



Universidade Federal do Pampa

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

ANDRESSA ROSSINI GOULART

QUANTIFICAÇÃO DE ÁCIDOS FENÓLICOS EM CHÁS DE *Plectranthus  
neochilus* POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA COM  
DETECTOR ELETROQUÍMICO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Uruguaiiana  
2019

**ANDRESSA ROSSINI GOULART**

**QUANTIFICAÇÃO DE ÁCIDOS FENÓLICOS EM CHÁS DE  
*Plectranthus neochilus* POR CROMATOGRÁFIA LÍQUIDA DE ALTA  
EFICIÊNCIA COM DETECTOR ELETROQUÍMICO**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Bioquímica da Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA-RS), como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Bioquímica.

Orientador: Prof<sup>o</sup>. Dr. Rafael Roehrs

**Uruguaiana  
2019**

Ficha catalográfica elaborada automaticamente com os dados fornecidos  
pelo(a) autor(a) através do Módulo de Biblioteca do  
Sistema GURI (Gestão Unificada de Recursos Institucionais) .

G694q Goulart, Andressa Rossini

Quantificação de ácidos fenólicos em chás de *Plectranthus neochilus* por cromatografia líquida de alta eficiência com detector eletroquímico / Andressa Rossini Goulart.

67 p.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Pampa,  
MESTRADO EM BIOQUÍMICA, 2019.

"Orientação: Rafael Roehrs".

1. Método HPLC-ECD. 2. *Plectranthus neochilus*. 3. Metabolismo secundário. 4. Ácidos fenólicos. 5. Condições ambientais. I. Título.

ANDRESSA ROSSINI GOULART

**QUANTIFICAÇÃO DE ÁCIDOS FENÓLICOS EM CHÁS DE *Plectranthus neochilus*  
POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA COM DETECTOR  
ELETROQUÍMICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação *Stricto Sensu* em Bioquímica da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Bioquímica.

Área de concentração: Bioprospecção Molecular

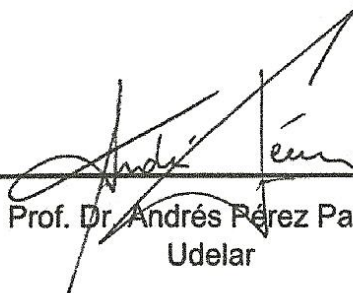
Dissertação defendida e aprovada em: 30, agosto de 2019.

Banca examinadora:



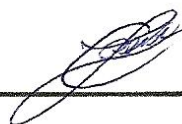
---

Prof. Dr. Rafael Roehrs  
Orientador  
Unipampa



---

Prof. Dr. Andrés Pérez Parada  
Udelar



---

Prof. Dr. Elton Luis Gasparotto Denardin  
Unipampa

Dedico este trabalho aos professores que contribuíram com seus ensinamentos em toda minha trajetória acadêmica e escolar, tudo que construí intelectualmente até agora, foi graças a vocês, também a todas as pessoas que se fizeram presente durante este processo, familiares, amigos e colegas.

## AGRADECIMENTO

Agradeço primeiramente à Deus, sem Ele nada disso teria iniciado, menos ainda findado, obrigada Pai por teu amor, por colocar pessoas tão boas no meu caminho, que ajudaram a tornar meu sonho realidade!

Ao meu orientador prof. Dr. Rafael Roehrs por todo o carinho, toda a força e por se fazer presente em cada etapa de meu aprendizado, obrigada pela oportunidade de aprender com você, por segurar minhas lágrimas e por acreditar em mim nos momentos que eu desacreditei. Raridade e presente é encontrar um amigo, pai e irmão, tudo isso no mesmo professor. Deus coloca as pessoas certas, no momento certo em nossas vidas, obrigada por ser essa pessoa no meu caminho!

Aos meus colegas do laboratório de Estudos Físico-Químicos e Produtos Naturais (LEFQPN) e do Grupo Interdisciplinar de Pesquisa em Prática de Ensino (GIPPE), que fazem de nosso local de estudo e trabalho, uma segunda casa, uma família. Pelo carinho, apoio e cumplicidade. Aos professores que são banca avaliadora Dr. Andrés Pérez Parada e Dr. Elton Luis Gasparotto Denardin que aceitaram o convite para engrandecer este trabalho com suas considerações.

À minha família. Minha mãe Tânia, guerreira, que muito lutou e luta para acompanhar cada vitória, tudo em mim é construído para te fazer feliz! Meu pai Dilson, fortaleza, que sempre me encorajou a construir bases para alcançar meus objetivos! Meus irmãos Tamir e Nefi, companheiros de vida, que sempre compreenderam que minha ausência era por uma causa maior. Ao Mauricio, meu companheiro de vida. Minha avó Ilza que me incentiva a ter foco na vida e meu avô Ademar Carvalho Rossini (*in memoriam*), artista uruguaianense, que faz tanta falta nos meus dias, tenho certeza que está acompanhando esta conquista, como fez com todas em minha vida! Amo vocês infinitamente, de uma maneira que nem consigo explicar.

“É preciso que eu suporte duas ou três  
larvas se quiser conhecer as borboletas”.

Antoine de Saint-Exupéry

## RESUMO

Dissertação de Mestrado  
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica  
Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA-RS)

### QUANTIFICAÇÃO DE ÁCIDOS FENÓLICOS EM *Plectranthus neochilus* POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA COM DETECTOR ELETROQUÍMICO

AUTORA: Andressa Rossini Goulart

ORIENTADOR: Rafael Roehrs

Data e Local da Defesa: Uruguaiiana, 30 de agosto de 2019

A *Plectranthus neochilus* Schlechter é uma planta utilizada pela medicina popular para cura e/ou tratamento de doenças, sintomas e sinais relativos ao aparelho digestivo e abdômen e também é conhecida pelos nomes de “boldo miúdo”, “boldo gambá”, “boldo rasteiro”, entre outros. Possui nas folhas maior quantidade de compostos bioativos com características farmacológicas, dentre eles os ácidos fenólicos provenientes do metabolismo secundário: ácidos gálico, protocatecuico, vanílico, p-cumárico, cafeico e ferúlico. Diversos fatores alteram a produção de metabólitos secundários das plantas e por consequência a qualidade e valor terapêutico das mesmas, como por exemplo ritmocircadiano, desenvolvimento, temperatura, disponibilidade hídrica, dentre outros. Em virtude disto, foi avaliada a concentração dos seis ácidos fenólicos mencionado, em amostras de folhas de *Plectranthus neochilus* sob diferentes condições ambientais, através de metodologia própria para CLAE-ECD, onde foi possível averiguar que diferentes condições de cultivo e colheita afetaram a síntese de metabólitos secundários da planta medicinal estudada, de acordo com suas características metabólicas.

**Palavras-Chave:** CLAE-ECD, *Plectranthus neochilus*, ácidos fenólicos, condições ambientais.



## **ABSTRACT**

Dissertation of Master's Degree  
Program of Post-Graduation in Biochemistry  
Federal University of Pampa (UNIPAMPA-RS)

### **QUANTIFICATION OF PHENOLIC ACIDS IN *Plectranthus neochilus* TEAS BY HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY WITH ELECTROCHEMICAL DETECTOR**

AUTHOR: Andressa Rossini Goulart

ADVISOR: Rafael Roehrs

Date and Place of Defense: Uruguaiiana, August 30th, 2019

*Plectranthus neochilus* Schlechter is a plant used by popular medicine to cure and/or treat diseases, symptoms and signs related to the digestive tract and abdomen and is also known by the names of "boldo miúdo", "boldo gambá", "boldo rasteiro", among others. It has the largest amount of bioactive compounds with pharmacological characteristics, including phenolic acids from secondary metabolism: gallic, protocatechuic, vanillic, p-coumaric, caffeic and ferulic acids. Several factors alter the production of secondary metabolites of the plants and consequently their quality and therapeutic value, such as rhythmic circadian, development, temperature, water availability, among others. As a result, the concentration of the six phenolic acids mentioned in *Plectranthus neochilus* leaf samples under different cultivation and harvesting conditions affected the synthesis of secondary metabolites of the medicinal plant studied, according to their metabolic characteristics.

Keywords: HPLC-ECD, *Plectranthus neochilus*, phenolic acids, environmental conditions.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – <i>Plectranthus neochilus</i> Schlechter.....	17
Figura 2 – Principais rotas de biossíntese de metabólitos secundários e suas inter-relações com o metabolismo primário.....	20
Figura 3 – Esquema da biossíntese de compostos fenólicos a partir da fenilalanina.	23

## LISTA DE TABELA

Tabela 1 – Características físico-químicas dos seis ácidos fenólicos.....	24
---	----

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C – graus Celsius

C3 – estrutura química com três carbonos

C6 – estrutura química com seis carbonos

CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

DAD – Detector por Arranjo de Diodos

ECD – Electrochemical Detector/Detector Eletroquímico

ERO – espécies reativas do metabolismo do oxigênio

g – gramas

g/dia – gramas por dia

g/mol – gramas por mol

HPLC – High Performance Liquid Chromatography

*P. neochilus* – *Plectranthus neochilus*

PAL – Phenylalanine ammonia lyase/Fenilalanina amônia liase

SPE – Solid Phase Extration/Extração em Fase Sólida

## SUMÁRIO

AGRADECIMENTO .....	6
RESUMO.....	8
ABSTRACT.....	9
LISTA DE FIGURAS .....	10
LISTA DE TABELA .....	11
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	12
SUMÁRIO .....	13
1 INTRODUÇÃO .....	14
2 CONCEITOS GERAIS E REVISÃO DE LITERATURA .....	17
2.1 A utilização de <i>Plectranthus neochilus</i> na medicina popular .....	17
2.2 O metabolismo secundário das plantas .....	18
2.2.1 Compostos fenólicos .....	20
2.2.1.1 Ácidos fenólicos.....	21
2.3 Cromatografia Líquida de Alta Aficiência (CLAE) .....	24
2.4 Detecção Eletroquímica (ECD) .....	25
3 OBJETIVOS.....	27
3.1 Objetivo Geral.....	27
3.2 Objetivos Específicos.....	27
4 ARTIGO CIENTÍFICO .....	28
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	51
REFERÊNCIAS.....	52
ANEXOS .....	57
ANEXO 1 – Normas para submissão de artigos Revista Chemosphere.....	57

## 1 INTRODUÇÃO

A utilização de plantas medicinais pela população, para alívio dos sintomas, prevenção, tratamento ou cura de doenças, é uma prática disseminada ao longo das gerações (PINTO *et al.*, 2006; VENDRUSCOLO & MENTZ, 2006; MEYER *et al.*, 2012), conhecimento propagado principalmente pelos idosos, o acesso a livros e indicações de parentes e amigos, também são formas de alastrar essa tradição popular (PINTO *et al.*, 2006; MEYER *et al.*, 2012).

A parte mais utilizada da planta na medicina popular, é a folha (VENDRUSCOLO & MENTZ, 2006; MEYER *et al.*, 2012). Esse aspecto, em relação à flora, favorece a preservação dos recursos vegetais, visto que, não atrapalha o desenvolvimento e a reprodução da planta, se a retirada não for excessiva (MEYER *et al.*, 2012). São vários os modos de preparo das folhas de plantas medicinais pela população: garrafada (combinações de plantas medicinais em bebidas alcoólicas), banho (folhas imersas em água para enxague corporal), *in natura*, massagem (corporal), xarope (mistura de planta, água e açúcar) e decocção ou infusão, sendo este último, o mais utilizado (MEYER *et al.*, 2012).

Dentre a vasta gama de plantas medicinais, destacamos a *Plectranthus neochilus* Schlechter, popularmente conhecida como “boldo japonês”, “boldo rasteiro”, “boldo miúdo”, “boldo gambá” e “boldo pequeno” (ROSAL *et al.*, 2009; LIMA *et al.*, 2017). As causas mais citadas pela população para utilização de *Plectranthus neochilus*, são para o tratamento de “doenças, sintomas e sinais relativos ao aparelho digestivo e abdome”, também apontadas como “dor de estômago”, “má digestão” e “problema do estômago” (VENDRUSCOLO & MENTZ, 2006; MEYER *et al.*, 2012). A utilização popular das folhas de *P. neochilus* (assim como as demais variações de plantas medicinais) deve-se, provavelmente, a propriedades dos compostos presentes na folha que auxiliam na melhora desejada para a saúde (MEYER *et al.*, 2012). Compostos estes, provindos do metabolismo secundário das plantas.

As plantas, de maneira geral, podem ter basicamente duas divisões quanto ao seu metabolismo: primário e secundário. O primário é referente aos processos metabólicos com função essencial no vegetal – exemplo: fotossíntese (GARCÍA & CARRIL, 2009; PERES, 2009). Enquanto o secundário, origina compostos específicos e característicos de acordo com cada vegetal – os produtos secundários

possuem ação protetora em relação a interações bióticas e estresses abióticos. Quatro grandes grupos fazem parte dos metabólitos secundários: terpenos, compostos fenólicos, glicosídeos e alcaloides (GARCÍA & CARRIL, 2009). Dentre estas classes, os compostos fenólicos são essenciais para o crescimento e reprodução das plantas e encontrados em abundância na natureza (ANGELO & JORGE, 2007; GARCÍA & CARRIL, 2009). Dentro da classe dos compostos fenólicos, existe os ácidos fenólicos, que em virtude de sua estrutura química, conferem propriedades antioxidantes para os vegetais, sendo também mais comuns (ANGELO & JORGE, 2007; SOUSA, 2007). As características químicas desses compostos desempenham um papel importante na neutralização ou sequestro de radicais livres e quelação de metais de transição, agindo tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo (SOUSA, 2007). O termo radical livre refere-se a um átomo ou molécula extremamente reativa (FERREIRA & MATSUBARA, 1997; CANUTO *et al.*, 2010). Esta reatividade se deve ao número ímpar de elétrons, em sua última camada eletrônica. Porém, radical livre não é o termo ideal para descrever os agentes reativos patológicos, pois alguns deles não apresentam elétrons desemparelhados em sua última camada, sendo mais adequado o termo “espécies reativas do metabolismo do oxigênio” (ERO). Embora as ERO possam ser mediadoras de doenças, sua formação nem sempre é prejudicial à saúde (FERREIRA & MATSUBARA, 1997). Contudo, se houver estímulo exagerado na produção dessas espécies, e a ele estiver associada uma falha da defesa antioxidante, poderão ocorrer diversas consequências bruscas para o organismo humano, como mutações, envelhecimento, câncer, doenças autoimunes, entre outras.

