

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

Fernanda Brum Pires

**PERFIL CROMATOGRÁFICO DE CONSTITUINTES FENÓLICOS EM
ESPÉCIES MEDICINAIS DA FLORA BRASILEIRA**

Santa Maria, RS
2016

Fernanda Brum Pires

**PERFIL CROMATOGRÁFICO DE CONSTITUINTES FENÓLICOS EM
ESPÉCIES MEDICINAIS DA FLORA BRASILEIRA**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração em Controle e Avaliação de Insumos e Produtos Farmacêuticos, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Ciências Farmacêuticas**.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Barcellos da Rosa

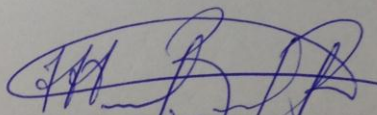
Santa Maria, RS
2016

Fernanda Brum Pires

**PERFIL CROMATOGRÁFICO DE CONSTITUINTES FENÓLICOS EM ESPÉCIES
MEDICINAIS DA FLORA BRASILEIRA**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração em Controle e Avaliação de Insumos e Produtos Farmacêuticos, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Ciências Farmacêuticas**.

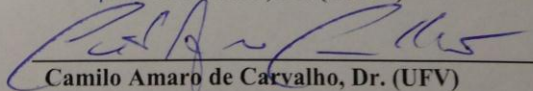
Aprovada em 19 de Fevereiro de 2016:



Marcelo Barcellos da Rosa, Dr. (UFSM)
(Presidente/Orientador)



Marcio Mazutti, Dr. (UFSM)



Camilo Amaro de Carvalho, Dr. (UFV)

Santa Maria, RS
2016

AGRADECIMENTOS

A Deus, por iluminar meu caminho e dar força para enfrentar os momentos difíceis desta caminhada.

Aos meus pais, Everton e Marion, pelo amor infinito, pelos ensinamentos de vida, vocês são meus exemplos de força e fé, se não fosse vocês jamais teria alcançado meus objetivos. Amo vocês!

Aos meus filhos de quatro patas, pelo companheirismo e carinho.

Aos meus avós Lindair e Sady, por serem meus segundos pais e por terem me dado muito carinho. Agradeço a força e compreensão de vocês, assim como dos tios, tias e primas nos momentos de ausência.

Ao meu namorado Daniel, pelo amor, apoio, paciência e por ser um dos maiores incentivadores desses desafios (Mestrado e Doutorado), por sempre acreditar em mim mais do que um dia até eu mesma acreditei.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Marcelo Barcellos da Rosa, pela acolhida e pela oportunidade de realizar o Mestrado, por todos os ensinamentos e pelo constante incentivo. Tenho certeza que tenho muito mais a crescer nos próximos anos de convivência que teremos.

A grande amiga Márcia Barichello, você é um exemplo de bondade e dedicação. Apenas palavras não são suficientes para agradecer o carinho de amiga e muitas vezes até mãe, no entanto não posso deixar de registrar o quanto você foi importante para realização dessa conquista, obrigada pela ajuda, apoio e por todos os ensinamentos transmiti-los, com tanto carinho. Obrigada por tudo!

As amigas, Carolina Bolssoni Dolwitsch, Thaís Dal Molin, Valéria Dal Prá, Patrícia Mattiazzi, Diana Muratt e Mariana Bortoluzzi, pelo carinho, pelo apoio, pelas risadas, vocês fazem essa trajetória mais leve e alegre, obrigada pela amizade!

Aos colegas Marcella Schmidt e Henrique Faccin, a atenção de vocês em ajudar, até mesmo quando estão ocupados.

A colega Débora Monego por ter me ajudado bastante com o inglês.

A todos os professores e demais colegas do Laboratório de Análises Químicas (LACHEM), todos contribuíram de alguma forma para realização deste trabalho.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

RESUMO

PERFIL CROMATOGRÁFICO DE CONSTITUINTES FENÓLICOS EM ESPÉCIES MEDICINAIS DA FLORA BRASILEIRA

AUTORA: Fernanda Brum Pires
ORIENTADOR: Marcelo Barcellos da Rosa

O uso de plantas com finalidade terapêutica é uma prática milenar exercida pela população desde os tempos remotos do homem na terra. No Brasil, a fitoterapia é bastante expressiva devido a nobre biodiversidade vegetal existente. Tem-se que as ações medicinais desempenhadas pelos vegetais, são decorrentes da presença de metabólitos secundários em sua composição. Com isso, nos últimos anos, pesquisas destinadas a identificação de fitocompostos tem ganhado espaço, como é o caso dos compostos fenólicos, em razão de suas inúmeras propriedades farmacológicas. Nesse sentido, este trabalho objetivou estudar os constituintes fenólicos presentes nas espécies medicinais, *Connarus perrottetti* var. *angustifolius*, *Cecropia palmata*, *Cecropia obtusa* e *Mansoa alliacea*, oriundas da Amazônia brasileira, extensivamente utilizadas na medicina popular, entretanto com escassa comprovação científica acerca da composição química. Dessa forma, este estudo propõe determinar o perfil cromatográfico de compostos fenólicos, nas espécies mencionadas, obtidos em três diferentes anos de coleta e submetidos à extração com solventes de polaridade distintas, sendo caracterizados por cromatografia líquida de alta eficiência. Foram identificados alguns ácidos fenólicos e flavonoides, nesse sentido, pode-se sugerir que as atividades exercidas pelas espécies sejam em decorrência da presença destes em suas composições. Ainda, observou-se que no período avaliado os vegetais não apresentaram os mesmos constituintes, nem mantiveram a mesma concentração, no entanto, sabe-se que diversos fatores bióticos e abióticos podem ter contribuído para tal comportamento, mesmo assim fica evidente a importância da análise química detalhada das espécies vegetais, destinadas ao tratamento terapêutico, como forma de garantir a concentração ideal de compostos ativos.

Palavras-chave: espécies medicinais. polifenóis. cromatografia líquida de alta eficiência. perfil cromatográfico.

ABSTRACT

CHROMATOGRAPHIC PROFILE OF PHENOLIC COMPOUNDS IN MEDICINAL PLANTS OF BRAZIL

AUTHOR: Fernanda Brum Pires
ADVISER: Marcelo Barcellos da Rosa

The use of plants for therapeutic purposes is an ancient practice. In Brazil, the herbal medicine is very expressive due to a great plant biodiversity. The medicinal value attributed to some plants results from the presence of secondary metabolites in their composition. Recently, many studies aimed the identification of phytochemicals, such as phenolic compounds, since they present important pharmacological properties. This study investigated the phenolic constituents present in the medicinal species *Connarus perrottetti* var. *angustifolius*, *Cecropia palmata*, *Cecropia obtusa* and *Mansoa alliacea*. These plants are found in Brazilian Amazon and are extensively utilized in popular medicine, even though there is little scientific knowledge on their chemical composition. Therefore, this study aims to determine the chromatographic profile of phenolic compounds in the aforementioned species, collected in three different years, submitted to extraction with solvents of different polarities and finally characterized by high-performance liquid chromatography. Some phenolic acids and flavonoids have been identified, suggesting that these plants pharmaceutical potential is correlated to their composition. Furthermore, it was observed that the composition, and even concentrations, varied over the period evaluated. Although various biotic and abiotic factors may have contributed to such behavior, the importance of detailed chemical analysis is evident in order to ensure the ideal concentrations of active compounds for the therapeutic treatment.

Keywords: medicinal plants. polyphenols. high-performance liquid chromatography. chromatographic profile.

LISTAS DE FIGURAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 1 - Biossíntese dos metabólitos secundários..... 18

ARTIGO

Figure 1- Chromatographic separation of the 13 antioxidants standards by DAD and Standard spectrum /sample..... 40

Figure 2 - Phenolic compounds found in the studied species via HPLC-DAD: (a) *Connarus perrottetti* var. *angustifolius*, (b) *Cecropia obtusa*, (c) *Cecropia palmata* and (d) *Mansoa alliacea*..... 41

LISTA DE QUADROS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Quadro 1 - Panorama geral para os gêneros <i>Connarus</i> , <i>Cecropia</i> e <i>Mansoa</i>	21
Quadro 2 - Literatura acerca da obtenção e caracterização de constituintes fenólicos para espécies dos gêneros <i>Connarus</i> , <i>Cecropia</i> e <i>Mansoa</i>	25

LISTA DE TABELAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Tabela 1 - Compostos fenólicos estudados..... 19

ARTIGO

Table 1 - Data from the chromatographic separation via HPLC-DAD..... 38

Table 2 - Tandem mass spectrometry (MS/MS) parameters of investigated phenolic compounds..... 49

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APCI	Ionização química com pressão atmosférica, do inglês, atmospheric pressure chemical ionization
EAU	Extração assistida por ultrassom
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária/ Brazilian Agricultural Research Cooperation
ESI	Ionização eletrospray, do inglês, electrospray ionization
GC-MS	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas, do inglês, gas chromatography-mass spectrometry
HPLC	Cromatográfica líquida de alta eficiência, do inglês, high-performance liquid chromatography
HPLC-DAD	Cromatográfica líquida de alta eficiência com detecção arranjo de diodos, do inglês, high-performance liquid chromatography-diode array detection
INMET	Instituto Nacional de Meteorologia/ National Institute of Meteorology
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia/ National Institute of Metrology
LC-MS	Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas, do inglês, liquid chromatography-mass spectrometry
LC-MS/MS	Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas sequencial, do inglês, liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry
LD/LOD	Limite de detecção/limit of detection
LQ/LOQ	Limite de quantificação/limit of quantification
MRM	Monitoramento de reação múltipla, do inglês, multiple reaction monitoring
OMS/WHO	Organização Mundial de Saúde/ World Health Organization
RMN	Ressonância magnética nuclear
UHPLC-ESI-MS/MS	Ultra-high-performance liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry
UV	Ultravioleta
UV/VIS	Ultravioleta/visível

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.2 OBJETIVOS	16
1.2.1 Objetivo Geral	16
1.2.2 Objetivos Específicos	16
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1 METABOLISMO VEGETAL	17
2.2 COMPOSTOS FENÓLICOS	18
2.3 PLANTAS MEDICINAIS	20
2.4 MÉTODOS DE EXTRAÇÃO	22
2.5 MÉTODOS DE CARACTERIZAÇÃO	24
2.6 PROPRIEDADES MEDICINAIS DOS POLIFENOIS	26
2.6.1 Atividade antioxidante	26
2.6.2 Atividade anti-inflamatória	27
2.6.3 Atividade antimicrobiana	27
3 ARTIGO – Distribution of Phenolic Compounds in <i>Connarus</i>, <i>Cecropia</i> and <i>Mansoa</i> Species	29
Abstract	31
Introduction	32
Experimental	34
Reagents	34
Sampling	35
Extraction procedure	35
Infusions	36
HPLC-DAD apparatus	36
UHPLC-ESI-MS/MS apparatus	38
Results and Discussion	39
<i>Connarus perrottetti</i> var. <i>angustifolius</i>	42
<i>Cecropia obtusa</i>	44
<i>Cecropia palmata</i>	45
<i>Mansoa alliacea</i>	46
Analysis of infusions by HPLC-DAD	48
Confirmation of the identity of antioxidant compounds by UHPLC-ESI-MS/MS	48
Conclusion	51
Acknowledgements	52
References	53
Supplementary Information	58
4 CONCLUSÃO	61
REFERÊNCIAS	63
APÊNDICE A – PERFIL CROMATOGRÁFICO <i>Connarus angustifolius</i> – 2012	69
APÊNDICE B – PERFIL CROMATOGRÁFICO <i>Connarus angustifolius</i> – 2013	70
APÊNDICE C – PERFIL CROMATOGRÁFICO <i>Connarus angustifolius</i> – 2014	73
APÊNDICE D – PERFIL CROMATOGRÁFICO <i>Cecropia obtusa</i> – 2012	75
APÊNDICE E – PERFIL CROMATOGRÁFICO <i>Cecropia obtusa</i> – 2013	76
APÊNDICE F – PERFIL CROMATOGRÁFICO <i>Cecropia obtusa</i> – 2014	77
APÊNDICE G – PERFIL CROMATOGRÁFICO <i>Cecropia palmata</i> – 2012	78
APÊNDICE H – PERFIL CROMATOGRÁFICO <i>Cecropia palmata</i> – 2013	79
APÊNDICE I – PERFIL CROMATOGRÁFICO <i>Mansoa alliacea</i> – 2012	81

APÊNDICE J – PERFIL CROMATOGRÁFICO <i>Mansoa alliacea</i> – 2013 e 2014.....	82
APÊNDICE L – PERFIL CROMATOGRÁFICO INFUSÃO <i>Connarus angustifolius</i>....	83
APÊNDICE M – PERFIL CROMATOGRÁFICO INFUSÃO <i>Cecropia obtusa</i>.....	84

1 INTRODUÇÃO

Desde os tempos remotos as drogas oriundas da natureza são utilizadas como recurso terapêutico no tratamento das doenças (PETROVSKA, 2012; SCHMITZ et al., 2005). O uso de plantas medicinais constitui uma prática milenar (VEIGA; PINTO; MACIEL, 2005), a qual representa parte da história de nossos ancestrais na terra (REZENDE; COCCO, 2002). Como se sabe, nos primórdios da humanidade não havia informações sobre as razões das doenças nem mesmo se conhecia como as plantas podiam curar as enfermidades em vista disso, essa atividade ocorria de forma instintiva e baseada em experiências (PETROVSKA, 2012). O emprego da fitoterapia originou-se a partir dos conhecimentos populares e durante muito tempo permaneceu como única alternativa para os problemas de saúde (ALVIM et al., 2006).

Ao longo dos anos, gradualmente o uso de plantas abandonou o lado empírico à medida que foram comprovadas cientificamente a eficácia de algumas espécies (PETROVSKA, 2012). Sendo nas últimas décadas consolidado por atuar de maneira complementar a medicina moderna (ALVIM et al., 2006).

O Brasil é um país com grande potencial para pesquisas envolvendo espécies vegetais, uma vez que apresenta a maior biodiversidade do planeta (PORT'S et al., 2013). Dentre os diversos biomas existentes, a Floresta Amazônica apresenta maior destaque já que sozinha compreende um quarto das espécies animais e vegetais do mundo (BIESKI et al., 2015).

No entanto, a maioria das espécies de plantas brasileiras ainda não foram estudadas, representando uma economia em potencial que precisa ser explorada (BOLZANI et al., 2012). Nesse sentido, são necessários estudos envolvendo as espécies vegetais destinados à identificação de constituintes químicos a fim de justificar as atividades farmacológicas desempenhadas.

Sabe-se que o metabolismo vegetal ocorre através da síntese de metabólitos primários e secundários. O metabolismo secundário desempenha um importante papel no processo de adaptação das plantas ao ambiente e ainda representa uma fonte de produtos bioativos (BOURGAUD et al., 2001).

Com isso, as ações medicinais que as plantas apresentam são atribuídas à presença de metabólitos secundários em sua constituição (PAREKH; KARATHIA; CHANDA, 2006), dentre estes os compostos fenólicos, um grupo amplamente distribuído no reino vegetal

responsável por diversas propriedades terapêuticas (CARVALHO; GOSMANN; SCHENKEL, 2004, p. 519, 528; PIETTA, 2000).

Inúmeras espécies da flora brasileira despertam interesse medicinal. Dentre estas, tem-se *Connarus perrottetti* var. *angustifolius*, *Cecropia palmata*, *Cecropia obtusa* e *Mansoa alliacea*, nativas da Amazônia, extensivamente utilizadas pela população local para diversos problemas de saúde.

Considerando as características da região Amazônica, o clima é bastante peculiar visto que, compreende um “período seco” de julho a outubro e um “período chuvoso” de dezembro a maio (ANANIAS et al., 2010). As espécies podem responder de maneira diferenciada, já que o conteúdo de metabólitos secundários é largamente influenciado por fatores ambientais (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

Nos últimos anos, houve um crescente aumento no interesse de polifenóis em vegetais. Seja tanto por parte da pesquisa, como pelo consumo humano, devido ao potencial nutricional e valor terapêutico agregado (AJILA et al., 2011).

Tendo em vista as escassas informações na literatura acerca dessas espécies, ainda considerando que não foram encontrados estudos dedicados a avaliar a constituição química principalmente no que tange a avaliação em diferentes períodos de amostragem, tornam-se relevantes pesquisas como esta. Desse modo, despertou-se interesse em obter dados científicos consistentes sobre as espécies a luz da temática, tanto da constituição fenólica, quanto do comportamento frente a diferentes períodos de coleta, procurando-se ainda estabelecer relação entre os compostos bioativos identificados e as atividades descritas pela medicina popular.

A pesquisa de produtos naturais aliada a métodos analíticos envolvendo cromatografia líquida de alta eficiência e espectrometria de massas possibilitam a identificação, quantificação e confirmação estrutural dos compostos de interesse (BOLZANI et al., 2012). Por consequência, auxiliam na investigação dos constituintes responsáveis pelas ações medicinais.

As plantas objeto de estudo desse trabalho estão sendo pesquisadas de forma consorciada com outros grupos de pesquisa, os quais possibilitam um estudo interdisciplinar. As espécies foram escolhidas pela ampla ação farmacológica bem como ao apelo nutricional, ambos mencionados pela medicina popular.

A presente dissertação está organizada na forma de artigo científico. Inicialmente é apresentada a introdução, objetivo geral, objetivos específicos e revisão da literatura. Na

sequência, é apresentado o artigo científico referente aos resultados experimentais desse trabalho, seguido da conclusão da pesquisa realizada. Ainda em apêndice encontra-se o perfil cromatográfico dos extratos e infusões que apresentaram os compostos de interesse nos diferentes anos de coletas das espécies estudadas.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo Geral

Estudar a constituição química das espécies *Connarus perrottetti* var. *angustifolius*, *Cecropia palmata*, *Cecropia obtusa* e *Mansoa alliacea*, considerando o perfil cromatográfico em extratos de polaridades distintas obtidos em três anos de coleta.

1.2.2 Objetivos Específicos

- Identificar e quantificar os constituintes fenólicos nas frações hidroalcoólico, n-butanol e acetato de etila, utilizando cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por arranjo de diodos (HPLC-DAD) para cascas de *Connarus perrottetti* var. *angustifolius* e folhas de *Cecropia palmata*, *Cecropia obtusa* e *Mansoa alliacea* obtidas em três anos de coletas;
- Obter a confirmação estrutural através de cromatografia líquida de ultra- alta eficiência baseado na espectrometria de massas (UHPLC-ESI-MS/MS) para cascas de *Connarus perrottetti* var. *angustifolius* e folhas de *Cecropia palmata*, *Cecropia obtusa* e *Mansoa alliacea* obtidas em três anos de coletas, para os constituintes fenólicos identificados anteriormente por HPLC-DAD;
- Estabelecer relação entre os constituintes fenólicos identificados nas cascas de *Connarus perrottetti* var. *angustifolius* e folhas de *Cecropia palmata*, *Cecropia obtusa* e *Mansoa alliacea* e as principais atividades descritas para as espécies pela medicina popular;

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

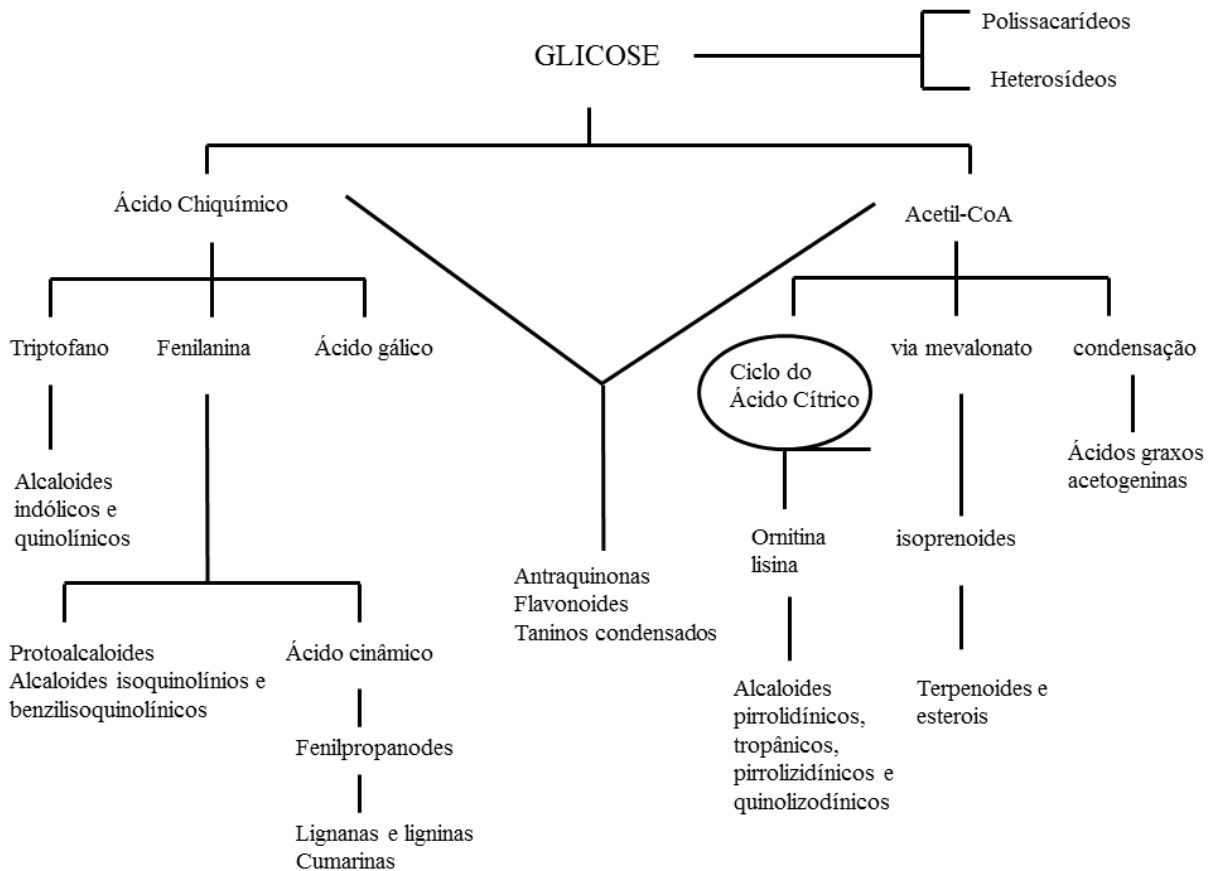
2.1 METABOLISMO VEGETAL

Tem-se por metabolismo, o conjunto de transformações das moléculas orgânicas, catalisadas por enzimas, que ocorre em células vivas, fornecendo energia e garantindo a continuidade das espécies. O metabolismo vegetal compreende metabólitos, conhecidos por primários e secundários (PEREIRA; CARDOSO, 2012). O metabolismo primário ou essencial é responsável pela síntese de celulose, ligninas, proteínas, lipídeos, açúcares e outras substâncias relacionadas às funções vitais (PEREIRA; CARDOSO, 2012), como divisão celular e crescimento, respiração, armazenamento e reprodução (BOURGAUD et al., 2001).

O metabolismo secundário ou não essencial é produzido a partir do primário, por aminoácidos ou acetil coenzima A (MATSUMURA et al., 2013, p 4). Este está diretamente envolvido nos mecanismos que permitem a adequação dos vegetais ao meio (PEREIRA; CARDOSO, 2012), pois conferem proteção contra patógenos como insetos, fungos, vírus e bactérias e radiação ultravioleta (SANTOS, 2004, p 404; TIVERON et al., 2012). Ainda, estão relacionados ao fato de conferirem diversas atividades biológicas, possuindo importância comercial, devido interesse farmacológico (BOURGAUD et al., 2001; ZUANAZZI; MONTANHA, 2004, p 601) e valor nutricional (HUBER; AMAYA, 2008; PEREIRA; CARDOSO, 2012).

Os metabólitos secundários classificam-se com base na origem biosintética, resultando em diversas classes de compostos bioativos (SANTOS, 2004, p 411). Em Pereira e Cardoso (2012), a origem destes pode ser resumida a partir do metabolismo da glicose, através de dois intermediários principais: o ácido chiquímico e o acetato. O ácido chiquímico é precursor de constituintes como: taninos hidrolisáveis, cumarinas, alguns alcaloides e fenilpropanoides; já os derivados do acetato originam terpenoides, esteroides, taninos condensados, alguns alcaloides dentre outros, como mostra a figura 1:

Figura 1 – Biossíntese dos metabólitos secundários:



Fonte: (SANTOS, 2004, p 411).

2.2 COMPOSTOS FENÓLICOS

O termo “fenólico” ou “polifenólico” pode ser definido como sendo uma substância que tem um ou mais núcleos aromáticos contendo substituintes hidroxilados e/ou seus derivados funcionais (ésteres, éteres metílicos, glicosídeos e outros). No entanto, deve-se levar em conta também sua origem biossintética para coerente definição (ZUANAZZI; MONTANHA, 2004, p 577).

Os compostos fenólicos são amplamente distribuídos no reino vegetal (CARVALHO; GOSMANN; SCHENKEL, 2004, p. 519), podem variar desde fenólicos simples a estruturas altamente polimerizadas (NACZK; SHAHIDI, 2004). Dividem-se em pelo menos 10 classes

de acordo com a estrutura química básica (BRAVO, 1998), sendo encontrados na tabela 1 os compostos de interesse neste trabalho.

