufagina Também produzido por animais na literatura.

Atividade antimicrobiana dos bufadienolideos marinobufagino e telecinobufagino isolados como componentes majoritários da secreção da pele da rã *Bufo rubescens*.

A espécie *Ocotea pulchella*, encontra-se em área de alta umidade, com muitas substâncias sendo apenas derivados de precursores comuns à família. No entanto, uma substância não se encaixa nesta lista: marinobufagina **(10)**. Este composto, foi descrito em pesquisas como encontrado apenas em animais, especificamente, na secreção da pele de sapos. Como diversos membros do gênero de sapos *Bufo* que produz este composto podem ser encontrados na Estação Ecológica Mogi das Cruzes, é possível que a amostra foi contaminada pela fauna local. No entanto, é uma substância de alta toxicidade, não se pode descartar a possibilidade de ser um mecanismo de defesa da espécie não estudado antes.

G5 *Ocotea pulchella*

Número do Grupo	Amostras no grupo	Características em comum	Características diferentes
G5	8 e 9	Espécie e local	Orgão de coleta

Ácido alfa-boswellico Triterpenoides

Ácido presente em plantas da família Burseraceae. Podem ter uso anti-inflamatório ou quimioterapêutico.

Phytoquímica e ações terapêuticas em potencial de ácidos Boswellicos: uma mini revisão

Éter metil Arborinol triterpenoides

Triterpeno encontrado mais em Gramineae, poucas citações na literatura.

Chasmanina Quinolidinas

Tem papel de antifagocito e metabólito da planta, estudado no gênero *Aconitum*

Limitadores de apetite de raízes de *Aconitum episcopale* contra o besouro farinha vermelha, *Tribolium castaneum*.

Chloranthalactona F Triterpenoides

Comum em chloranthaceae, um lindenano sesquiterpenoide, pouco estudada.
Talvez com efeito anti-inflamatório

Efeitos anti-inflamatórios de chloranthalactona B in células estimuladas por LPS- Raw263.7

Ácido Lonchocarpico Hydroxisoflavnoides

Atividade antifagocita

Pesticidas botânicos na agricultura

Exame químico de inseticidas de plantas - Parte II. Componentes químicos de *Derris scandens*

Mudanpiosideo I Glicosideos de terpeno

Inibidor de tironase, artigos no gênero *Paeonia*

Inibidores de Tyrosinase isolados das raízes de *Paeonia suffruticosa*

Rhodojaponinal Grayanoides

Toxina antifagocita e inseticida, venenosa.

Stereoestrutura de Rhodojaponina I, II, III, toxinas de *Rhododendron japonicum* e de Asebotoxina III, toxina de *Pieris japonica*

Anti-alimentícea de insetos e inseticidas de graianoide diterpeno de *Rhododendron molle*

Álcool wuweizi A Taninas hidrolisáveis

Atividade cardioprotetora, hepatoproteção

Papel protetor de Deoxyschizandrina e Schisanterina A contra *Myocardial Ischemia*– Reperfusão de machucados em ratos

Bufotalinina Bufanolideos e derivados

Ação cardiotônica e convulsiva. Artigos falam de sapos e não plantas.

Atividade comparative de Bufadienolideos

Este grupo contém compostos do mesmo local de coleta e espécie, sendo que a única diferença entre as amostras é o órgão da planta onde foram coletadas (galhos ou folhas). Ainda há a presença de bufadienolídeos como bufotalinin (**11**), como observado no grupo anterior, substâncias encontradas apenas em sapos. Por estar na mesma localização que o G4, isto reforça as hipóteses de que a amostra ou foi contaminada ou que a espécie possui este mecanismo de defesa.

Além disso, há a presença de diversas substâncias tóxicas, como rodojaponina I (**12**) e o ácido linchocárpico (**13**), ambos já utilizados em inseticidas devido sua alta potência. Uma vez identificamos CHECAR compostos inseticidas pode-se afirmar que a espécie *Ocotea pulchella* é a com mecanismos de defesa contra pragas mais intensos dentre as estudadas.