Os seres vivos desenvolveram um complexo sistema de defesa antioxidantes para combater espécies reativas. Este sistema envolve enzimas de defesa antioxidante e os compostos não-enzimáticos (FERREIRA & MATSUBARA, 1997; SOUSA, 2007; CANUTO *et al.*, 2010; SILVA *et al.*, 2010). Diversas funções e mecanismos importantes dos compostos fenólicos no organismo humano vem sendo destacados em pesquisas, os quais não estão relacionados somente a sua atividade antioxidante direta, mas também a habilidade destas substâncias de se ligarem a proteínas (SILVA *et al.*, 2010). Desta forma, somando-se aos efeitos protetores em organismo humano, ingerir estes antioxidantes é de relevante importância (FERREIRA & MATSUBARA, 1997).

Incluir uma fase de preparo de amostra é de suma importância, devido às baixas concentrações que se encontram ácidos fenólicos nas folhas da planta. Uma das ferramentas mais empregadas para extração e/ou pré-concentração de analitos presentes em matrizes complexas é a Extração em Fase Sólida (SPE, do inglês *Solid Phase Extration*), este tipo de extração permite a concentração do analito e eliminação máxima dos interferentes, além de diminuir o tempo de análise, o consumo de solventes, não formar emulsões, promover o enriquecimento de traços e apresentar alto potencial para automatização. (QUEIROZ *et al.*, 2001; NETO & SIQUEIRA, 2005; SILVA, 2012).

Os ácidos fenólicos são ácidos orgânicos eletroativos e devido à esta característica, podem ser separados e detectados através de Detector Eletroquímico acoplado à Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, pois não se torna necessária a derivatização da amostra para a análise desses compostos (SEDENHO, 2016).

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) ou *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC), é uma técnica utilizada para separação de compostos fenólicos, muito adequada, pois, tem a capacidade de realizar separações e análises quantitativas de um vasto grupo de compostos presentes em vários tipos de amostras, em curta escala de tempo, com alta resolução, eficiência e sensibilidade (ANGELO & JORGE, 2007). Devido ao caráter antioxidante dos ácidos fenólicos, podemos utilizar para detectar, quantificar e identificar sua presença, o Detector por Arranjo de Diodos (DAD) ou o Detector Eletroquímico (do inglês *Eletrochemical Detector – ECD*) para CLAE. Dentre os detectores possíveis para utilização em CLAE, o eletroquímico se destaca, pois este detector possui uma alta seletividade, detecta somente as espécies que se oxidam ou reduzem, em um potencial inferior ou igual ao fixado, é altamente sensível e muito bom para análises de traços (LIANG *et al.*, 2009).



## 2 CONCEITOS GERAIS E REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 A utilização de *Plectranthus neochilus* na medicina popular

A *Plectranthus neochilus* Schlechter é uma planta herbácea da família Lamiaceae, perene ou por vezes anual, ramificada e densa, prostrada e ereta, mede de 0,12 m a 0,5 m de altura, possui aroma intenso, folhas carnosas e opostas (Fig. 1), sua inflorescência é racemosa e de coloração violeta, suas raízes são tuberosas e é popularmente conhecida pelos nomes de “boldo japonês”, “boldo rasteiro”, “boldo miúdo”, “boldo gambá” e “boldo pequeno” (ROSAL *et al.*, 2009; VIANA, 2011; LIMA *et al.*, 2017).

Figura 1 – *Plectranthus neochilus* Schlechter.



Fonte: do autor.

Devido às atividades biológicas, as plantas do gênero *Plectranthus* são utilizadas na medicina tradicional para variados fins como dores de cabeça, queimaduras, alergias, entre outros (VIANA, 2011).

A utilização de plantas medicinais pela população, para alívio dos sintomas, prevenção, tratamento ou cura de doenças, é uma prática disseminada ao longo das

gerações (PINTO *et al.*, 2006; VENDRUSCOLO & MENTZ, 2006; MEYER *et al.*, 2012). A *P. neochilus* é popularmente empregada para o tratamento de “doenças, sintomas e sinais relativos ao aparelho digestivo e abdome”, também apontadas como “dor de estômago”, “má digestão” e “problemas do estômago” (PINTO *et al.*, 2006; VENDRUSCOLO & MENTZ, 2006; MEYER *et al.*, 2012), ou seja, os compostos bioativos da planta são potenciais medicamentos para insuficiência hepática e dispepsia (VIANA, 2011). A parte da *P. neochilus* mais utilizada são as folhas, pois, assim como as demais variações de plantas medicinais, é o local no vegetal onde estão mais presentes os compostos cujas propriedades auxiliam na melhora desejada para a saúde (MEYER *et al.*, 2012). Além disso, utilizar as folhas ao invés de outras partes da planta favorece a preservação dos recursos vegetais, visto que, não atrapalha o seu desenvolvimento e a sua reprodução, se a retirada não for excessiva (MEYER *et al.*, 2012).

As folhas de plantas medicinais são frequentemente preparadas para ingestão em forma chá, através de infusão. Também existem outras formas de aproveitamento das folhas: garrafada (combinação de plantas medicinais veiculadas em bebida alcoólica), banho (imersão das folhas em água morna, para enxágue corporal), *in natura* (consumo das folhas frescas), massagem (esfoliação corporal a partir de folhas secas), xarope, decocção (MEYER *et al.*, 2012).

## **2.2 O metabolismo secundário das plantas**

O metabolismo é constituído pelo conjunto de reações químicas que ocorrem em um organismo. O metabolismo primário das plantas ocorre onde maior parte do carbono, nitrogênio e energia é transformada em moléculas comuns a todas as células, necessárias para seu funcionamento e dos organismos, como, aminoácidos, nucleotídeos, açúcares e lipídios (GARCÍA & CARRIL, 2009).

Diferente de outros organismos, as plantas sintetizam uma ampla variedade de moléculas orgânicas a partir de uma quantidade significativa de carbono assimilado e energia, estas moléculas sintetizadas não têm uma função direta em processos fotossintéticos, respiratórios, assimilação de nutrientes, entre outros (GARCÍA & CARRIL, 2009). São denominados metabólitos secundários ou produtos secundários, também chamados de produtos naturais.

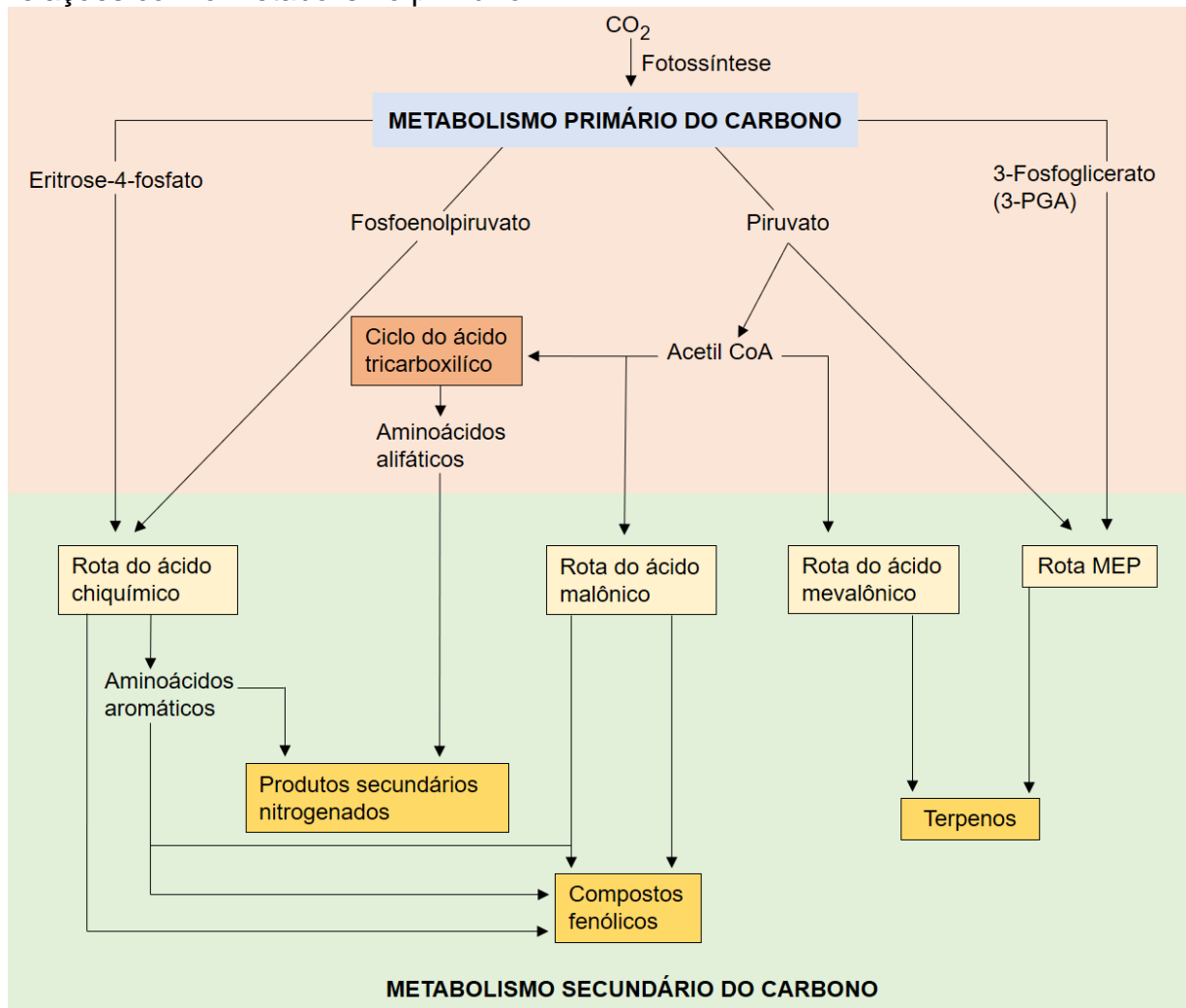
Além de os metabólitos secundários não apresentarem funções definidas nos processos mencionados, não se encontram em todos os grupos de plantas e são sintetizados em pequenas quantidades, restringida a um determinado gênero de plantas, família ou espécies (GARCÍA & CARRIL, 2009).

Algumas das funções dos metabólitos secundários são específicas e possuem funções de extrema importância no vegetal, como atrair ou repelir animais (GARCÍA & CARRIL, 2009; TAIZ & ZEIGER, 2009). Muitos são pigmentos que proporcionam cores a flores e frutos, que são fundamentais para atrair insetos polinizadores, para que ocorra a reprodução, ou animais que aproveitarão os frutos como fonte de alimento, contribuindo assim, na dispersão de sementes. A função protetora de repelir predadores proporciona à planta sabores amargos, fazendo-as indigestas ou venenosas, também atuam como pesticidas naturais, agem contra infecções por organismos patogênicos e como agente na competição planta-planta e nas simbioses plantas-organismos (GARCÍA & CARRIL, 2009; TAIZ & ZEIGER, 2009). A sobrevivência das plantas e suas relações ecológicas são, portanto, profundamente afetadas pelas funções dos seus metabólitos secundários (TAIZ & ZEIGER, 2009).

Na agricultura o metabolismo secundário também possui relevância, por exemplo, os compostos responsáveis por aumentar o desempenho reprodutivo das plantas, quando atuam na defesa contra organismos como fungos, bactérias ou herbívoros, podem torná-las indesejáveis para o consumo na dieta humana. Nessa perspectiva, algumas plantas têm sido cultivadas e selecionadas artificialmente para que sejam produzidos níveis relativamente baixos desses compostos (TAIZ & ZEIGER, 2009).

O metabolismo primário do carbono é precursor para as rotas de biossíntese de metabólitos secundários (Fig. 2) (GARCÍA & CARRIL, 2009), que também são chamados de produtos naturais e possuem um significativo valor medicinal e econômico, sendo amplamente utilizados na indústria cosmética, alimentícia e farmacêutica. Uma grande parte destes produtos naturais eram utilizados na medicina antiga como remédios para alívio dos sintomas, prevenção, tratamento ou cura de doenças e se utilizam na atualidade como medicamentos, resinas, gomas, intensificadores de sabor, aromas, corantes, dentre outros (PINTO *et al.*, 2006; VENDRUSCOLO & MENTZ, 2006; GARCÍA & CARRIL, 2009; MEYER *et al.*, 2012).

Figura 2 – Principais rotas de biossíntese de metabólitos secundários e suas inter-relações com o metabolismo primário.



Fonte: Taiz & Zeiger (2009, p. 346)

Quatro grandes grupos fazem parte dos metabólitos secundários das plantas, são eles: os terpenos, encontram-se em hormônios, pigmentos e óleos essenciais; os glicosídeos, que compreendem as saponinas, glicosídeos cardíacos, glicosídeos cianogênicos e glucosinolatos; os alcaloides, que tem função de defesa contra insetos e animais predadores; os compostos fenólicos, que compreendem as cumarinas, flavonoides, ácidos fenólicos, ligninas e taninos (GARCÍA & CARRIL, 2009).

### 2.2.1 Compostos Fenólicos

Os compostos fenólicos são produtos do metabolismo secundário das plantas, basicamente, estruturas químicas que contém um grupamento hidroxila ligado a um anel aromático. Sua estrutura possui ampla variedade de conformações, que vai

desde moléculas simples como ácidos fenólicos, até polímeros complexos como taninos e ligninas (GARCÍA & CARRIL, 2009; ARAÚJO, 2011). Estão naturalmente presentes em cereais, hortaliças, frutas, chá, ervas, chocolate, café e vinho. (ARAÚJO, 2011.)

Existem cerca de oito mil tipos de compostos fenólicos descritos, classificados em fenóis simples, fenóis ácidos, cumarinas, flavonoides, estibenos, taninos e ligninas. (ARAÚJO, 2011).