Tabela 1 – Compostos fenólicos estudados:

(continua)

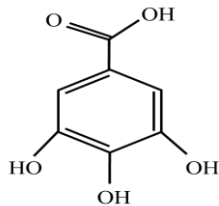
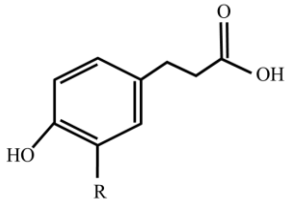
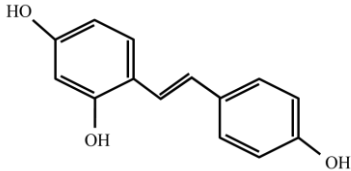
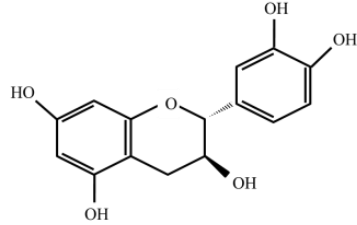
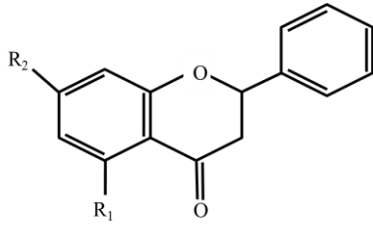
CLASSES/ COMPOSTOS FENÓLICOS	FÓRMULA ESTRUTURAL
<p><u>Ácido hidroxibenzoico</u></p> <p>Ácido Gálico</p>	
<p><u>Ácido hidroxicinâmico</u></p> <p>Ácido Cafeico: R=OH Ácido Ferúlico: R=OCH₃</p>	
<p><u>Estilbeno</u></p> <p>Resveratrol</p>	
<p><u>Flavanol</u></p> <p>Catequina</p>	
<p><u>Flavona</u></p> <p>Crisina: R₁ = R₂ = OH Flavona: R₁ = R₂ = H</p>	

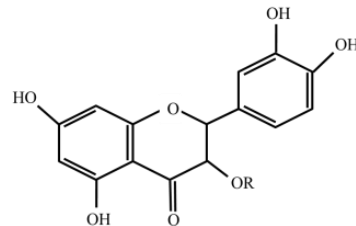
Tabela 1 – Compostos fenólicos estudados:

(conclusão)

CLASSES/ COMPOSTOS FENÓLICOS**FÓRMULA ESTRUTURAL**Flavonol – glicosilado

Quercitrina: R=raminose

Rutina: R=rutinose



Os ácidos fenólicos provêm da via do ácido chiquímico, podendo ser originados a partir do ácido benzoico (ácido gálico), os quais possuem esqueleto básico (C_6-C_1), outros se originam a partir ácido hidroxicinâmico (ácido cafeico e ferúlico), com esqueleto comum (C_6-C_3). Da combinação de unidades do ácido chiquímico com unidades de acetato, com estrutura básica ($C_6-C_2-C_6$), tem-se os estilbenos e ainda os flavonoides ($C_6-C_3-C_6$), sendo que os últimos podem subdividir-se em diversas classes, dependendo dos substituintes nos núcleos (BRAVO, 1998; SANTOS, 2004, p 411- 412, 422).





2.3 PLANTAS MEDICINAIS

Mesmo com o grande avanço da medicina moderna, a fitoterapia tem um espaço bastante significativo. Segundo a Organização Mundial de Saúde cerca de 80% da população dos países em desenvolvimento utilizam plantas ou preparações destas, como recurso terapêutico básico (BRASIL, 2006). Estima-se que cerca de 30% dos fármacos disponíveis no mercado mundial, derivem de fontes naturais (IPEA, 2011).

Desse modo, os dados referenciados demonstram a importância de pesquisas destinadas à identificação dos constituintes químicos, nesse caso os compostos fenólicos, visto que contribuem com informações científicas acerca da utilização das espécies na medicina tradicional e em razão das inúmeras propriedades terapêutica que estes podem oferecer.

No quadro 1, estão agrupadas as características botânicas, alguns fitocompostos já identificados e uso reconhecido pela medicina popular dos gêneros de interesse no estudo.

Quadro 1 – Panorama geral para os gêneros *Connarus*, *Cecropia* e *Mansoa*.

GÊNERO-ESPÉCIE	CARACTERÍSTICAS	FITOCOMPOSTOS	USO POPULAR
<p><i>Connarus perrottetti</i> var. <i>angustifolius</i></p> 	<p>O gênero <i>Connarus</i> pertence à família <i>Connaraceae</i>, possui 16 gêneros e cerca de 300 espécies, distribuídas nas regiões tropicais. Conhecido popularmente por barbatimão do Pará (PARACAMPO, 2011).</p>	<p>Taninos, catequinas, flavonoides, glicosídeos cardiotônicos, cumarinas e saponinas (OLIVERIA 2013).</p>	<p>Tratamento de infecções geniturinárias, hemorragia uterina, corrimento vaginal, cefaléia, doenças gástricas e tosse (COELHO-FERREIRA, 2009).</p>
<p><i>Cecropia obtusa</i></p>  <p><i>Cecropia palmata</i></p> 	<p>O gênero <i>Cecropia</i> pertence à família <i>Moraceae/ Cecropiaceae</i>, possuem cerca de 75 espécies distribuídas no Brasil. As árvores possuem troncos reto e oco que atingem de 4 a 30 metros e folhas grandes. Conhecidas popularmente por embaúbas (ARAGÃO et al., 2013; BERINGHS et al., 2015; LUENGAS-CAICEDO, 2005).</p>	<p>Flavonoides, catequinas, triterpenos, taninos, esteroides e saponinas (AREND, 2010; ROCHA et al., 2007; SANTOS et al., 2011).</p>	<p>Tratamento de enfermidades respiratórias (tosse, asma, expectorante) hipertensão, anti-inflamatória, antimicrobiana e diurética (AREND, 2010; FREITAS; FERNANDES, 2006; SANTOS et al., 2011).</p>
<p><i>Mansoa alliacea</i></p> 	<p>O gênero <i>Mansoa</i> pertence à família <i>Bignoniaceae</i>, inclui 11 espécies distribuídas principalmente em florestas secas e úmidas. Conhecida popularmente por cipó-de-alho (RIBEIRO 2008; ZOGHBI et al., 2009).</p>	<p>Alcaloides, taninos, flavonoides, quinonas glicosídeos, esteroides, cumarinas e derivados sulfurados (OLIVEIRA 2013; ZOGHBI et al., 2009).</p>	<p>Tratamento de resfriados, pneumonia e malária, como um inseticida e antirreumática (PATEL et al., 2013; ZOGHBI et al., 2009).</p>

2.4 MÉTODOS DE EXTRAÇÃO

A extração é o principal procedimento para a recuperação e isolamento dos compostos bioativos a partir de materiais de plantas antes da análise (STALIKAS, 2007). Dentre os diversos métodos de extração têm-se os chamados convencionais, como soxhlet, hidrodestilação e maceração, e os considerados alternativos a estes como ultrassom, fluido supercrítico, dentre outros (VINATORU, 2001; WU et al., 2015).

Nos últimos anos, a fim de ultrapassar as desvantagens dos métodos convencionais de extração, houve um crescente interesse por métodos alternativos, como a extração assistida por ultrassom (EAU). O processo extratório trás vantagens, simplicidade de operação, tempo reduzido do processo, menor quantidade de solvente utilizado e maior rendimento final (PORTO; PORRETTO; DECORTI, 2013).

A (EAU) ocorre baseada no fenômeno de cavitação acústica, o qual se refere à formação, crescimento e implosão de bolhas de gás. O colapso das bolhas de cavitação na fase líquida próximo da parede celular vegetal promove a ruptura celular facilitando a penetração do solvente e intensificando a transferência de massa (AJILA et al., 2011; BENELLI, 2010; MA et al., 2008).

Estudos de Hojnik e colaboradores (2007) avaliaram diferentes técnicas para extração de compostos da *Urtiga dioica*, os quais demonstraram que o ultrassom é um método alternativo e promissor visto que, possibilitou uma maior eficiência na extração. Esse método tem aumentado à eficácia de extrações envolvendo polifenóis em matrizes vegetais, já que reduzem o tempo de extração e não provocam degradação de compostos termolábeis (AJILA et al., 2011). É reconhecido pelo seu potencial de aplicação na indústria fitofarmacêutica (VILKHU et al., 2008).

Sabe-se que não existe um método de extração satisfatório para isolamento dos compostos fenólicos ou de uma classe específica, visto que a extração é influenciada por diversos fatores como: natureza química, tamanho de partícula, tempo e condições de armazenamento. Ainda, a solubilidade destes é influenciada pela polaridade do solvente sendo necessário o empregado de diferentes solventes e combinações com água (NACZK; SHAHIDI, 2004, 2006; STALIKAS, 2007), podendo também estar complexados a outros componentes vegetais e outras substâncias não fenólicas, afetando os procedimentos de extração (AJILA et al., 2011).

Assim como outros métodos, este também possuem suas limitações, visto que a extração assistida em banho de ultrassom perde em eficiência se comparada com a sonda de ultrassom (LUQUE- GARCIA; LUQUE DE CASTRO, 2003). No entanto, a metodologia de extração utilizada reflete o que se deseja obter, bem como, a instrumentação disponível.

2.5 MÉTODOS DE CARACTERIZAÇÃO

Existem diversos métodos reportados na literatura acerca da obtenção, detecção e quantificação de compostos fenólicos em extratos vegetais, os quais variam desde os mais preliminares como análise fitoquímica até metodologias mais sofisticadas como cromatográfica líquida acoplada a detector de massas (LC-MS), cromatografia gasosa acoplada a detecção de massas (CG-MS) e ressonância magnética nuclear (RMN).

Os ensaios de análise fitoquímica são ferramentas clássicas, baseiam-se na realização de reações químicas que resultam no desenvolvimento de coloração e/ou precipitado característico de grupos substâncias (FALKENBERG; SANTOS; SIMÕES, 2004, p 234-235).

Segundo Ignat e colaboradores (2013), a cromatografia líquida de alta eficiência-HPLC é a técnica mais utilizada para a separação e caracterização de polifenóis, possui instrumentação versátil e adaptável com vantagens, como alta seletividade, sensibilidade, resolução, precisão e preservação das amostras.

No entanto, a detecção no ultravioleta/visível (UV/VIS) apenas baseada na comparação dos tempos de retenção dos compostos com os padrões analíticos podem conduzir a erros de identificação, quando se trata de matrizes complexas como os extratos de plantas. Nesse contexto, as técnicas de hifenização LC-MS superam o problema mencionado, já que utilizam o potencial da separação do HPLC e elucidação estrutural de massas (IGNAT; VOLFF; POPA, 2013, p 2077).

A cromatografia gasosa é uma das principais técnicas disponíveis para análises de ácidos fenólicos em vegetais, no entanto devido ao grupamento hidroxil na estrutura apresentam baixa volatilidade necessitando de derivatização química, processo que promove a conversão de grupos hidroxil em éteres ou ésteres tornando estes compostos mais voláteis e passíveis de serem identificados por essa metodologia. Sua associação à espectrometria de massas garante sensibilidade e especificidade às análises (STALIKAS, 2007).

A ressonância magnética nuclear é uma técnica complementar utilizada na elucidação estrutural de constituintes fenólicos isolados de diferentes plantas medicinais. É necessário grande quantidade de amostra para análise, no entanto quando bidimensional não necessita de padrões de referência e apresenta várias vantagens em relação a outros instrumentos, sendo mais precisa e exata que a HPLC. Ainda fornece informação sobre impurezas e estruturas de compostos isômeros impossíveis de diferenciar LC-MS (AJILA et al., 2011).

No quadro 2, estão agrupadas informações encontradas na literatura quanto a extração, caracterização e os fitocompostos identificados referentes aos gêneros em estudo.

Quadro 2 – Literatura acerca da obtenção e caracterização de constituintes fenólicos para espécies dos gêneros *Connarus*, *Cecropia* e *Mansoa*.

PLANTA	MÉTODO DE EXTRAÇÃO	MÉTODO DE CARACTERIZAÇÃO	COMPOSTOS IDENTIFICADOS
<i>Connarus perrottetti</i> var. <i>angustifolius</i>	Sob refluxo	Análise fitoquímica	Saponinas, cumarinas e flavonoides (OLIVEIRA, 2013).
	Maceração	HPLC-PAD	Ácido gálico, ácido cafeico e catequina (SILVEIRA et al., 2015).
<i>Cecropia glaziovii</i>	Maceração e percolação	HPLC-UV	Rutina, quercetina, epicatequina e catequina (LUENGAS-CAICEDO, 2005).
<i>C. glaziovii</i>	Maceração	HPLC-UV	Ácido cafeico e clorogênico (BERINGHS et al., 2015).
<i>C. glaziovii</i> e <i>pachystachya</i>	Infusão	HPLC-DAD	Ácido clorogênico, isoorientina, orientina e isovitexina (COSTA et al., 2011).
<i>Cecropia obtusa</i> e <i>palmata</i>	Maceração	HPLC-PAD	Ácido <i>p</i> -coumárico, ácido ferúlico, ácido cafeico, resveratrol e catequina (SILVEIRA et al., 2015).
<i>Mansoa alliacea</i>	Maceração	Análise fitoquímica	Taninos, flavonoides e catequina (PATEL et al., 2013). Triterpenos e alcaloides (RIBEIRO, 2008).
	Maceração	HPLC-PAD	Ácido <i>p</i> -coumárico, ácido ferúlico e resveratrol (SILVEIRA et al., 2015).
	Sob refluxo	Análise fitoquímica	Alcaloides e taninos (OLIVEIRA, 2013).

As técnicas empregadas nesse trabalho para caracterização, quantificação e confirmação estrutural das espécies encontram-se referenciadas abaixo:

A cromatografia líquida de alta eficiência com detector arranjo de diodos (HPLC-DAD) fornece os dados espectrais no UV dos compostos separados; Assim, quando um pico corresponde ao tempo de retenção de um dos padrões analíticos, pode ser identificado pela comparação espectral de ambos (IGNAT; VOLFF; POPA, 2013 p 2076).

A cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa sequencial (LC-MS/MS) é amplamente utilizada a fim de evitar as ambiguidades relacionadas em outras técnicas. Nesse sentido, o acoplamento de dois ou mais analisadores de massas ao sistema aumenta ainda mais a sensibilidade e seletividade na detecção, pois geram dados estruturais adicionais relevantes para identificação. As fontes de ionização geralmente utilizadas na caracterização dos compostos fenólicos são APCI e ESI “atmospheric pressure chemical ionization” e “electrospray ionization” respectivamente (IGNAT; VOLFF; POPA, 2013 p 2080, 2082).

Na literatura, diversos estudos demonstram a importância e eficiência dos métodos de HPLC-DAD e LC-MS/MS na separação, identificação e quantificação de polifenóis em espécies vegetais, sendo dessa maneira empregadas por possibilitarem alcançar os objetivos propostos deste trabalho.

2.6 PROPRIEDADES MEDICINAIS DOS POLIFENOIS

Os constituintes fenólicos são reconhecidos por diversas propriedades medicinais, como antioxidantes, antibacterianas, antivirais (ZUANAZZI; MONTANHA, 2004, p 601-606), anti-inflamatórias, antialérgicas (PIETTA, 2000), entre outras. A seguir, encontra-se uma breve menção em relação às principais atividades farmacológicas descritas a cerca dos fitocompostos fenólicos.

2.6.1 Atividade antioxidante

O benefício mais bem conhecido de polifenóis para a saúde humana é atribuída a sua propriedade antioxidante (BANERJEE; RAJAMANI, 2013). Segundo Yao e colaboradores (2004), esses compostos possuem estrutura química ideal para a atividade de eliminação de radicais livres, já que apresentam não somente grupos hidroxila fenólicos que são propensos a

doar um átomo de hidrogênio ou um elétron para um radical livre, mas também um sistema aromático conjugado estendido para deslocar um elétron não emparelhado.

O potencial antioxidante dos compostos fenólicos está relacionado ao número e a disposição dos grupos hidroxilo na molécula de interesse (SHAHIDI; AMBIGAIPALAN, 2015). A atividade antioxidante dos flavonoides depende de sua estrutura química, de modo geral, quanto maior o número de hidroxilas, maior a atividade como agente doador de hidrogênios e elétrons (ALVES et al., 2007).

Derivados de ácidos fenólicos como ácido cafeico e ferúlico, quercetina, canferol, miricetina, dentre outros, são reportados na literatura acerca da atividade antioxidante (CARVALHO; GOSMANN; SCHENKEL, 2004, p. 528; ZUANAZZI; MONTANHA, 2004, p. 602). Em vista disso, estes compostos podem atuar retardando doenças relacionadas ao estresse oxidativo (CARVALHO; GOSMANN; SCHENKEL, 2004, p. 528), como diabetes, câncer, (SILVA; JASIULIONIS, 2014) e reumatismo (FERREIRA; MATSUBARA, 1997), assim a presença desses constituintes nas espécies vegetais justificam o uso terapêutico para tais finalidades.

2.6.2 Atividade anti-inflamatória

Em relação à atividade anti-inflamatória, os flavonoides atuam modulando células envolvidas com a inflamação (inibindo a proliferação de linfócitos T), inibindo a produção de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α e IL-1), modulando a atividade das enzimas da via do ácido araquidônico, tais como fosfolipase A2, ciclo-oxigenase e lipooxigenase, além de modularem a enzima formadora de óxido nítrico. Diversos compostos como, quercetina, canferol, rutina, apigenina, luteolina, crisina, vitexina (COUTINHO et al., 2009) e resveratrol (ANTUS et al., 2015; LÓPEZ-POSADAS et al., 2008) são mencionados pelo poder anti-inflamatório, nesse sentido sustentam a utilização medicinal de espécies que os contenham na composição em busca da propriedade terapêutica.

2.6.3 Atividade antimicrobiana

Os compostos de origem natural têm cada vez mais despertado interesse em pesquisas, principalmente no sentido de explorar a atividade antimicrobiana, devido ao aumento de casos

de resistência bacteriana, em razão o mau uso de antibióticos. Nesse sentido, tem-se destacado estudos envolvendo os compostos fenólicos (BORGES et al., 2013).

Para os polifenóis, assim como o sítio e o número de grupos hidroxilo influenciam a capacidade antioxidantes, também estão relacionados à toxicidade para os micro-organismos, sendo que o aumento hidroxilas resulta aumento da toxicidade. A ação de compostos como ácido gálico e ferúlico envolve mecanismos, como ruptura e formação de poros nas membranas celulares bacterianas (BORGES et al., 2013) tanto tem sido demonstrado para algumas bactérias positiva quanto negativas. Ainda, ácido gálico, catequina (DÍAZ-GÓMEZ et al., 2013, 2014; SARJIT et al., 2015) e resveratrol (BRONW et al., 2009) são reportados na literatura como agentes antibacterianos.

Estudos envolvendo a atividade antiviral principalmente englobam flavonoides como quercetina e seus derivados por inibição da replicação viral. Também encontram-se descritos quecitrina, canferol, apigenina, crisina, luteolina, galangina como agentes antivirais (ZUANAZZI; MONTANHA, 2004, p 601-602, 607).

Segundo Zhang e colaboradores (2013), rutina, apigenina e quercetina, apresentam atividade antifúngica. Com isso, justifica-se o uso terapêutico de espécies que apresentem esses constituintes na composição a fim de tratar infecções virais, fúngicas e bacterianas.

3 ARTIGO**Distribution of Phenolic Compounds in *Connarus*, *Cecropia* and *Mansoa* Species**

Artigo submetido ao periódico *Journal of the Brazilian Chemical Society*

----- Forwarded message -----

From: help_office@jbcs.sbq.org.br

Date: 2016-01-13 15:00 GMT-02:00

Subject: Journal of the Brazilian Chemical Society - Manuscript ID JBCHS-2016-0043

To: barcellos19720129@gmail.com, marcelo.b.rosa@ufsm.br

Cc:fernandabrumpires@gmail.com, caroldol@gmail.com, vdpdalpra@gmail.com, henriquefaccin1992@gmail.com, debora.monego@gmail.com, lemacarvalho@gmail.com, carineviana@yahoo.com.br, osmar.lameira@embrapa.br, barcellos19720129@gmail.com, marcelo.b.rosa@ufsm.br

13-Jan-2016

Dear Prof. Rosa: Your manuscript entitled "Distribution of phenolic compounds in *Connarus*, *Cecropia* and *Mansoa* species" has been successfully submitted online and is presently being given full consideration for publication in the Journal of the Brazilian Chemical Society.

Your manuscript ID is JBCHS-2016-0043.

Please mention the above manuscript ID in all future correspondence or when calling the office for questions. If there are any changes in your street address or e-mail address, please log in to ScholarOne Manuscripts at <https://mc04.manuscriptcentral.com/jbchs-scielo> and edit your user information as appropriate.

You can also view the status of your manuscript at any time by checking your Author Center after logging in to <https://mc04.manuscriptcentral.com/jbchs-scielo>.

Thank you for submitting your manuscript to the Journal of the Brazilian Chemical Society.

Sincerely, Journal of the Brazilian Chemical Society Editorial Office.

Distribution of Phenolic Compounds in *Connarus*, *Cecropia* and *Mansoa* Species

*Fernanda B. Pires,^a Carolina B. Dolwitsch,^a Valéria Dal Prá,^a Henrique Faccin,^b Débora Luana Monego,^b Leandro M. de Carvalho,^{a,b} Carine Viana,^a Osmar Lameira^c e Marcelo B. da Rosa^{*a,b}*

^aPrograma de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Santa Maria, Camobi, Santa Maria, RS 97105-900, Brazil

^bPrograma de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal de Santa Maria, Camobi, Santa Maria, RS 97105-900, Brazil

^cEmbrapa Amazônia Oriental, Belém, PA, 66095-100, Brazil

*e-mail: marcelobdarosa@gmail.com

Abstract

This paper provides an overview on the chemical composition of phenolic compounds in medicinal species *Connarus perrottetti* var. *angustifolius*, *Cecropia palmata*, *Cecropia obtusa* and *Mansoa alliacea*, collected in 2012, 2013 and 2014. The samples were obtained by ultrasound assisted extractions with hydroalcoholic solvent, butanol and ethyl acetate and analyzed by high-performance liquid chromatography with diode array detection. The results were confirmed by mass spectrometry. Compounds identified were: gallic acid, catechin, caffeic acid, ferulic acid, rutin, quercitrin and resveratrol. *Connarus perrottetti* showed greater diversity of polyphenols. *Mansoa alliacea* had the higher concentration of caffeic acid even though it was found in all species. Catechin was the major antioxidant, but was not detected in *Mansoa alliacea*. We verified that the phenolic composition of studied species, as well as concentrations, varied over the evaluated period. However, a discussion on the constituents and their medicinal action was established.

Keywords: medicinal species, phenolic compounds, antioxidants, liquid chromatography.

Introduction

The use of medicinal plants for prevention and recovery of infections as well as for health promotion is an ancient practice.¹⁻³ This activity grew out of popular knowledge and for a long time was the only alternative treatment for health problems.³

Throughout history, the therapeutic use of medicinal plants has been considered both positive and negative, depending on the prevailing culture of that time. However, in the 80s and 90s, it was rescued and scientifically grounded to complement modern medicine.³

The use of these plants today continues to expand. According to the World Health Organization (WHO), about 80% of world population uses traditional medicine in its primary health care needs.⁴

Brazil holds an expressive plant biodiversity, along with the largest rain forest on the planet: the Amazon.⁵ Although the employment of plants for medicinal purposes is very widespread in Brazil, knowledge about their chemical composition is rather limited, as most of them are applied with little or no scientific proof of action.⁶ In order to change this situation, relevant studies concerning the chemical composition of these species and the arising pharmacological properties are of considerable importance.

Properties of medicinal plants result from secondary metabolites present in their constitution.⁷ Phenolic compounds, for instance, are a group widely distributed in the Plantae kingdom and exert antioxidant, antibacterial, antiviral,⁸ anti-inflammatory and anti-allergic properties.⁹ Besides, these compounds grant the plant protection against ultraviolet radiation and pathogen attack such as insects, fungi, viruses and bacteria.^{8,10}

Polyphenols have been increasingly investigated and consumed in recent years due to their nutritional potential and therapeutic value.¹¹ However, numerous species of medicinal interest still need to be studied regarding this and other classes of compounds. Amongst them

are *Connarus perrottetti* var. *angustifolius*, *Cecropia palmata*, *Cecropia obtusa* and *Mansoa alliacea*, all native species of the Amazon rainforest, where they are extensively used by the locals with limited scientific information.

The species *Connarus perrottetti* var. *angustifolius*, popularly known as “barbatimão do Pará”, is a member of the Connaraceae family. This plant present antidiarrheal, anti-bleeding, anti-inflammatory, antibacterial, antifungal, antiviral and healing activities,⁵ being commonly used in the treatment of genitourinary infections in women, uterine bleeding, vaginal discharge, headache, gastric diseases and cough.¹²

The species *Cecropia palmata* and *Cecropia obtusa*, popularly known in Brazil as “Red Embaúba” and “White Embaúba” respectively, are both members of the Moraceae family.¹³ Plants of this genus present several recognized activities, such as antidiabetic,¹⁴ expectorant, mucolytic, antiseptic, laxative, antimicrobial,¹⁵ diuretic, antitussive and anti-inflammatory.¹⁴⁻¹⁶

In Brazil, especially in the state of Pará, *Mansoa alliacea* is popularly known as “cipó-d’alho” due to the characteristic smell of garlic released by its leaves when macerated.¹⁷ This plant belongs to the Bignoniaceae family and is used by its anti-rheumatic¹⁸, antimalarial¹⁹, antifungal and antiviral¹⁷ activities and to the treatment of respiratory diseases¹⁸.