G6 – *Ocotea megabotamica*

Número do Grupo	Amostras no grupo	Características em comum	Características diferentes
G6	3 (grupo isolado)	-	-

Fisalina H Fisalinas e derivados

Antimicrobiana, indução de atividade quinona redutase

Biotransformação de fisalina H e atividade leishmaniana de seus produtos transformados

Aminofisalina de *Filasis angulate* inédita

Presente apenas nas folhas da *Ocotea megabotamica*, muitas das substâncias são apenas derivados alternativos dos mesmos precursores comuns, com algumas exceções. Uma dessas é a presença de fisalina H (**14**), uma das muitas classes deste tipo de metabólito, mas que só foram encontradas nesse extrato. É um grupo de substâncias de alta toxicidade, inicialmente encontradas no gênero *Physalis*. O composto específico também possui essa toxicidade, conferindo às folhas das plantas em questão uma resistência superior à muitos microrganismos na região. Sua citotoxicidade é alta o suficiente para serem consideradas aplicações em tratamentos de infecções de diversos protozoários e de câncer.

G7 – Nectandra membranaceae e Ocotea megabotamica

Número do Grupo	Amostras no grupo	Características em comum	Características diferentes
G7	2 e 6	Órgão	Espécie e local de coleta

Ajugasida A Glicosídeos diterpenos

Atividade anti complemento sérico

Atividade anti-complemento de compostos isolados das raízes de *Clerodendrum bungei* Steud.

Kadsurenina K Metoxifenois

Antagonista PAF (platelet activating factor)

Estudos sobre neoligantes antagonistas biciclo(3,2,1) de *Piper kadsura*

Acetozipinoresinol Lignoides furofurantes

Lignoide de azeite de oliva.

Pinatifiniseia A Estirenos

Usada em medicina tradicional chinesa

Síntese do núcleo spiroqueetal da família pinnatifosidea de produtos naturais

Nigakihemiacetal F Quassinóide

As diferentes espécies estão localizadas em diferentes áreas geográficas, no entanto apresentam muitas substâncias em comum presentes em suas folhas, o que indica um grau de parentesco de certas substâncias presentes na família, tais como: flavonóides, quassinóides e isoflavonóides.

Essas substâncias indicam não apenas a síntese a partir de precursores similares, mas também necessidades parecidas geradas por condições ambientais similares: quassinóides como nigaquilactona H **(15)** são estruturas comumente com função fagoinibidora que protegem as plantas de herbívoros, tornando suas folhas não atrativas para o consumo devido ao gosto ou cheiro bem como estirenos, que causam irritação com o contato prolongado. Os flavonóides e isoflavonóides são estruturas mais comumente presentes em vegetais, mas neste grupo G7 destacamos a presença do flavonóide kadsurenina K **(17)**, conhecido por ser um fator ativador de plaquetas (FAP).

G8 - *Ocotea megabotamica*

Número do Grupo	Amostras no grupo	Características em comum	Características diferentes
G8	6 e 7	Espécie e local	Órgão de coleta

Ajugasidea A Glicosídeos de diterpeno

Atividade anti complemento sérico

Atividade anti-complemento de compostos isolados de raízes de *Clerodendrum bungei* Steud

Isoanhidroicaritina 8-prenilatada flavonas

Comum em plantas Chinesas, mas não possui muitos usos.

***Sophora flavescens* Ait.: usos tradicionais, fitoquímica a farmacologia de um importante medicamento chinês tradicional**

Noranhioicaritina 8-prenilatada Flavonoides

Comum em plantas chinesas, poucos usos, não alcaloide

Componentes não alcaloides de *Sophora flavescens*

Estemospironina Azepanas

Presente especialmente em *Stemona sessilifolia*

Alcaloides de raízes de *Stemona sessilifolia* e suas atividades antitussivas

Fuzinosida Dissacarídeos

Estrutura real não determinada

Síntese e avaliação de atividade cariaca das estruturas propostas de fuzinosida

Kaempfero-3-gentiobiosida Flavonoide-3-O-glicosida

Metabólitos de plantas, ação antioxidante e de proteção contra bactérias.