Os fenóis ácidos constituem a principal classe de compostos fenólicos consumidos em nossa dieta, estimados em um terço (0,025 g a 1 g/dia) do total da ingestão desses compostos. (ARAÚJO, 2011).

### **2.2.1.1 Ácidos Fenólicos**

Os ácidos fenólicos são compostos de função fenol que contém grupo funcional carboxila, sendo subdivididos em duas classes: derivados do ácido benzoico e do ácido cinâmico. Os ácidos hidrocinâmicos são mais comuns que os hidrogenbenzoicos, sendo o p-cumárico, cafeíco, ferúlico e sináptico os mais frequentes presentes em alimentos e bebidas de origem vegetal, como o café, erva mate, frutas, entre outros. Os ácidos hidroxibenzoicos são componentes das complexas estruturas dos taninos hidrolisáveis e menos abundantes nos vegetais de consumo humano, como os ácidos gálico, p-hidroxibenzoico, protocatecuico, vanílico e siríngico (ANGELO & JORGE, 2007; GARCÍA & CARRIL, 2009; ARAÚJO, 2011).

Para a biossíntese de compostos fenólicos existem duas rotas básicas: a do ácido chiquímico e a do ácido malônico (Fig. 2) (GARCÍA & CARRIL, 2009; TAIZ & ZEIGER, 2009). Esta última é uma fonte importante de fenóis em fungos e bactérias, porém pouco empregada em plantas superiores (TAIZ & ZEIGER, 2009).

A rota do ácido chiquímico é responsável pela maioria dos ácidos fenólicos nas plantas. Esta rota está presente em plantas, fungos e bactérias, mas não em animais. A série de reações até a formação do ácido chiquímico e seus derivados (fenilalanina, triptofano e tirosina), acontece a partir da metabolização da eritrose-4-fosfato e do ácido fosfoenolpirúvico (TAIZ & ZEIGER, 2009; ARAÚJO, 2011).

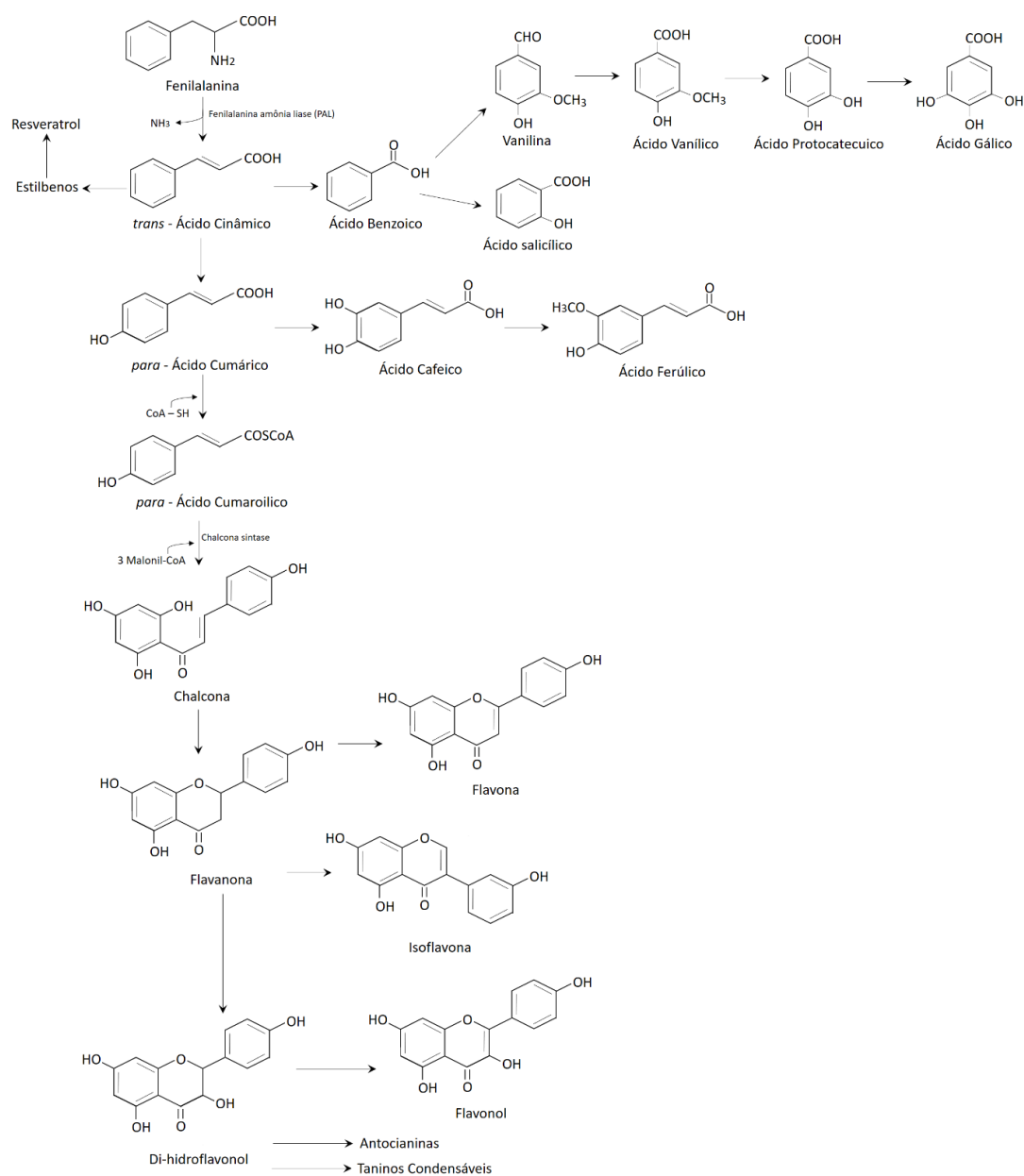
A maioria dos compostos fenólicos derivam da fenilalanina, esta, junto com o triptofano fazem parte dos aminoácidos essenciais para os animais, que são incorporados na dieta (ARAÚJO, 2011).

As classes de compostos fenólicos derivadas da fenilalanina são sintetizadas por meio de eliminação de uma molécula de amônia, que origina o ácido cinâmico (Fig. 3). Esta reação é catalisada pela enzima fenilalanina amônio liase (PAL, *phenylalanine ammonia lyase*) (GARCÍA & CARRIL, 2009). Esta enzima está situada em um ponto de ramificação entre o metabolismo primário e secundário da planta, é uma importante etapa reguladora na formação de muitos compostos fenólicos e as demais reações catalisadas posteriores a PAL são fundamentalmente adições de grupos hidroxilas (TAIZ & ZEIGER, 2009; ARAÚJO, 2011).

Os ácidos ferúlico e cafeico são formados a partir da metabolização dos ácidos trans-cinâmico e p-cumárico, cuja função principal é atuarem como precursores de derivados complexos como cumarinas, lignina, taninos, flavonoides e isoflavonas (GARCÍA & CARRIL, 2009). Os fenilpropanoides são ácidos fenólicos que incluem os ácidos cinâmico e cumárico e seus derivados, contêm em sua estrutura um anel benzeno (C6) e uma cadeia lateral de três carbonos (C3) (GARCÍA & CARRIL, 2009).

Os ácidos fenólicos derivados do ácido benzoico possuem estrutura formada por fenilpropanoides que perderam um fragmento dos carbonos da cadeia lateral, sendo a vanilina e o ácido salicílico exemplos destes derivados, que atuam como reguladores do crescimento vegetal, agindo na resistência da planta frente à patógenos. (GARCÍA & CARRIL, 2009; TAIZ & ZEIGER, 2009).

Figura 3 – Esquema da biossíntese de compostos fenólicos a partir da fenilalanina.



Fonte: Taiz & Zeiger (2009, p. 351) – adaptado.

A atividade enzimática da fenilalanina amônia liase (PAL) é regulada de maneira complexa em muitas espécies vegetais, pela existência de genes múltiplos que codificam essa enzima, sendo expressos apenas em tecidos específicos ou sob certas condições ambientais. Existem fatores que aumentam a atividade da PAL, como por exemplo: iluminação, infecção por fungos e baixos níveis de nutrientes (TAIZ & ZEIGER, 2009).

Os fatores que podem influenciar na produção de metabólitos secundários das plantas e por consequência na qualidade e valor terapêutico das mesmas, são:

sazonalidade, ritmo circadiano, desenvolvimento, temperatura, disponibilidade hídrica, radiação ultravioleta, nutrientes, altitude local, poluição atmosférica, indução por estímulos mecânicos ou ataque de patógenos (GOBBO-NETO & LOPES, 2006; ANGELO & JORGE, 2007; RAMBORGGER, 2017).

Os ácidos gálico, protocatecuico, vanílico, p-cumárico, ferúlico e cafeico possuem características bem definidas quanto à sua fórmula molecular e massa molar (Tab. 1).

Tabela 1 – Características físico-químicas dos seis ácidos fenólicos.

Ácido Fenólico	Fórmula Molecular	Nomenclatura Sinônima	Massa Molar (g mol <sup>-1</sup> )	Ponto/intervalo de fusão
Ácido Gálico	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>5</sub>	Ácido 3,4,5-trihidroxibenzoico	170,12	251°C – dec.
Ácido Protocatecuico	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub>	Ácido 3,4-dihidroxibenzoico	154,12	200 – 202°C
Ácido Vanílico	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>	Ácido 4-hidroxi-3-metoxibenzoico	168,15	208 – 211°C
Ácido p-Cumárico	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	Ácido 4-hidroxicinâmico	164,16	214°C – dec.
Ácido Ferúlico	C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>	Ácido 4-hidroxi-3-metoxicinâmico	194,18	168 – 172°C – lit.
Ácido Cafeico	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>	Ácido 3,4-dihidroxicinâmico	180,16	211 – 213°C – dec.

Fonte: Sigma-Aldrich.

### 2.3 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Os ácidos fenólicos são ácidos orgânicos eletroativos que devido à esta característica, podem ser separados e detectados através de Detector Eletroquímico acoplado à Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, pois não se torna necessária a derivatização da amostra para a análise desses compostos (SEDENHO, 2016).

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) ou mesmo é uma técnica físico-química de separação, utilizada para análises qualitativas e quantitativas de um vasto grupo de compostos presentes em diferentes tipos de amostras (ANGELO & JORGE, 2007; SEDENHO, 2016).

A separação de compostos de uma mistura por CLAE está baseada na migração diferencial dos analitos de acordo com interações específicas entre duas fases imiscíveis, denominadas fase móvel e estacionária (SEDENHO, 2016).

Esta técnica tem sido amplamente utilizada por apresentar características vantajosas atribuídas à alta pressão da fase móvel, as quais possibilitam a separação de misturas complexas, além de análises qualitativas e quantitativas (SEDENHO,



2016). Dentre as vantagens analíticas da CLAE estão: tempo reduzido, alta resolução, eficiência e sensibilidade (ANGELO & JORGE, 2007; SEDENHO, 2016). Além do que, “os métodos cromatográficos se destacam na análise de ácidos orgânicos por possibilitarem a separação, identificação e a quantificação destes” (SEDENHO, 2016).

Para a identificação de ácidos fenólicos presentes em uma amostra, os detectores utilizados em CLAE são o Detector por Arranjo de Diodos (DAD) e o Detector Eletroquímico (ECD – do inglês *Electrochemical Detector*). O ECD é amplamente utilizado para este tipo de análise, pois possui alta seletividade e apenas detecta compostos iônicos ou capazes de serem reduzidos ou oxidados diante da aplicação de um determinado potencial elétrico (LIANG *et al.*, 2009; SEDENHO, 2016).

## 2.4 Detecção Eletroquímica (ECD)

Os detectores eletroquímicos são todos aqueles que medem a capacidade que um composto possui de se oxidar ou reduzir na aplicação de um potencial elétrico (SEDENHO, 2016). Existem diversos tipos de detectores eletroquímicos, como por exemplo, o voltamétrico, condutimétrico, potenciométrico e o amperométrico. Este último, possui maior destaque em diversos trabalhos (SEDENHO, 2016).

O detector amperométrico é um dos mais importantes entre os eletroquímicos e sua detecção consiste no monitoramento de uma reação sofrida pelo analito na superfície de um eletrodo. Essa característica diferencia a detecção eletroquímica das demais técnicas de detecção que são baseadas nas propriedades físicas do analito, como por exemplo, a espectrometria de massa, através da massa molar e a detecção de absorvância, através da absorvidade molar. (ANTEC, 2015; SILVA, 2017).

Na detecção eletroquímica é aplicado um potencial determinado entre os eletrodos de referência e de trabalho, o analito eletroquimicamente ativo sofrerá oxidação ou redução e esta reatividade molecular será determinada no eletrodo de trabalho. A diferença de potencial fornece o nível ideal de energia para iniciar ou aumentar a reação eletroquímica (ANTEC, 2015). Esta técnica de detecção é aplicada especialmente nas áreas de alimentos, bebidas, neurociência, análises clínicas, bioenergia, meio ambiente e nas áreas farmacêuticas (SILVA, 2017).

A ECD possui alta seletividade, pois detecta somente as espécies que se oxidam ou reduzem, em um potencial inferior ou igual ao fixado, é altamente sensível

para espécies eletroativas e muito boa para análises de traços (LIANG *et al.*, 2009), permite a detecção de uma grande variedade de compostos quimicamente ativos e é vantajosa quando comparada com outros tipos de detectores que podem ser utilizados em CLAE, pois apresentam uma alta especificidade, boa relação sinal/ruído e configuração simplificada (SEDENHO, 2016; SILVA, 2017).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral

Avaliar a concentração de ácidos fenólicos em amostras de *Plectranthus neochilus* sob diferentes condições ambientais, através de metodologia própria para CLAE-ECD.