Several factors can coordinate or change the rate of production of phenolic compounds and other secondary metabolites in plants. The period of collection is one of them, since the concentration and even nature of such compounds may vary considerably over the year.²⁰

Phenolic compounds range from simple to highly polymerized structures, which can withal be complexed to various other plant components. Therefore, different methods of extraction combined with solvents of different polarities are required to obtain them.²¹

This paper aims to identify and to quantify phenolic constituents, namely, gallic acid, catechin, caffeic acid, rutin, ferulic acid, quercitrin, myricetin, fisetin, resveratrol, quercetin,

kaempferol, chrysin and flavone, present in the species *Connarus perrottetti* var. *angustifolius*, *Cecropia palmata*, *Cecropia obtusa* and *Mansoa alliacea*. The samples analyzed were obtained by the extraction of plants collected in the experimental area of Brazilian Agricultural Research Corporation (EMBRAPA) Eastern Amazon (Belém, PA), in the period of 2012-2014, using ethanol/water, n-butanol and ethyl acetate as solvents. The separation, identification and quantification of the aforementioned compounds were carried out using high-performance liquid chromatography with diode array detection (HPLC-DAD). Confirmation of the results was obtained by performing an ultra-high-performance liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry (UHPLC-ESI-MS/MS) analysis. In addition, a discussion regarding the pharmaceutical applicability of such species was established.

Experimental

Reagents

Analytical standards of gallic acid, (+)-catechin, caffeic acid, rutin, quercetin, myricetin, fisetin, quercetin, kaempferol, chrysin and flavone were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Ferulic acid was purchased from Fluka (Buchs, Switzerland) and Resveratrol from Tedia (Rio de Janeiro, RJ, Brazil). All standards solutions used were of analytical grade ($\geq 95\%$ purity).

The mobile phase was prepared by diluting an 85% (v/v) Phosphoric acid (PA) (F. Maya, Brazil) with ultrapure water (Milli-Q, Millipore Synergy UV, Bedford, MA, USA) to a concentration of 0.1% (w/w) in a volumetric flask. The solution was then filtered under vacuum system (Primatec, 131, 2 V) through a 0.2 μm cellulose acetate membrane filter

(Sartorius, Goettingen, Germany). Acetonitrile was also in the composition of the eluent and was obtained from Panreac ITW companis (Germany).

Stock solutions of 1000 mg L⁻¹ were prepared by diluting each phenolic compound studied in HPLC grade methanol, supplied by Tedia (Rio de Janeiro, RJ, Brazil). They were stored in Falcon tubes at -30 °C. These solutions were then diluted in methanol to reach intermediate concentrations.

Plant samples were weighed on a digital analytical balance (Shimadzu / AUY 220) with a 0.0001 g precision.

Sampling

Barks of *Connarus perrottetti* var. *angustifolius* Radlk (IAN 184393) and leaves of *Cecropia palmata* Willd (IAN 185556), *Cecropia obtusa* Trécul (IAN 185555) and *Mansoa alliacea* (IAN 184394) were collected in April and May of 2012, 2013 and 2014, properly identified, dried and milled. All plants studied were provided by the Brazilian Agricultural Research Corporation (EMBRAPA Eastern Amazon, Belém, PA), located at 1° 27' 21'' S and 48° 30' 14'' W, at an altitude of 10 m and an average annual temperature of 30 °C.

According to Ananias et al.,²² the climate of the Amazon region is characterized by a dry period (July-October) and a rainy season (December-May), while June and November are considered transition periods. In addition, it is considered a hot and humid climate with very small temperature gradients. Therefore, samples studied were collected during the rainy season.

Extraction procedure

Plant extracts were prepared by ultrasound assisted extraction (Bandelin, Sonorex Super RK 510 H). Glass tubes containing approximately 0.2 g of the samples received 10 ml of the extraction solvent (70% hydroethanolic, butanol or ethyl acetate) and were placed in an ultrasonic bath for 4 hours at room temperature. Then, the supernatant was withdrawn and the remaining extract was filtered on a 0.22 μm membrane (Sorblin Technologie). Butanol and ethyl acetate were evaporated at 40 $^{\circ}\text{C}$ in a glass beaker. These extracts were later resuspended in HPLC grade methanol and filtered in a 0.22 μm membrane (Sorblin Technologie). The initial concentrations were maintained. The extracted samples remained stored at -30 $^{\circ}\text{C}$ until the analysis. Before injection into the chromatograph, all samples were diluted to 1% with HPLC grade methanol.

Infusions

50 mL of water at 90 $^{\circ}\text{C}$ were added to 1.5 g of dried plant. Thirty minutes later, the infusions were filtered, both by a paper filter and by a 0.22 μm membrane (Sorblin Technologie) and then stored at -40 $^{\circ}\text{C}$ until used. The samples injected were first diluted at 1% with HPLC grade methanol.

HPLC-DAD apparatus

The chromatographic analysis was performed in a Knauer chromatograph (Berlin, Germany) equipped with a manual Knauer injector (20 μL loop). The system consisted of a Smartline Pump 1000, a Smartline Manager 5000 and a Smartline UV detector 2600 with photodiode array technology. Instrument control and data acquisition and processing were managed by the ChromGate[®] V 3.3.1 Knauer software.

Identification and quantification of phenolic compounds were performed using the methodology developed by Lima.²³ Besides the low limits of detection and quantification presented by this chromatographic method, the analytical validation confirmed its selective, linear, precise and accurate character.

Compounds were separated with a gradient reverse-phase system. A 250 x 4.6 mm chromatographic column packed with C₁₈ (5µm particle diameter, Phenomenex) and a guard column with similar composition were employed. The mobile phase consisted of orthophosphoric acid solution (0.1%, w/w) as solvent A and acetonitrile as solvent B. The elution conditions were: 90-80% A and 10-20% B (0-5 min); 80-75% A and 20-25% B (5-35 min); 75-0% A and 25-100% B (35-55min). The flow rate of the mobile phase was 0.8 mL min⁻¹ (0-35 min) and 0.8-1.0 mL min⁻¹ (35-55 min). Room temperature (21 ± 2 °C) was monitored during all chromatographic runs. The wavelengths scanned were 220 nm, 254 nm, 320 nm and 360 nm.

Identification of compounds was based on the correspondence of retention times of chromatographic signals of plant extracts and reference materials, the ultraviolet (UV) spectra and by the addition of three different concentrations of the standard solutions to the samples.

Following, compounds were quantified by the standard addition method, which correlates the concentration of the standard solution (added in µmol L⁻¹) to the peak area. According to Ribani et al.,²⁴ the concentration of the samples analyzed may be determined through straight line extrapolation, corresponding to the point where it cuts the axis of the abscissae (x).

Table 1 shows the retention times of the antioxidant compounds found in plant species, as well as the detection wavelength (nm), limit of detection and limit of quantification of the chromatographic separation via HPLC-DAD.

Table 1. Data from the chromatographic separation via HPLC-DAD

Phenolic compound	t_R (min) ^a	λ (nm) ^b	LOD (mg kg ⁻¹) ^c	LOQ (mg kg ⁻¹) ^d
1. Gallic acid	4.40	220	0.7	1.0
2. (+)- Catechin	8.65	220	1.7	2.8
3. Caffeic acid	10.10	320	0.3	1.0
4. Rutin	12.45	254	0.6	2.4
5. Ferulic acid	14.75	320	0.5	1.0
6. Quercitrin	18.00	254	0.4	0.8
7. Resveratrol	28.45	320	0.4	0.8

^a t_R : Retention time; ^b λ : Wavelength; ^c LOD: Detection limit; ^d LOQ: Quantification limit.

The limits of detection (LOD) and of quantification (LOQ) were determined by the signal-to-noise ratio, in accordance to INMETRO - National Institute of Metrology (document DOQ-CGCRE-008)²⁵. The area and standard deviation of the retention times were computed through the injection of 7 replicates of the blank (matrix free of the compound of interest), in this case methanol (HPLC grade). $LOD = X + t_{(n-1)} \cdot s$ and $LOQ = X + 10 \cdot s$, where: X = mean of blanks, s = standard deviation of blanks, t = number of injections $(7-1) = 6$ degrees of freedom. Considering the degrees of freedom, the unilateral t , at a 99% confidence level, is 3.143.

UHPLC-ESI-MS/MS apparatus

The method developed and applied by Faccin et al²⁶ to detect the molecular ions through mass spectrometry was employed for confirmation purposes. This method employs the 1260 Infinity Binary UHPLC system (Agilent, Santa Clara, USA) and Zorbax SB-C₁₈ reverse-phase column, Rapid Resolution HD, 2.1 × 50 mm, 1.8 μm particle size (Agilent) maintained at 40 °C. The mobile phase consisted of 0.1% acetic acid (A) and acetonitrile (B) under a constant flow rate of 800 μL min⁻¹. 5 μL of the samples were automatically injected into the system and a gradient elution was used for the separation following the conditions: 8.0% B (0.00-0.10 min); 8.0-25.8% B (0.10 – 3.45 min); 25.8-54.0% B (3.45-6.90 min); 54.0-100.0% B (6.90-7.00 min); 100.0% B (7.00-9.00 min).

The liquid chromatography-mass spectrometry used an electrospray interface (ESI) as ionization source. Compounds were analyzed by an Agilent 6430 Triple Quadrupole Mass Spectrometer operating in multiple reaction monitoring mode (MRM). Data collection and treatment was managed by MassHunter Workstation Qualitative Analysis software (version B.04.00, Build 4.0.479.0, Agilent Technologies, Inc. 2011).

Results and Discussion

The methodology employed to determine the phenolic constituents by HPLC-DAD enables the separation and identification of thirteen antioxidants as shown in Figure 1 (A). Among these, seven were detected in the studied plants, namely, gallic acid (1), catechin (2), caffeic acid (3), rutin (4), ferulic acid (5), quercitrin (6) and resveratrol (9).

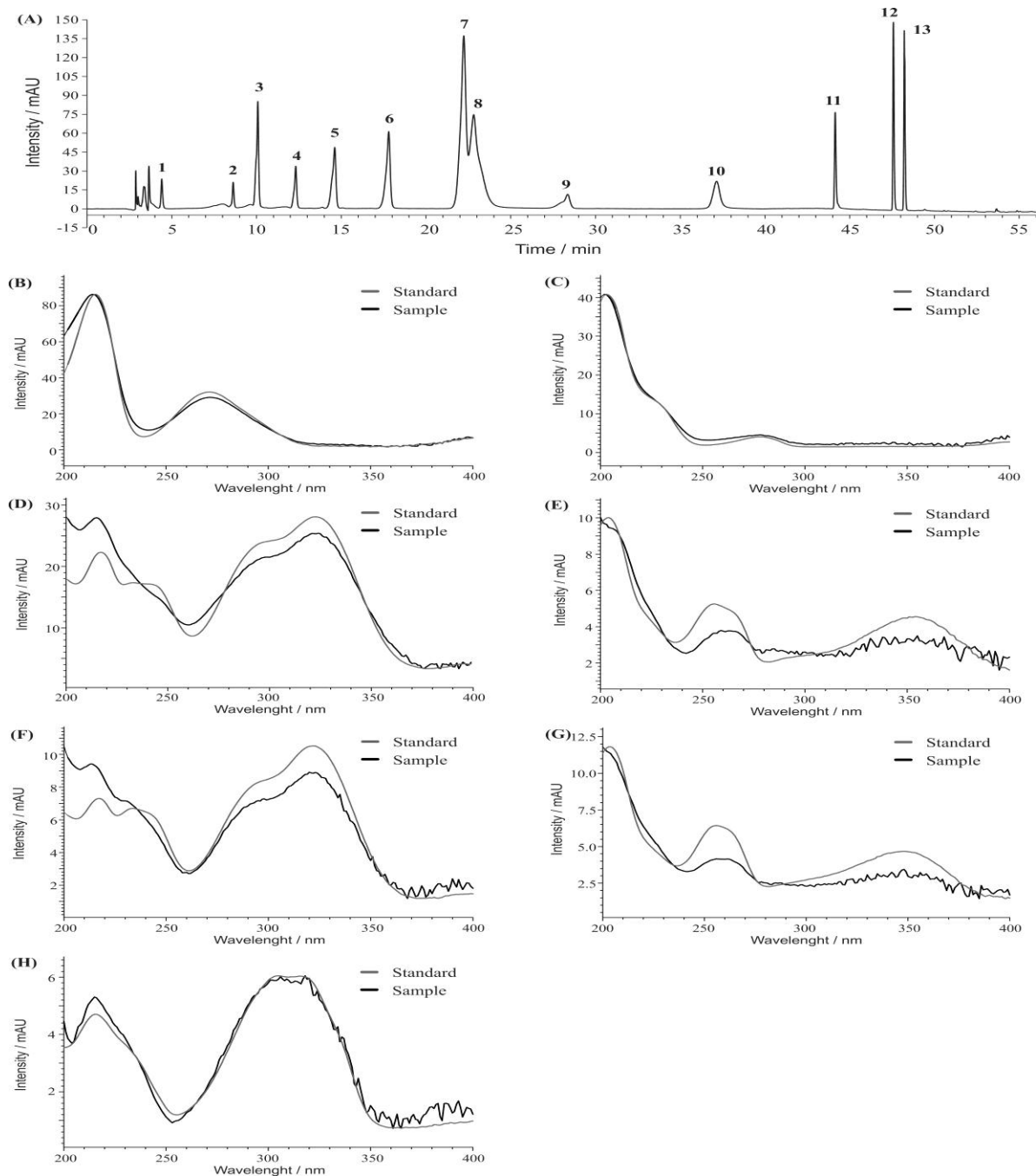
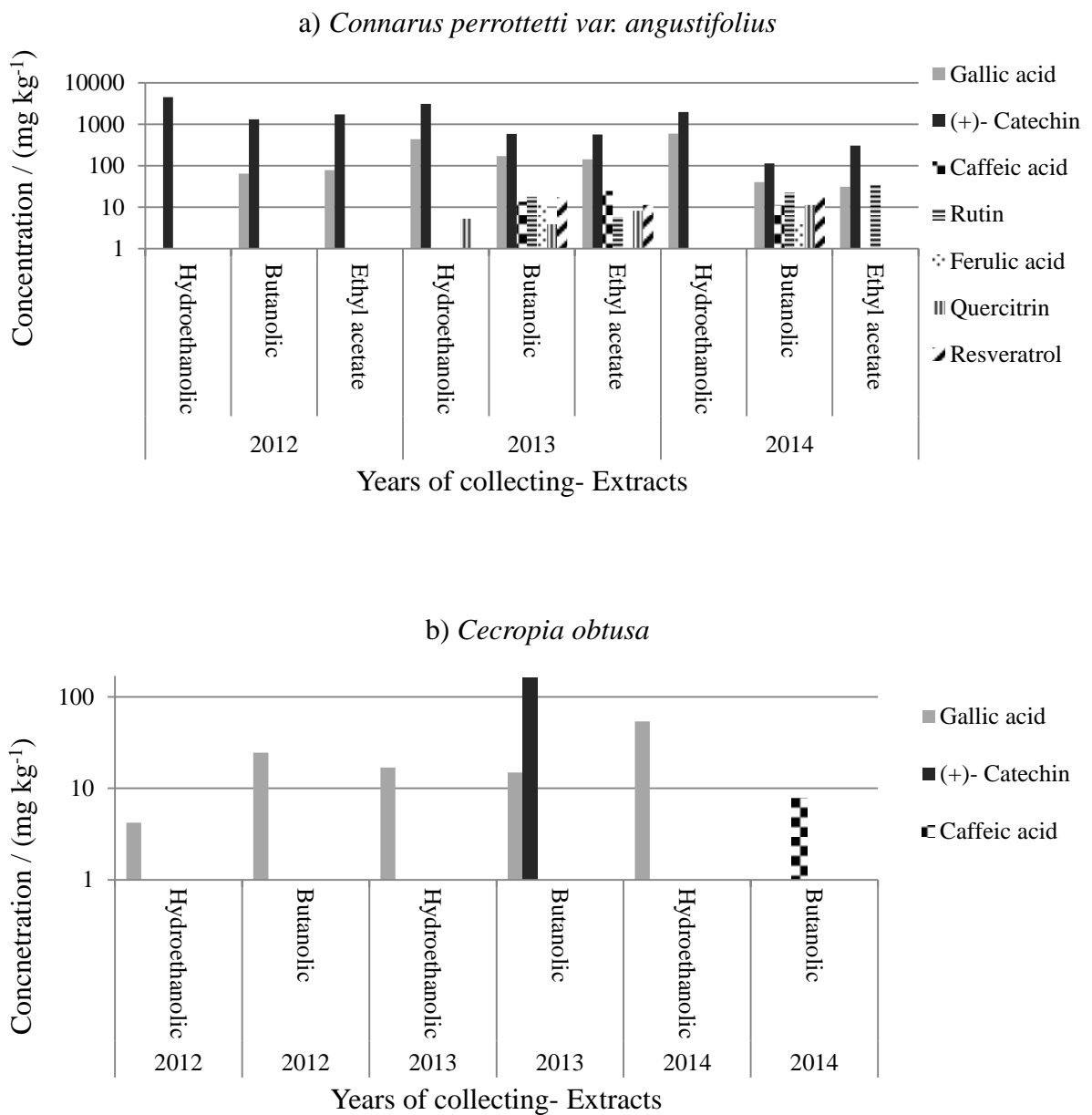


Figure 1. (A) Chromatographic separation of the 13 antioxidants standards by DAD ($20.5\text{-}218.25\ \mu\text{mol L}^{-1}$) - 1. Gallic acid, 2. Catechin, 3. Caffeic acid, 4. Rutin, 5. Ferulic acid, 6. Quercitrin, 7. Myricetin, 8. Fisetin, 9. Resveratrol, 10. Quercetin, 11. Kaempferol, 12. Chrysin and 13. Flavone; (B) Standard spectrum of Gallic acid/sample: *Cecropia obtusa* - Hydroalcoholic Extract - 2013; (C) Standard spectrum of Catechin/sample: *Cecropia palmata* - Butanolic Extract - 2013; (D) Standard Spectrum of Caffeic acid/sample: *Mansoa alliacea* - Butanolic Extract - 2013; (E) Standard spectrum of Rutin/sample: *Connarus perrottetti* var. *angustifolius* - Ethyl Acetate Extract - 2014; (F) Standard spectrum of Ferulic acid/Sample: *Cecropia palmata* - Butanolic Extract - 2013; (G) Standard spectrum of Quercitrin/sample: *Connarus perrottetti* var. *angustifolius* - Butanolic Extract - 2014; (H) Standard spectrum of Resveratrol/sample: *Connarus perrottetti* var. *angustifolius* - Ethyl Acetate Extract - 2013.

Determination by HPLC-DAD of phenolic compounds in plant extracts from different years of collection

Figure 2 shows the concentration of antioxidants found in the medicinal species studied relating the extracts to the respective collection period.



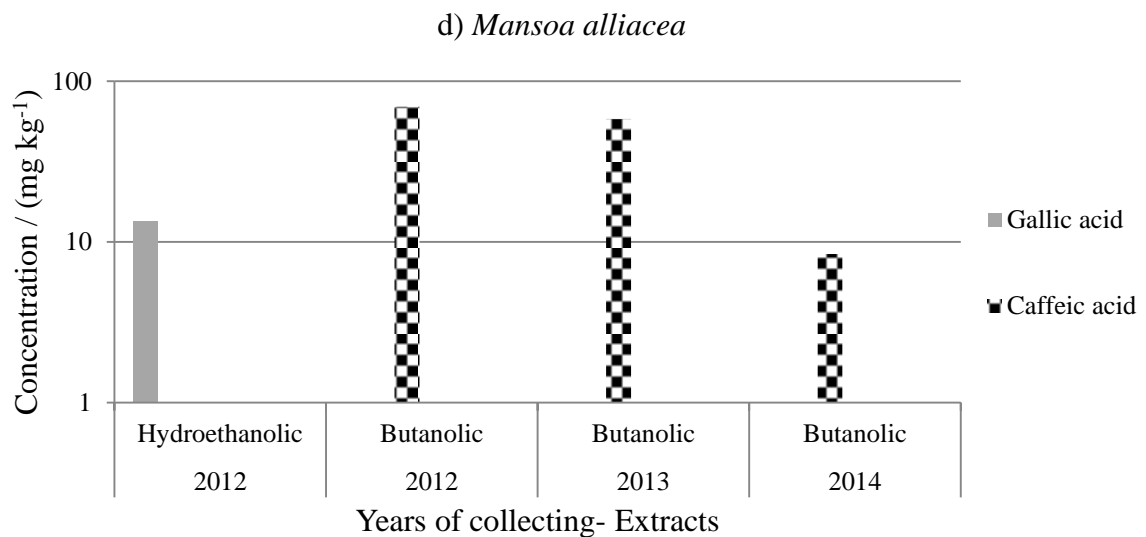
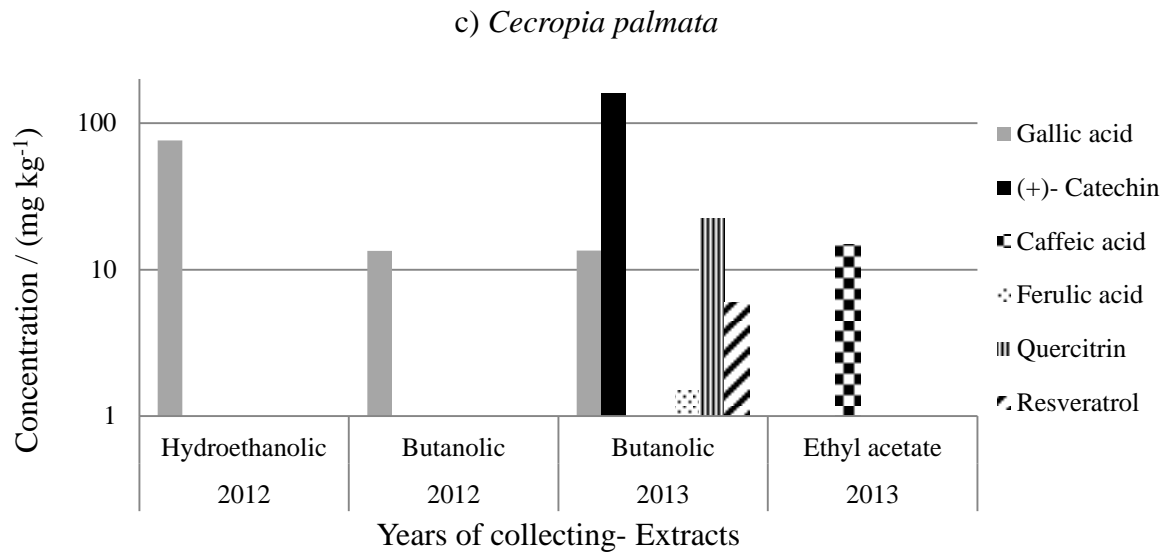


Figure 2. Phenolic compounds found in the studied species via HPLC-DAD; (a) *Connarus perrottetti* var. *angustifolius*, (b) *Cecropia obtusa*, (c) *Cecropia palmata* and (d) *Mansoa alliacea*

Connarus perrottetti var. *angustifolius*

Among the analyzed species, *Connarus perrottetti* var. *angustifolius* presented the highest diversity of phenolic compounds. Although catechin was the predominant antioxidant, corresponding to approximately 80%, all seven compounds determined in the studied plants were encountered in this species.

There was a decrease on the concentration of catechin between collections of 2012 and 2014. This behavior was observed for all extracts analyzed, but there was no clear correlation with the concentration.

Greater amounts of catechin and gallic acid were found in the hydroethanolic extract. This may be explained by the higher polarity of those compounds and by the consequent higher interaction with this solvent, as the presence of 30% water increases the polarity of ethanol, easing the extraction of polar constituents.²⁷

The use of solvents with lower polarities, such as butanol and ethyl acetate, enabled the identification of less polar constituents. This observation is supported by Naczki and Shahidi,²⁸ who reports that the solubility of phenolic compounds is affected by the chemical nature of the plant constituents and by the polarity of the solvent extractor. Therefore, various organic solvents and aqueous mixtures with alcohols are reported in the extraction of these metabolites.^{11,29}

Silveira et al.³⁰ extracted the sample collected in 2012 with the same solvents reported in this study and analyzed the extracts by liquid chromatography with amperometric detection, also finding the presence of gallic acid and catechin. Caffeic and ferulic acid were present in higher concentrations in the sample collected in 2013, while rutin and quercitrin in the one collected in 2014.

There was no significant variation on resveratrol concentration when comparing butanolic extracts of *Connarus perrottetti* var. *angustifolius* collected in different years (2013

and 2014). Nonetheless, extracts using ethyl acetate as a solvent exhibited a decrease of approximately 34% on this concentration from 2013 to 2014. This is a strong evidence of the lower affinity between resveratrol and this solvent, since it was not even detected in plants collected in 2012.

Rutin and resveratrol stand out due to their anti-inflammatory activity.^{31,32} According to Coutinho et al,³³ rutin may act by two mechanisms: modulation of cyclooxygenase and inhibition of proinflammatory cytokines. The second mechanism is also assigned to resveratrol,³⁴ that also shows antibacterial activity and action front strains of *Helicobacter pylori*.³⁵ These information explain the therapeutic properties attributed to the studied species.