Deteção, infusão e extrato hidroalcolico de thime cultivado: atividades antioxidantes e antibacteriais e caracterização fenólica

Oxotuberostemonina Indoles e derivados

Alcaloide de *Stemona tuberosa*

Sete novos alcaloides das raízes de *Stemona tuberosa*.

3-hidroxipuerarina C-glicosídeos isoflavonoides

Antioxidante da planta

Rápida análise de constituintes antioxidantes ativos de *puerariae lobatae radix* baseados na investigação do relacionamento de atividade padrão quantitativa

Beta-hidroxiisovalerilshikonina Naphtoquinonas

Controla crescimento, inibe tirosina kinase

Beta-hidroxiisovalerilshikonina inibe o crescimento de múltiplas células U266 myelomas ao ativar o caminho mitocondrial

Turpinionosídeo e Sesquiterpenoides

Distribuídos amplamente em plantas

Turpinionosídeos A—E: Glucosídeos megastigmanos de folhas de *Turpinia ternata*

Isodihidrofutoquinol B Monoterpenoides bicíclicos.

Inibidores

Compostos substituídos com metilendioxifenil de espécies piper como inibidores da aflatoxina B1-DNA microsedimentada em fígados in vitro

Kadsurenina C Dimetoxibenzenos

Antagonista PAF

Estudos no antagonista PAF biciclo(3,2,1) octanoídeo neolignoides de *Piper kadsura*

Este grupo contém compostos do mesmo local de coleta e espécie, sendo que a única diferença entre as amostras é o órgão da planta onde foram coletadas (galhos e folhas).

Percebe-se a presença de fortes compostos antioxidantes neste grupo, como a 3-hidroxipuerarina (**18**) e a beta-hidroxiisovalerilshikonina (**19**), como a Estação Ecológica de coleta possui forte presença de luz solar, tais compostos são essenciais para a sobrevivência da planta uma vez que a protegem da formação de radicais livres que a constante exposição aos raios UV forma em seus corpos.

Também é notada a presença de kadsurenina C (**20**), muito similar ao composto (**17**) e com características parecidas, visto que partem do mesmo precursor.

G9 e 10 - *Ocotea megabotamica* e *Ocotea odorífera*

Número do Grupo	Amostras no grupo	Características em comum	Características diferentes
G9	1 e 7	Órgão	Espécie e local de coleta
G10	1 e 7	Órgão	Espécie e local de coleta

Ajugaside A Glicosídeos diterpeno

Atividade anti complemento sérico

Atividade anti-complemento de compostos das raízes de *Clerodendrum bungei* Steud

Kadsurenina C Dimetóxiбенzenos

Antagonista PAF

Estudos do antagonismo PAF biciclo (3,2,1) octanoides neolignoides de *Piper kadsura*

Presentes no mesmo local, os galhos destas plantas contêm os mesmos derivados de catequinas, como Procyanidin A2 (**21**), antioxidantes que são utilizados para a defesa da planta contra a formação de radicais livres.

Também há a presença de Ajugaside A (22), com atividade anti complemento sérico , ou seja, que é capaz de inibir o sistema imunológico da planta, se necessário.

G11 – *Ocotea odorífera* e *Nectrandra membranacea*

Número do Grupo	Amostras no grupo	Características em comum	Características diferentes
G11	1 e 2	Local e órgão	Espécie diferentes

Presentes no mesmo local, mas em espécies diferentes (*Ocotea odorífera* e *Nectrandra membranacea*), identificamos que as folhas de ambas as plantas possuem fagoinibidores na forma de Limonoides como Obacunone (23).

Esses compostos normalmente estão presentes em árvores com frutos cítricos e conferem um sabor desagradável para espantar a fauna, especificamente, insetos que se alimentam de seus órgãos, sem prejudicar aqueles que auxiliam na polinização. No caso, funcionam tanto como toxinas como fagoinibidores.