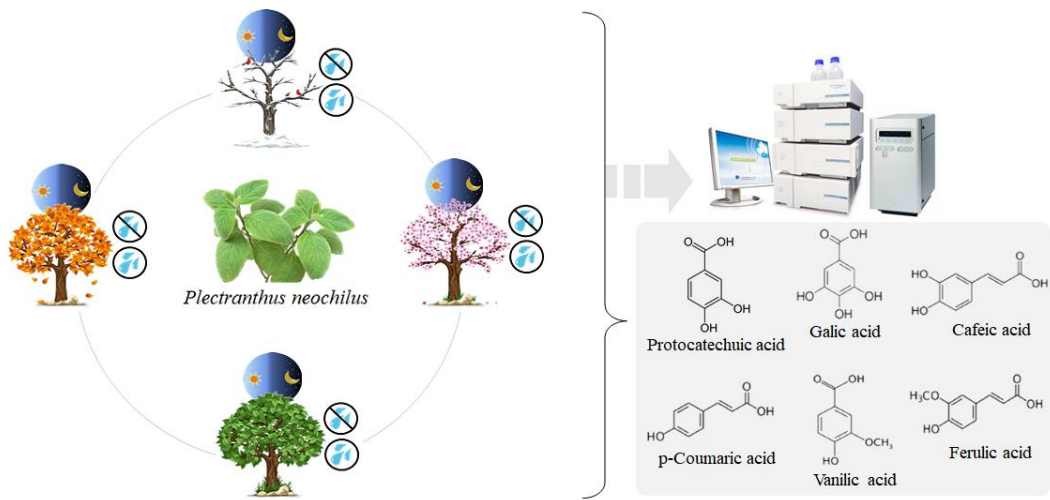
#### 3.2 Objetivos Específicos

- Desenvolver e validar metodologia de detecção simultânea de seis ácidos fenólicos por CLAE-ECD;
- Otimizar o processo de extração por SPE de compostos fenólicos;
- Quantificar e avaliar a concentração de ácidos fenólicos (gálico, protocatecuico, vanílico, cafeico, p-cumárico, ferúlico) nas folhas de *P. neochilus* em diferentes estações do ano, horas do dia, mediante disponibilidade e restrição hídrica.

#### 4 ARTIGO CIENTÍFICO

Os resultados referentes a esta dissertação estão apresentados sob o modelo de artigo científico e neste, presentes as seções de *Materiais e Métodos*, *Resultados e Discussão* e *Referências Bibliográficas*. O manuscrito está apresentado conforme submetido à Revista ***Chemosphere***.

## Resumo gráfico



**Quantificação de ácidos fenólicos em chás de *Plectranthus neochilus* por cromatografia líquida de alta eficiência com detector eletroquímico**

Andressa Rossini Goulart<sup>1</sup>, Bruna Piaia Ramborger<sup>1</sup>, Lisiane de Oliveira<sup>1</sup>, Murilo Ricardo Sigal Carriço<sup>1</sup>, Daniela Teixeira Rodrigues<sup>1</sup>, Elton Luis Gasparotto Denardin<sup>2</sup>, Rafael Roehrs<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Grupo Interdisciplinar de Pesquisa em Práticas de Ensino (GIPPE), *campus* Uruguaiana, Federal University of Pampa, CEP 97501-970, Uruguaiana, RS, Brazil.

<sup>2</sup>Laboratório de Estudos Físico-Químicos e Produtos Naturais (LEFQPN), *campus* Uruguaiana, Federal University of Pampa, CEP 97501-970, Uruguaiana, RS, Brazil.

**\*Autor correspondente**

Prof. Dr. Rafael Roehrs

Endereço eletrônico: rafael.roehrs@gmail.com

Tel: +5555999524367

## Resumo

A *Plectranthus neochilus* Schlechter é uma planta utilizada pela medicina popular para cura e/ou tratamento de doenças, sintomas e sinais relativos ao aparelho digestivo e abdômen e também é conhecida pelos nomes de “boldo miúdo”, “boldo gambá”, “boldo rasteiro”, entre outros. Possui nas folhas maior quantidade de compostos bioativos com características farmacológicas, dentre eles os ácidos fenólicos provenientes do metabolismo secundário: ácidos gálico, protocatecuico, vanílico, p-cumárico, cafeico e ferúlico. Diversos fatores alteram a produção de metabólitos secundários das plantas e por consequência a qualidade e valor terapêutico das mesmas, como por exemplo ritmo circadiano, desenvolvimento, temperatura, disponibilidade hídrica, dentre outros. Em virtude disto, foi avaliada a concentração dos seis ácidos fenólicos mencionados, em amostras de *Plectranthus neochilus* sob diferentes condições ambientais, através de metodologia própria para HPLC-ECD, onde foi possível averiguar que diferentes condições de cultivo e colheita afetaram a síntese de metabólitos secundários da planta medicinal estudada, de acordo com suas características metabólicas.

**Palavras-chave:** HPLC-ECD, *Plectranthus neochilus*, ácidos fenólicos, condições ambientais.

## 1. Introdução

A *Plectranthus neochilus* Schlechter é uma planta herbácea da família Lamiaceae, perene, ramificada e densa, possui aroma intenso, com flores de coloração azuis e roxas, folhas carnosas e opostas e é popularmente conhecida pelos nomes de “boldo japonês”, “boldo rasteiro”, “boldo miúdo”, “boldo gambá” e “boldo pequeno” (Rosal et al., 2009; Viana, 2011; Lima et al., 2017). Devido às atividades biológicas, as plantas do gênero *Plectranthus* são utilizadas na medicina tradicional para variados fins como dores de cabeça, queimaduras, alergias, entre outras aplicações (Viana, 2011).

A *P. neochilus* é popularmente empregada para o tratamento de “doenças, sintomas e sinais relativos ao aparelho digestivo e abdômen”, também apontadas como “dor de estômago”, “má

digestão” e “problemas do estômago” (Pinto et al., 2006; Vendruscolo e Mentz, 2006; Meyer et al., 2012), ou seja, os compostos bioativos da planta são potenciais medicamentos para insuficiência hepática e dispepsia (Viana, 2011). A parte da *P. neochilus* mais utilizada são as folhas, pois, assim como as demais variações de plantas medicinais, é o local no vegetal onde estão mais presentes os compostos cujas propriedades auxiliam na melhora desejada para a saúde (Meyer et al., 2012). Sendo o preparo das folhas, mais utilizado pela população, em forma de chá, através de infusão.

Os compostos bioativos das plantas com características farmacológicas para os seres humanos provêm do metabolismo secundário dos vegetais, estas substâncias possuem diversas finalidades e características de acordo com tipo e necessidade de cada planta (García e Carril, 2009). O metabolismo é constituído pelo conjunto de reações químicas que ocorrem em um organismo. O metabolismo primário das plantas ocorre onde maior parte do carbono, nitrogênio e energia é transformada em moléculas comuns a todas as células, necessárias para seu funcionamento e dos organismos, como, aminoácidos, nucleotídeos, açúcares e lipídios (García e Carril, 2009). Diferente de outros organismos, as plantas sintetizam uma ampla variedade de moléculas orgânicas a partir de uma quantidade significativa de carbono assimilado e fotossintéticos, respiratórios, assimilação de nutrientes, entre outros (García e Carril, 2009; Yang et al., 2012). São denominados metabólitos secundários ou produtos secundários. O metabolismo primário do carbono é precursor para as rotas de biossíntese de metabólitos secundários (García e Carril, 2009), que também são chamados de produtos naturais e possuem um significativo valor medicinal e econômico, sendo amplamente utilizados na indústria cosmética, alimentícia e farmacêutica. Uma grande parte destes produtos naturais eram utilizados na medicina antiga como remédios para alívio dos sintomas, prevenção, tratamento ou cura de doenças e se utilizam na atualidade como medicamentos, resinas, gomas,



intensificadores de sabor, aromas, corantes, dentre outros (Pinto et al., 2006; Vendruscolo e Mentz, 2006; García e Carril, 2009; Meyer et al., 2012).

Quatro grandes grupos fazem parte dos metabólitos secundários das plantas, são eles: os terpenos, encontram-se em hormônios, pigmentos e óleos essenciais; os glicosídeos, que compreendem as saponinas, glicosídeos cardíacos, glicosídeos cianogênicos e glucosinolatos; os alcaloides, que tem função de defesa contra insetos e animais predadores; os compostos fenólicos, que compreendem as cumarinas, flavonoides, ácidos fenólicos, ligninas e taninos (Jiménez et al., 2003; García e Carril, 2009). A estrutura química dos compostos fenólicos é basicamente um grupamento hidroxila ligado a um anel aromático. Sua estrutura possui ampla variedade de conformações, que vai desde moléculas simples como ácidos fenólicos, até polímeros complexos como taninos e ligninas. (García e Carril, 2009; Araújo, 2011). Os ácidos hidroxibenzoicos são componentes das complexas estruturas dos taninos hidrolisáveis e menos abundantes nos vegetais de consumo humano (García e Carril, 2009; Araújo, 2011). Existem diversos fatores que alteram a produção de metabólitos secundários das plantas e por consequência a qualidade e valor terapêutico das mesmas, são eles: sazonalidade, ritmo circadiano, desenvolvimento, temperatura, disponibilidade hídrica, radiação ultravioleta, nutrientes, altitude, poluição atmosférica, indução por estímulos mecânicos ou ataque de patógenos. (Angelo e Jorge, 2007; Gobbo-neto e Lopes, 2007; Ramborger et al., 2017).

Os ácidos fenólicos são ácidos orgânicos eletroativos que devido à esta característica, podem ser separados e detectados através de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) com Detector eletroquímico (ECD) acoplado ao sistema, pois não se torna necessária a derivatização da amostra para a análise desses compostos (Sedenho, 2016).

A técnica de HPLC tem sido altamente utilizada por apresentar características vantajosas atribuídas à alta pressão da fase móvel, as quais possibilitam a separação de misturas complexas, além de análises qualitativas e quantitativas (Sedenho, 2016). Dentre as vantagens

da HPLC estão: tempo reduzido, alta resolução, eficiência e sensibilidade (Angelo e Jorge, 2007; Sedenho, 2016). Além do que, “os métodos cromatográficos se destacam na análise de ácidos orgânicos por possibilitarem a separação, identificação e a quantificação destes” (Sedenho, 2016).

Para a identificação de ácidos fenólicos presentes em uma amostra, os detectores utilizados em HPLC são o detector de arranjo de diodos (DAD) e o detector eletroquímico (ECD). O ECD é amplamente utilizado para este tipo de análise, pois possui alta seletividade e apenas detecta compostos iônicos ou capazes de serem reduzidos ou oxidados diante da aplicação de um determinado potencial elétrico (Liang et al., 2009; Sedenho, 2016).

O ECD possui alta seletividade, pois detecta somente as espécies que se oxidam ou reduzem, em um potencial inferior ou igual ao fixado, é altamente sensível para espécies eletroativas e muito boa para análises de traços (Liang et al., 2009), permite a detecção de uma grande variedade de compostos quimicamente ativos e é vantajosa quando comparada com outros tipos de detectores que podem ser utilizados em HPLC, pois apresentam uma alta especificidade, boa relação sinal/ruído e configuração simplificada (Sedenho, 2016; Silva, 2017).

De acordo com isto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a concentração de seis ácidos fenólicos (ácidos cafeico, ferúlico, gálico, protocatecuico, p-cumárico, vanílico) em amostras de *Plectranthus neochilus* sob diferentes condições ambientais, através de metodologia própria para HPLC-ECD.

## **2. Materiais e Métodos**

### **2.1 Químicos e reagentes**

Ácido Acético Glacial P.A. pureza 99,7% (Alphatec, Brazil), methanol grau HPLC (T.J. Baker, Holand), Acetonitrila (T.J. Baker, Holand), água ultrapura adquirida através de sistema Milli-Q (Millipore, Estados Unidos da América).

### **2.2 Instrumentos**

Cartuchos para solid phase extraction Strata-X (Phenomenex, Estados Unidos da América), de fase reversa, sorbente polimérico, 33  $\mu\text{m}$  (500 mg/3 mL). Rotaevaporador Büchi R-210 (Marshall Scientific, Estados Unidos da América). Sistema cromatográfico de alta eficiência Young Lin (YL) 9100 (Anyang, Korea), equipado com vacuum degasser (YL9101), quaternary pump (YL9110), autosampler (YL9150) e detector eletroquímico Decade II (Antec Leyden, Estados Unidos da América). A programação do equipamento e a aquisição de dados foram obtidos através do software YL-Clarity Chromatograph Data System (2009).

### 2.3 SPE

Os cartuchos para SPE Strata-X foram condicionados com 6 mL de metanol grau HPLC, 6 mL de água ultrapura e 6 mL de água acidificada com solução de ácido fosfórico 1:1 pH 3, a amostra foi percolada e a etapa de clean-up realizada com 6 mL de água pH 3. Os analitos foram eluídos com 3 mL de metanol grau HPLC e 3 mL de acetonitrila. Esse procedimento foi realizado em Manifold para SPE acoplado em bomba à vácuo controlado. O volume final foi completamente evaporado em rotaevaporador, sob pressão de 30 mbar, com frequência de giro de 50 rpm, temperatura de 40°C e ao final o analito dissolvido em 1 mL de metanol grau HPLC.

### 2.4 HPLC-ECD

Para a separação simultânea dos seis ácidos fenólicos foram utilizadas duas fases móveis: (A) água ultrapure e ácido acético glacial 96:4 (v/v); (B) Metanol grau HPLC (Liang et al., 2009 – adaptado). Fase Estacionária: coluna HPLC Nucleosil 100-5, fase octadecil, end-capped, system ec, dimensões 250 x 4,6 mm, partícula 5  $\mu\text{m}$  (Macherey-Nagel, Alemanha). Na detecção eletroquímica a frequência foi ajustada para 10 Hz e a tensão de 1.0 V (Liang et al., 2009).

O método foi desenvolvido a partir da solução-mãe de concentração 100 mg L<sup>-1</sup> dos seis ácidos fenólicos (cafeico, ferúlico, gálico, protocatecuico, p-cumárico, vanílico), preparou-se uma solução de trabalho de concentração 10 mg L<sup>-1</sup> que foi levada à separação cromatográfica. Para

a curva analítica foram preparadas a partir da solução-mãe dos ácidos fenólicos, soluções com concentrações de 0.1; 0.25; 0.5; 0.75; 1.0; 2.5; 5.0; 7.5; 10.0 mg L<sup>-1</sup> e levadas à separação cromatográfica. A validação do método HPLC-ECD seguiu os critérios de seletividade, linearidade e faixa linear, precisão, limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ), exatidão. (Aragão et al., 2009).