Studies by Oliveira³⁶ demonstrated the anti-allergic activity of *Connarus perrottetti* var. *angustifolius* extracts. This activity is related to the inhibition of histamine secretion due to the presence of compounds such as catechin and flavonoids in the composition of these species, endorsing the results of this study.

Cecropia obtusa

From 2012 to 2014, a significant increase (92.2%) was observed on the concentration of lactic acid in the hydroethanolic extract of this species. This may be a result of some stress suffered by the plant, since, as reported in literature, many environmental factors such as seasonality, temperature, water availability, ultraviolet radiation, nutrients and altitude may interfere with the biosynthesis of secondary metabolites.^{20,37}

Catechin was the major compound in *Cecropia obtusa*, but it was detected only in the butanolic extract of plants collected in 2013. These extraction conditions also detected caffeic acid in the sample collected in 2014.

Besides presenting little variety of antioxidants in its constitution, *C. obtusa* has shown very irregular behavior during the analyzed period. This may be related to the defense strategy of the plant against the influence of biotic and/or abiotic factors, as mentioned by Morais³⁷ and Coutinho et al.³⁸

Numerous medicinal actions are attributed to gallic acid and catechin, both found in this species. For instance, antimicrobial activity against *Escherichia coli*^{39,40} and some strains of *Helicobacter pylori*⁴¹, which corroborate the popular medicinal use of *C. obtusa*.

Cecropia palmata

Regarding the studied compounds, *Cecropia palmata* exhibited a greater diversity when compared to the other species of the same genus analyzed.

The hydroethanolic solvent extracted the highest concentration of gallic acid on plants collected in 2012. The similarity between polarities (both high) of solvent and extracted compound justifies this result. However, this condition did not extract any other compound of interest.

Butanolic extraction of *C. palmata* collected in 2013, on the other hand, enabled the separation of less polar compounds which have not been identified in this plant so far. In addition to gallic acid, the following compounds were extracted: catechin, ferulic acid, quercitrin and resveratrol. This solvent was also able to extract caffeic acid, despite its higher affinity with ethyl acetate.

Similarly to what was observed to *C. obtusa*, catechin was the major compound, but was only detected on butanolic extracts of the sample collected in 2013. Comparing both

species in relation to the catechin concentration, a minor difference of 1.3% - higher for *C. obtusa* - is observed.

There are several studies regarding species of *Cecropia* genus reported in literature. Fanck⁴² analyzed phenolic acids and flavonoids in extracts of the leaves of *C. hololeuca*, *C. pachystachaya* and *C. glaziovii* using thin-layer chromatography. *C. glaziovii* was also studied using liquid chromatography by Luengas-Caicedo et al.,⁴³ who identified catechin, and by Arend et al.,⁴⁴ and Beringhs et al.,⁴⁵ who detected caffeic acid. These results support the ones presented here for the two species of *Cecropia* investigated.

All compounds detected in *Connarus perrottetti* var. *angustifolius*, except by rutin, were also found in *C. palmata*. Studies showed that ferulic acid and quercetin are able to increase the insulin secretion by pancreatic beta cells, since their antioxidant power reduces the oxidative stress caused by diabetes.^{46,47} This theory sustains the popular use of *C. palmata* as antidiabetic.

This species is also used in popular medicine as antimicrobial, what may be related to the presence of gallic and ferulic acid in its composition, since they manifest antibacterial action front *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*.^{40,48} The use of *Connarus perrottetti* var. *angustifolius* for this purpose is also justified, since these compounds are common to the two species.

Mansoa alliacea

This species showed the lower diversity of phenolic compounds. In contrast, it presented the highest concentration of caffeic acid, detected in the butanolic extract. Considering the entire period of collection, i.e. 2012 to 2014, there was a decrease of 87.9%

in the concentration of such compound. Similarly to the other plants evaluated in this study, gallic acid was detected in *C. palmata*, but only in samples collected in 2012.

Phytochemical studies involving the leaves of *Mansoa alliacea* revealed the presence of polyphenols and flavonoids^{18,49} and the absence of catechins.¹⁸ Also, flavonoids like luteolin and apigenin were detected in the flowers,¹⁷ and phenols in the root.⁴⁹ The chemical composition of this species may be better understood due to the results presented in this study, since they agree with the aforementioned works and provide additional information on the phenolic acids composition, such as caffeic and gallic.

Simões et al.⁸ account for the antioxidant role played by caffeic acid, saying that the inclusion of this flavonoid on the diet could decelerate the evolution of diseases caused by oxidative stress.

According to the National Institute of Meteorology – INMET,⁵⁰ the average rainfall during the years of collections (2012, 2013 and 2014) was 416.7 ± 80.4 mm and the coefficient of variation stayed around 20%. The temperatures varied between a minimum of 23.3 ± 0.3 °C and a maximum of 32.8 ± 0.3 °C. Becho et al.⁵¹ showed that compounds with higher polarity can be eliminated from plants by leaching. Whereas the samples analyzed were collected during the rainy season, these data support the behavior observed concerning the period of collection.

Although the chemical composition of plants is largely determined by the genetic characteristics of the species, various environmental factors and the employment of different extraction methods can change it.⁵² Thus, each species may exhibit a specific behavior when exposed to such variations and studies considering these factors are of an undeniable importance.

Analysis of infusions by HPLC-DAD

Investigated compounds were detected only on infusions of *Connarus perrottetti* var. *angustifolius* and *Cecropia obtusa*. Considering the use of these species in the form of tea, a concentration of 0.81 mg 100 mL⁻¹ of gallic acid was quantified in samples of *Connarus perrottetti* var. *angustifolius* collected in 2013 and 0.58 mg 100 mL⁻¹ in samples collected in 2014. Concentrations of catechin were considerably higher on this species: 7.9 mg 100 mL⁻¹ in samples collected in 2013 and 3.5 mg 100 mL⁻¹ in samples from 2014. Samples of *Cecropia obtusa* collected in 2012 and 2013 showed no variation on the concentration of gallic acid, which was of 0.14 mg 100 mL⁻¹.

Regarding medicinal purposes, the consumption of tea obtained by infusion of barks of *Connarus perrottetti* var. *angustifolius* can provide reasonable amounts of active compounds to the organism, such as gallic acid and catechin, which are associated to different pharmacological effects and especially recognized for their antioxidant activity.

Confirmation of the identity of antioxidant compounds by UHPLC-ESI-MS/MS

In order to confirm the phenolic constitution of the medicinal plants studied, the results obtained by the analysis performed by HPLC-DAD and by UHPLC-ESI-MS/MS were compared.

Negative chemical ionization was employed for all phenolic compounds analyzed and the retention times ranged from 0.39 to 3.66 minutes. The mass spectral data obtained are summarized in Table 2.

Table 2. Tandem mass spectrometry (MS/MS) parameters of investigated phenolic compounds.

Phenolic compound	Fragmentor (V)	Quantification transition ^a	Confirmation transition ^b
1. Gallic acid	106	169.0 > 125.1 (10)	-
2. (+)-Catechin	134	289.1 > 245.1 (10)	289.1>203.2(15)
3. Caffeic acid	106	179.0 > 135.1 (10)	-
4. Rutin	210	609.1 > 300.1 (31)	-
5. Ferulic acid	88	193.1 > 134.1 (9)	193.1 > 178.1 (7)
6. Quercitrin	164	447.1 > 301.1 (17)	-

^{a,b}The energy collision (V) is given in brackets.

More than 60% of the results reported in Figure 2 are in good agreement with the ones from analysis by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). In all samples analyzed with diode array detection, the presence of catechin and ferulic acid was confirmed by LC-MS/MS.

The results not supported by LC-MS/MS were: caffeic acid, rutin and quercitrin on samples of *Conarus perrottetti* var. *angustifolius* collected in 2013, as well as resveratrol for all periods assessed for this species; gallic acid on infusion and samples of *Cecropia obtusa* collected in 2012 and 2014; gallic acid on *Mansoa alliacea* samples; gallic acid, quercitrin and resveratrol on *Cecropia palmata* samples. This disagreement is believed to be due to the difference in the extraction methods used, as all these were obtained from cold maceration.

According to Naczki and Shahidi,²⁸ the extraction of phenolic compounds in plants is influenced by several factors, such as chemical nature of the species, extraction method,

sample particle size, processing, amongst others. Each extraction method affects the selectivity of the compounds, especially when it involves the study of antioxidant components, since they are sensitive to the action of light, oxygen and heat.^{53,54}

There is no standard or fully satisfactory procedure for the extraction of all phenolic compounds or a specific class of vegetable material²¹. Given the vast number of studies on the subject, however, the extraction assisted by ultrasound proves to be quite effective in isolating polyphenols.^{55,56}

According to Dal Prá et al.,⁵⁷ extraction assisted by ultrasound involves the formation of cavitation bubbles, which assist the release of the vegetable content, increasing the mass transfer. In studies with *Brassica oleracea*, the extraction assisted by ultrasound had a positive effect, increasing the efficiency in approximately $36.1 \pm 15.5\%$ when compared to conventional extraction (maceration).

Some phenolic compounds are very photosensitive. Therefore, time-consuming extraction may result in degradation. Thereby techniques involving ultrasound have been widely used mainly in order to prevent the degradation of resveratrol.⁵⁸ Resveratrol belongs to the class of stilbenes, which present high sensitivity to external agents such as air, light and oxidative enzymes. Accordingly, there are many food additives being developed aiming the increase on solubility and photostability of these compounds.⁵⁹

Studies regarding the solid phase extraction of polyphenols in wine demonstrated a low recovery rate for the gallic acid. Even tough, quantification was still possible, given the large amounts of this compound present in this matrix.⁶⁰ Hence, when occurring in lower concentrations, as in some plant species, the detection may not be possible, depending on the extraction procedure.

According to Jacques et al.,⁶¹ who studied the change on phenolic compound composition of blackberry pulps during storage, lactic acid suffered the major degradation. This result is related to the redox reactions resulting from its highly hydroxylated structure.

Furthermore, according to Waterhouse,⁶² gallic acid is widely used as a standard in the Folin-Ciocalteu method for the determination of total polyphenols, because it is relatively inexpensive and pure and its dry form is very stable. However, the standard solution loses about 5% of its effectiveness after one week at room temperature and the decomposition is even faster when the solution is exposed to the air.

Taking into account all parameters involving the determination of the polyphenols, which were here demonstrated, along with the numerous studies on this subject, we can affirm that both analysis performed in this study, by diode array detection and by mass spectrometry, yielded satisfactory results.

Conclusions

One or more phenolic compounds, e.g. phenolic acids and flavonoids, are present in the chemical constitution of the extracts of medicinal plants analyzed.

Phenolic acids, namely, gallic and caffeic acid, were the only antioxidants found in all species when analyzing the extracts with diode array detection. In *Connarus perrottetti* var. *angustifolius*, catechin, rutin, ferulic acid, quercitrin and resveratrol were also present. Among these, only rutin was not detected in *Cecropia palmata*. Catechin was not present only in *Mansoa alliacea*, being the major compound in all other species. The infusion with *Connarus perrottetti* var. *angustifolius* may provide important amounts of gallic acid and catechin, supporting its employment with medicinal purposes.

The analysis via LC-MS/MS had confirmatory character on the results obtained by HPLC-DAD. Over 60% of these are in agreement. Of all compounds, only resveratrol could not be detected by mass spectrometry. However, this result, as well as the fact that other components were also not detected in some periods of collection or even in some plant species, may be a consequence of the extraction method used.

The phenolic compounds assessed in medicinal plants are known for presenting several pharmacological activities, such as antioxidant, antitumor, antimicrobial and anti-allergic. Although phenolic constituents found in the studied species are extensively explored in the literature concerning the pharmacological activities described by the popular use, the results of this work demonstrate that the studied plants do not exhibit the same constituents or concentrations in different years of collection. Thus, the need for detailed chemical analysis of these plants, to ensure the appropriate concentration of active ingredients on therapeutics, is paramount.

Also, studies concerning the species belonging to the Brazilian flora are fundamental, since these are widely employed in popular medicine and as a source of nutrients.

Supplementary Information

Supplementary Information are available for free in <http://jbcs.org.br> as a PDF file.

Acknowledgements

To the National Council for Scientific and Technological Development – CNPq for financial support.

References

1. Veiga, V. F. J.; Pinto, A. C.; Maciel, M. A. M.; *Quim. Nova* **2005**, 28, 519.
2. Schmitz, W.; Saito, A. Y; Saridakis, D. H. O.; *Semina cienc. biol. saude.* **2005**, 26, 119.
3. Alvim, N. A. T.; Ferreira, M. A.; Cabral, I. A.; de Almeida, J.; *Rev. Latino-Am. Enfermagem* **2006**, 14.
4. MS - Ministério da Saúde: *Política Nacional de Plantas Medicinais e Medicamentos Fitoterápicos*, 1th ed.; Brasília: Brasil, 2006.
5. Paracampo, N. E. N. P.; *Connarus perrottetii* var. *angustifolius* Radlk. (*Connaraceae*): *tradicionalmente utilizada como barbatimão no Pará*, 1th ed.; Embrapa Amazônia Oriental, Belém-PA: Brasil, 2011.
6. Campelo, P. M. S.; *Rev. Est. Biol. Amb. Divers.* **2006**, 28, 1.
7. Parekh, J.; Karathia, N.; Chanda, S.; *African J. Biomed. Res.* **2006**, 9, 53.
8. Simões, C. M. O.; Schenkel, E. P.; Gosmann, G.; Mello, J. C. P.; Mentz, L. A.; Petrovick, P. R.; *Farmacognosia: da planta ao medicamento*, 6th ed.; Universidade Federal de Santa Catarina: Florianópolis, Brasil, 2007.
9. Pietta, P.; *J. Nat. Prod.* **2000**, 63, 1035.
10. Tiveron, A. P.; Melo, P. S.; Bergamaschi, K. B.; Vieira, T. F. S.; Regitano-d'Arce, M. A. B.; Alencar, S. M.; *Int. J. Mol. Sci.* **2012**, 13, 8943.
11. Ajila, C. M.; Brar, S. K.; Verma, M.; Tyagi, R. D.; Godbout, S.; Valéro, J. R.; *Crit. Rev. Biotechnol.* **2011**, 31, 227.
12. Coelho-Ferreira, M.; *J. Ethnopharm.* **2009**, 126, 159.
13. Homma, A. K.; *História da Agricultura na Amazônia: das era pré-colombiana ao*

- terceiro milênio*, 1th ed.; Embrapa: Brasília, 2003.
14. Freitas, J. C.; Fernandes, M. E. B.; *Bol. Mus. Para. Emílio Goeldi, sér. Ciências Naturais* **2006**, *1*, 11.
 15. Lameira, O. A.; Paiva, J. S.; Oliveira, E. C. P. de.; Pinto, J. E. B. P.; *Hortic. bras.* **2004**, *20*, 349.
 16. Costa, G. M.; Ortmann, C. F.; Schenkel, E. P.; Reginatto, F. H.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2011**, *22*, 1096.
 17. Zoghbi, M. G. B.; Oliveira, J.; Skelding, G. M.; Guilhon, P.; *Braz. J. Pharmacogn.* **2009**, *19*, 795.
 18. Pérez D.; *Fol. Amazon.* **2002**, *13*, 87.
 19. Ribeiro, C. M.; Souza, K. G. da S. Ribeiro, A. B. R.; Mendonça, L. C. V.; Barbosa, W. L. R.; *Infarma* **2009**, *21*, 45.
 20. Gobbo-Neto, G. L.; Lopes, N. P.; *Quim. Nova* **2007**, *30*, 374.
 21. Naczki, M.; Shahidi, F.; *J. Chromatogr. A* **2004**, *1054*, 95.
 22. Ananias, D. dos S.; Souza, E. B.; Souza, P. F. S.; Souza, M. de L.; Vitorino, M. I.; Teixeira, G. M.; Ferreira, B. da S.; *Rev. bras. meteorol.* **2010**, *25*, 218.
 23. Lima, F. O. *Estudo comparativo da bioatividade de compostos fenólicos em plantas medicinais*. 2013. 145 f. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria, 2013.
 24. Ribani, M.; Bottoli, C. B. G.; Collins, C. H.; Jardim, C. S. F.; *Quim. Nova* **2004**, *27*, 771.
 25. Inmetro - Instituto Nacional de Metrologia, *Normalização e Qualidade Industrial: Orientações sobre Validação de Métodos Analíticos - DOQ-CGCRE-008*, 2th ed.; 2010.

26. Faccin, H.; Viana, C.; Nascimento, P. C do.; Bohrer, D.; Carvalho, L. M de.; *J. Chromatogr. A* **2016**, *1427*, 111.
27. Stalikas, C. D.; *J. Sep. Sci.* **2007**, *30*, 3268.
28. Naczk, M.; Shahidi, F.; *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2006**, *41*, 1523.
29. Ignat, I.; Volf, I.; Popa, V. I.; In *Natural Products - Phytochemistry, Botany and Metabolism of Alkaloids, Phenolics and Terpenes*; Ramawat, K. G.; Mérillon, J-M., eds.; Springer: Berlim, 2013, ch. 67.
30. Silveira, G. D. da.; Motta, M. J.; Müller, L. S.; Lameira, O.; Athayde, M. L.; Pianna, M.; Rosa, M. B. da.; Viana, C.; Carvalho, L. M. de.; *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **2015**, *38*, 1259.
31. Babu, P. V. A.; Dongmin. L.; Gilbert, E. R.; *J. Nutr. Biochem.* **2013**, *24*, 1777.
32. Antus, C.; Dombovari, P.; Fonai, F.; Avar, P.; Matyus P.; Sumegi, B.; Veres, B.; *Eur. J. Pharmacol.* **2015**, *748*, 61.
33. Coutinho, M. A. S.; Muzitano, M. F.; Costa, S. S.; *Rev. Virt. Quim.* **2009**, *1*, 241.
34. López-Posadas, R.; Ballester, I.; Abadía-Molina, A. C.; Suárez, M. D.; Zaruelo, A.; Martínez-Augustin, O.; Sánchez, de. M. F.; *Biochem Pharmacol.* **2008**, *76*, 495.
35. Brown, J.; Huang, G.; Haley-Zitlin, V.; Jiang, X.; *Appl. Environ. Microbiol.* **2009**, *75*, 848.
36. Oliveira, D. M. C. de.; Triagem de cinco espécies de plantas medicinais usadas na Amazônia através da análise de secreção de histamina. 2013. 105 f. Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Biológicas. Belém, 2013.
37. Morais, L.; *Hortic. bras.* **2009**, *27*, 4050.
38. Coutinho, I. D.; Kataoka, V. M. F.; Honda, N. K.; Coelho, R. G.; Vieira, M. C.; Cardoso, C. A. L.; *Braz. J. Pharmacogn.* **2010**, *20*, 322.

39. Díaz-Gómez, R.; Toledo-Arayab, H.; López-Solís, R.; Obreque-Slier, E.; *Food Sci. Technol.* **2014**, *59*, 896.
40. Sarjit, A.; Yi, W.; Gary, A. D.; *Food Microbiol.* **2015**, *46*, 227.
41. Díaz-Gómez, R.; López-Solís, R.; Obreque-Slier, E.; Toledo-Araya, H.; *Food Sci. Technol.* **2013**, *54*, 331.
42. Franck, U.; *Phytochemische und pharmakologische Untersuchungen der kardiovaskulären Wirkprinzipien von Cecropia hololeuca Miq., Cercropia pachystachya Tréc., Cecropia glaziovii Sneath., Musanga cecropioides R. Brown und Crataegus L. monogyna, oxyacantha*; Herdecke GCA-Verl.: Alemanha, 1998.
43. Luengas-Caicedo, P. E.; Oliveira, A. B. de.; Brago, F. C.; Brandão, G. C.; *J. Biosci.* **2007**, *62*, 701.
44. Arend, D. P.; dos Santos, T. C. do.; Sonaglio, D.; dos Santos, A. L. G. dos.; Reginatto, F. H.; Campo, A. M.; *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2011**, *54*, 58.
45. Beringhs, A. O.; Dalmina, M.; Crecznski-Pasa, T. B.; Sonaglio, D.; *Braz. J. Pharmacogn.* **2015**, *25*, 513.
46. Srinivasan, M.; Sudheer, A. R.; Venugopal, P. M.; *J. Clin. Biochem. Nutr.* **2007**, *40*, 92.
47. Babujanarthanam, R.; Kavitha. P.; Rao, M.; Padian, M. R.; *Mol. Cell. Biochem.* **2011**, *358*, 121.
48. Borges, A.; Ferreira, C.; Saavedra, M. J.; Simões, M.; *Microb. Drug Resist.* **2013**, *19*, 256.
49. Patel, I.; Sipai, S.; Rathod, D.; Shrimali, G.; Patel, A.; Rami, E.; *Int. J. Adv. Pharm. Res.* **2013**, *4*, 1823.
50. http://www.inmet.gov.br/sim/gera_graficos.php, accessed in October 2015.

51. Becho, J. R. M.; Machado, H.; Guerra, M. de.; *Rev. Int. Est. Exp.* **2009**, *1*, 21.
52. Diniz, V. W. B.; Dantas, H. A.; Müller, R. C. S.; Fernandes, K. G.; Palheta, D. C.; *Quim. Nova* **2013**, *36*, 257.
53. Andreo, D.; Jorge, N.; *B. do CEPPA* **2006**, *24*, 319.
54. Pereira, C.; Meireles, M. A. A.; *Food Bioprocess Technol.* **2010**, *3*, 340.
55. Luque, M. D. de C.; Priego-Capote, F.; *Talanta* **2007**, *72*, 321.
56. Routray, W.; Orsat, V.; In *Natural Products - Phytochemistry, Botany and Metabolism of Alkaloids, Phenolics and Terpenes*; Ramawat, K. G.; Mérillon, J-M., eds.; Springer: Berlin, 2013, ch. 65.
57. Dal Prá, V.; Dolwitsch, C. B.; Lima, F. O.; Carvalho, C. A. de.; Viana, C.; Nascimento, P. C. do.; Rosa, M. B. da.; *Food Technol. Biotechnol.* **2014**, *53*, 102.
58. Guamán-Balcázar, M. C.; Setyaningsih, W.; Palma, M.; Barroso, C. G.; *Appl. Acoustics* **2016**, *103*, 207.
59. Silva, F.; Gallardo, A. F. E.; Nerín, C.; Domingues, F. C.; *Food Chem.* **2014**, *145*, 115.
60. Villiers, F. L.; Lynen, A.; Crouch, S. P.; *Chromatographia* **2004**, *59*, 403.
61. Jacques, A. C.; Pertuzatti, P. B.; Barcia, M. T.; Zambiasi, R. C.; Chim, J. F.; *Quim. Nova* **2010**, *33*, 1720.
62. Waterhouse, A. L.; *Curr. Protoc. Food Anal. Chem.* **2002**, *6*, 1.

Supplementary Information

Distribution of Phenolic Compounds in *Connarus*, *Cecropia* and *Mansoa* Species

*Fernanda B. Pires,^a Carolina B. Dolwitsch,^a Valéria Dal Prá,^a Henrique Faccin,^b Débora Luana Monego,^b Leandro M. de Carvalho,^{a,b} Carine Viana,^a Osmar Lameira^c e Marcelo B. da Rosa^{*a,b}*

^a*Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Santa Maria, Camobi, Santa Maria, RS 97105-900, Brazil*

^b*Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal de Santa Maria, Camobi, Santa Maria, RS 97105-900, Brazil*

^c*Embrapa Amazônia Oriental, Belém, PA, 66095-100, Brazil*

Spectrum Gallic acid:

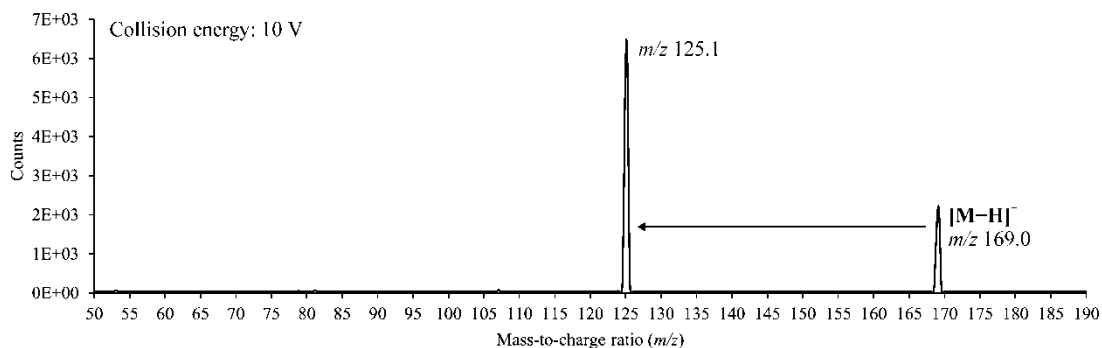
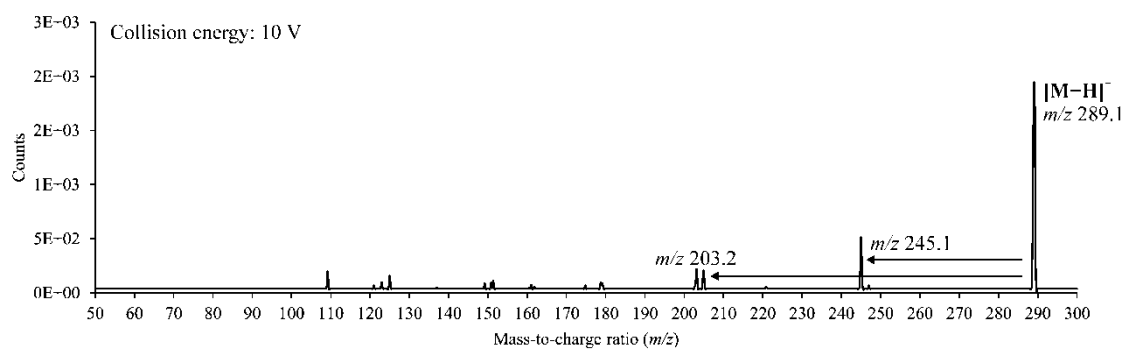
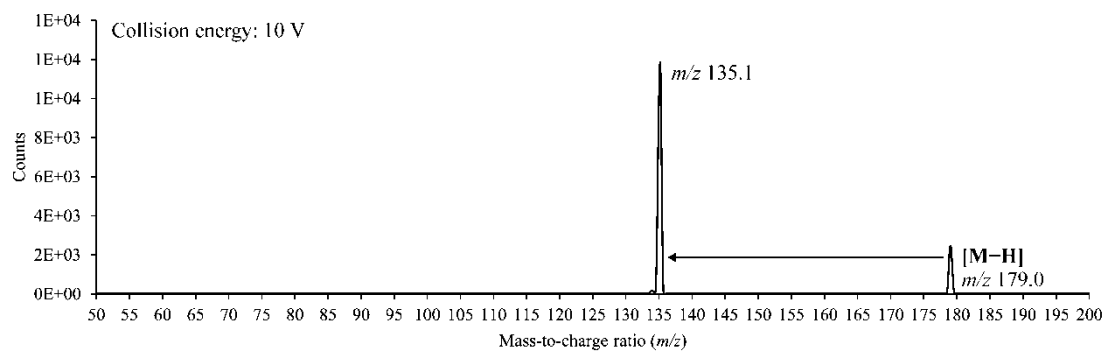


Figure S1. Mass spectrum of compound **1**.