Além destes também possuem em comum iridoides como oleuropeína (24), que são conhecidos por protegerem de ataques de pragas protozoárias.

4.1.3.-Grupos de interesse presentes em cada planta

No grupo 1 há diversos compostos da classe de triterpenoides (ácido ganodérico, ginsenosídeo e trilina) nos galhos e folhas da planta. Tais compostos são uma das classes de substâncias mais comuns para a defesa de plantas, muitas vezes desempenhando funções antioxidantes. Tais funções também levam a muitos destes compostos serem considerados para uso em humanos, uma vez que poder combater câncer e outras doenças de comportamento similar. Em particular a trilina é estudada amplamente por ser um composto com forte intensidade destas características citadas.

Também há a presença de saponinas, especificamente a timosaponina A1. São substâncias pouco conhecidas no ocidente, mas que fazem parte da medicina tradicional chinesa e cujos mecanismos de ação apenas recentemente foram estudados.

No grupo 2 há a presença também de outros triterpenoides e saponinas, com características similares as acima. Além disso, há a presença de quassinoides como picrassinossídeo G que permitem que a planta se proteja de fauna comum à EEMG(Estação ecológica Mogi-Guaçu), devido a suas atividades antifagocitas.

Também se nota a presença do ácido glicólico, responsável pelo transporte mais eficiente de gorduras. Devido ao clima com menor disponibilidade de água, a presença de compostos com essa função emulsificadora auxilia o fluxo dessas moléculas na planta.

No grupo 3 surgem os compostos quinolidíneos e a vomicina, parte de um grupo de compostos com toxicidade elevada que ataca diversos animais que se alimentam de suas folhas, protegendo a espécie de predadores e garantindo que seja mais resistente que o normal.

No grupo 4 não há muitos compostos diferentes, com exceção da marinobufolina, da classe das bufolinas, grupo de compostos encontrados apenas em sapos. É uma substância que garante à planta defesa como os sapos possuem contra predadores, mas sua presença no extrato pode indicar apenas contaminação quando coletado, já que é composto comum aos sapos nas áreas de interesse.

No grupo 5, novamente há triterpenoides com a função similar, no entanto, sua concentração é mais baixa por se tratar de uma diferente espécie. Essa menor quantidade é contraposta pela presença de grajanolídeos como a radojaponina, que possuem a mesma função, mas tem potência muito maior. São utilizados em inseticidas frequentemente devido a essa característica.

No grupo 6, a toxicidade desta espécie vem de filasinas, especificamente a philasina H, substância de citotoxicidade elevada, geralmente encontrada em plantas do gênero *Physalis*, sua aplicação é considerada no tratamento de doenças protozoárias e câncer. Como esse grupo trata apenas de uma espécie específica, a produção de fisalonas deve ser exclusiva a ela dentre os extratos analisados

No grupo 7, temos plantas de espécies e locais diferentes, implicando que os compostos encontrados são comuns às Lauraceae. Vários metoxi-fenóis, tais como a kadsurenina K, possuem estudos sobre seu potencial uso como fator ativador de plaquetas. Outras kadsureninas também possuem atividades biológicas parecidas, sendo que em plantas, possuem função de fagoinibidores, mas não foram encontradas nos extratos. A função destes compostos é complementada pela presença de quassinóides, que possuem ação deterrante de várias pragas, e fago-irritação em diversos predadores.

No grupo 8, há a presença de antioxidantes como as naftoquinonas, tais como a beta-hidroxiisovalerilshikonina, que possuem a capacidade de proteger a planta contra radicais livres. Devido ao clima com maior incidência de luz solar, substâncias como essas são indispensáveis para planta e podem ser adotadas por seres humanos para o tratamento de câncer.

Nos grupos 9 e 10, o ajugasídeo A possui atividade anti s rum complemento, capaz de limitar a ação do sistema imunológico quando o mesmo ataca as próprias células da planta. Seu uso para combater doenças da mesma natureza que afetam humanos já foi relatado.