## **2.5 Material Vegetal**

Os espécimes de *Plectranthus neochilus* Schltr. foram obtidas do herbário da Universidade Federal do Pampa, BR 472, Km 592, Uruguaiana/RS, Brazil. Identificadas e registradas pelo n.108/2016. As mudas do vegetal foram mantidas em água durante uma semana (7 dias) para promover o crescimento das raízes (Ramborger et al., 2017). Após o período de crescimento radicular, as plantas foram separadas em dois grupos: o grupo 1 destinado a receber ao final de cada semana uma quantidade de água suficiente para molhar o solo, sem encharcar, o grupo 2 privado de oferta hídrica. Ambos os grupos foram colocados em vasos individuais contendo solo de jardinagem adubado, sob luz natural indireta, em área externa de residência doméstica, protegidos das chuvas, porém suscetíveis à mudanças de temperatura e ação da umidade local.

## **2.6 Conjunto experimental**

Durante um mês (30 dias) até mudar a estação, as mudas de *P. neochilus* foram cultivadas em vasos individuais com terra de jardinagem, adubada, até o momento da colheita das folhas. Os grupos foram cultivados em triplicata. As plantas do grupo 1 receberam irrigação ao final de cada semana, em quantidade suficiente para molhar a terra sem encharcar, foram nomeadas de grupo “irrigado”. Foi utilizada água potável (da torneira) provinda do sistema municipal de abastecimento hídrico. As plantas do grupo 2 não foram irrigadas durante o cultivo nos vasos e receberam nome de grupo “não irrigado”.

As folhas colhidas tinham diferentes níveis de maturação e foram misturadas para garantir que o estágio de crescimento foliar não influenciasse nos resultados da síntese de ácidos fenólicos (Santos et al., 2011; Mediani et al., 2012).

A colheita das folhas de *P. neochilus* aconteceu nas datas: 21 de Junho (outono) – final do outono, começo do inverno, 21 de Setembro (inverno) – final do inverno, começo da primavera e 21 de Dezembro (primavera) – final da primavera, começo do verão de 2018 e 21 de Março (verão) – final do verão, começo do outono de 2019. Em dois horários: às 6:30 AM (antes do nascer do Sol) e às 8:30 PM (após o pôr do Sol). O material vegetal colhido às 6:30 AM corresponde ao metabolismo da planta após o período noturno, por isto designado “noite” e o material vegetal colhido às 8:30 PM, corresponde ao metabolismo da planta após o período diurno, este designado “dia”.

As amostras foram congeladas e no dia seguinte à colheita, levadas ao Laboratório de Estudos Físico-Químicos e Produtos Naturais da Universidade Federal do Pampa, Uruguaiana/RS, Brasil, para respectivo preparo e análise.

Para cada amostra foram pesadas em balança de precisão 9 g do material vegetal colhido e submetidos a infusão em 100 mL de água destilada, por 10 min, para mimetização do chá na medicina popular. Em seguida, o chá foi filtrado com filtro de papel em funil de Büchner e imediatamente realizada a Solid Phase Extraction (SPE) para eliminação máxima de interferentes e concentração dos analitos (Buszewski e Szultka, 2012). Realizada a SPE, o volume resultante foi levado ao rotaevaporador, em 50 rpm, sob pressão de 30 mbar, para evaporação total do solvente, à temperatura de 40°C. O analito foi diluído em 1 mL de metanol grau HPLC, filtrado em politetrafluoroetileno (PTFE) 0.22 µm e levado à separação em HPLC-ECD.

## 2.7 Análise estatística

O tratamento estatístico foi realizado através do software GraphpadPrism5®, com análise de variância (ANOVA) de duas vias e Bonferroni post hoc test ( $p < 0.01$ ).

## 3 Resultados e discussão

### 3.1 Método SPE

O percentual de recuperação para cada um dos seis ácidos fenólicos, utilizando o cartucho Strata-X para SPE, foi acima de 77% (Tabela 1). Os intervalos aceitáveis de recuperação para análise de resíduos geralmente estão entre 70 e 120%, porém de acordo com a complexidade analítica e da amostra, este valor pode ser de 50 a 120% (Ribani et al., 2004).

**Tabela 1** Percentual de recuperação e desvio padrão dos ácidos fenólicos para o cartucho Strata-X.

Phenolic Acids	Recovery Percentage (%)
<b>Gallic acid</b>	85.5±1.12
<b>Protocatechuic acid</b>	91.8±1.40
<b>Vanillic acid</b>	87.9±1.61
<b>Caffeic acid</b>	77.3±2.04
<b>p-Coumaric acid</b>	88.8±0.20
<b>Ferulic acid</b>	84±1.96

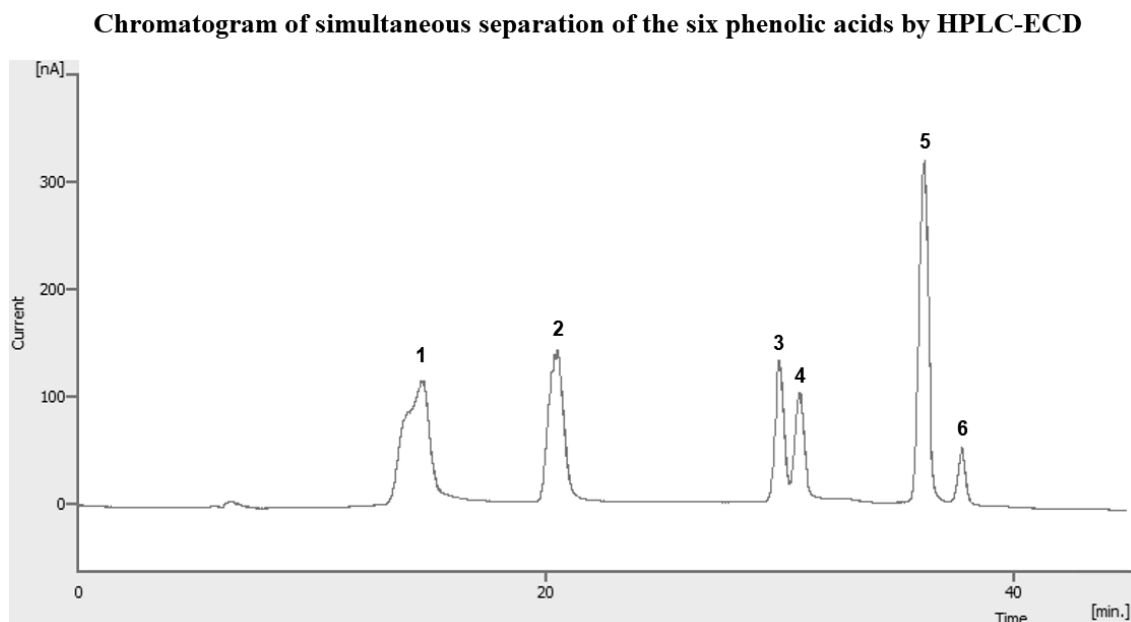
### 3.2 Validação do método HPLC-ECD

O tempo para a eluição dos seis ácidos fenólicos através de HPLC-ECD totalizou 45 minutos, utilizando gradiente de ácido acético 4% e metanol grau HPLC para a fase móvel, sendo reestabelecida nos últimos 5 minutos as condições cromatográficas iniciais (Tabela 2).

**Tabela 2** Especificações de eluição em gradiente para a separação simultânea dos seis ácidos fenólicos através de HPLC-ECD.

Time (min)	Acetic Acid 4% (%)	Methanol (%)	Flow (mL min <sup>-1</sup> )
Start	95	5	0.9
10	80	20	0.9
15	70	30	0.9
35	40	60	0.9
40	40	60	1.0
41	95	5	1.0
45	95	5	0.9

A separação simultânea dos ácidos gálico, protocatecuico, vanílico, p-cumárico, cafeico e ferúlico através de HPLC-ECD foi eficiente, cada composto teve um pico específico, em tempo de retenção próprio e bem definido (Fig. 1).



**Fig. 1** Cromatograma de separação simultânea dos ácidos fenólicos: (1) ácido gálico, (2) ácido protocatecuico, (3) ácido vanílico, (4) ácido cafeico, (5) ácido p-cumárico e (6) ácido ferúlico através do método de HPLC-ECD, relação corrente (nA) por tempo (min).

Os compostos que possuem característica química mais polar, eluem antes daqueles que são mais apolares, pois estes últimos, interagem com maior intensidade com a fase estacionária (apolar) (Olsen, 2001). As interações que ocorrem dos analitos com a fase estacionária utilizada neste trabalho, são do tipo hidrofóbicas (van der Waals), possuindo também ligeiras interações de silanol residual.

O nível de polaridade da fase móvel muda conforme a proporção de eluição utilizada entre o ácido acético e o metanol. Comparando as estruturas químicas, o ácido acético possui caráter mais polar, enquanto o metanol, característica mais apolar. Conforme o gradiente de eluição, a separação cromatográfica e a detecção eletroquímica dos ácidos fenólicos obedeceu uma ordem determinada.

De acordo com os resultados obtidos (Tabela 3), o coeficiente de determinação  $R^2$  para todos os ácidos fenólicos foi  $\geq 0.99$ , indicando qualidade da curva analítica, pois quanto mais próximo de 1.0, menor a dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor a incerteza dos coeficientes de regressão estimados (Ribani et al., 2004; Aragão et al., 2009). Os valores obtidos de desvio padrão relativo (RSD) foram de no máximo 5% para todos os ácidos fenólicos (Tabela 3), obedecendo o sugerido para determinação da faixa de aplicação, com um RSD entre as injeções inferior a 5% e de até 20% na análise da precisão (Ribani et al., 2004; Aragão et al., 2009). Os valores referentes ao limite de detecção (LOD) representam a menor concentração dos compostos que podem ser detectados, enquanto os valores do limite de quantificação (LOQ) representam a menor concentração de cada substância que pode ser medida (Ribani et al., 2004), respectivamente os valores obtidos para cada ácido fenólico foram  $\leq 0.0333$  para o LOD e  $\leq 0.1010$  para o LOQ (Tabela 3).

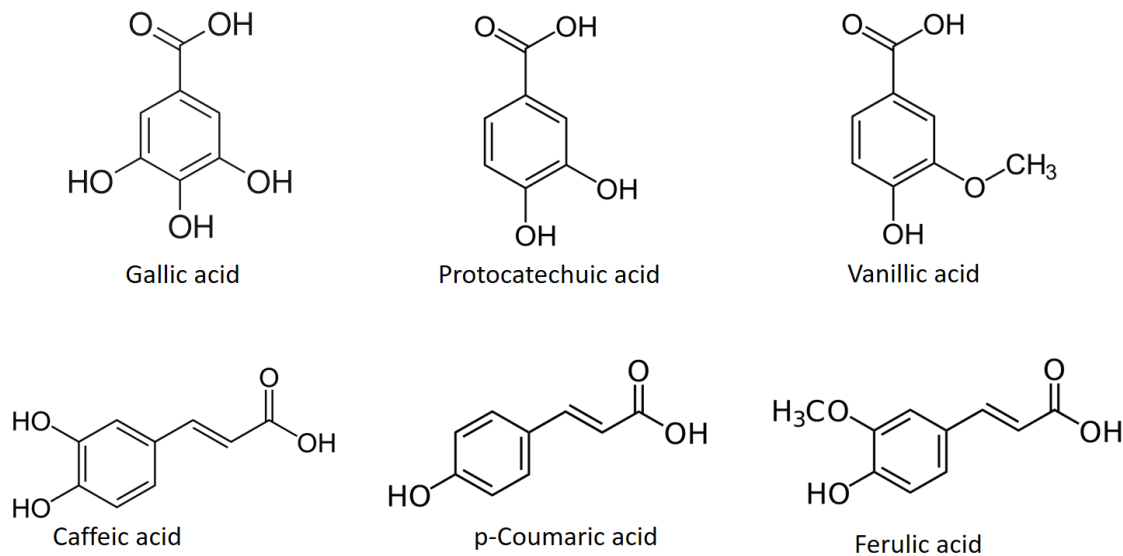
**Tabela 3** Parâmetros de validação do método cromatográfico através de HPLC-ECD para seis ácidos fenólicos.

Phenolic Acids	Work Range (mg L <sup>-1</sup> )	y = ax + b	R <sup>2</sup>	LOD (mg L <sup>-1</sup> )	LOQ (mg L <sup>-1</sup> )	RSD (%)
<b>Gallic</b>	0.1-1.0	y = 1489.6x + 167.18	0.9949	0.0235	0.0712	3.56
<b>Protocatechuic</b>	1.0-10.0	y = 425.98x + 472.43	0.9995	0.0191	0.0580	0.53
<b>Vanillic</b>	0.1-1.0	y = 985.69x + 100.48	0.99	0.0276	0.0838	5.04
<b>Caffeic</b>	0.1-1.0	y = 2812.3x + 96.798	0.9967	0.0091	0.0278	2.57
<b>p-Coumaric</b>	0.1-1.0	y = 728.13x + 53.006	0.9902	0.0140	0.0426	3.28
<b>Ferulic</b>	0.25-1.0	y = 595.77x + 63.728	0.9967	0.0333	0.1010	2.70

Os valores de voltagem e frequência utilizados na detecção eletroquímica (ECD), respectivamente de 1.0 V e 10 Hz, proporcionaram ao cromatograma melhor resolução dos picos, valores maiores ou menores aos mencionados implicam em perda de altura e área dos picos (Liang et al., 2009). O ECD possui alta seletividade, pois detecta somente as espécies que se oxidam ou reduzem, em um potencial inferior ou igual ao fixado, é altamente sensível para espécies eletroativas e muito boa para análises de traços (Liang et al., 2009), permite a detecção de uma grande variedade de compostos quimicamente ativos e é vantajosa quando comparada



com outros tipos de detectores que podem ser utilizados em HPLC, pois apresentam uma alta especificidade, boa relação sinal/ruído e configuração simplificada (Sedenho, 2016; Silva, 2017). O ECD é amplamente utilizado na análise de ácidos fenólicos, pois devido à estrutura química deles (Fig. 2), formam íons, respondendo a aplicação de um determinado potencial elétrico (Liang et al., 2009; Sedenho, 2016).