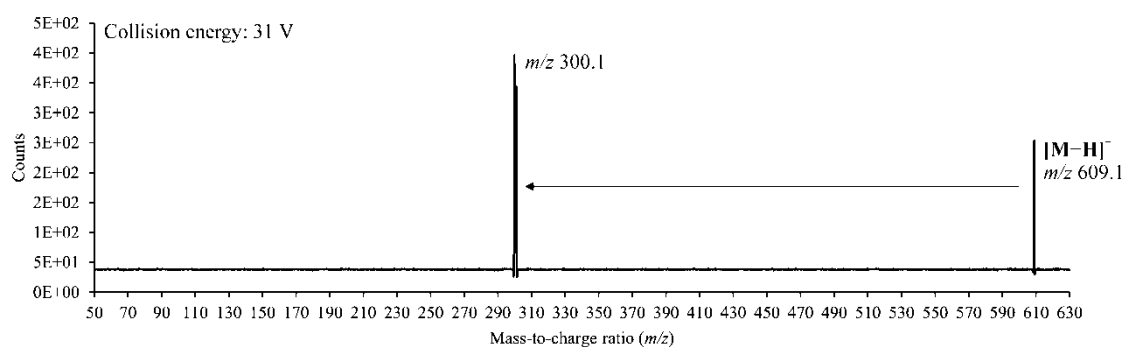
Spectrum Catechin

**Figure S2.** Mass spectrum of compound 2.

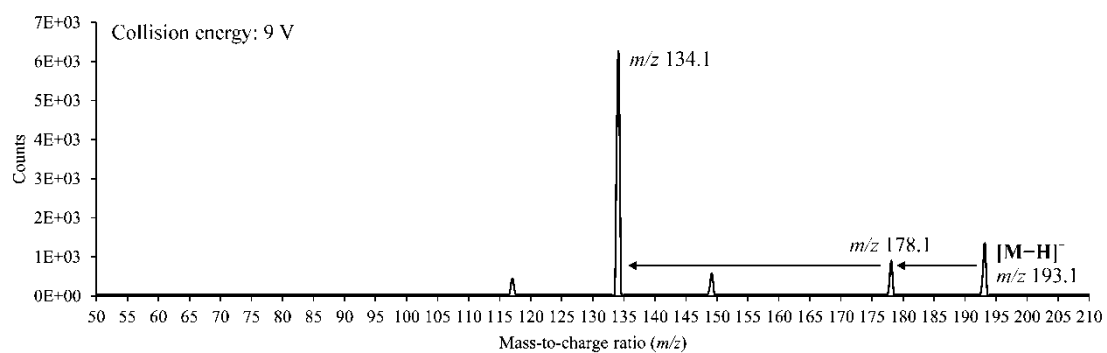
Spectrum Caffeic acid

**Figure S3.** Mass spectrum of compound 3.

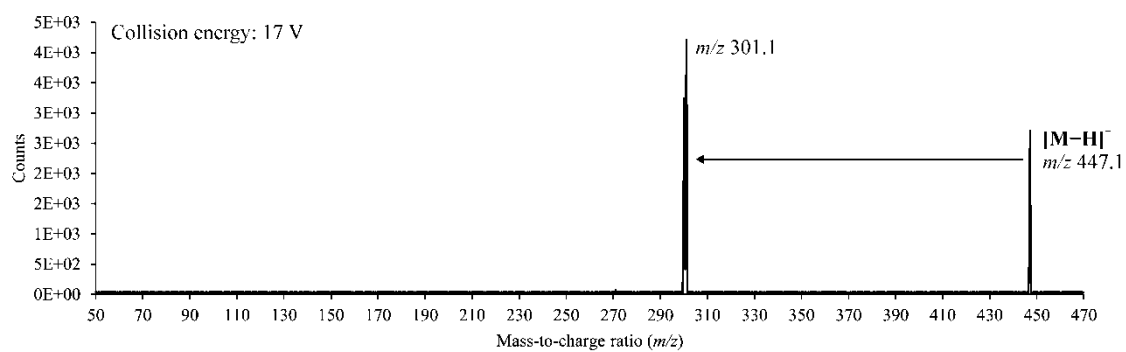
Spectrum Rutin

**Figure S4.** Mass spectrum of compound 4.

Spectrum Ferulic acid:

**Figure S5.** Mass spectrum of compound 5.

Spectrum Quercitrin:

**Figure S6.** Mass spectrum of compound 6.

4 CONCLUSÃO

- As técnicas empregadas para detecção e quantificação assim como a metodologia para análise confirmatória permitiram atingir os objetivos propostos pelo trabalho.
- Conseguiu-se traçar o perfil cromatográfico das espécies acerca de constituintes fenólicos, através da detecção por arranjo de diodos, onde determinou-se: ácido gálico, catequina, ácido cafeico, ácido ferúlico, rutina, quercitrina e resveratrol.
- Dos resultados obtidos por HPLC-DAD, *Connarus perrottetti* var. *angustifolius* foi a única espécie que apresentou todos os antioxidantes descritos acima; *Cecropia palmata* apenas não obteve rutina; Todas as espécies apresentaram catequina como composto majoritário, com exceção de *Mansoa alliacea*, única que não apresentou esse constituinte; Todos os vegetais apresentaram ácido cafeico, o qual obteve maior concentração em *Mansoa alliacea*, no entanto esta apresentou menor diversidade de polifenóis em sua constituição.
- As análises das infusões de *Connarus perrottetti* var. *angustifolius* fornecem quantidades importantes de ácido gálico e catequina sustentando seu emprego com finalidade terapêutica na forma de chá, e ainda *Cecropia obtusa* pode contribuir com ácido gálico embora apresente uma quantidade bem inferior em relação a primeira. Não foi possível determinar nas infusões de *Cecropia palmata* e *Mansoa alliacea* a presença de polifenóis.
- Dos resultados obtidos pela detecção de arranjo de diodos possui concordância com as análises obtidas por espectrometria de massas, o qual serviu de caráter confirmatório. Todas as amostras que apresentaram catequina e ácido ferúlico foram respaldadas por LC-MS; ácido cafeico 75%; ácido gálico, cerca de, 72%; rutina 50% e quercitrina 20%.
- As espécies em questão apresentaram diferença na composição e concentração de polifenóis no período avaliado, no entanto, diversos fatores podem influenciar a taxa de produção de metabólitos secundários pelos vegetais, para isso, são necessários estudos futuros envolvendo o monitoramento desses parâmetros, como chuva, luminosidade, sazonalidade, entre outros a fim de obter maior compreensão sobre o comportamento.

- Foi possível relacionar as principais atividades mencionadas pelo uso popular à presença dos compostos fenólicos identificados, com isso conclui-se que as atividades desempenhadas pelas espécies podem ser resultantes da presença destes em sua constituição.

- Fica evidente a importância de estudos envolvendo a análise da composição química vegetal, a fim de assegurar que as espécies utilizadas na terapêutica apresentam a concentração ideal dos ativos para desempenho das atividades requeridas. Ainda, é relevante por abranger plantas da flora brasileira que são amplamente utilizadas pela população com pouca comprovação científica.

REFERÊNCIAS

- AJILA, C. M. et al. Extraction and Analysis of Polyphenols: Recent Trends. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 31, n. 3, p. 227-249, 2011.
- ALVES, C. Q. et al. Avaliação da atividade antioxidante de flavonoides. **Diálogos e Ciência**, n. 12, p. 1-8, 2007.
- ALVIM, N. A. T. et al. O uso de plantas medicinais como recurso terapêutico: das influências da formação profissional às implicações éticas e legais de sua aplicabilidade como extensão da prática de cuidar realizada pela enfermeira. **Revista Latino-Americana de Enfermagem**, v.14, n. 3, p. 316-323, 2006.
- ANANIAS, D. dos S. et al. Climatologia da estrutura vertical da atmosfera em Novembro para Belém-PA. **Revista Brasileira de Meteorologia**, v. 25, n. 2, 218-226, 2010.
- ANTUS, C. et al. Anti-inflammatory effects of a triple-bond resveratrol analog: Structure and function relationship. **European Journal of Pharmacology**, v. 748, n. 4, p. 61-67, 2015.
- ARAGÃO, D. M. de O. et al. Anti-Inflammatory, antinociceptive and cytotoxic effects of the methanol extract of *Cecropia pachystachya* Trécul. **Phytotherapy Research**, v. 27, n. 6, p. 926-930, 2013.
- AREND, D. P. **Desenvolvimento de sistema microestruturado contendo extrato padronizado de *Cecropia glaziovii* Sneth (Embaúba)**. 2010. 198 p. Dissertação (Mestrado em Farmácia) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, 2010.
- BANERJEE, S.; RAJAMANI, P. **Cellular, Molecular, and Biological Perspective of Polyphenols in Chemoprevention and Therapeutic Adjunct in Cancer**. In: RAMAWAT, K. G.; MÉRILLON, J-M. Natural Products Phytochemistry, Botany and Metabolism of Alkaloids, Phenolics and Terpenes; Berlin: Springer, 2013. cap. 71, p. 2184.
- BENELLI, P. **Agregação de valor ao bagaço de laranja (*Citrus sinensis* L. Osbeck) mediante obtenção de extratos bioativos através de diferentes técnicas de extração**. 2010. 233 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia dos Alimentos) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, 2010.
- BERINGHS, A. O. et al. Response Surface Methodology IV-Optimal design applied to the performance improvement of an RP-HPLC-UV method for the quantification of phenolic acids in *Cecropia glaziovii* products. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 25, n. 5, p. 513-521, 2015.
- BIESKI, I. G. C. et al. Ethnobotanical study of medicinal plants by population of Valley of Juruena Region, Legal Amazon, Mato Grosso, Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 15, n. 173, p. 383-423, 2015.

BOLZANI, V. da S. et al. Natural products from Brazilian biodiversity as a source of new models for medicinal chemistry. **International Union of Pure and Applied Chemistry**, v. 84, n. 9, p. 1837-1846, 2012.

BORGES, A. et al. Antibacterial Activity and Mode of Action of Ferulic and Gallic Acids Against Pathogenic Bacteria. **Microbial drug resistance**, v. 19, n. 4, p. 256-265, 2013.

BOURGAUD, F. et al. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. **Plant Science**, v. 161, n. 5, p. 839-851, 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Política Nacional de Plantas Medicinais e Medicamentos Fitoterápicos**. Brasília, 2006. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/politica_nacional_fitoterapicos.pdf> Acessado em: 22 dez. 2015.

BRAVO, L. Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, and Nutritional Significance. **Nutrition Reviews**, v. 56, n. 11, p. 317-333, 1998.

BROWN, J. et al. Antibacterial effects of grape extracts on *Helicobacter pylori*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 3, p. 848-852, 2009.

CAICEDO-LUENGAS, P. E. **Contribuição para padronização de extratos de folhas de *Cecropia glaziovii* Snethl.: Estudos de variação sazonal e intra-específica de flavonóides e proantocianidinas, de metodologias de extração e de atividade vasorelaxante**. 2005. 292 f. Tese (Doutorado Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, 2005.

CARVALHO, J. C.T.; GOSMANN, G.; SCHENKEL, E. P. **Compostos fenólicos simples e heterosídeos**. In: SIMÕES, C. M. O. et al. Farmacognosia – da Planta ao Medicamento. 5. ed. Porto Alegre: Editora da UFRG/Editora da UFSC, 2004. cap. 20, p. 519, 528.

COELHO-FERREIRA, M. Medicinal knowledge and plant utilization in an Amazonian coastal community of Maruda, Pará State (Brazil). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 126, n. 1, p. 159-175, 2009.

COSTA, G. M. et al. An HPLC-DAD Method to Quantification of Main Phenolic Compounds from leaves of *Cecropia* species. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 22, n. 6, p. 1096-1102, 2011.

COUTINHO, M. A. S.; MUZITANO, M. F.; COSTA, S. S. Flavonoides: Potenciais Agentes Terapêuticos para o Processo Inflamatório. **Revista Virtual de Química**, v.1, n. 3, p. 241-256, 2009.

DÍAZ-GÓMEZ, R. et al. Combined effect of gallic acid and catechin against *Escherichia coli*. **Food Science and Technology**, v. 59, p. 896-900, 2014.

DÍAZ-GÓMEZ, R. et al. Comparative antibacterial effect of gallic acid and catechin against *Helicobacter pylori*. **Food Science and Technology**, v. 54, p. 331-335, 2013.

FALKENBERG, M. B.; SANTOS, R. I. **Introdução à análise fitoquímica**. In: SIMÕES, C. M. O. et al. *Farmacognosia – da Planta ao Medicamento*. 5. ed. Porto Alegre: Editora da UFRG/Editora da UFSC, 2004. cap. 10, p. 234-235.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais Livres: Conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43, n. 1, p. 61-68, 1997.

FREITAS, J. C.; FERNANDES, M. E. B. Uso de plantas medicinais pela comunidade de Enfarrusca, Bragança, Pará. **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi**, Ciências Naturais, Belém, v. 1, n. 3, p. 11-26, 2006.

GOBBO-NETO, G. L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.

HOJNIK, M.; SKERGET, M.; KNEZ, Z. Isolation of chlorophylls from stinging nettle (*Urtica dioica* L.). **Separation and Purification Technology**, n. 57, p. 37-46, 2007.

HUBER, L. S.; AMAYA, D. B. R. Flavonóis e flavonas: fontes brasileiras e fatores que influenciam a composição em alimento, **Alimentos e Nutrição**, v. 19, n. 1, p. 97-108, 2008.

IGNAT, I.; VOLF, I.; POPA, V. I. **Analytical Methods of Phenolic Compounds**. In: RAMAWAT, K. G.; MÉRILLON, J-M. *Natural Products Phytochemistry, Botany and Metabolism of Alkaloids, Phenolics and Terpenes*; Berlin: Springer, 2013. cap. 67, p. 2076-2077, 2080, 2082.

INSTITUTO DE PESQUISA ECONÔMICA APLICADA, **Sustentabilidade ambiental no Brasil: biodiversidade, economia e bem-estar humano**. Brasília, 2010. Disponível em: <http://www.ipea.gov.br/portal/images/stories/PDFs/livros/livros/livro07_sustentabilidadeambiental.pdf> Acessado em: 10 dez. 2015.

LUQUE-GARCIA, J. L.; LUQUE DE CASTRO, M. D.; Ultrasound: a powerful tool for leaching. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 22, n. 1, p. 41-47, 2003.

MA, Y. et al. Phenolic compounds and antioxidant activity of extracts from ultrasonic treatment of Sastsuma Mandarin (*Citrus unshiu* Marc.) Peels. **Journal Agricultural Food Chemistry**, v. 56, n. 14, p. 5682-90, 2008.

MATSUMURA, E. et al. **Microbial Production of Plant Benzyloquinoline Alkaloids**. In: RAMAWAT, K. G.; MÉRILLON, J-M. *Natural Products Phytochemistry, Botany and Metabolism of Alkaloids, Phenolics and Terpenes*; Berlin, Heidelberg: Springer, 2013. cap. 1, p. 4.

NACKZ, M.; SHAHIDI, F. Extraction and analysis of phenolics in food. **Journal of Chromatography A**, v. 1054, n. 1-2, p. 95-111, 2004.

NACZK, M.; SHAHIDI, F. Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 41, p. 1523-1542, 2006.

LÓPEZ-POSADAS, R. et al. Effect of flavonoids on rat splenocytes, a structure–activity relationship study. **Biochemical Pharmacology**, v. 76, n. 4, p. 495-506, 2008.

OLIVEIRA, D. M. C. de. **Triagem de cinco espécies de plantas medicinais usadas na Amazônia através da análise de secreção de histamina**. 2013. 105 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade Federal do Pará, Belém, PA, 2013.

PARACAMPO, N. E. N. P. ***Connarus perrottetii* var. *angustifolius* Radlk. (Connaraceae): tradicionalmente utilizada como barbatimão no Pará**, Belém, PA: Embrapa Amazônia Oriental, 2011.

PAREKH, J.; KARATHIA, N.; CHANDA, S. Evaluation of antibacterial activity and phytochemical analysis of *Bauhinia variegata* L. bark. **African Journal of Biomedical Research**, v. 9, p.53 -56, 2006.

PATEL, I. et al. Phytochemical studies on *Mansoa alliacea* (Lam.). **International Journal of Advances in Pharmaceutical Research**, v. 4, n. 6, p. 1823-1828, 2013.

PEREIRA, R. J.; CARDOSO, M. das G. Vegetable secondary metabolites and antioxidants benefits. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 3, n. 4, p. 146-152, 2012.

PETROVSKA, B. B. Historical review of medicinal plants' usage. **Review Pharmacognosy**, v. 6, n. 11, p. 1-5, 2012.

PIETTA, P. Flavonoids as antioxidants. **Journal of Natural Products**. v. 63, n. 7, p.1035-1042, 2000.

PORTO, da C.; PORRETTO, E.; DECORTI, D. Comparison of ultrasound-assisted extraction with conventional extraction methods of oil and polyphenols from grape (*Vitis vinifera* L.) seeds. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 20, n. 4, p. 1076–1080, 2013.

PORT'S, P.S.P. et al. The phenolic compounds and the antioxidant potential of infusion of herbs from the Brazilian Amazonian region. **Food Research International**, v. 53, n. 2, p. 875-881, 2013.

REZENDE, H. A.; COCCO, M. I. M. A utilização de fitoterapia no cotidiano de uma população rural. **Revista Escola de Enfermagem USP**, v. 36, n. 3, p. 282-288, 2002.

RIBEIRO, C. M. **Avaliação da atividade antimicrobiana de plantas utilizadas na medicina popular da Amazônia**. 2008. f. 66. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Pará, Belém, PA, 2008.

ROCHA, G. G. et al. Natural triterpenoids from *Cecropia lyratiloba* are cytotoxic to both sensitive and multidrug resistant leukemia cell lines. **Bioinorganic & Medicinal Chemistry**,

v. 15, n. 23, p. 7355-7360, 2007.

SANTOS, R. I. **Metabolismo básico e origem de metabólitos secundários**. In: SIMÕES, C. M. O. et al. *Farmacognosia – da Planta ao Medicamento*. 5. ed. Porto Alegre: Editora da UFRG/Editora da UFSC, 2004. cap. 16, p. 404, 411-412, 422.

SARJIT, A.; Yi, W.; GARY, A. D. Antimicrobial activity of gallic acid against thermophilic *Campylobacter* is strain specific and associated with a loss of calcium ions. **Food Microbiology**, v. 46, p. 227-233, 2015.

SCHMITZ, W.; SAITO, Y. A.; SARIDAKIS, H. O. D. O chá verde e suas ações como quimioprotetor. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 26, n. 2, p.119-130, 2005.

SHAHIDI, F.; AMBIGAIPALAN, P. Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects: A review. **Journal of Functional Foods**, v. 18, p. 820-897, 2015.

SILVA, C. T.; JASIULIONIS, M. G. Relação entre estresse oxidativo, alterações epigenéticas e câncer. **Ciência e Cultura**, v. 66, n. 1, p. 38-42, 2014.

SILVEIRA, G. D. et al. Determination of Phenolic Antioxidants in Amazonian Medicinal Plants by HPLC with Pulsed Amperometric Detection. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 38, p. 1259-1266, 2015.

STALIKAS, C. D. Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. **Journal Separation Science**, v.30, n. 18, p.3268-3295, 2007.

TIVERON, A. P. Antioxidant activity of Brazilian vegetables and its relation with phenolic composition. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, n.7, p. 8943-8957, 2012.

VEIGA, V. F. J.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura. **Química Nova**, v. 28, n. 3, p. 519-528, 2005.

VILKHU, K. et al. Applications and opportunities for ultrasound assisted extraction in the food industry - A review. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 9, n. 2, p. 161-169, 2008.

VINATORU, M. An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 8, p. 303-313, 2001.

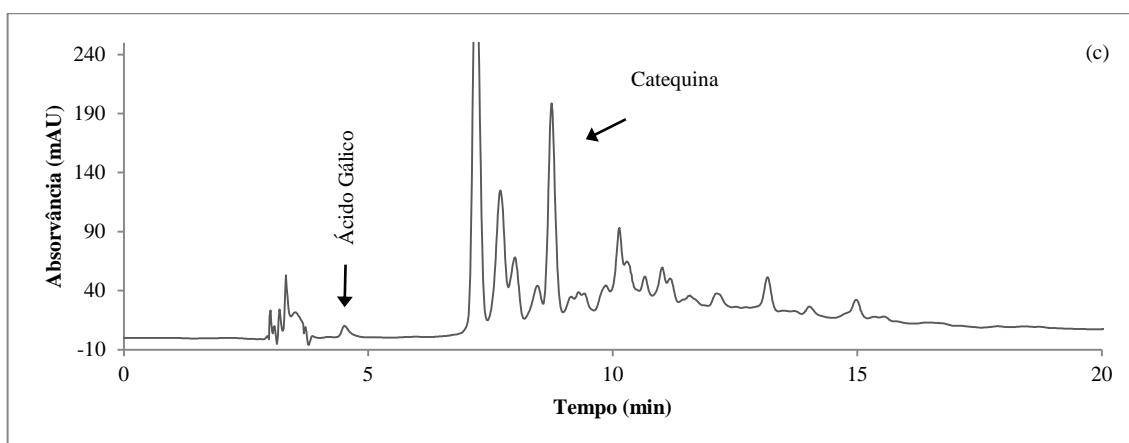
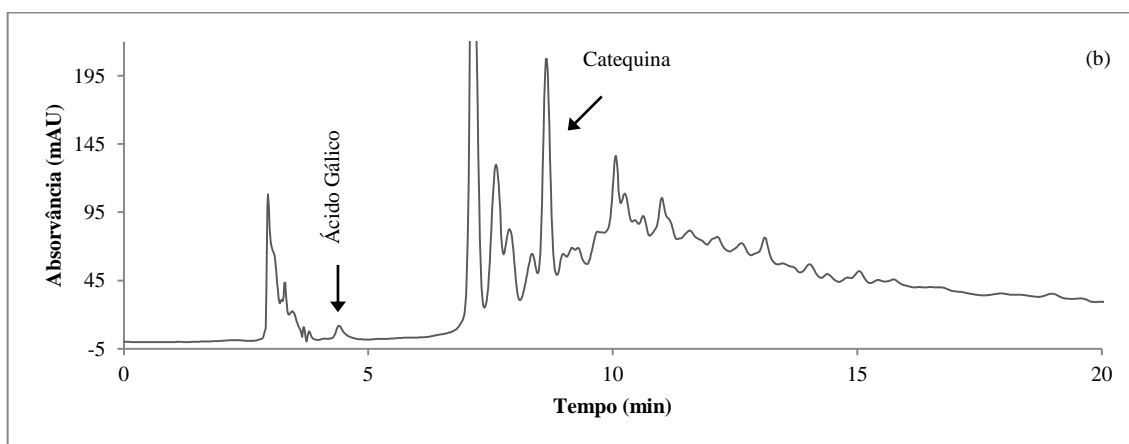
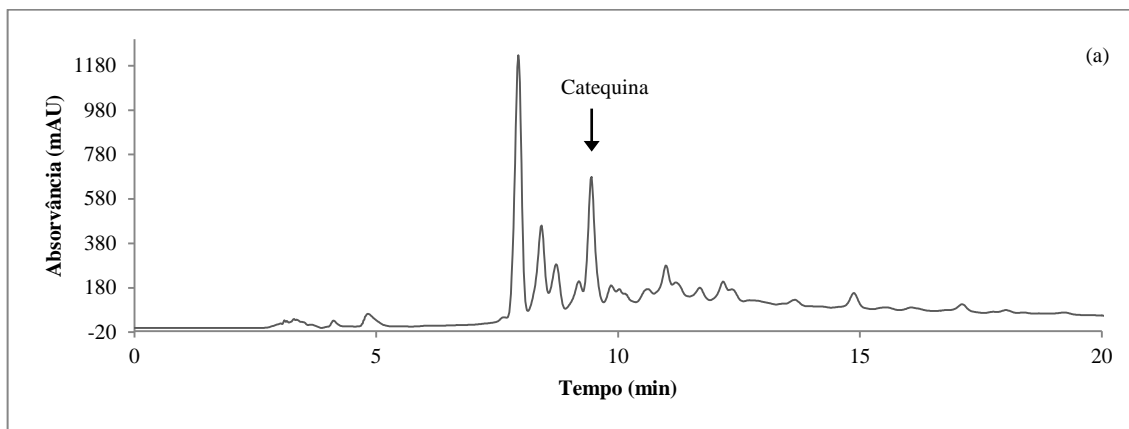
WU, C. et al. A comparison of volatile fractions obtained from *Lonicera macranthoides* via different extraction processes: ultrasound, microwave, soxhlet extraction, hydrodistillation, and cold maceration. **Integrative Medicine Research**, v. 4, n. 3. p. 171-177, 2015.