No grupo 11, foi encontrado o limon ide obacunona. Limonoides são fagoinibidores específicos de frutos c tricos, mas encontrados nessas folhas com a mesma função: tornam-nas muito pouco atrativas a insetos sem comprometer aqueles que auxiliam na polinização. Ainda, a presença de iridoides como a oleuroperina, protegem contra diversas ações de microrganismos.

4.2.1- Comparação de similaridades e diferenças entre os extratos de plantas

Como visto na tabela 2, 5 espécies de plantas foram estudadas: *Ocotea odorífera*, *Nectandra membracea*, *Ocotea pulchella*, *Endlicheria paniculata* e *Ocotea megabotamica*. As características gerais quanto aos compostos de cada uma foram compiladas abaixo:

Ocotea odorífera

Não há muitos compostos diferentes, com exceção da marinobufolina, da classe de bufolinas, grupo de compostos encontrados apenas em sapos. É uma substância que garante à planta defesa como os sapos possuem contra predadores, mas sua presença no extrato pode indicar apenas contaminação quando coletada. Foram encontrados outros compostos de mesma classe na planta, o que reforça essa hipótese.

Nectandra membracea

É a espécie onde foram encontradas a maior quantidade de substâncias com características n  usuais, sendo a espécie mais variada. A presença tanto de compostos com atividade anti complemento sérico e com atividades do tipo FAP, como descritos acima, oferece áreas únicas de estudos para extratos da espécie.

A espécie, presente na EEJI (Estação ecológica da Juréia-Itatins), também possuía grupos de compostos pertencentes apenas às plantas locais (*Ocotea odorífera*). Os mais notáveis sendo fagoinibidores c tricos, foram os limonoides. As espécies presentes possuem defesas n  usuais   família contra a fauna local, o que pode indicar uma adaptação e seleção das plantas capazes de produzir compostos de defesa alternativos.

Ocotea pulchela

Esta foi a única espécie cujos extratos estavam presentes em mais de uma localização, assim, é a que tem a maior variedade de compostos. As localizações correspondiam a EEMG (Estação ecológica da Mogi-Guaçu) com estações de clima mais seco e PEIC com umidade alta todo o ano. Foram encontrados agentes fagoinibidores, antioxidantes e tóxicos demonstrando que seu metabolismo exerce as mesmas funções independentemente de onde foram coletadas as amostras, justificando sua alta adaptabilidade. Notou-se que, apesar de apresentar esta atividade em ambos os locais, as substâncias responsáveis por trás do mesmo eram quase sempre diferentes, mas pertencentes ao mesmo grupo, o que confirma o efeito do ambiente na produção de metabolitos secundários na planta.

A espécie, quando presente na EEMG (Estação ecológica da Mogi-Guaçu), possuía compostos presentes em todas as outras plantas do local (*Endlicheria paniculata*), em especial, os triterpenoides Ácido Ganoderico MA e Ginsenosideo Rh4, ambos responsáveis por ações fagoinibidoras, mas o primeiro só possui relatos na literatura sobre sua presença em fungos e o segundo, em espécies de gengibres. As espécies onde esses compostos são usualmente encontrados encontram-se em climas tropicais similares ao da reserva, indicando que devem oferecer vantagens para a sobrevivência de seres nestes locais.

A espécie, quando presente na PEIC, também possuía grupos de compostos pertencentes apenas às plantas locais (*Ocotea megabotamica*), em especial, os antioxidantes presentes eram de intensidade maior que o normal, como 3

Hydroxipuerarina e Beta-hidroxiisovaleriishikonina, essenciais para uma área de maior incidência de luz solar para proteger as plantas de radicais livres. Além disso, todos os extratos possuíam algum tipo de moléculas relacionadas às kadsureninas (C, D ou K). Apesar do grupo de compostos não ter algum uso único para plantas, sua ação FAP é notável e, portanto, para estudos de plantas capazes de produzi-lo, um ambiente similar a PEIC seria preferível.

Endlicheria paniculata

É a espécie mais resistente a ataques de insetos e herbívoros. Tem uma variedade muito grande de fagoinibidores, justificando seu grande uso em reflorestamentos. Alguns podem frequentemente serem encontrados em pesticidas e venenos para uso humano, mas é em geral a espécie com maior resistência a fauna do ambiente.