**Fig. 2** Estruturas moleculares dos seis ácidos fenólicos estudados.

### 3.3 Concentração de ácidos fenólicos em chás de *Plectranthus neochilus*

Os fenóis ácidos constituem a principal classe de compostos fenólicos consumidos em nossa dieta, estimados em um terço (0.025 g a 1 g/dia) do total da ingestão desses compostos (Araújo, 2011). Os ácidos fenólicos são compostos fenóis que contêm grupo funcional carboxila, sendo subdivididos em duas classes: derivados do ácido benzoico e do ácido cinâmico. Os ácidos hidrocinâmicos são mais comuns que os hidrobenzoicos, sendo o p-cumárico, cafeico, ferúlico e sináptico os mais frequentes presentes em alimentos e bebidas de origem vegetal, como o café, erva mate, frutas, entre outros.

Vários fatores físicos e ambientais podem alterar a biossíntese de ácidos fenólicos e metabólitos secundários (Gobbo-neto e Lopes, 2007), bem como a região de cultivo da planta (Santos et al., 2011).

O estado do Rio Grande do Sul, possui características geográficas específicas. Este estado está situado na região sul do Brasil e apresenta as quatro estações do ano (outono, inverno, primavera, verão) bem definidas. O clima predominante é o subtropical úmido e a temperatura varia de acordo com as altitudes, apresentando clima tropical nas áreas de baixa elevação e clima temperado nas áreas de alta elevação. As chuvas são bem distribuídas ao longo do ano, o inverno apresenta as menores temperaturas do país, com ocorrência de geadas durante a estação mais fria, atingindo geralmente temperaturas negativas e em locais de maior altitude (Serra) pode haver ocorrência de neve. O verão é úmido e com altas temperaturas, o que favorece a incidência de chuvas.

De acordo com o acompanhamento anual da *P. neochilus*, os resultados se mostraram expressivos para a biossíntese de ácidos fenólicos. O ácido protocatecuico (Fig. 3b) e o ácido cafeico (Fig. 3d) tiveram maior produção durante a primavera, neste período o ácido protocatecuico foi altamente influenciado pela luminosidade, tendo sua maior produção durante a noite, enquanto o ácido cafeico atingiu seu ápice durante o tratamento dia/irrigado. A maior produção de ácido vanílico (Fig. 3c) aconteceu durante o outono, este ácido sofreu com a influência luminosa e hídrica, sendo que sua maior concentração foi registrada no tratamento dia/irrigado, enquanto no período noturno foi no tratamento não irrigado, indicando que a estação do ano, maior luminosidade e oferta hídrica afetaram suas produções (Santos et al., 2011), o mesmo comportamento foi observado para o ácido p-cumárico (Fig. 3e) no mesmo período do ano e para o ácido ferúlico (Fig. 3f) no outono, a maior produção foi com o tratamento sem irrigação, com maior concentração durante a noite. Há indícios de que a combinação entre maior incidência de luminosa e estresse hídrico gera como resposta biológica

na planta, um aumento na produção de flavonoides visualizado em *E. uniflora*, assim como em espécies de trigo de salgueiro e primavera (Santo et al., 2017).

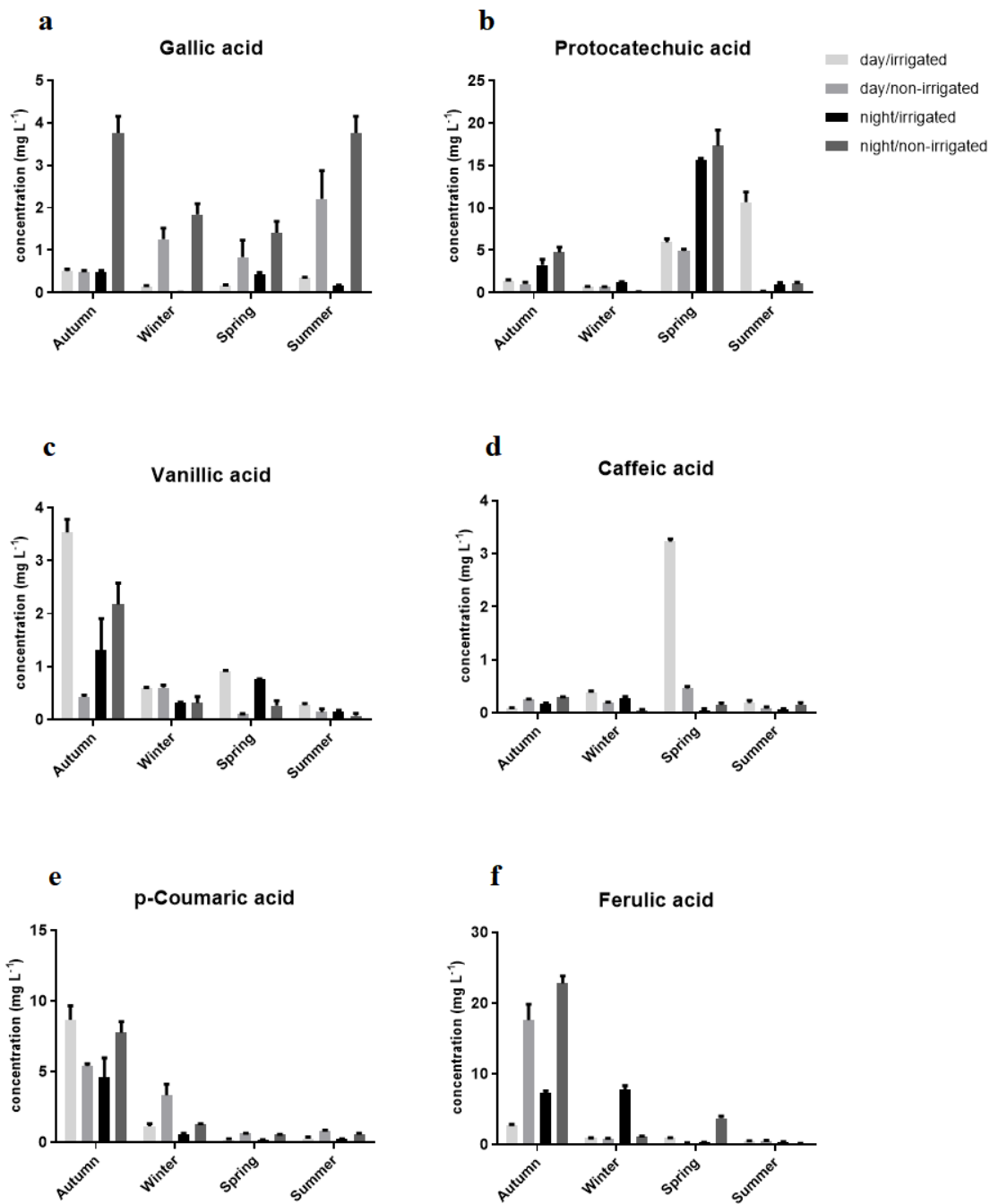
Para o ácido gálico (Fig. 3a), a concentração foi crescente para os meses mais quentes, primavera e verão, ambas com produção sob maior influência da restrição hídrica, atingindo um valor máximo durante a noite. A primavera e verão são épocas quentes onde ocorre a floração da *P. neochilus* em decorrência disto, a planta sofre uma provável maior exposição a insetos, o que supostamente induz a produção de metabólitos para auxiliar no ataque de predadores. Em um trabalho semelhante, a maior concentração de compostos fenólicos totais foi observada durante a primavera, esse experimento também foi durante as diferentes estações do ano, analisando-se as folhas de *Chelidonium majus* L., onde a biossíntese de compostos fenólicos foi efetivamente induzida pela luz solar (Soni et al., 2015). Em outro estudo, as folhas de *M. oleífera* de Mardaan (Paquistão) tiveram conteúdo fenólico total maior em março, correspondente à primavera, do que em dezembro, correspondente ao inverno, provavelmente devido ao clima frio extremo em Mardaan durante dezembro, no entanto em condições agroclimáticas quase idênticas e temperatura ambiente não apresentaram diferenças significativas no conteúdo fenólico total, sendo atribuído à temperatura um forte efeito sobre os fenóis e podendo a radiação solar estar associada à formação de radicais livres e à produção de oxigênio singlete, devido à exposição à radiação ultravioleta (Igbal e Bhangar, 2006). Durante o período do outono, a produção de ácido protocatecuico ocorreu com maior concentração durante o período noturno, não tendo diferença significativa entre os tratamentos com e sem irrigação.

Os ácidos p-cumárico e ferúlico tiveram sua maior produção durante o período do outono, porém o ácido cumárico foi através do tratamento dia/irrigado e noite/não irrigado, mostrando que a maior disponibilidade de luz e oferta hídrica induziram a sua produção, e para o ácido ferúlico, o tratamento mais influente na sua biossíntese foi através de restrição hídrica, tanto

durante a noite (maior síntese), quanto durante o dia, indicando que a menor luminosidade e estresse hídrico induziram sua produção. A atividade da planta geralmente está no seu máximo durante as estações quentes, levando a uma perda de conteúdo fenólico, porém essa atividade diminui conforme diminui a temperatura sazonal, resultando em uma retenção de fenólicos, também um aumento de ácidos graxos insaturados é geralmente associado a climas mais frios que levam a produção de antioxidantes para um sistema de autodefesa contra o estresse ambiental, sucedendo efeitos da temperatura ambiente na atividade antioxidante (Igbal e Bhangar, 2006).

As concentrações dos metabólitos das plantas diferem de uma época para outra e entre diferentes fases de desenvolvimento (Mediani et al., 2012), as plantas, especialmente as perenes, devem ser avaliadas para a época ideal de colheita, em relação aos seus constituintes de importância comercial e/ou farmacêutica (Soni et al., 2015). A intensidade luminosa variou ao longo das estações, uma vez que o experimento foi conduzido sob luz natural. Estas variações luminosas, bem como a estação do ano e temperatura podem induzir respostas biológicas, alterando a biossíntese de alguns compostos (Mediani et al., 2012; Pineli et al., 2012; Uleberg et al., 2012; Soni et al., 2015), nas épocas mais secas é comum altos níveis de fenóis, flavonoides e evaporação, durante o clima úmido e quente, que coincide com a proliferação de insetos e microorganismos patogênicos, indica a necessidade de um nível mais elevado de defesa endógena, como taninos hidrolisáveis (Santos et al., 2011).

Fatores fisiológicos podem ser alterados por estresse hídrico e, conseqüentemente, levar a alterações no metabolismo secundário, também o estresse térmico e choque térmico, resfriamento e congelamento, salinidade e deficiência de oxigênio podem atuar de tal modo que biomassa ou produtividade agrônômicas no final da estação expressam apenas uma fração do potencial genético das plantas (Freire, 2004; Gobbo-Neto e Lopes, 2007; Taiz e Zeiger, 2009).



**Fig. 3** Representação gráfica da concentração de cada ácido fenólico (a. gallic acid; b. protocatechuic acid; c. vanillic acid; d. caffeic acid; e. p-coumaric acid; f. ferulic acid) de acordo com os tratamentos (dia/irrigado; dia/não irrigado; noite/irrigado; noite/não irrigado) realizados ao final de cada estação.

#### 4 Conclusões

O método HPLC-ECD para separação simultânea dos seis ácidos fenólicos atendeu aos critérios de validação, sendo possível aplicar o método em amostras reais, como na análise dos ácidos fenólicos nas folhas de *P. neochilus*.

A variação na biossíntese de cada um dos seis ácidos fenólicos na planta *P. neochilus*, de acordo com seu metabolismo, depende da estação do ano, temperatura, luminosidade, disponibilidade hídrica e também da provável tendência a exposição de insetos em uma determinada época do ano, sendo que, ainda são necessárias mais pesquisas de investigação nesse sentido. Pois, avaliar e escolher a época em que será coletada uma planta que envolve metabólitos empregados na terapêutica é um dos fatores de maior importância, já que estes variam de acordo com as condições ambientais e quando o cultivo é mal conduzido pode gerar nas plantas de uso medicinal produtos ativos em quantidades pequenas ou ao contrário, tornar o produto nocivo por gerar maior quantidade de substâncias consideradas tóxicas para o organismo humano e desta forma a utilização terapêutica se tornar inviável.

#### Agradecimentos

Os autores agradecem à Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela execução deste trabalho.

#### Referências

- Angelo, P.M., Jorge, N. (2007). Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão. Rev. Inst. Adolfo Lutz. 66(1), 1-9.
- Aragão, N.M., Veloso, M.C.C, Andrade, J.B. (2009). Validação de métodos cromatográficos de análise – Um experimento de fácil aplicação utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e os princípios da “química verde” na determinação de metilxantinas em bebidas. Quim. Nova. 32(9), 2476-2481. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422009000900043>.