YAO, L. H. et al. Flavonoids in food and their health benefits. **Plant Foods for Human Nutrition**. v. 59, p. 113-122, 2004.

ZOGHBI, M. G. B.; OLIVEIRA, J.; GUILHON, G.M. P. The genus *Mansoa* (Bignoniaceae):

a source of organosulfur compounds. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 19, n. 3, p. 795-804, 2009.

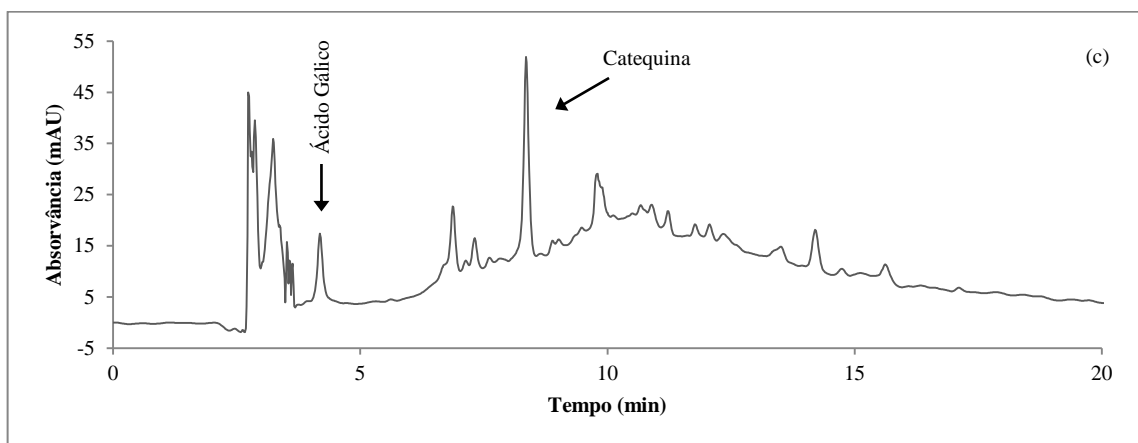
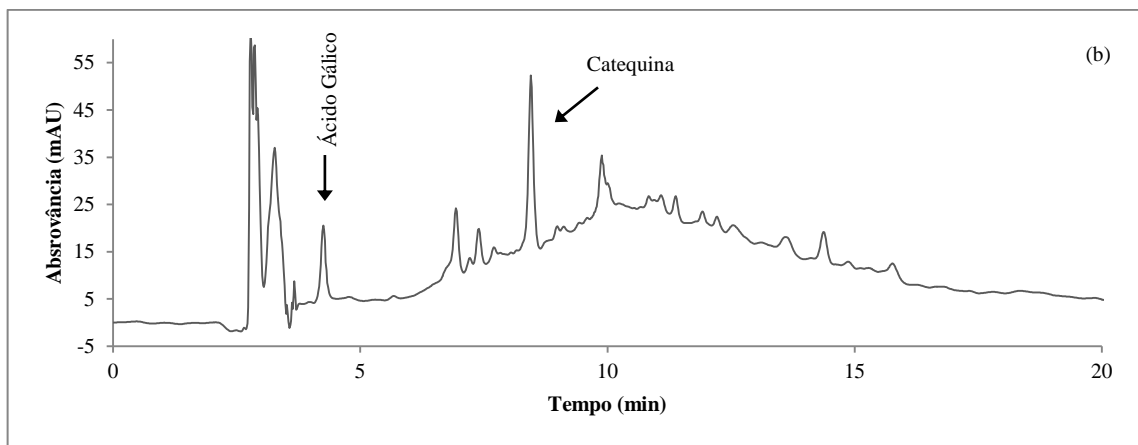
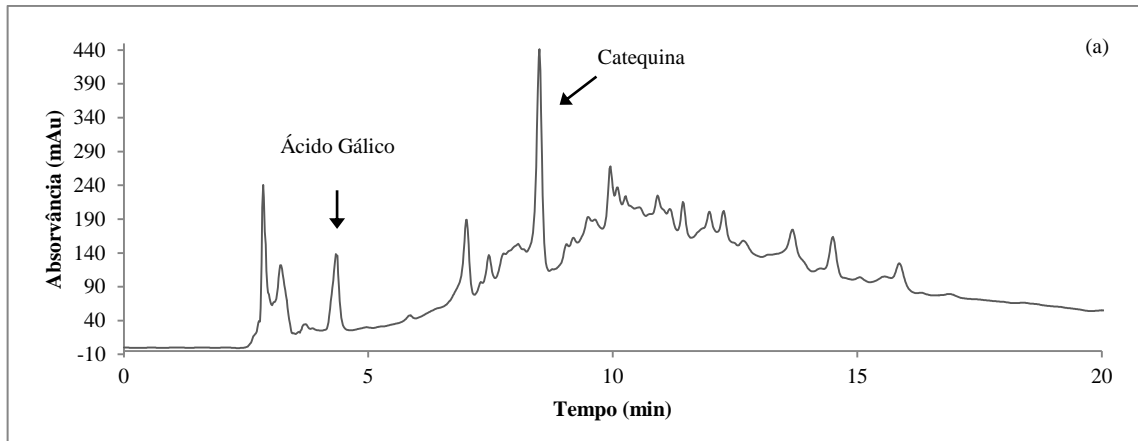
ZUANAZZI, J. A. S.; MONTANHA, J. A. **Flavonoides**. In: SIMÕES, C. M. O. et al. *Farmacognosia – da Planta ao Medicamento*. 5. ed. Porto Alegre: Editora da UFRG/Editora da UFSC, 2004. cap. 23, p. 577, 601-607.

APÊNDICE A – PERFIL CROMATOGRÁFICO *Connarus angustifolius* - 2012

Apêndice A – Perfil Cromatográfico de *Connarus perrottetti* var. *angustifolius* - coleta 2012 obtidos por HPLC-DAD: (a) Extrato Hidroetanólico, (b) Extrato Butanólico, (c) Extrato Acetato de Etila; Comprimento de onda de análise: 220 nm

APÊNDICE B – PERFIL CROMATOGRÁFICO *Connarus angustifolius* – 2013

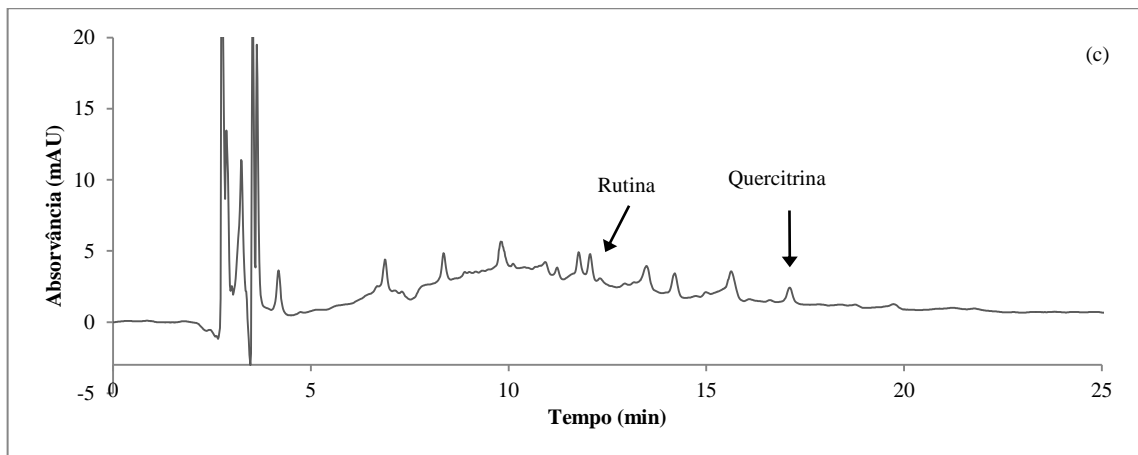
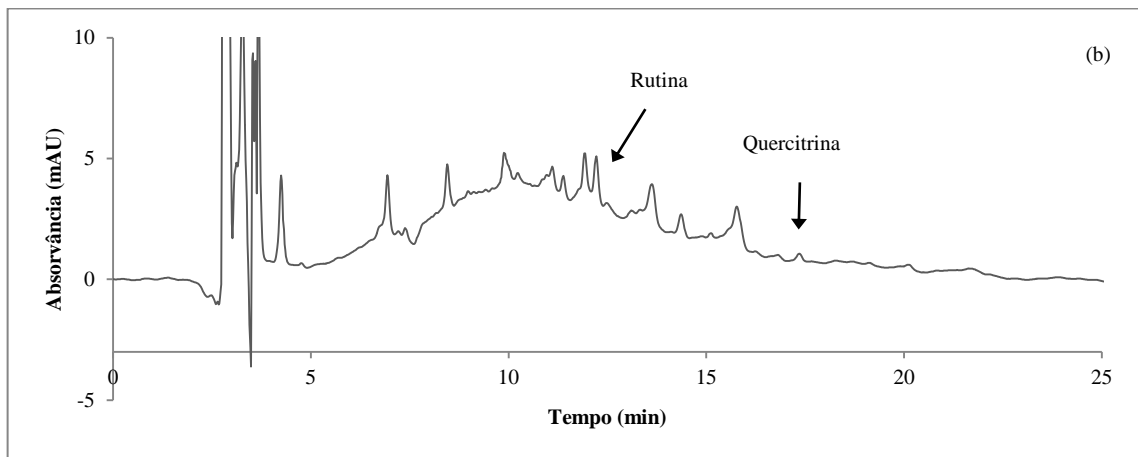
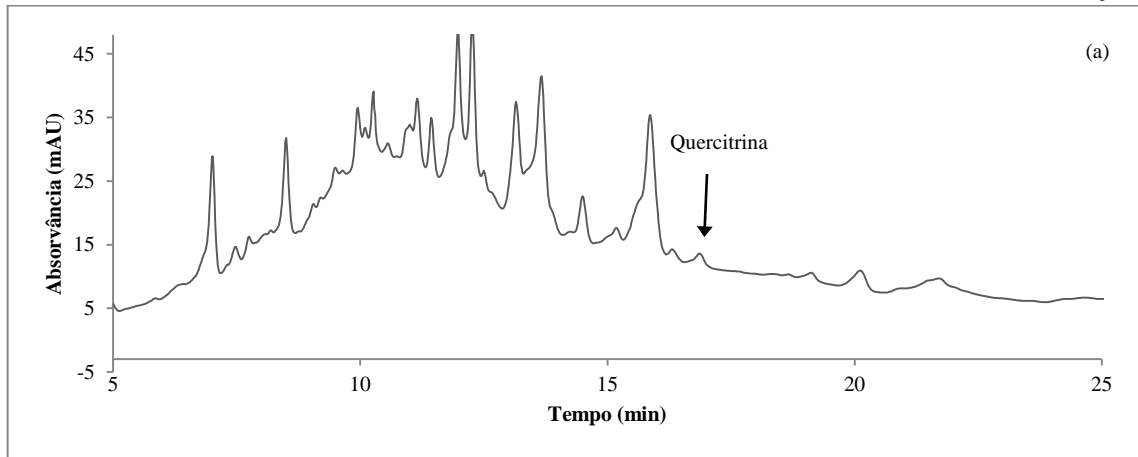
(continua)



Apêndice B – Perfil Cromatográfico de *Connarus perrottetti* var. *angustifolius* - coleta 2013 obtidos por HPLC-DAD: (a) Extrato Hidroetanólico, (b) Extrato Butanólico, (c) Extrato Acetato de Etila; Comprimento de onda de análise: 220 nm.

APÊNDICE B – PERFIL CROMATOGRÁFICO *Connarus angustifolius* - 2013

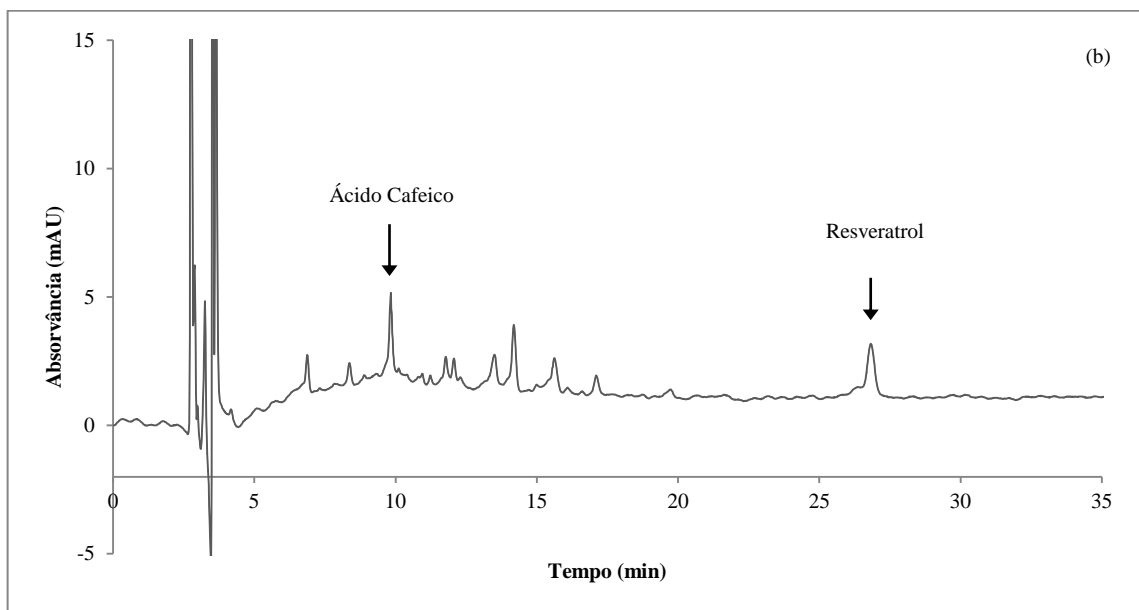
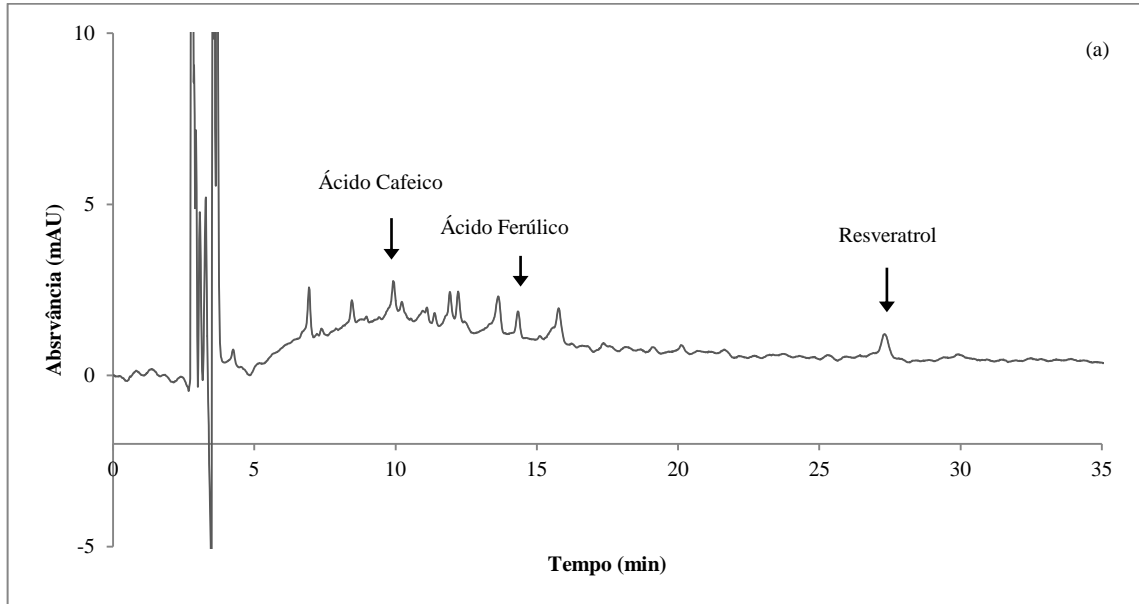
(continuação)



Apêndice B – Perfil Cromatográfico de *Connarus perrotteti* var. *angustifolius* - coleta 2013 obtidos por HPLC-DAD: (a) Extrato Hidroetanólico, (b) Extrato Butanólico, (c) Extrato Acetato de Etila; Comprimento de onda de análise: 254 nm.

APÊNDICE B – PERFIL CROMATOGRÁFICO *Connarus angustifolius* – 2013

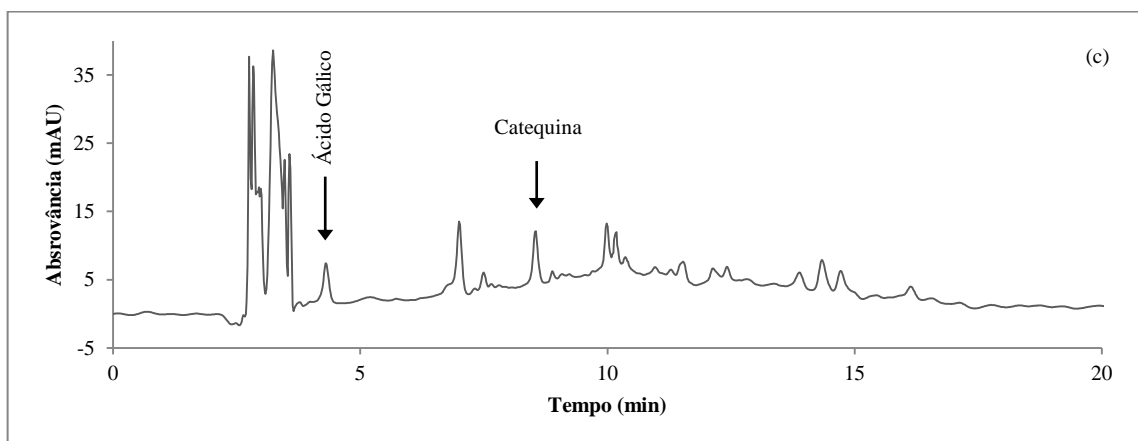
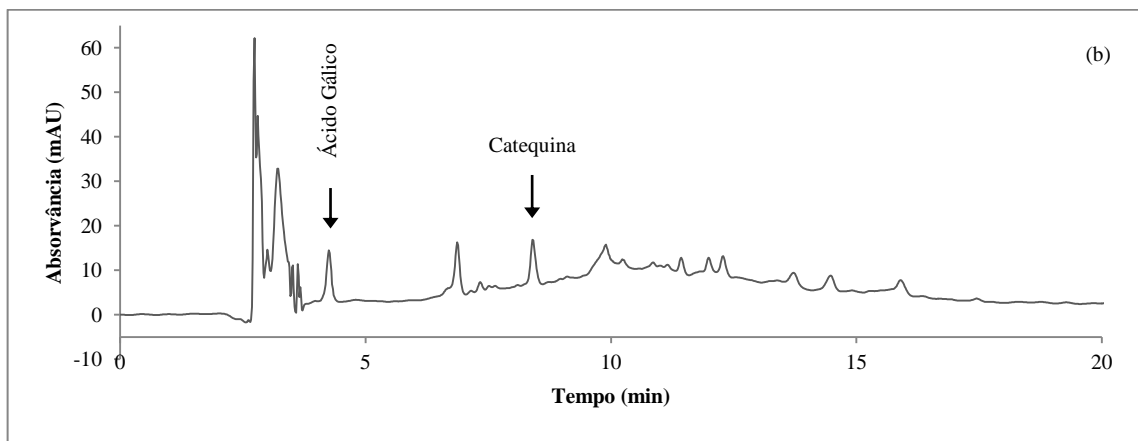
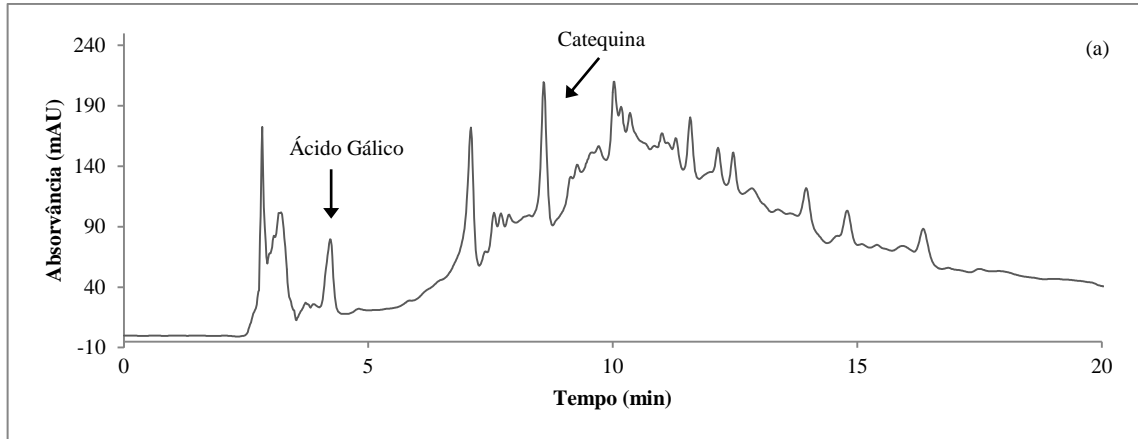
(conclusão)



Apêndice B – Perfil Cromatográfico de *Connarus perrottetti* var. *angustifolius* - coleta 2013 obtidos por HPLC-DAD: (a) Extrato Butanólico, (b) Extrato Acetato de Etila; Comprimento de onda de análise: 320 nm.