Ocotea megabotamica

Espécie com a maior quantidade de compostos que são majoritariamente encontrados em outros gêneros e famílias, como *Stemona*, *Myeloma* e *Piper*. Não há características marcantes em seus extratos, o que pode implicar em sua contaminação antes do preparo de suas amostras.

5. Conclusão

O estudo das 5 espécies da família Lauraceae em três ambientes distintos, o ambiente onde uma planta se encontra define diversas variações em seus metabólitos secundários. Dentre os compostos diferentes encontrados, notou-se que a maioria tinha função de defesa, aumentando a taxa de sobrevivência da planta.

Os metabólitos secundários presentes mantêm, em grande parte, as bases estruturais e seus precursores quando na mesma espécie. O que muda é a adição ou remoção de algumas funções orgânicas. O ambiente não causa o aparecimento de variações grandes, apenas altera o que já está presente, mostrando uma adaptação.

Há também compostos que independem do local de coleta, ou seja, que a planta é capaz de sintetizar não importa sua localização. Estes são, em sua maioria, metabólitos secundários que auxiliam em funções como transporte de substâncias na planta ou garantem uma proteção mais geral à microrganismos, sendo importantes em quase todas as situações, para a sobrevivência da planta.

Quanto a utilidade das substâncias, o mais incomum é o fato de muitas não terem relatos ou estudos de serem encontradas em plantas, como saponinas (timosaponina A1 e mabufurogina), encontradas em animais como sapos e conferindo aos mesmos sua toxicidade característica. Apesar de isto poder indicar apenas sua contaminação pela fauna e fungos do ambiente onde se encontram, não se pode descartar a possibilidade de que, devido aos poucos estudos da família Lauraceae, ela é capaz de produzir tais compostos.

Substâncias encontradas em outras famílias de plantas também estavam presentes como Kadsurenina C, Turpinionosideo E, Estemospironina e Oxotuberostemonina . Já existem estudos sobre o uso das mesmas, especialmente na medicina ou como agrotóxicos, mas sem considerar sua potencial extração em Lauraceaes, o que a torna ela uma família de interesse para essas aplicações se for possível cultivar em larga escala e a concentração por massa da planta for significativa, possibilitando uma produção mais eficiente.

6. Referências

- Kingston,D.G.I.; A Natural Love of Natural Products **Journal of Organic Chemistry** V 73, n11, p 3975–3984, Junho 2008
- Croteau, R.; Kutchan, T. M.; Lewis, N. G.; Biochemistry & Molecular Biology of Plants, p 1250-1318, 2000
- Treutter D.; Significance of flavonoids in plant resistance and enhancement of their biosynthesis, **Plant Biology** V 7, N 6, Pages 581-591, Novembro 2005
- Close, D.C; McArthur, C.; Rethinking the role of many plant phenolics - Protection from photodamage not herbivores? **Oikos** V 99, N 1, P 166-172, Outubro 2002
- Wink M.; Plant breeding: importance of plant secondary metabolites for protection against pathogens and herbivores **Theoretical and Applied Genetics** V 75, N 2, P 225-233, Janeiro 1988
- Newman D.J.; Cragg G.M.; 2007 Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. **Journal of Natural Products** V 70 N 3 p 461-77. Março 2007
- Hussain, H.; Al-Harrasi, A.; Al-Rawahi, A.; Green, I. R.; and Gibbons, S.; Fruitful Decade for Antileishmanial Compounds from 2002 to Late 2011 Chemical Reviews, V114 n20, p 10369–10428, 2014
- Ndjonka, D.; Rapado, L. N.; Silber, A.M.; Liebau, E.; Wrenger C.; Natural Products as a Source for Treating Neglected Parasitic Diseases **International Journal of Molecular Sciences**; V 14, n 2, p 3395–3439, Fevereiro 2013
- Tabassum, N.; Vidyasagar, G. M.; Antifungal investigations on plant essential oils. A review **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences** V 5, n 2, 2013
- Kichenin, E.; Wardle, D. A. ; Peltzer, D.A. ; Morse, C. W. ; Freschet, G. T.; Contrasting effects of plant inter- and intraspecific variation on community-level trait measures along an environmental gradient **Functional Ecology** V 27, n 5, p 1254-1261, Outubro 2013
- (P.G. Hahn, Maron J. L.; A Framework for Predicting Intraspecific Variation in Plant Defense **Trends in Ecology & Evolution** 2016)

