



AVALIAÇÃO METABOLÔMICA E ANTIOXIDANTE DO EXTRATO METANÓLICO DE *OCOTEA THINICOLA* VAN DER WERFF & P.L.R. MORAES (LAURACEAE)

Alana K. M. Miranda¹; Alda M. F. Fernandes¹; Victor S. A. de Lira¹; Paulo R. R. de Jesus¹; Floricéa M. Araújo¹.

¹ Universidade Federal da Bahia - UFBA, Instituto de Química, Departamento de Química Orgânica, Metabolomics Research Group, Rua Barão de Jeremoabo s/n, 40170 - 115, Salvador, Bahia, Brasil.

Palavras-Chave: Substâncias bioativas, Planta medicinal, Atividade leishmanicida.

Introdução

As plantas são amplamente utilizadas para fins medicinais e servem como alternativas terapêuticas complementares no tratamento de doenças, trazendo inúmeros benefícios quando empregadas de forma adequada. É importante destacar que elas podem apresentar diferentes constituintes químicos, que podem tanto promover benefícios quanto desencadear riscos potenciais à saúde (PEDROSO; ANDRADE; PIRES, 2021). Conhecer a composição química de espécies vegetais, contribui para garantir a segurança no uso medicinal e permite que os efeitos sejam aproveitados de forma eficaz e segura, minimizando o risco de reações adversas.

Ocotea, o maior gênero neotropical pertencente à família Lauraceae, compreende aproximadamente 350 espécies e está distribuído na América tropical e subtropical (ROHWER, 1993). No Brasil, foram identificadas cerca de 172 espécies (QUINET et al., 2016; BROTTTO; SANTOS; CERVI, 2013). Os principais constituintes que foram relatados para o gênero incluem lignanas, neolignanas, alcaloides, sesquiterpenos e flavonoides, além da presença de outros tipos de compostos minoritários como os alquilfenóis, arilpropenos, cumarinas, ésteres e saponinas. Estudos mostraram que os princípios ativos de *Ocotea* apresentam uma ampla atividade farmacológica, como atividades anti-inflamatórias, citotóxicas, antimicrobianas, e antiproliferativas (Salleh e Ahmad, 2017).

Ocotea thinicola van der Werff et P.L.R. Moraes, popularmente conhecida como Louro Cravo, é endêmica do bioma semiárido do Brasil e foi encontrada na área rural da cidade de Amargosa-Bahia, mais especificamente na Comunidade Quilombola de Três Lagoas. A espécie é amplamente utilizada no tratamento de feridas na pele de animais, sintoma comum associado à leishmaniose, doença parasitária transmitida por insetos. Para esta planta ainda não existem relatos referentes a determinação da composição química e atividades biológicas dos extratos, o que torna relevante este estudo numa perspectiva de determinar sua eficácia e garantir a segurança do seu uso medicinal. Dessa maneira, os resultados desta pesquisa fornecem as evidências necessárias para indicar futuras aplicações etnofarmacológicas da espécie.

Segundo Ruiz-Moreno 2020, a metabolômica é um campo de pesquisa ômica que realiza a caracterização abrangente de metabólitos em sistemas biológicos que podem fornecer uma visão geral dos eventos bioquímicos associados a um sistema celular. Tendo em vista a utilização da planta pela comunidade, os estudos para o gênero indicam uma rica



diversidade de compostos bioativos, o que pode contribuir para a presença de propriedades medicinais na espécie. Diante do exposto, este trabalho tem o objetivo de realizar a análise metabolômica, com o intuito de caracterizar a composição química do extrato metanólico de *O. thicola* e utilizar a análise estatística de correlação como ferramenta para associar as substâncias identificadas com a atividade antioxidante, que foi relatada anteriormente por este grupo de pesquisa (MIRANDA et al., 2023).

Material e Métodos

Avaliação por UPLC-MS

A avaliação por Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas, foi baseada na metodologia descrita por RIBEIRO et al., (2023). Os dados cromatográficos foram obtidos pelo Laboratório de Análises Cromatográficas e Espectrométricas (LACE), IQ - UFBA. A análise realizada possuiu o auxílio do Metabolomics Research Group (MRG). Inicialmente, foi preparada a solução do extrato metanólico com solvente grau HPLC com concentração de 1mg/ml e filtrada utilizando uma membrana de 0.45 μm . Após diluição, a injeção foi realizada no equipamento com uma solução de concentração 0,5 mg/ml. As condições de aquisição dos dados incluíram a utilização de uma coluna C18 (3.0 mm x 150 mm, 2.6 μm , Kinetex, Phenomenex) à 40°C. O fluxo de injeção foi de 0.2 mL.min⁻¹. As condições de aquisição para o MS foram de 50 a 1000 m/z , 3,2 kV na interface ESI, utilizando o modo de ionização positivo.