APÊNDICE C – PERFIL CROMATOGRÁFICO *Connarus angustifolius* – 2014

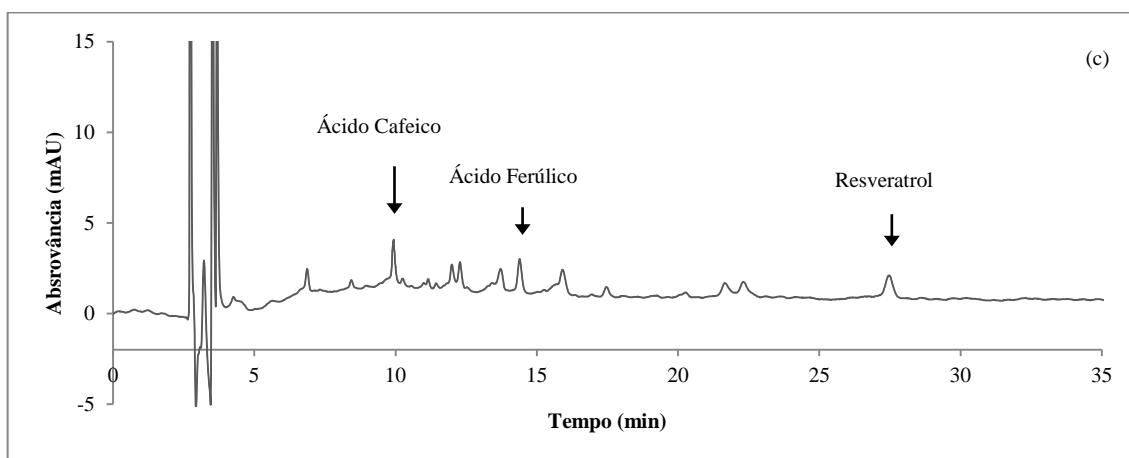
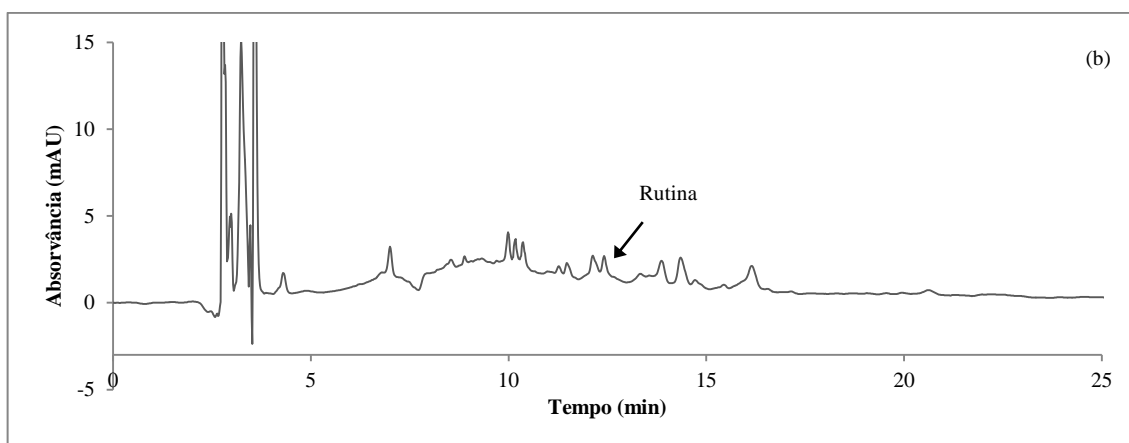
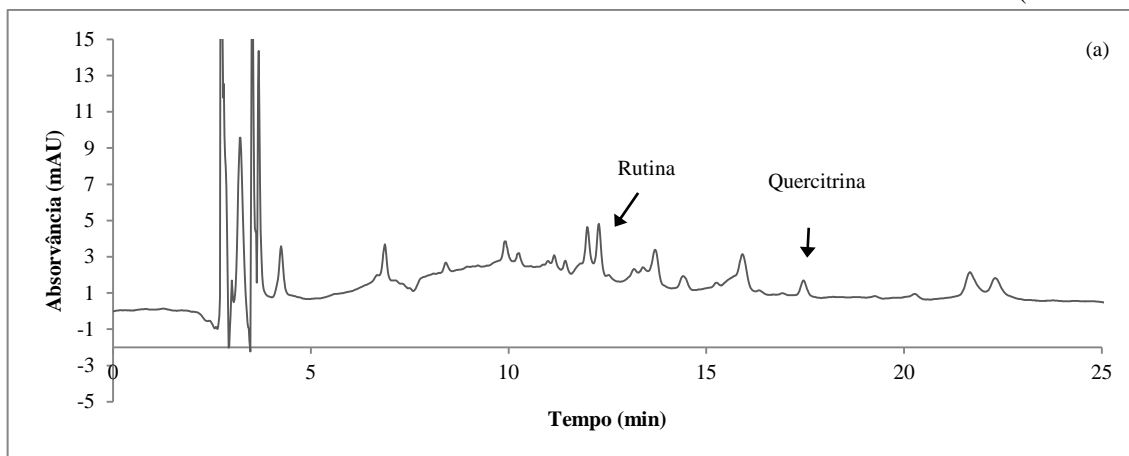
(continua)



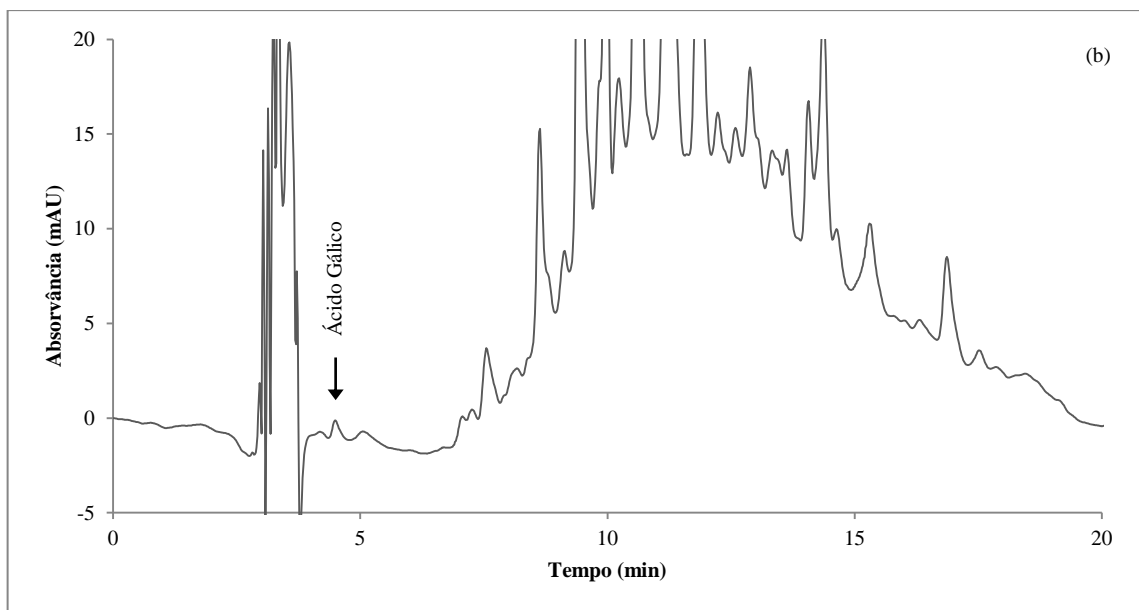
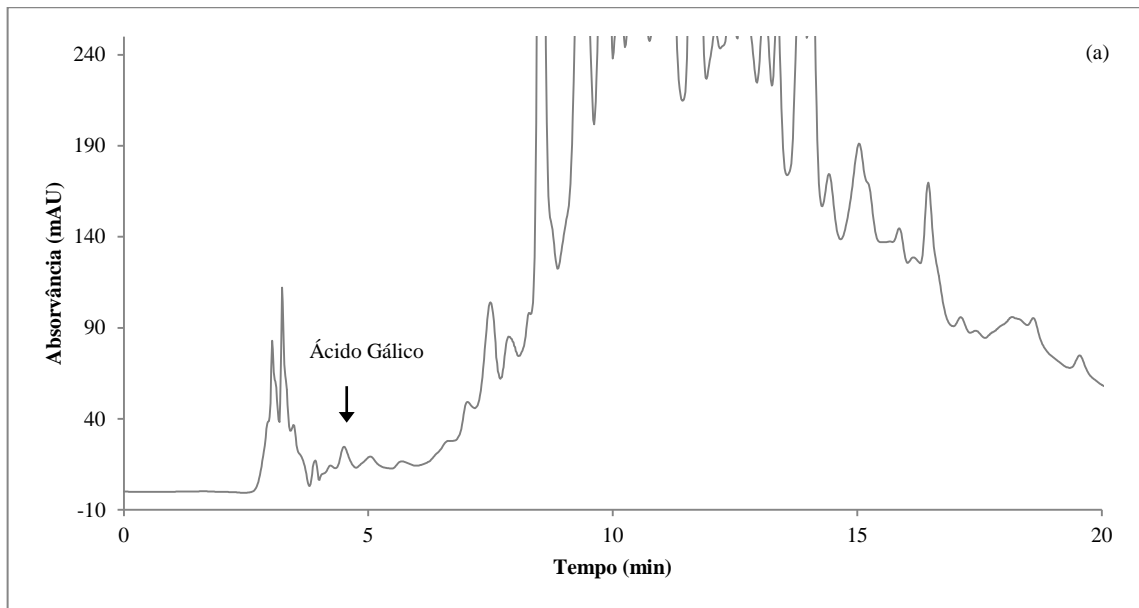
Apêndice C – Perfil Cromatográfico de *Connarus perrottetti* var. *angustifolius* - coleta 2014 obtidos por HPLC-DAD: (a) Extrato Hidroetanólico, (b) Extrato Butanólico, (c) Extrato Acetato de Etila; Comprimento de onda de análise: 220 nm.

APÊNDICE C – PERFIL CROMATOGRÁFICO *Connarus angustifolius* – 2014

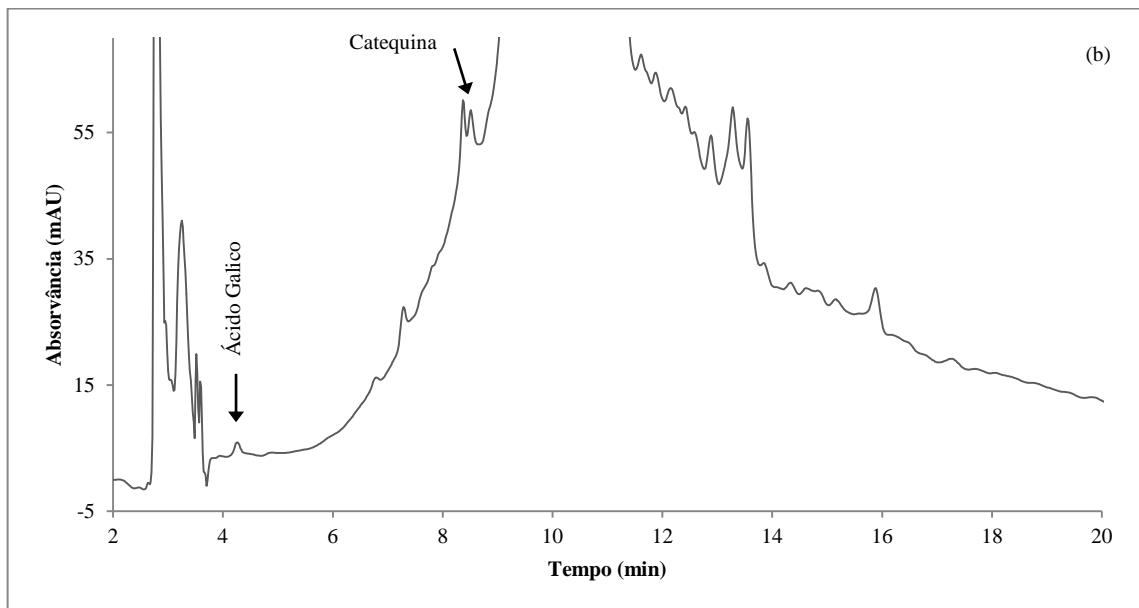
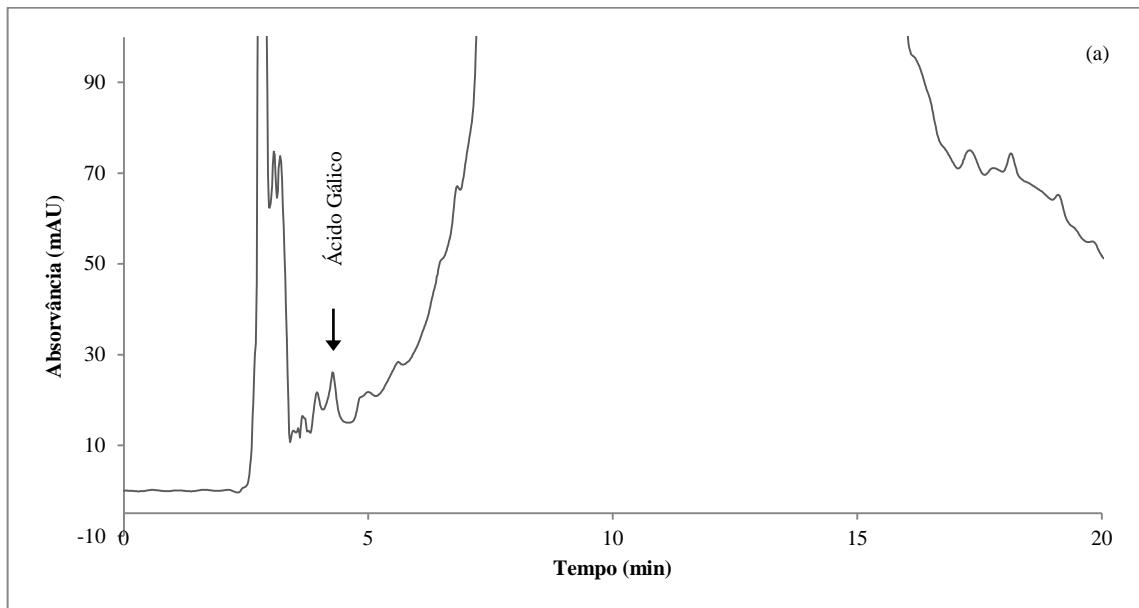
(conclusão)



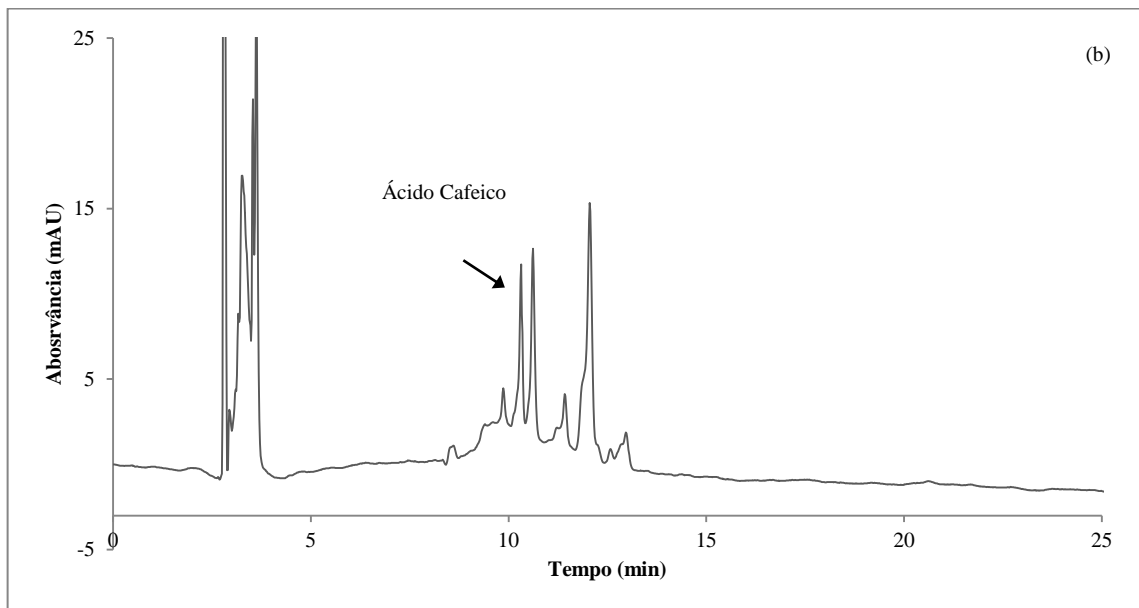
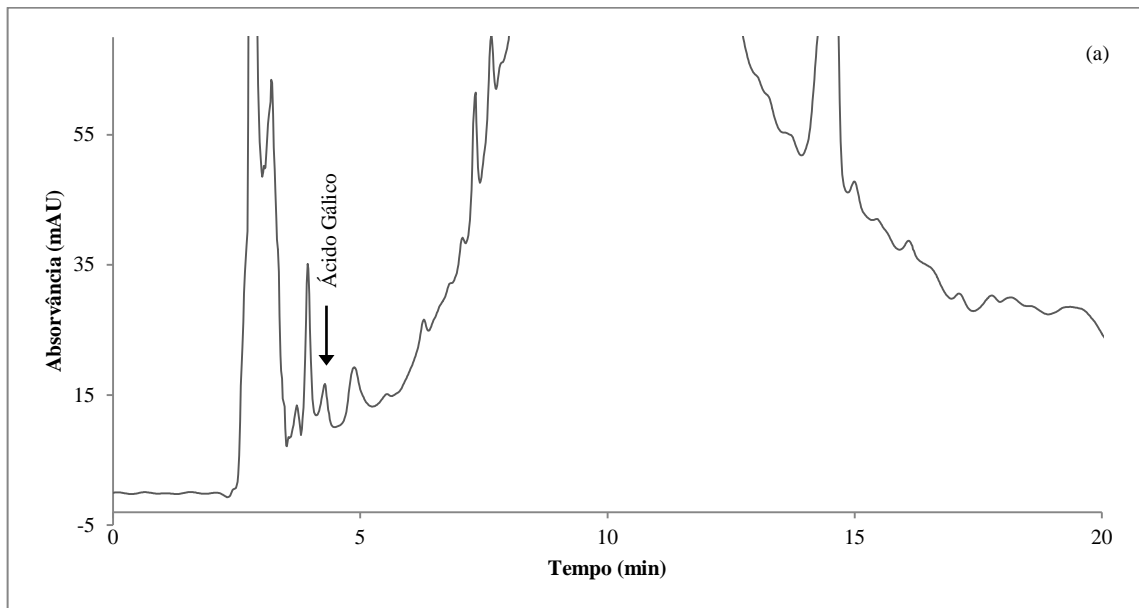
Apêndice C – Perfil Cromatográfico de *Connarus perrottetti* var. *angustifolius* - coleta 2014 obtidos por HPLC-DAD: (a) Extrato Butanólico, (b) Extrato Acetato de Etila; Comprimento de onda de análise: 254 nm; (c) Extrato Butanólico; Comprimento de onda de análise: 320 nm.

APÊNDICE D – PERFIL CROMATOGRÁFICO *Cecropia obtusa* – 2012

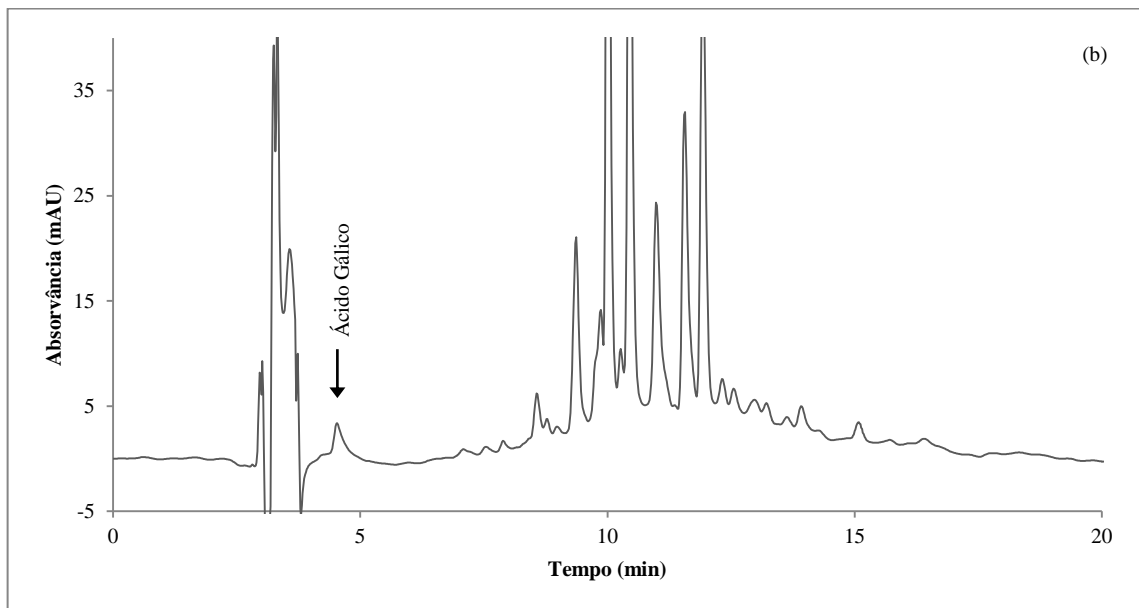
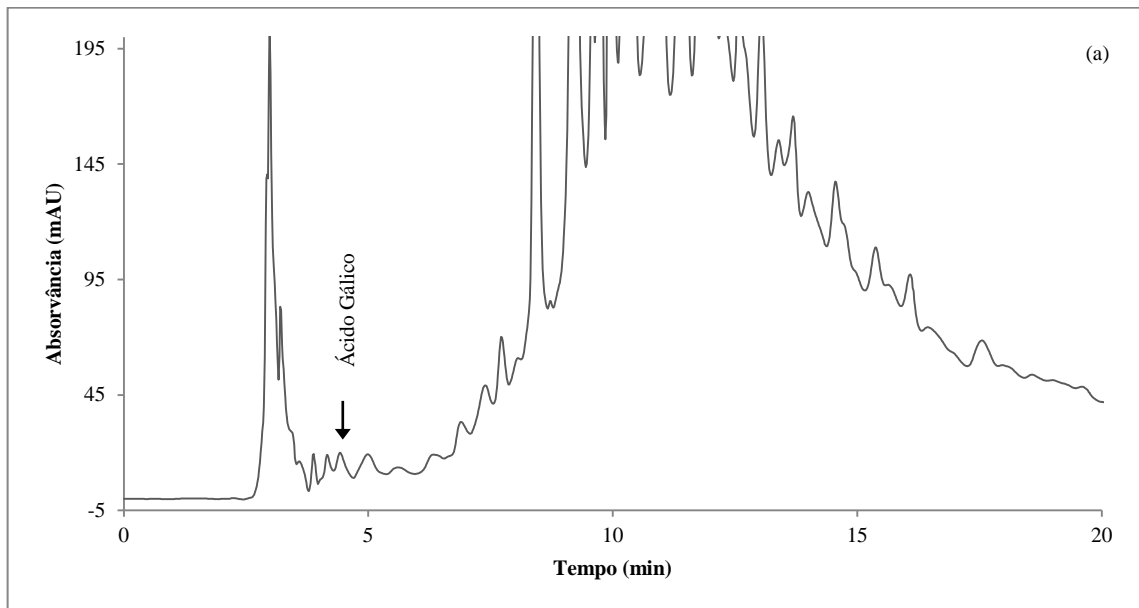
Apêndice D – Perfil Cromatográfico de *Cecropia obtusa* - coleta 2012 obtidos por HPLC-DAD: (a) Extrato Hidroetanólico; (b) Extrato Butanólico; Comprimento de onda de análise: 220 nm.

APÊNDICE E – PERFIL CROMATOGRÁFICO *Cecropia obtusa* – 2013

Apêndice E – Perfil Cromatográfico de *Cecropia obtusa* - coleta 2013 obtidos por HPLC-DAD: (a) Extrato Hidroetanólico; (b) Extrato Butanólico; Comprimento de onda de análise: 220 nm.

APÊNDICE F – PERFIL CROMATOGRÁFICO *Cecropia obtusa* – 2014

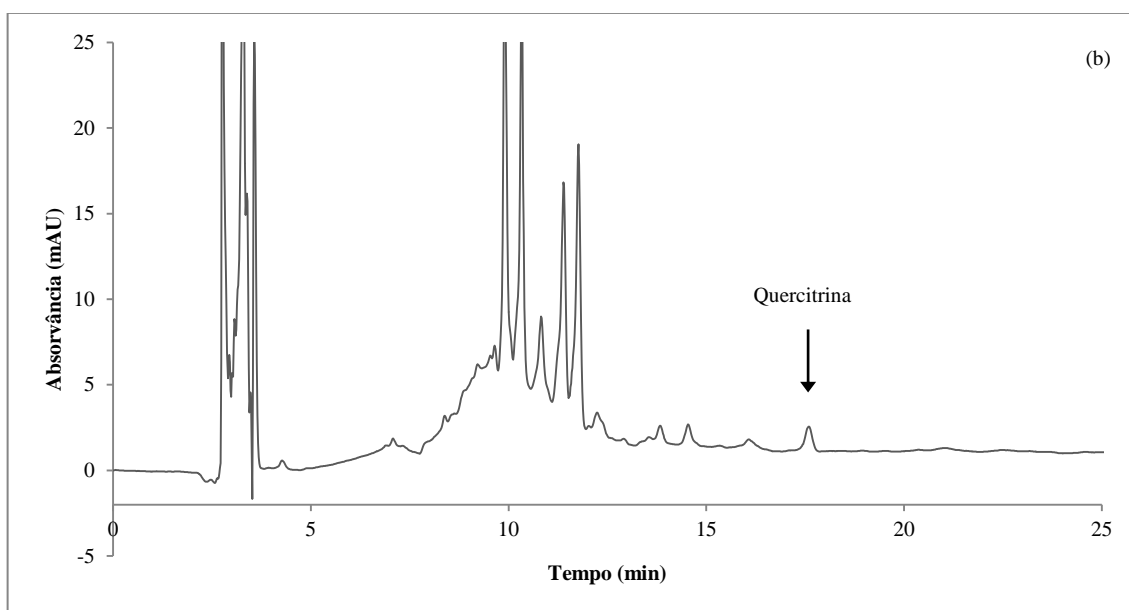
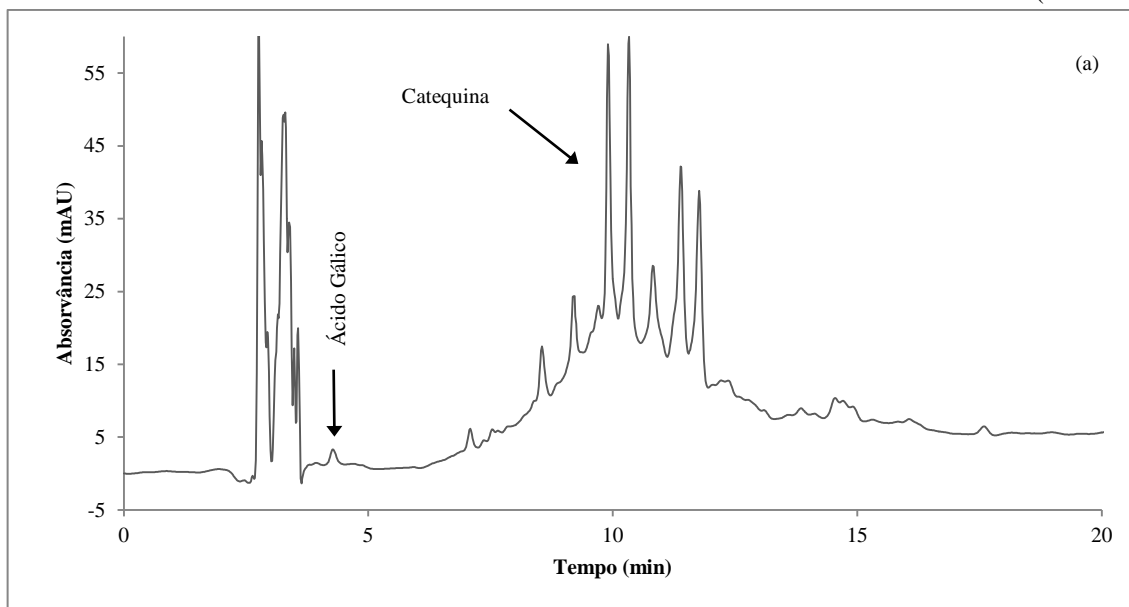
Apêndice F – Perfil Cromatográfico de *Cecropia obtusa* - coleta 2014 obtidos por HPLC-DAD: (a) Extrato Hidroetanólico; Comprimento de onda de análise: 220 nm. (b) Extrato Butanólico; Comprimento de onda de análise: 320 nm.