- Araújo, J.M.A. (2011). Química de Alimentos: teoria e prática. 5th Edition, 1st reprint. UFV, Viçosa. Universidade Federal de Viçosa. 601 pp.
- Badhani, B., Sharma, N., Kakkar, R. (2015). Gallic acid: a versatile antioxidant with promising therapeutic and industrial applications. RSC Advances. 5(35), 27540-27557. <http://doi.org/10.1039/c5ra01911g>.
- Buszewski, B., Szultka, M. (2012). Past, Present, and Future of Solid Phase Extration: A Review. Critical Reviews in Analytical Chemistry. 42(3), 198-213. <https://doi.org/10.1080/07373937.2011.645413>.
- Freire, M.F.I. (2004). Plantas medicinais: a importância do saber cultivar. Revista científica eletrônica agronomia. 3th Ed. n.5 .Disponível em: [http://faef.revista.inf.br/imagens\\_arquivos/arquivos\\_destaque/7ucemh9Yj4dcHPw\\_2013-4-26-12-10-36.pdf](http://faef.revista.inf.br/imagens_arquivos/arquivos_destaque/7ucemh9Yj4dcHPw_2013-4-26-12-10-36.pdf). Acesso em: 26th jun. 2019
- García, A.A., Carril, E.P-U. (2009). Metabolismo secundario de plantas. Reduca (Biología), Serie Fisiología Vegetal. 2(3), 119-145.
- Gobbo-Neto, L., Lopes, N.P. (2007). Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. Quím. Nova. 30(2), 374-381. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422007000200026>.
- Iqbal, S., Bhangar, M.I. (2006). Effect of season and production location on antioxidant activity of *Moringa oleífera* leaves grown in Pakistan. J. Food Composition and Analysis. 19, 544-551. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfca.2005.05.001>.
- Jiménez, S.G., Ducoing, P.H., Sosa, R.M. (2003). La Participación de los Metabolitos Secundarios en la Defensa de las Plantas. Revista Mexicana de Fitopatologia. 21(3), 355-363.
- Liang, Y., Cao, W., Chen, W-J., Xiao, X-H., Zheng, J-B. (2009). Simultaneous determination of four phenolic components in citrus honey by high performance liquid chromatography

using electrochemical detection. Food Chem. 114(4), 1537-1541.

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.11.024>.

Lima, N.R.W., Sodr , G.A., Lima, H.R.R., Mancebo, S.S.S., Campos, L.V., Gidson, A., Souza, V., Couto, W., Giacomo, L., Narcizo, A., Lob o, A.Q., Delou. C.M.C. (2017). The efficacy of a Pratical Activity in the Construction of Knowledge of the Concepts of Species and Phenotypic Plasticity Using the Boldo Mirim (*Plectranthus neochilus* Schltr.). Creat Educ. 8, 2036-2048. <https://doi.org/10.4236/ce.2017.813138>.

Mediani, A., Abas, F., Ping, T.C., Khatib, A., Lajis, N.H. (2012). Influence of Growth Stage and Season on the Antioxidant Constituents of *Cosmos caudatus*. Plant Foods Hum. Nutr. 67, 344-350. <http://doi.org/10.1007/s11130-012-0317-x>.

Meyer, L., Quadros, K.E., Zeni, A.L.B. (2012). Etnobot nica na comunidade de Santa Bárbara, Ascurra, Santa Catarina, Brasil. R. Bras. Bioci. 10(3), 258-266.

Olsen, B.A. (2001). Hydrophilic interaction chromatography using amino and s lica columns for the determination of polar pharmaceuticals and impurities. J. Chromatography A. 913, 113-122. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)01063-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)01063-3).

Pineli, L.L.O., Moretti, C.L., Rodrigues, J.S.Q., Ferreira, D.B., Chiarello, M.D. (2012). Variations in antioxidant properties of strawberries grown in Brazilian savannah and harvested in different seasons. J. Sci. Food Agric. 96, 831-838. <https://doi.org/10.1002/jsfa.4654>.

Pinto, E.P.P., Amorozo, M.C.M., Furlan, A. (2006). Conhecimento popular sobre plantas medicinais em comunidades rurais de mata atlântica – Itacaré, BA, Brasil. Acta. Bot. Bras. 20(4), 751-762. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-33062006000400001>.

Ramborger, B.P., Gularte, C.A.O., Rodrigues, D.T., Gayer, M.C., Carri o, M.R.S., Bianchini, M.C., Puntel, R.L., Denardin, E.L.G., Roehrs, R. (2017). The phytoremediation potential of *Plectranthus neochilus* on 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and the role of antioxidant



capacity in herbicide tolerance. *Chemosphere*. 188, 231-240.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.08.164>.

Ribani, M., Bottoli, C.B.G., Collins, C.H., Jardim, I.C.S.F., Melo, L.F.C. (2004). Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Quim. Nova*. 27(5), 771-780.

<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422004000500017>.

Rosal, L.F., Pinto, J.E.B.P., Brant, R.S. (2009). Produção de biomassa e óleo essencial de *Plectranthus neochilus* Schlechter cultivado no campo sob níveis crescentes de adubo orgânico. *Pesq. Apl. Agr.* 2(2), 63-67.

Santos, R.M., Oliveira, M.S., Ferri, P.H., Santos, S.C. (2011). Seasonal variation in the phenol content of *Eugenia uniflora* L. leaves. *Rev. Bras. Pl. Med.* 13(1), 85-89.

<http://dx.doi.org/10.1590/S1516-05722011000100013>.

Sedenho, G.C. (2016). Desenvolvimento de detector eletroquímico para cromatografia líquida de alta eficiência baseado em um eletrodo modificado com nanopartículas metálicas para determinação de ácidos carboxílicos em vinhaça de cana-de-açúcar. Dissertation (Master's degree in Chemistry). Universidade Estadual Paulista, Araraquara.

Silva, J.L. (2017). Desenvolvimento de detectores nanoestruturados de óxidos metálicos em grafeno para detecção eletroquímica de aminoácido em vinhaça de cana-de-açúcar utilizando cromatografia líquida de alta eficiência. Thesis (Doctorate's degree in Chemistry). Universidade Estadual Paulista, Araraquara.

Soni, U., Brar, S., Gauttam, V.K. (2015). Effect of season variation on secondary metabolites of medicinal plants. *I. J. Pharmaceutical Sciences and Research*. 6(9), 3654-3662.

[http://dx.doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.6\(9\).3654-62](http://dx.doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.6(9).3654-62).

Taiz, L., Zeiger, E. (2009). *Fisiologia Vegetal*. 4th Edition. Porto Alegre: Artmed. 848 pp.

Uleberg, E., Rohloff, J., Jaakola, L., Tröst, K., Junttila, O., Häggman, H., Martinussen, I. (2012). Effects of Temperature and Photoperiod on Yield and Chemical Composition of

Northern and Southern Clones of Bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.). J. Agric. Food Chem. 60, 10406-10414. <http://dx.doi.org/10.1021/jf302924m>.

Vendruscolo, G.S., Mentz, L.A. (2006). Estudo da concordância das citações de uso e importância das espécies e famílias utilizadas como medicinais pela comunidade do bairro Ponta Grossa, Porto Alegre, RS, Brasil. Acta Bot. Bras. 20(2), 367-382. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-33062006000200012>.

Viana, A.J.S. (2011). Estudo químico e de atividade biológica de *Plectranthus neochilus* Schltr. (Lamiaceae). Dissertation (Master's degree in Chemistry). Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina.

Yang, C-Q., Fang, X., Wu, X-M., Mao, Y-B., Wang, L-J., Chen, X-Y. (2012). Transcriptional Regulation of Plant Secondary Metabolism. J. Int. Plant Biol. 54(10), 703-712. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7909.2012.01161.x>.

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O método CLAE-ECD para separação simultânea dos seis ácidos fenólicos estudados (gálico, protocatecuico, vanílico, cafeico, p-cumárico e ferúlico) atendeu aos critérios de validação, sendo possível aplicar o método em amostras reais, como na análise da concentração dos ácidos fenólicos nas folhas de *Plectranthus neochilus* Schltr. Sob diferentes condições ambientais.

A variação na biossíntese de cada um dos seis ácidos fenólicos na planta *P. neochilus*, de acordo com seu metabolismo, depende da sazonalidade, temperatura, luminosidade (ritmo circadiano), disponibilidade hídrica e também da provável tendência a exposição de insetos em uma determinada época do ano, sendo que, ainda são necessárias mais pesquisas de investigação nesse sentido. Pois, avaliar e escolher a época em que será coletada uma planta que envolve metabólitos empregados na terapêutica é um dos fatores de maior importância, já que estes variam de acordo com as condições ambientais e quando o cultivo é mal conduzido pode gerar nas plantas de uso medicinal produtos ativos em quantidades pequenas ou ao contrário, tornar o produto nocivo por gerar maior quantidade de substâncias consideradas tóxicas para o organismo humano e desta forma a utilização terapêutica se tornar inviável.

## REFERÊNCIAS

PINTO, Erika de Paula; AMOROZO, Maria Christina de Mello; FURLAN, Antonio. Conhecimento popular sobre plantas medicinais em comunidades rurais de mata atlântica – Itacaré, BA, Brasil. **Acta Bot. Bras.**, v.20, n.4, p.751-762, 2006.

VENDRUSCOLO, Giovana Secretti; MENTZ, Lilian Auler. Estudo da concordância das citações de uso e importância das espécies e famílias utilizadas como medicinais pela comunidade do bairro Ponta Grossa, Porto Alegre, RS, Brasil. **Acta Bot. Bras.**, v.20, n.2, p.367-382, 2006.

MEYER, Leila; QUADROS, Karin Esemann de; ZENI, Ana Lúcia Bertarello. Etnobotânica na comunidade de Santa Bárbara, Ascurra, Santa Catarina, Brasil. **Rev. Bras. Bioci.**, Porto Alegre, v.10, n.3, p.258-266, 2012.

ROSAL, Louise Ferreira; PINTO, José Eduardo Brasil Pereira; BRANT, Renata da Silva. Produção de biomassa e óleo essencial de *Plectranthus neochilus* Schlechter cultivado no campo sob níveis crescentes de adubo orgânico. **Pesq. Apl. Agr.**, v.2, n.2, 2009.

LIMA, Neuza Rejane Wille; SODRÉ, Gabriel Araújo; LIMA, Helena Roland Rodrigues; MANCEBO, Sueli Soares de Sá; CAMPOS, Luana Vieira; GIBSON, Anna; SOUZA, Victoria; COUTO, Wladimir; GIACOMO, Livia Di; NARCIZO, Amanda; LOBÃO, Adriana Quintela; DELOU, Cristina Maria Carvalho. The efficacy of a Practical Activity in the Construction of Knowledge of the Concepts of Species and Phenotypic Plasticity

Using the Boldo Mirim (*Plectranthus neochilus* Schltr.). **Creat. Educ.**, v.8, p.2036-2048, 2017.

GARCÍA, Adolfo Ávalos; CARRIL, Elena Pérez-Urria. Metabolismo secundario de plantas. **Reduc (biol)**., v.2, n.3, p.119-145, 2009.

PERES, Lázaro Eustáquio Pereira. **Metabolismo Secundário das Plantas**. In: AZAMBUJA, W. Óleos Essenciais.org. 2009. Disponível em: <<http://www.oleosessenciais.org/metabolismo-secundario-das-plantas/>>. Acesso em: 15 mai. 2019.

ANGELO, Priscila Milene; JORGE, Neuza. Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão. **Rev. Inst. Adolfo Lutz.**, v.66, n.1, p.1-9, 2007.

SOUSA, Cleyton Marcos de M.; SILVA, Hiliris Rocha e; VIEIRA-JR, Geraldo Magela; AYRES, Mariane Cruz C.; COSTA, Charllyton Luis S. da; ARAÚJO, Delton Sérvulo; CAVALCANTE, Luis Carlos D.; BARROS, Elcio Daniel S.; ARAÚJO, Paulo Breitner de; BRANDÃO, Marcela S.; CHAVES, Mariana H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Quím. Nova**, São Paulo, v.30, n.2, p.351-355, 2007.

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Rev. Ass. Med. Bras.**, Botucatu, v.43, n.1, p.61-68, 1997.

CANUTO, Gisele André Baptista; XAVIER, Ana Augusta Odorissi; NEVES, Leandro Camargo; BENASSI, Marta de Toledo. Caracterização físico-química de polpas de frutos da Amazônia e sua correlação com a atividade anti-radicalar livre. **Rev. Bras. Frutic.**, v.32, p.1196-1205, 2012.

SILVA, Marília Lordêlo Cardoso; COSTA, Renata Silva; SANTANA, Andréa dos Santos; KOBLITZ, Maria Gabriela Bello. Compostos fenólicos, carotenoides e atividade antioxidante em produtos vegetais. **Semin: Cien. Agrar.**, Londrina, v.31, n.3, p.669-682, 2010.

QUEIROZ, Sonia C.N.; COLLINS, Carol H.; JARDIM, Isabel C.S.F. Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluidos biológicos para posterior determinação cromatográfica. **Quím. Nova**, v.24, n.1, p.68-76, 2001.

NETO, Alvaro José dos Santos; SIQUEIRA, Maria Elisa Pereira Bastos de. Análise de praguicidas organofosforados em água por extração em fase sólida (SPE) utilizando discos C18 e cromatografia em fase gasosa: avaliação da contaminação do reservatório de Furnas (MG-Brasil). **Quím. Nova**, v.28, n.5, p.747-750, 2005.

SILVA, Patrícia Damasceno. **Determinação de compostos fenólicos por HPLC**. 2012. 108 f. Dissertação (Mestrado) – Curso de Química Industrial, Ciências, Universidade da Beira Interior, Covilhã, 2012.

SEDENHO, Graziela Cristina. **Desenvolvimento de detector eletroquímico para cromatografia líquida de alta eficiência baseado em um eletrodo modificado com**

**nanopartícula metálicas para determinação de ácidos carboxílicos em vinhaça de cana-de-açúcar.** 2016. 125 f. Dissertação (Mestrado) – Curso de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2016.

LIANG, Yan; CAO, Wei; CHEN, Wei-jun; XIAO, Xue-hong; ZHENG, Jian-bin. Simultaneous determination of four phenolic components in citrus honey by high performance liquid chromatography using electrochemical detection. **Food Chem.**, v.114, n.4, p.1537-1541, 2009.

VIANA, Abraão José Silva. **Estudo químico e de atividade biológica de *Plectranthus neochilus* Schltr. (Lamiaceae).** 2011. 128 f. Dissertação (Mestrado) – Curso de Química, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, 2011.

TAIZ, Lincoln; ZEIGER, Eduardo. **Fisiologia Vegetal.** 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2009.

ARAÚJO, Júlio M.A. **Química de Alimentos: teoria e prática.** 5. ed. 1 – reimpressão. UFV, Viçosa, Universidade Federal de Viçosa, 601 p. 2011.

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

RAMBORGER, Bruna Piaia. **Fitorremediação do 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) pelo *Plectranthus neochilus***. 2017. 88 f. Dissertação (Mestrado) – Curso de Bioquímica, Universidade Federal do Pampa, Uruguaiana, 2017.