Processamento dos resultados obtidos

Os espectros cromatográficos oriundo do UPLC-MS foram processados no programa XCMS, disponível em uma plataforma online, com acesso pelo endereço virtual: <https://xcmsonline.scripps.edu/>. O tratamento realizado pelo algoritmo do software possibilitou a transposição da intensidade dos picos do cromatograma, em uma tabela contendo as informações de cada área correspondente, suas respectivas relações massa/carga (m/z) e seus tempos de retenção.

Identificação das substâncias

A partir dos valores provenientes do XCMS, foram utilizados os m/z no banco de dados virtual do Human Metabolome Database (HMDB), com o intuito de identificar os possíveis metabólitos. Nesse sentido, a pesquisa foi feita utilizando $[M + H]^+$ e $[M + Na]^+$ como adutos e três ppm como erro máximo. Durante a consideração dos resultados foram admitidos somente metabólitos de origem vegetal. Em consonância a essa análise, foi realizada a comparação dos m/z com as massas das substâncias que já foram relatadas para o gênero, através do levantamento bibliográfico prévio para *Ocotea*. Foi necessário realizar o cálculo da massa molecular das substâncias e calcular o intervalo de 3 ppm, considerando os adutos $[M+H]^+$ e $[M+Na]^+$. Estes valores foram obtidos com o auxílio da plataforma online: calculadora de massas exatas, na função cálculo de m/z da fórmula molecular e erro de massa.

Análise estatística

Os dados foram submetidos no Metabo Analyst 6.0 e tratados pelo algoritmo do software. Dentre eles, o coeficiente de correlação de Spearman (ρ) é a medida utilizada para descrever a relação não-linear das amostras. Os seguintes parâmetros foram utilizados para interpretar a correlação: O $\rho = 0,00$ a $0,3$, positivo ou negativo, indica uma correlação desprezível; $\rho = 0,3$ a $0,5$, positivo ou negativo, indica uma correlação fraca; $\rho = 0,5$ a $0,7$, positivo ou negativo, indica uma correlação moderada; $\rho = 0,7$ a $0,9$, positivo ou negativo, indica uma correlação forte; o $\rho = 0,09$ a $0,99$, positivo ou negativo indica uma correlação muito forte (MUKAKA, 2012).

Resultados e Discussão

A partir da análise por UPLC/MS, foi possível caracterizar o perfil metabolômico que indicou a presença de setenta e um metabólitos para o extrato metanólico de *Ocotea thinicola*. Foram observadas dezoito classes, dentre elas apresentam-se vinte alcalóides, dezessete flavonóides, sete ácidos e seus derivados, seis lignanas, quatro flavonas, dois terpenóides, duas xantonas, duas cumarinas, duas isoquinolinas, uma antraquinona, uma hidroquinolona, um álcool graxo, um flavonol, um composto fenólico, um tanino, um aminoácido, um esteróide e um oligossacarídeo (tabela 1). Os resultados obtidos para o ExM de *O. thicola*, destacam os alcalóides e flavonóides como constituintes majoritários o qual corroboram com as classes metabólicas já relatadas para outras espécies do gênero (Salleh e Ahmad, 2017),

A comparação dos setenta e um compostos identificados com resultados obtidos para outras espécies do gênero, indica que quarenta e quatro substâncias já haviam sido descritas anteriormente, o que corresponde a uma compatibilidade de aproximadamente 63% de semelhança química entre *Ocotea thinicola* e outras espécies do gênero. No entanto, vale destacar que a presença de xantonas, flavonas, esteróides e do álcool graxo, classes de metabólitos que ainda não haviam sido relatadas para o gênero.

Tabela 1 - Classes do ExM de *Ocotea thinicola* e suas respectivas substâncias

Classe	Substância
Alcalóides	Cassiticin; Armejavine; Coclaurine; N-methyl boldine; N-methyl isodomeesticine; Isodomeesticine; Norisoboldine; Roemerine; Roemerine N-Oxide; 6aR(-)-salsoline; (+)-3-hydroxynornuciferine; (+)-boldine; (+)-3-methoxynordomeesticine; (+)-nordomeesticine; Ocoxylinin; Ocotein; Dicentrin; 1,2-methylenedioxy-3, 10, 11-trimethoxypporphine; Thalictuberine; 3-O-demethylthalictuberine
Flavonóides	Ephedranine A; Quercetin; Astragaline; Kaempferol-3-O-pentoside; Isorhamnetin-glucuronide; Engeletin; Quercetin-3-O- β -D-galactoside; Kaempferol; Taxifolin; 5,4'-Dihydroxy-3,3'-dimethoxy-6:7-methylenedioxyflavone; Pyranodelphinin A; Pyranocyanin A; Eriodictyol 7-(6-cis-p-coumaroylglucoside); Eriodictyol; 7-(6-trans-p-coumaroylglucoside); Garcimangosone D; 6"-O-Acetylglycitin