Ramakrishna A., Ravishankar G. A.; Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants **Plant Signaling and Behavior** Vol 6 n 11, p 1720–1731, Novembro 2011;

Gutbrodt B., Dorn S., Unsicker S.B., Mody K.; Species-specific responses of herbivores to within-plant and environmentally mediated between-plant variability in plant chemistry **Chemoecology**, V 22, n 2, p 101–111, Junho 2012)]

de Moraes, P.L.R.; Monteiro, R.; Vencovsky R.; Estrutura genética intrapopulacional em *Cryptocarya moschata* Nees(Lauraceae) **Brazilian Journal of Botany** vol.27 no.3 2004

Gottlieb O.R.; Chemosystematics of the lauraceae **Phytochemistry** V 11, N 5, Pages 1537-1570, Maio 1972

Werff, Richter, Toward an improved classification of Lauraceae **Annals of the Missouri Botanical Garden** V 83, N 3, Pages 409-418, 1996

Shang-Tzen, C.; Pin-Fun, C.; Shan-Chwen, C.; Antibacterial activity of leaf essential oils and their constituents from *Cinnamomum osmophloeum*. **Journal of ethnopharmacology** V 77, N 1, P 123-127, Setembro 2001

Rozman, V.; Kalinovic, I; Korunic, Z.; Toxicity of naturally occurring compounds of Lamiaceae and Lauraceae to three stored-product insects. **Journal of Stored Products Research** V 43, N 4, P 349-355, 2007

Telascrea, M; de Araújo, C. C.; Marques, M.O.M.; Facanali, R.; de Moraes, P.L.R.; Cavaleiro, A.J. Essential oil from leaves of *Cryptocarya mandioccana* Meisner (Lauraceae): Composition and intraspecific chemical variability. **Biochemical Systematics and Ecology** V. 35, N 4, P 222-232, Abril 2007.

Alcarde, C.C; Köppen's climate classification map for Brazil. **Meteorologische Zeitschrift** V. 22, N 6, P 113-115, Abril 2013.

Schaller H; The role of sterols in plant growth and development.. **Prog Lipid** V. 42, N 3, P 163-175, Maio 2013.

Mohini Gupta,M.; Manickam Subhash, C. Sinha ;Anjana Sinha –Bagchi Anil B.Ray ; Withanolides of *Datura metel*. **Phytochemistry** V. 31, N 7, P 2423-2427, Maio 1992.

Hörtensteiner S.; Vogt E.; Hagenbuch B.; Meier P.J.; Amrhein N.; Martinoia E.; Direct energization of bile acid transport into plant vacuoles.. **Journal of Biochemistry** V. 268, N 25, P 234-239, Setembro 1993.

Takashi M.; Guanying W.; Jie Z.; Hirokazu K.; Tsuyoshi N.; & Jingxuan L.; Reishi, *Ganoderma lucidum* and *Ganoderma tsugae*: Bioactive substances and medicinal effects. **Food Reviews International** V. 11, N 1, P 151-166, Setembro 1995.

Liu Z.; Liu M.; Qi Y.; Zhu Z.; Chai Y.; Yuan C.; Lin Y.; Plasma pharmacochimistry combined with microdialysis to screen potential bioactive components and their metabolites in *Anemarrhena asphodeloides* saponin extract using ultrahigh-performance liquid chromatography/quadrupole-time-of-flight mass spectrometry. **Journal of Pharmacy and Chemistry** V. 36, N 9, P 1659-1666, Maio 2013.