APÊNDICE G – PERFIL CROMATOGRÁFICO *Cecropia palmata* – 2012

Apêndice G – Perfil Cromatográfico de *Cecropia palmata* - coleta 2012 obtidos por HPLC-DAD: (a) Extrato Hidroetanólico; (b) Extrato Butanólico; Comprimento de onda de análise: 220 nm.

APÊNDICE H – PERFIL CROMATOGRÁFICO *Cecropia palmata* – 2013

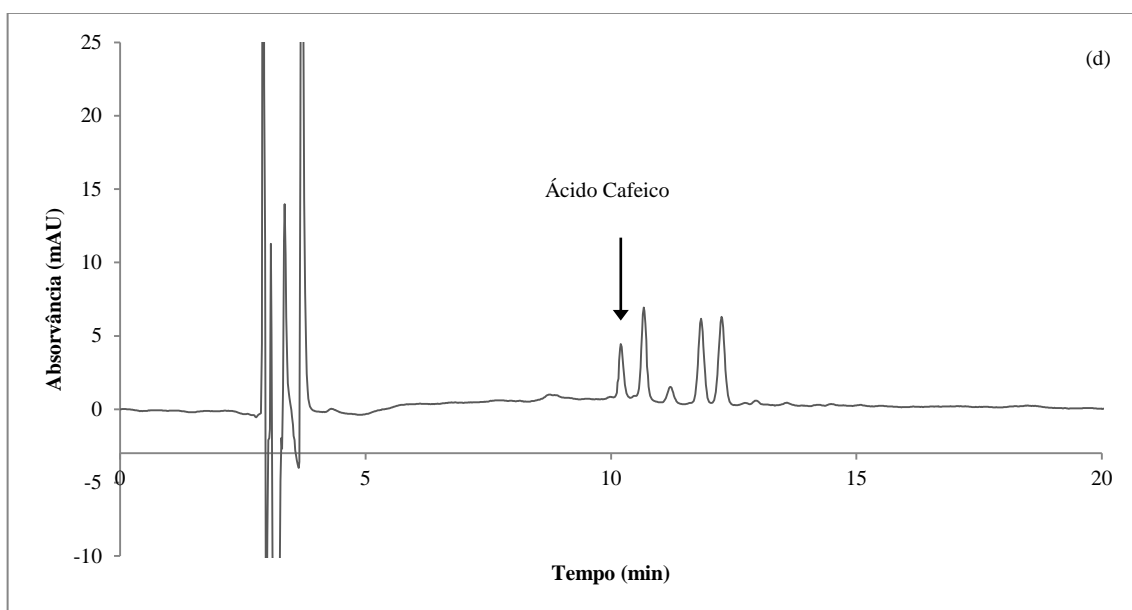
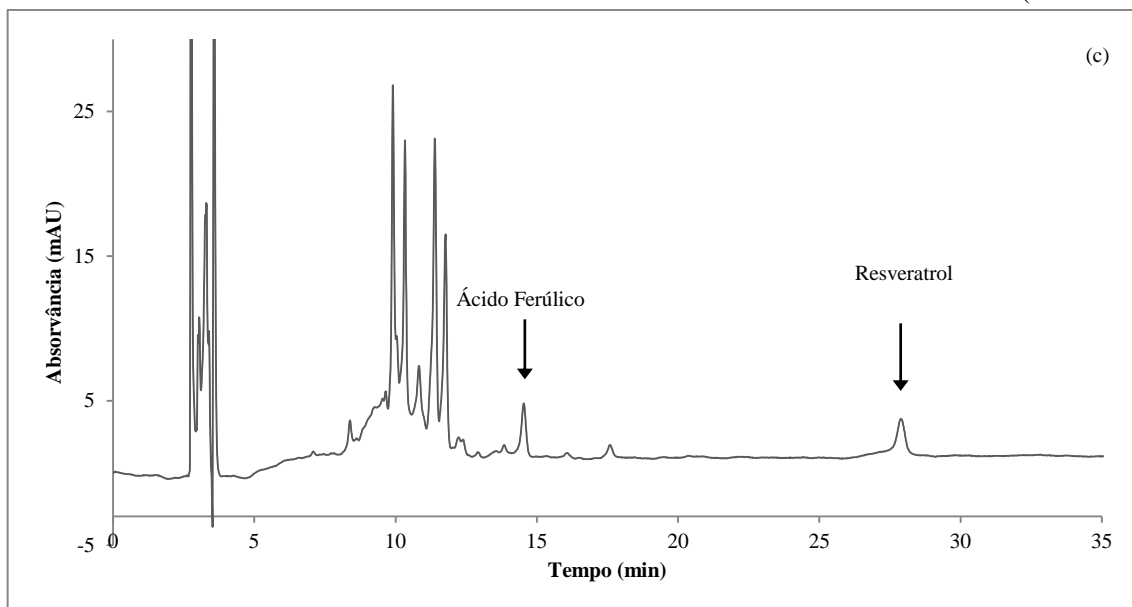
(continua)



Apêndice H – Perfil Cromatográfico de *Cecropia palmata* - coleta 2013 obtidos por HPLC-DAD: (a) Extrato Butanólico; Comprimento de onda de análise: 220 nm. (b) Extrato Butanólico; Comprimento de onda de análise: 254 nm;

APÊNDICE H – PERFIL CROMATOGRÁFICO *Cecropia palmata* – 2013

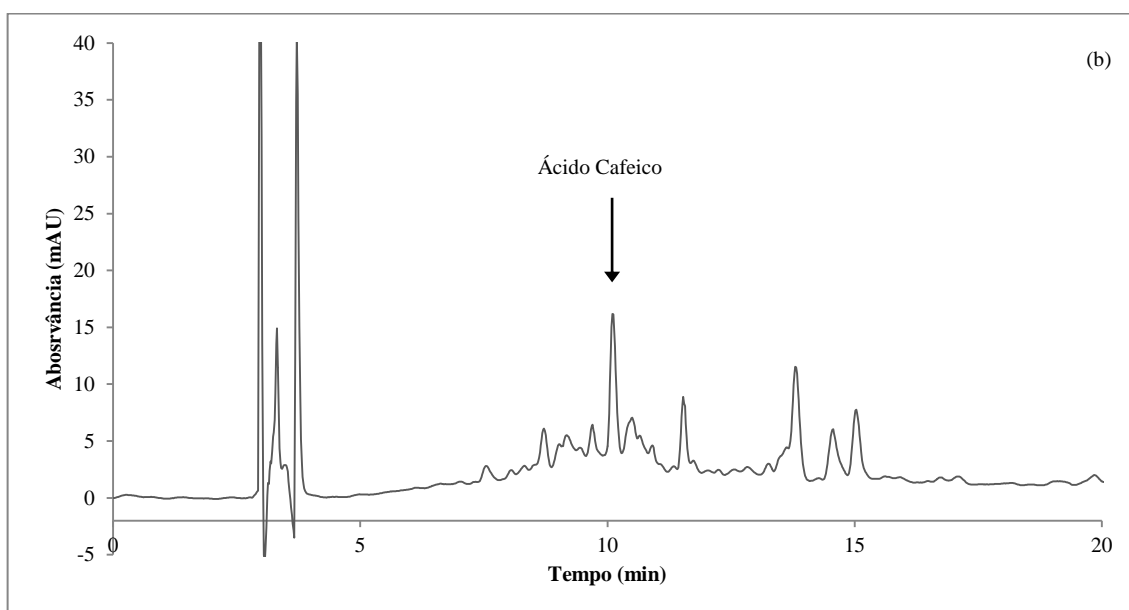
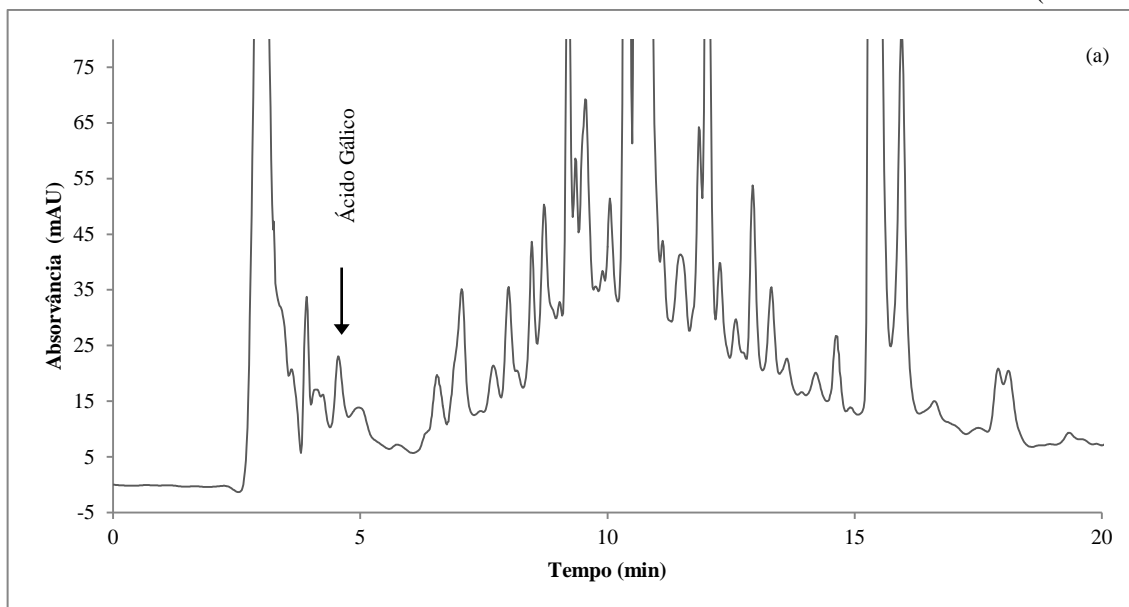
(conclusão)



Apêndice H – Perfil Cromatográfico de *Cecropia palmata* - coleta 2013 obtidos por HPLC-DAD: (c) Extrato Butanólico; (d) Extrato Acetato de Etila; Comprimento de onda de análise: 320 nm;

APÊNDICE I – PERFIL CROMATOGRÁFICO *Mansoa alliacea* – 2012

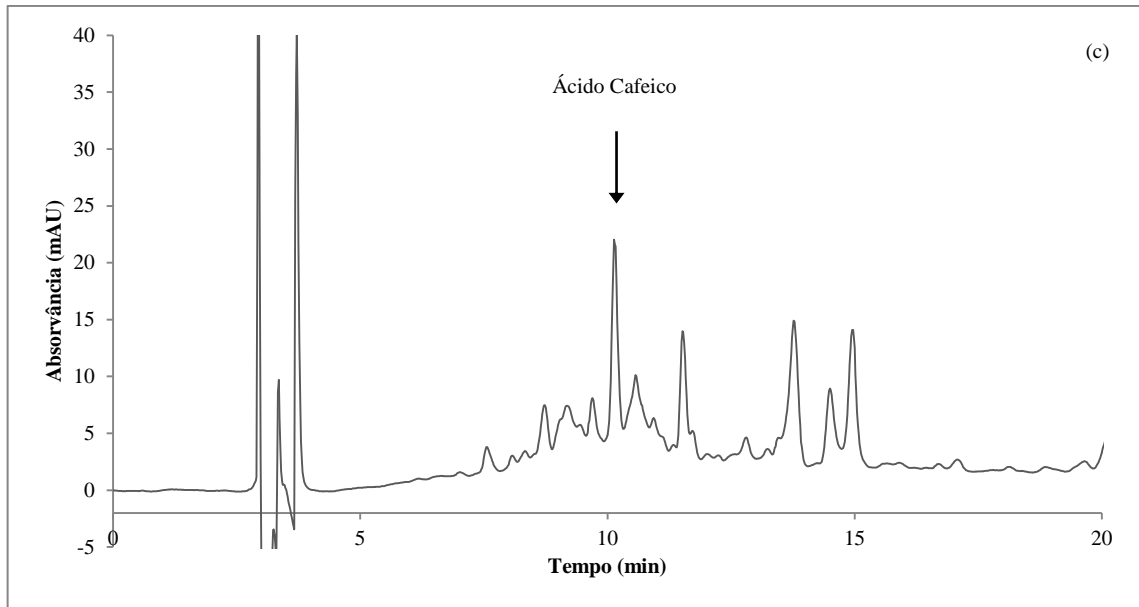
(continua)



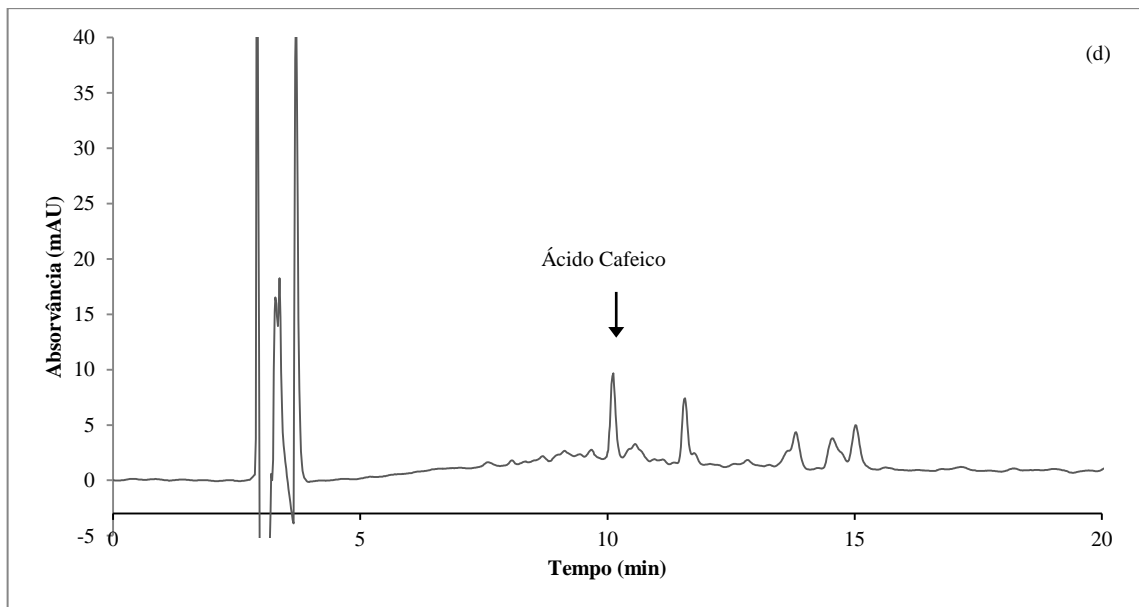
Apêndice I – Perfil Cromatográfico de *Mansoa alliacea* - coleta 2012 obtidos por HPLC-DAD: (a) Extrato Hidroetanólico; Comprimento de onda de análise: 220 nm. (b) Extrato Butanólico; Comprimento de análise: 320 nm;

APÊNDICE J – PERFIL CROMATOGRÁFICO *Mansoa alliacea* – 2013 e 2014

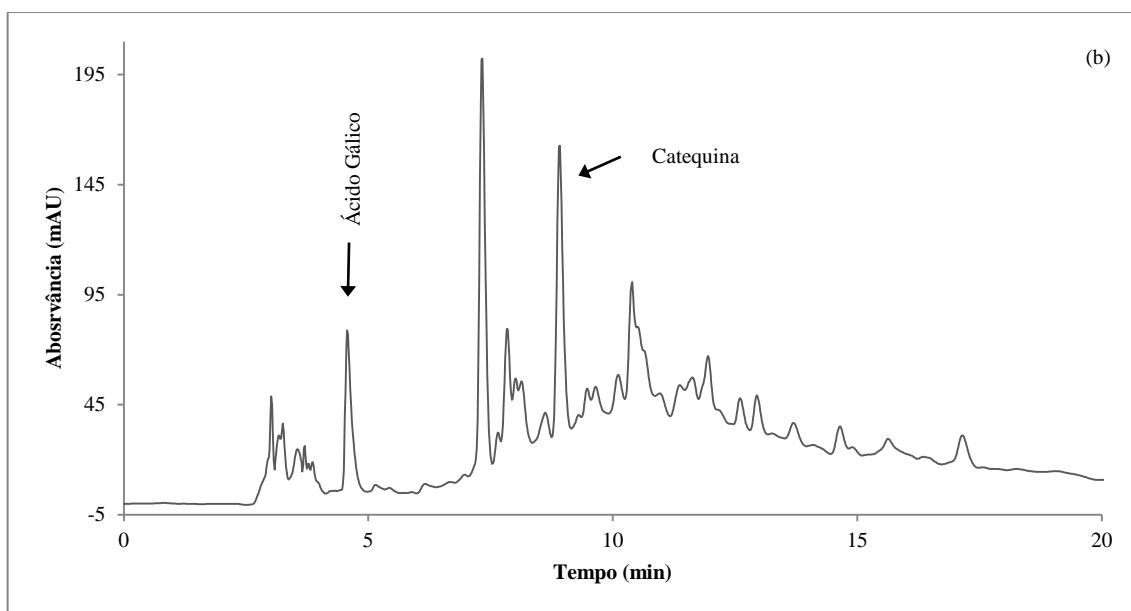
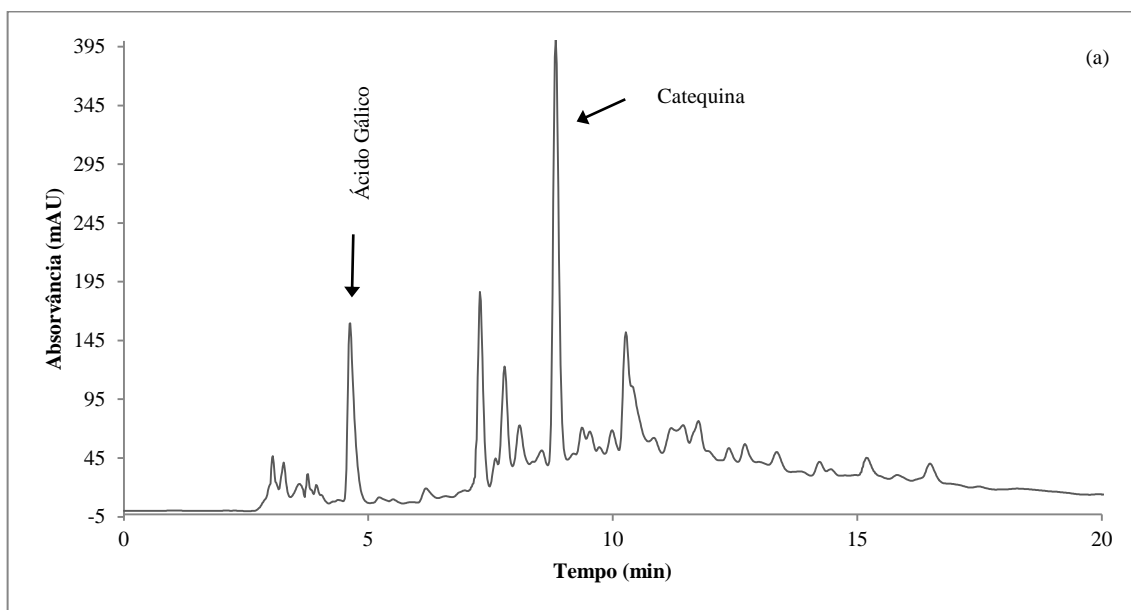
(conclusão)



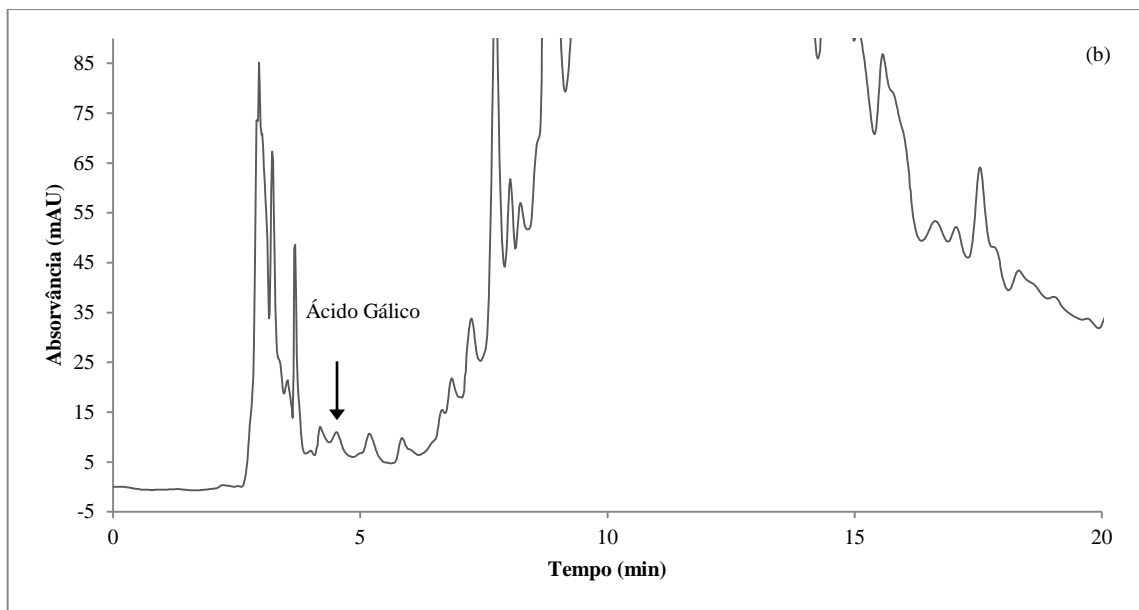
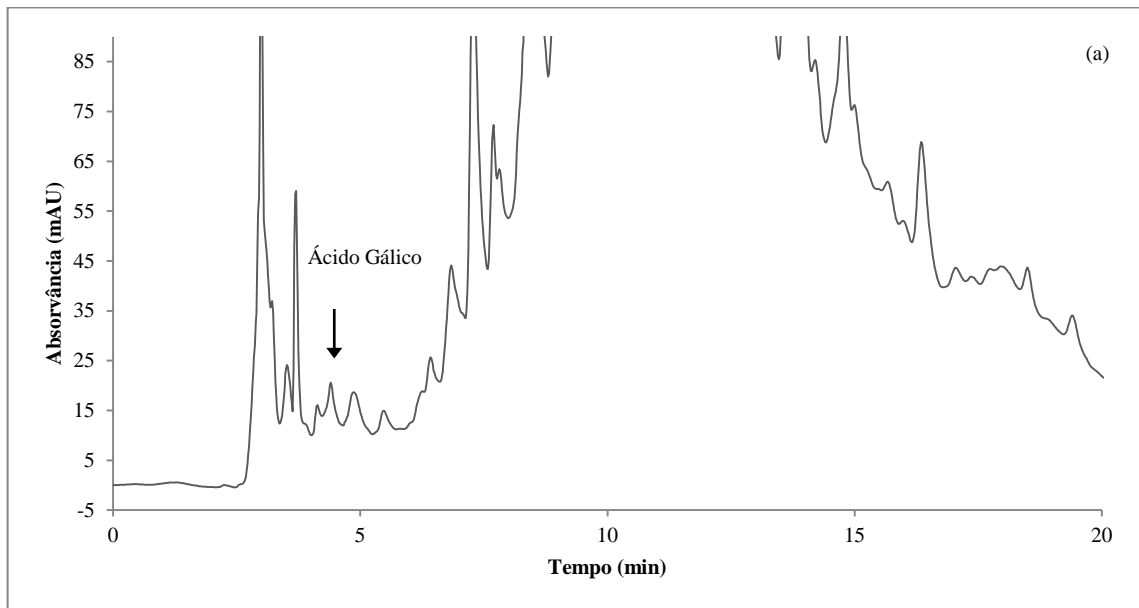
Apêndice J – Perfil Cromatográfico de *Mansoa alliacea* - coleta 2013 obtidos por HPLC-DAD: (c) Extrato Butanólico; Comprimento de onda de análise: 320 nm.



Apêndice J – Perfil Cromatográfico de *Mansoa alliacea* - coleta 2014 obtidos por HPLC-DAD: (d) Extrato Butanólico; Comprimento de onda de análise: 320 nm.

APÊNDICE L – PERFIL CROMATOGRÁFICO INFUSÃO *Connarus angustifolius*

Apêndice L – Perfil Cromatográfico das infusões, obtidos por HPLC-DAD: (a) Coleta 2013; (b) Coleta 2014; Comprimento de onda de análise: 220 nm.

APÊNDICE M – PERFIL CROMATOGRÁFICO INFUSÃO *Cecropia obtusa*

Apêndice M – Perfil Cromatográfico das infusões, obtidos por HPLC-DAD: (a) Coleta 2012; (b) Coleta 2013; Comprimento de onda de análise: 220 nm.