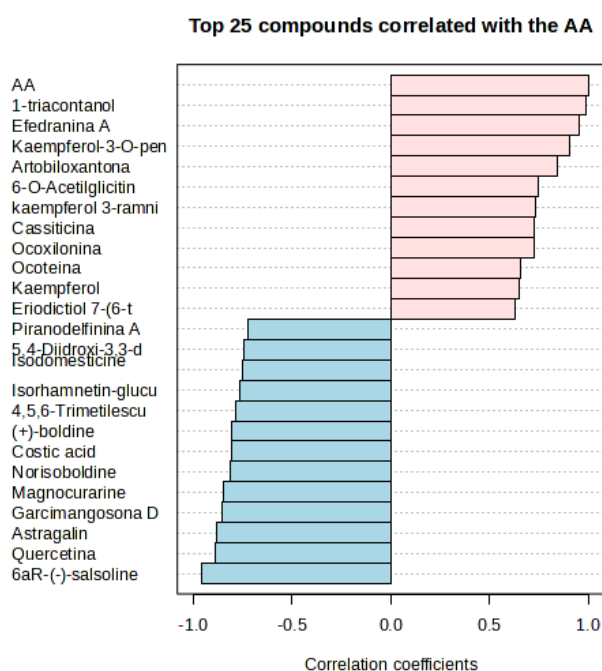
Classe	Substância
Ácidos	Costic acid; Quinic acid; Neochlorogenic acid methyl ester; Ethyl; 2-(4-hydroxyphenyl)acetate; 2-(4-hydroxyphenyl)acetic acid; 3,4-dicaffeoyl-1,5-quinolactone; 1,1'-ethylidenebityryptophan
Lignan	Mururin; crisoeriol 7-O-neohesperidoside; kaempferida 3-glicosídeo-7-ramnosídeo kaempferol 3-ramninosídeo; Tetrahydrobenzofuran-6(2H)-one (C ₂₃ H ₃₀ O ₇); Tetrahydrobenzofuran-6(2H)-one (C ₂₃ H ₃₀ O ₇)
Flavonas	Sylidian; 7,4'-dimethoxy-3'-hydroxyflavone; KB 2; Afzelin
Terpenóides	Cincassiol B; Geranylcitronellol
Xantonas	Artobioxanthone Dihydro-O-methylsterigmatocystin
Cumarinas	11-Metilgerberinol; 7,7'-Diidroxí-6,8'-biocoumarin
Isoquinolinas	S-(+)-reticuline; Magnocurarine
Antraquinonas	4',5,6-Trimetilescutelareína 7-glicosídeo
Hidroquinolonas	2-undecil-4(1H)-quinolinone
Álcool graxos	1-triacontanol
Flavonol	Theaflavonin
Compostos fenólicos	5-caffeoylquinic acid
Taninos	Ellagic acid 2-rhamnoside
Aminoácidos	(-)-trans-4-hydroxy-N-methylproline
Esteróide	(+)-pallidine
Oligossacarídeo	gamma-Chaconine

Para auxiliar na manutenção do equilíbrio e evitar o estresse oxidativo, as plantas possuem uma grande variedade de substâncias com propriedades antioxidantes que constituem um sistema exógeno de proteção, essas moléculas são denominadas como compostos bioativos (Manach, C. et al., 2004). As substâncias boldina, norisoboldina, ocoteína, dicentrina, quercetina e astragalín, identificadas no extrato, destacam-se por apresentar comprovação do potencial antioxidante. Essas substâncias são metabolizadas como mecanismo de defesa e amplamente reconhecidas por sua capacidade de neutralizar radicais livres, prevenindo o estresse oxidativo. Esses resultados corroboram com o que foi relatado para os extratos metanólicos do caule (IC₅₀ = 70,14 µg/ml) e folhas (IC₅₀ = 12,99 µg/ml) de *O. thinicola*, reforçando uma atividade antioxidante bastante significativa da espécie em estudo (MIRANDA et al., 2023).