Daido M.; Fukamiya N.; Okano M.; Taoahara K.; Hatakoshi M.; Yamazaki H.; Antifeedant and Insecticidal Activity of Quassinoids against Diamondback Moth (*Plutella xylostella*). **Bioscience Biotechnology and Biochemistry** V. 57, N 2, P 244-246, Maio 1993.

Hörtensteiner S.; Vogt E.; Hagenbuch B.; Meier P.J.; Amrhein N.; Martinoia E.; Direct energization of bile acid transport into plant vacuoles. **Journal of Biochemistry** V. 25, N 7, P 268-279, Setembro 1993.

Frédérich M.; De Pauw M.C.; Llabrès G.; Tits M.; Hayette M.P.; Brandt V.; Penelle J.; De Mol P.; Angenot L.; New antimalarial and cytotoxic spongicucurbitane derivatives from *Strychnos icaia* roots. **Plant Medicine** V. 11, N 2, P 307-310, Abril 2000.

Cunha Filho G.A.; Schwartz C.A.; Resck I.S.; Murta M.M.; Lemos S.S.; Castro M.S.; Kyaw C.; Pires O.R.; Jr, Leite J.R.; Bloch C. Jr; Schwartz E.F.; Antimicrobial activity of the bufadienolides marinobufagin and telocinobufagin isolated as major components from skin secretion of the toad *Bufo rubescens*. **Toxicon** V. 45, N 6, P 777-779, Abril 2005.

Chen K.K.; Henderson F.G.; Comparative activity of bufadienolides. **Journal of Medicine and Pharmacy** V. 10, N 3, P 111-127, Abril 1961.

Hikino H.; Ito K.; Ota T.; Takemoto T.; Stereostructure of Rhodojaponin I, II, and III, Toxins of *Rhododendron japonicum*, and of Asebotoxin III, Toxin of *Pieris japonica*. **Chemistry Pharmacy Bull** V. 17, N 5, P 1006-1012, Maio 1999.

Subba Rao, N. V. .; Chemical examination of plant insecticides - Part II. Chemical components of *Derris scandens* **Indian Academy of Sciences** V. 4, N 7, P 365-374, Maio 1946.

Sun C.P.; Oppong M.B.; Unprecedented aminophysalin from *Physalis angulate*. **Organic Biomolecular Chemistry** V. 15, N 41, P 342-346, Outubro 2017.

Ma Y.; Han G.Q.; Studies on PAF antagonistic bicyclo(3,2,1) octanoid neolignans from *Piper kadsura*. **Yau Xue Xue Bao** V. 28, N 3, P 207-211, Outubro 2010.

Chenxi Z.; Dalin Y.; Rapid screening of antioxidant active constituents from puerariae lobatae radix based on the investigation of quantitative pattern-activity relationship. **Journal of Plant Microbial life** V. 11, N 4, P 302-305, Setembro 2015.

Yihui H.; Xiaoyan C.; Beta-Hydroxyisovalerylshikonin Inhibits the Growth of U266 Multiple Myeloma Cells by Triggering the Mitochondrial Pathway. **Journal of Leukemia** V. 2, N 4, P 384-389, Abril 2014.

Kim S.K.; Cho S.B.; Anti-complement activity of isolated compounds from the roots of Clerodendrum bungei Steud. **PythOther Resolutions** V. 24, N 11, P 100-106, Abril 2010.

Roy A.; Saraf S.; Limonoids: overview of significant bioactive triterpenes distributed in plants kingdom.. **BioPharmacy Bulletin** V. 29, N 2, P 191-201, Maio 2012.

Anexos

- **ANEXO 1 – Tabela 1 - Dados das amostras**

<https://drive.google.com/file/d/1MukMirKcPuDY2VWDgSAMqDcWkzITA0kU/view?usp=sharing>

- **ANEXO 2 – Tabela 2 - Composição de cada amostra e Tabela de comparação de concentração de substâncias**

<https://drive.google.com/file/d/1-2qnhhnvwkHDZWZm9taPkvJj-DgdXK6F/view?usp=sharing>