MERCK. Sigma-Aldrich Catalog. Disponível em: <<https://www.sigmaaldrich.com/catalog>>. Acesso em: 10 ago. 2019.

ANTEC, Scientific. **Decade II User Manual**. 2015. 88 f. 12. ed. Disponível em: <<https://antescientific.com/download/file?file=ZG93bmxvYWRzL21hbnVhbHMvdXNlcl9tYW51YWxzLzE3MV8wMDEwXzEyIC0gREVDQURFIEIJHVzZXIgbWFudWFsLnBkZg==>>. Acesso em 21 jun. 2019.

SILVA, José Luiz da. **Desenvolvimento de detectores nanoestruturados de óxidos metálicos em grafeno para detecção eletroquímica de aminoácido em vinhaça de cana-de-açúcar utilizando cromatografia líquida de alta eficiência**. 2017. 55 f. Tese (Doutorado) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2017.

FREIRE, Márcia de Fátima Inácio. Plantas Medicinais: a importância do saber cultivar. **Rev. Cient. Eletr. Agr.** 3. ed. n.5. 2004. Disponível em: <[http://faef.revista.inf.br/imagens\\_arquivos/arquivos\\_destaque/7ucemh9Yj4dcHPw\\_2013-4-26-12-10-36.pdf](http://faef.revista.inf.br/imagens_arquivos/arquivos_destaque/7ucemh9Yj4dcHPw_2013-4-26-12-10-36.pdf)>. Acesso em: 26 jun. 2019.



## ANEXOS

### ANEXO 1 – Normas para submissão de artigos Revista Chemosphere

Link de acesso ao site: <https://www.elsevier.com/journals/chemosphere/0045-6535/guide-for-authors>

#### **LINE and PAGE NUMBERING (NEW AND REVISED SUBMISSIONS):**

Please ensure the text of your paper is double-spaced and has consecutive(continuous) LINE numbering. Please also ensure to add PAGE numbers to the source file- this is an essential peer review requirement.

#### ***References***

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the article number or pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct.

#### **Formatting requirements**

There are no strict formatting requirements but all manuscripts must contain the essential elements needed to convey your manuscript, for example **Abstract, Keywords, Introduction, Materials and Methods, Results, Conclusions, Artwork and Tables with Captions.**

If your article includes any Videos and/or other Supplementary material, this should be included in your initial submission for peer review purposes.

Divide the article into clearly defined sections.

#### ***Figures and tables embedded in text***

Please ensure the figures and the tables included in the single file are placed next to the relevant text in the manuscript, rather than at the bottom or the top of the file. The corresponding caption should be placed directly below the figure or table.

#### ***Subdivision - numbered sections***

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

**Introduction**

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

**Material and methods**

Provide sufficient details to allow the work to be reproduced by an independent researcher. Methods that are already published should be summarized, and indicated by a reference. If quoting directly from a previously published method, use quotation marks and also cite the source. Any modifications to existing methods should also be described.

**Theory/calculation**

A Theory section should extend, not repeat, the background to the article already dealt with in the Introduction and lay the foundation for further work. In contrast, a Calculation section represents a practical development from a theoretical basis.

**Results**

Results should be clear and concise.

**Discussion**

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

**Conclusions**

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

**Appendices**

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

**Essential title page information**

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.

- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that phone numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address. Contact details must be kept up to date by the corresponding author.**

- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

## Highlights

Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). You can view [example Highlights](#) on our information site.

## Abstract

A concise and factual abstract is required. **The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone.** For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself (and then later again when used in the text, see Abbreviations).

## Graphical abstract

Although a graphical abstract is optional, its use is encouraged as it draws more attention to the online article. The graphical abstract should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. You can view [Example Graphical Abstracts](#) on our information site.

Authors can make use of Elsevier's [Illustration Services](#) to ensure the best presentation of their images and in accordance with all technical requirements.

## Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly

established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

### ***Abbreviations***

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

### ***Acknowledgements***

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

### **Nomenclature and units**

Follow internationally accepted rules and conventions: **use the international system of units (SI)**. If other quantities are mentioned, give their equivalent in SI. You are urged to consult IUPAC: Nomenclature of Organic Chemistry: <http://www.iupac.org/> for further information.

### ***Math formulae***

Please submit math equations as editable text and not as images. Present simple formulae in line with normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

### **Footnotes**

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many wordprocessors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

#### *Table footnotes*

Indicate each footnote in a table with a superscript lowercase letter.

### **Artwork**

#### ***Electronic artwork***

##### *General points*

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Preferred fonts: Arial (or Helvetica), Times New Roman (or Times), Symbol, Courier.

- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Indicate per figure if it is a single, 1.5 or 2-column fitting image.
- For Word submissions only, you may still provide figures and their captions, and tables within a single file at the revision stage.
- Please note that individual figure files larger than 10 MB must be provided in separate source files.

A detailed [guide on electronic artwork](#) is available.

**You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.**

### *Formats*

Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalized, please 'save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings. Embed the font or save the text as 'graphics'.

TIFF (or JPG): Color or grayscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPG): Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale): a minimum of 500 dpi is required.

#### **Please do not:**

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); the resolution is too low.
- Supply files that are too low in resolution.
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

### ***Color artwork***

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or online only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <https://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

**Please note:** Because of technical complications which can arise by converting color figures to 'gray scale' (for the printed version should you not opt for color in print) please submit in addition usable black and white versions of all the color illustrations.

### ***Figure captions***

Ensure that each illustration has a caption. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

## **Tables**

Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text. Place footnotes to tables below the table body and indicate them with superscript lowercase letters. Avoid vertical rules. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in tables do not duplicate results described elsewhere in the article.

## **References**

### ***Citation in text***

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

### ***Reference links***

Increased discoverability of research and high quality peer review are ensured by online links to the sources cited. In order to allow us to create links to abstracting and indexing services, such as Scopus, CrossRef and PubMed, please ensure that data provided in the references are correct. Please note that incorrect surnames, journal/book titles, publication year and pagination may prevent link creation. When copying references, please be careful as they may already contain errors. Use of the DOI is highly encouraged.

A DOI is guaranteed never to change, so you can use it as a permanent link to any electronic article. An example of a citation using DOI for an article not yet in an issue is: VanDecar J.C., Russo R.M., James D.E., Ambeh W.B., Franke M. (2003). Aseismic continuation of the Lesser Antilles slab beneath northeastern Venezuela. *Journal of Geophysical Research*, <https://doi.org/10.1029/2001JB000884>. Please note the format of such citations should be in the same style as all other references in the paper.

### ***Data references***

This journal encourages you to cite underlying or relevant datasets in your manuscript by citing them in your text and including a data reference in your Reference List. Data references should include the following elements: author name(s), dataset title, data repository, version (where available), year, and global persistent identifier. Add [dataset] immediately before the reference so we can properly identify it as a data reference. The [dataset] identifier will not appear in your published article.

### **References in a special issue**

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

### **Reference management software**

This journal has standard templates available in key reference management packages EndNote (<http://www.endnote.com/support/enstyles.asp>) and Reference Manager (<http://refman.com/support/rmstyles.asp>). Using plug-ins to wordprocessing packages, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article and the list of references and citations to these will be formatted according to the journal style which is described below.

### **Reference formatting**

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the article number or pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct. If you do wish to format the references yourself they should be arranged according to the following examples:

### **Reference style**

*Text:* All citations in the text should refer to:

1. *Single author:* the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;
2. *Two authors:* both authors' names and the year of publication;
3. *Three or more authors:* first author's name followed by 'et al.' and the year of publication.

Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references should be listed first alphabetically, then chronologically.

Examples: 'as demonstrated (Allan, 2000a, 2000b, 1999; Allan and Jones, 1999). Kramer et al. (2010) have recently shown ....'

*List:* References should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication.

*Examples:*

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2010. The art of writing a scientific article. *J. Sci. Commun.* 163, 51–59.

Oguro, M., Imahiro, S., Saito, S., Nakashizuka, T., 2015. Mortality data for Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions. *Mendeley Data*, v1. <http://dx.doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1>.

Reference to a book:

Strunk Jr., W., White, E.B., 2000. *The Elements of Style*, fourth ed. Longman, New

York.

Reference to a chapter in an edited book:  
Mettam, G.R., Adams, L.B., 2009. How to prepare an electronic version of your article, in: Jones, B.S., Smith, R.Z. (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*. E-Publishing Inc., New York, pp. 281–304.

### ***Journal abbreviations source***

Journal names should be abbreviated according to the [List of Title Word Abbreviations](#).

### **Data visualization**

Include interactive data visualizations in your publication and let your readers interact and engage more closely with your research. Follow the instructions [here](#) to find out about available data visualization options and how to include them with your article.

### **Supplementary data**

Elsevier accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, high resolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please provide the data in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at <https://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

### **Data at PANGAEA**

Electronic archiving of supplementary data enables readers to replicate, verify and build upon the conclusions published in your paper. We recommend that data should be deposited in the data library PANGAEA (<http://www.pangaea.de>). Data are quality controlled and archived by an editor in standard machine-readable formats and are available via Open Access. After processing, the author receives an identifier (DOI) linking to the supplements for checking. As your data sets will be citable you might want to refer to them in your article. In any case, data supplements and the article will be automatically linked as in the following example: [https://doi.org/10.1016/0016-7037\(95\)00105-9](https://doi.org/10.1016/0016-7037(95)00105-9). Please use PANGAEA's web interface to submit your data (<http://www.pangaea.de/submit/>).

### **Research data**

This journal encourages and enables you to share data that supports your research publication where appropriate, and enables you to interlink the data with your published articles. Research data refers to the results of observations or experimentation that validate research findings. To facilitate reproducibility and data reuse, this journal also



encourages you to share your software, code, models, algorithms, protocols, methods and other useful materials related to the project.

Below are a number of ways in which you can associate data with your article or make a statement about the availability of your data when submitting your manuscript. If you are sharing data in one of these ways, you are encouraged to cite the data in your manuscript and reference list. Please refer to the "References" section for more information about data citation. For more information on depositing, sharing and using research data and other relevant research materials, visit the [research data](#) page.

### ***Data linking***

If you have made your research data available in a data repository, you can link your article directly to the dataset. Elsevier collaborates with a number of repositories to link articles on ScienceDirect with relevant repositories, giving readers access to underlying data that gives them a better understanding of the research described.

There are different ways to link your datasets to your article. When available, you can directly link your dataset to your article by providing the relevant information in the submission system. For more information, visit the [database linking page](#).

For [supported data repositories](#) a repository banner will automatically appear next to your published article on ScienceDirect.

In addition, you can link to relevant data or entities through identifiers within the text of your manuscript, using the following format: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN).

### ***Mendeley Data***

This journal supports Mendeley Data, enabling you to deposit any research data (including raw and processed data, video, code, software, algorithms, protocols, and methods) associated with your manuscript in a free-to-use, open access repository. During the submission process, after uploading your manuscript, you will have the opportunity to upload your relevant datasets directly to *Mendeley Data*. The datasets will be listed and directly accessible to readers next to your published article online.

For more information, visit the [Mendeley Data for journals page](#).

### ***Data in Brief***

You have the option of converting any or all parts of your supplementary or additional raw data into one or multiple data articles, a new kind of article that houses and describes your data. Data articles ensure that your data is actively reviewed, curated, formatted, indexed, given a DOI and publicly available to all upon publication. You are encouraged to submit your article for *Data in Brief* as an additional item directly alongside the revised version of your manuscript. If your research article is accepted, your data article will automatically be transferred over to *Data in Brief* where it will be editorially reviewed and published in the open access data journal, *Data in Brief*. Please note an open access fee of 600 USD is payable for publication in *Data in Brief*.

Full details can be found on the [Data in Brief website](#). Please use [this template](#) to write your Data in Brief.

### ***MethodsX***

You have the option of converting relevant protocols and methods into one or multiple MethodsX articles, a new kind of article that describes the details of customized research methods. Many researchers spend a significant amount of time on developing methods to fit their specific needs or setting, but often without getting credit for this part of their work. MethodsX, an open access journal, now publishes this information in order to make it searchable, peer reviewed, citable and reproducible. Authors are encouraged to submit their MethodsX article as an additional item directly alongside the revised version of their manuscript. If your research article is accepted, your methods article will automatically be transferred over to MethodsX where it will be editorially reviewed. Please note an open access fee is payable for publication in MethodsX. Full details can be found on the [MethodsX website](#). Please use [this template](#) to prepare your MethodsX article.

### ***Data statement***

To foster transparency, we encourage you to state the availability of your data in your submission. This may be a requirement of your funding body or institution. If your data is unavailable to access or unsuitable to post, you will have the opportunity to indicate why during the submission process, for example by stating that the research data is confidential. The statement will appear with your published article on ScienceDirect. For more information, visit the [Data Statement page](#).

### **Submission checklist**

The following list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item.

#### **Ensure that the following items are present:**

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address

All necessary files have been uploaded, and contain:

- Keywords
- All figure captions
- All tables (including title, description, footnotes)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell-checked' and 'grammar-checked'
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Web)
- Color figures are clearly marked as being intended for color reproduction on the Web (free of charge) and in print, or to be reproduced in color on the Web (free of charge) and in black-and-white in print
- If only color on the Web is required, black-and-white versions of the figures are also

supplied for printing purposes .

For any further information please visit our customer support site at <https://service.elsevier.com>.

### **Additional information**

Paper Length: The Editors generally encourage brevity for all Research Papers.

Short Communications must not exceed 2,000 words and will be given priority for rapid publication.

**Research papers should preferably not exceed 6,500 words (excluding refs.). The abstract could range upto 250 words. Review papers should preferably be 10,000 words or less (excluding refs.). Each figure or table should be considered equal to 300 words. The number of figures and/or tables should not exceed a total amount of seven.** Every page of the manuscript, including the title page, references, tables, etc. should be numbered. However, in the text no reference should be made to page numbers; if necessary, one may refer to sections. In case you have serious reasons for submitting a paper that is longer than the aforementioned word limits, make sure you include convincing arguments in your cover letter. Please avoid lengthy submissions if possible.