Dos 71 metabólitos identificados, 12 apresentam registros de combate a leishmania, sendo a cassitina, boldina, norisoboldina, N-metil-boldina, talactuberina, quercetina, kaempferol, taxifolin, eriodictiol, afzelin, artobioxantona e principalmente a dicentrina

(Schmeda-Hirschmann et al., 2005), as substâncias atribuídas a este potencial da espécie. Estas informações contribuem para inferir que os alcalóides e flavonóides presentes na planta atuam, majoritariamente, como as classes responsáveis por essas características antioxidantes e pela ação antileishmanicida de *Ocotea thinicola*. Ao realizar a análise estatística de correlação de padrões lineares, entre os resultados obtidos na caracterização metabolômica e os valores encontrados para atividade antioxidante (MIRANDA et al., 2023), foi possível designar quais metabólitos possuem maior contribuição para atuar na redução dos radicais livres do extrato. No total foram obtidos os 24 metabólitos que mais influenciam na atividade da planta.

Imagem 1 - Correlação entre atividade antioxidante e os metabólitos do ExM



Foi identificado uma correlação positiva forte ($\rho = 0,7$ a $0,9$) para o 1-triacontanol, Efedranina A, Kaempferol-3-O-pentosídeo, Artobioxantona, 6-O-Acetilglicitina, Kaempferol 3-ramnosídeo, Cassitina e Ocoxilonina. Houve uma correlação positiva moderada ($\rho = 0,5$ a $0,7$) com a Ocoteina, Kaempferol e o Eriodictiol 7-(6-cis-p-cumaroilglicosídeo). Dentre as substâncias listadas com contribuição significativa para a atividade antioxidante, destaca-se a presença dos derivados do kaempferol, o kaempferol-3-O-pentosídeo (Kim et al., 2008) e o kaempferol-3-O-ramnosídeo (Céspedes-Acuña et al., 2020) além da ocoteína (Ara et al., 2004), que são amplamente reconhecidos por sua capacidade antioxidante. Houve uma correlação negativa e moderada para substâncias que geralmente apresentam atividade antioxidante, como a boldina (Speisky et al., 2009), isoboldina, norisoboldina (Li et al., 2007), quercetina (Boots et al., 2008) e astragalin (Seo et al., 2013). Logo, a correlação negativa apresentada por estes compostos possivelmente deve estar relacionada com a baixa concentração destas substâncias quando comparado aos demais constituintes presentes no extrato.



Conclusões

Este estudo permitiu a identificação de setenta e um metabólitos no extrato metanólico de *Ocotea thinicola*, dos quais 63% são comuns ao gênero *Ocotea*. Foram identificadas um total de 18 classes metabólicas para o ExM de *Ocotea thinicola*, possuindo os alcaloides e flavoanóides como constituintes comuns ao gênero. A avaliação metabolômica do extrato identificou a presença de 12 substâncias com atividades leishmanicidas e antioxidantes, a exemplo da dicentrina e cassinina. Este resultado contribui para a comprovação da eficácia terapêutica da espécie.

Além disto, a análise estatística revelou que a Cassitina, Kaempferol-3-O-pentosídeo, Kaempferol-3-O-ramnosídeo, Ocoxilonina e Efedranina A, são os compostos que mais contribuem no desempenho da atividade antioxidante, o que pode ser particularmente relevante para a atividade medicinal da planta, haja vista que ajuda na redução do estresse oxidativo associado à infecção e à cicatrização de feridas.

Assim, este trabalho não só reafirma o potencial de *O. thinicola* e do seu gênero, como também destaca a importância de ampliar as pesquisas sobre *Ocotea*, especialmente no aspecto biológico e medicinal, tendo como perspectiva realizar a avaliação metabolômica para os extratos em hexano e acetato de etila. A relação entre a atividade antioxidante e antileishmanicida dos compostos, além do uso tradicional de *O. thinicola* para tratar feridas pode abrir novas perspectivas para o desenvolvimento de terapias antileishmanicidas baseadas em plantas, o que contribuirá para a valorização do conhecimento tradicional da comunidade de Três Lagoas.

Agradecimentos

Ao PIBIC/UFBA, CNPQ, FAPESB pela bolsa e fomento à pesquisa, e ao Laboratório de Análises Cromatográficas e Espectrométricas LACE/IQ/UFBA pelo suporte do UPLC/MS.

Referências

ANDRADE, Géssica; PEDROSO, Reginaldo dos Santos; PIRES, Regina Helena. Plantas medicinais: uma abordagem sobre o uso seguro e racional. *Physis: Revista de Saúde Coletiva*, v. 31, n. 2, e310218, 2021.

Ara, M. M. et al. (2004). "Ocoteine from *Ocotea bullata* as an antioxidant compound." *Phytochemistry*, 65(15), 2091-2095. DOI: 10.1016/j.phytochem.2004.06.022

Boots, A. W., Haenen, G. R. M. M., & Bast, A. (2008). "Health effects of quercetin: From antioxidant to nutraceutical." *European Journal of Pharmacology*, 585(2-3), 325-337. DOI: 10.1016/j.ejphar.2008.03.008

BROTTO, M. L.; SANTOS, E. P.; CERVI, A. C. O gênero *Ocotea* (Lauraceae) no estado do Paraná, Brasil. *Rodriguésia*, Rio de Janeiro, v. 64, n. 3, p. 495-525, 2013.



Cespedes-Acuña, C. L., et al. (2020). "Kaempferol-3-O-rhamnoside isolated from *Persea lingue* and its antioxidant and vasodilator activity." *Phytotherapy Research*, 34(7), 1723-1730. DOI: 10.1002/ptr.6642

Kim, H. Y., et al. (2008). "Antioxidant activities of the extracts from the herbs of *Artemisia apiacea*." *Food Science and Biotechnology*, 17(2), 416-419.

MANACH, C. et al. Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition*, v. 79 (5), p. 727-747, 2004.

MIRANDA, Alana Kércia M.; MARTINS, Victoria Gomes; J., Paulo Roberto R. de; AONA, Lidyanne Y. S.; ARAÚJO, Floricéa M. Determination of Flavonoids, Tannins, Total Phenols and Antioxidant Activity of crude extracts of the species *Ocotea thincicola* van der Werff & P.L.R Moraes (Lauraceae). In: 9th Brazilian Conference on Natural Products, 2023, Salvador.

MUKAKA, M. M. Statistics corner: A guide to appropriate use of correlation coefficient in medical research. *Malawi Medical Journal*, v. 24, n. 3, p. 69–71, 2012.

QUINET, A. et al. Lauraceae in Flora do Brasil 2020 em construção. Rio de Janeiro: Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2016.

PEDROSO, Reginaldo dos Santos; ANDRADE, Géssica; PIRES, Regina Helena. Plantas medicinais: uma abordagem sobre o uso seguro e racional. *Physis: Revista de Saúde Coletiva*, v. 31, n. 2, e310218, 2021.

RIBEIRO, Luiz A. F.; SANTOS, Iago B. F. dos; FERRAZ, Caline G.; SOUZA-NETA, Lourdes C. de; SILVA, Valdenizia R.; SANTOS, Luciano de S.; BEZERRA, Daniel P.; SOARES, Milena B. P.; ZAMBOTTI-VILLELA, Leonardo; COLEPICCOLO, Pio;

FERREIRA, Antonio G.; ARAÚJO, Floricéa M.; RIBEIRO, Paulo R. Bioactive compounds from *Vellozia pyrantha* A.A.Conc: A metabolomics and multivariate statistical analysis approach. *Fitoterapia*, v. 171, p. 105686, 2023. DOI: 10.1016/j.fitote.2023.105686.

ROHWER, J. G. Lauraceae. In: KUBITZKI, K.; ROHWER, J. G.; BITTRICH, V. (Ed.). *The families and genera of vascular plants: volume 2*. Amsterdam: Springer, 1993. p. 366-391.

Ruiz-Moreno, M. I. et al. Metabolomics and the Mediterranean diet. In: PREEDY, V. R.; WATSON, R. R. (Ed.). *The Mediterranean Diet*. 2. ed. London: Academic Press, 2020. p. 517-525.

Salleh WMN, Ahmad F. Fitoquímica e atividades biológicas do gênero *Ocotea* (Lauraceae): uma revisão sobre resultados de pesquisas recentes (2000-2016). *J App Pharm Sci*, 2017; 7 (05): 204-218.

Schmeda-Hirschmann, G. et al. (2005). "Antioxidant activity of alkaloids from *Prosopis* species." *Journal of Ethnopharmacology*, 99(2), 185-190. DOI: 10.1016/j.jep.2005.01.019



63º Congresso Brasileiro de Química
05 a 08 de novembro de 2024
Salvador - BA

Seo, O. N., et al. (2013). "Determination of polyphenol components of Korean prostrate spurge (*Euphorbia supina*) and their antioxidant effects." *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 6(3), 253-258. DOI: 10.1016/S1995-7645(13)60030-8

Speisky, H. et al. (2009). "Boldine and its antioxidant properties: critical review." *Toxicology*, 259(1-2), 1-9. DOI: 10.1016/j.tox.2009.01.005