

TERMOESTABILIDADE DE PROCESSOS EXTRATIVOS DE *Nasturtium officinale* R. Br., BRASSICACEAE POR SISTEMA SOXHLET MODIFICADO

João Luiz de Souza Carvalho, Miriam Machado Cunico, Josiane de Fátima Gaspari Dias*, Marilis Dallarmi Miguel e Obdulio Gomes Miguel

Departamento de Farmácia, Universidade Federal do Paraná, Av. Prefeito Lothário Meissner, 3400, 80210-170 Curitiba – PR, Brasil

Recebido em 6/12/07; aceito em 26/9/08; publicado na web em 2/2/09

TERM-STABILITY OF EXTRACTIVE PROCESSES FROM *Nasturtium officinale* R. Br., BRASSICACEAE FOR SOXHLET MODIFIED SYSTEM. This work had as objective verified the term-stability of the Soxhlet modified system with analytical and pharmacotechnical application in extractive processes of *Nasturtium officinale*. It has proven that the process is thermo-stable. The analysis with analytical have determined 3.606 mg g⁻¹ in chlorogenic acid and 11.813 mg g⁻¹ in rutin (extract 1:20 w/v) and with pharmacotechnical 3.427 mg g⁻¹ in chlorogenic acid and 11.278 mg g⁻¹ in rutin (extract 1:6 w/v). The income of the pharmacotechnical process was inferior to the analytical, suggesting that the pharmacotechnical process would need of at least the double of time in each extraction system.

Keywords: thermo-stable, Soxhlet, *Nasturtium officinale*.

INTRODUÇÃO

Nasturtium officinale, conhecida popularmente como agrião, contém glucosinolatos (gluconasturtiin, precursor do feniletil isotiocianato e o 2-feniletilglucosinolato),^{1,2} nitrilas (3-fenilpropionitrila e 8-metiltoctanona nitrila), minerais (manganês, ferro, fósforo, iodo, cobre e cálcio), vitaminas A, C, E e nicotinamida.^{1,3}

Possui atividade antibacteriana, antiescorbútica, colagoga e propriedades expectorantes. Estudos farmacológicos demonstraram que esta espécie pode ser utilizada como protetora pulmonar de tabagistas contra agentes neoplásicos presentes no tabaco.¹ Apresenta potencial cardioprotetor,⁴ o que justifica seu uso popular para tal fim, e atividade hipolipidêmica, que pode ser atribuída ao seu potencial antioxidante.⁵

Dentre os diversos processos comumente utilizados para obtenção de extratos de *N. officinale*, tem-se alcoolatura (trituração com álcool 96%), maceração, percolação, turbólise (emprego de equipamento tipo liquidificador industrial, que pulveriza as partes vegetais e lava os conteúdos celulares) e o sistema Soxhlet, que permite a renovação do solvente sem adição de mais solvente. Estas possibilidades de extração resultam em produtos distintos quanto à qualidade e concentração de ativos, levando a resultados terapêuticos variáveis e diferentes custos finais.⁶

Dentro desta perspectiva, este trabalho teve como finalidade determinar a termoestabilidade do sistema Soxhlet, utilizando como referência dois compostos presentes no metabolismo secundário do *N. officinale*.⁷⁻⁹ Paralelamente, verificou-se o rendimento de diferentes processos de obtenção de extratos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise preliminar realizada por meio de cromatografia em camada delgada⁶ com utilização de padrões demonstrou a presença de fenólicos nos extratos analisados. A termoestabilidade do sistema Soxhlet foi previamente verificada e confirmada com as posteriores análises por meio de CLAE.

O método de CLAE utilizado para detecção simultânea dos compostos derivados do ácido clorogênico e rutina, para qualificação e quantificação nas amostras analisadas, foi validado conforme especificação da RE nº 899/03¹⁰ – categoria I. Os dados referentes à validação encontram-se na Tabela 1. Ao verificar a especificidade do método em dosar flavonóides em rutina e fenilpropanóides em ácido clorogênico encontram-se quantidades diferentes de resultados, pois a biblioteca da *WorkStation D7000* do programa LaChrom na aquisição de dados (*Reverse Library Search Results*) encontrou seis estruturas relacionadas para rutina e quatro para ácido clorogênico.

As análises de CLAE realizadas nos extratos em estudo demonstraram composição rica em fenilpropanóides e flavonóides. Na Tabela 2 verificam-se os teores das substâncias analisadas nos diferentes processos extrativos. A colocação do “d-“ antes de rutina ou ácido clorogênico indica que é um “derivado de”, ou seja, apresenta mais de 95% de correlação com o pico padrão e o mesmo espectro segundo biblioteca eletrônica.

A alcoolatura teve a finalidade de servir como padrão para o processo extrativo inerte, assim como para comparação da composição de analitos em estudo no vegetal *in natura* antes da estabilização. O material vegetal fresco apresentou 6% de rendimento em sólidos a 45 °C ou 94% de perda em água. A alcoolatura apresentou um teor de sólidos de 1,06% ou 7,42 g de sólidos nos 700 mL e 3,18 g de sólidos extraíveis nos 300 mL de alcoolatura impregnados no resíduo, perfazendo uma massa total de 10,6 g de extraíveis em 500 g (1000 mL de alcoolatura) de *N. officinale in natura*. Considerando-se 30 g de massa seca das 500 g de *N. officinale in natura* (6% de sólidos) obteve-se rendimento de 35,33% de sólidos da composição extraída (Tabela 3) e 0,673 mg g⁻¹ de fenólicos calculados em ácido clorogênico e rutina (Tabela 2).

Na extração por dupla maceração, o extrato bruto de *N. officinale* apresentou 67% da solução extratora e os 33% restantes permaneceram no resíduo. A massa de sólidos extraída nas 500 g de planta foi de 110 g ou 22% de sólidos da composição extraída (Tabela 3) e 9,381 mg g⁻¹ de fenólicos calculados em ácido clorogênico e rutina (Tabela 2).

*e-mail: jodias@pop.com.br

Tabela 1. Resultados das análises realizadas para validação da metodologia - doseamento de flavonóides em rutina e fenilpropanóides em ácido clorogênico

Parâmetro Analisado	Especificação	Doseamento de flavonóides em rutina	Doseamento de fenilpropanóides em ácido clorogênico		
Especificidade	Influência dos excipientes	Os excipientes não podem interferir no doseamento dos analitos	Conforme		
	Pureza dos picos	Mínimo 99%	99,96% (tr 24,70)	99,19% (tr 20,70)	
			99,88% (tr 37,20)	99,26% (tr 22,50)	
			99,23% (tr 38,40)	99,97% (tr 27,70)	
			99,53% (tr 40,70)	99,89% (tr 24,27)	
			99,34% (tr 42,00)	99,57% (tr 43,20)	
	Correlação com pico padrão	Mínimo 95%	99,57% (tr 43,20)	98,31% (tr 24,70)	
			98,31% (tr 24,70)	96,11% (tr 20,70)	
			98,67% (tr 37,20)	96,13% (tr 22,50)	
			96,65% (tr 38,40)	99,45% (tr 27,70)	
98,18% (tr 40,70)			99,54% (tr 24,27)		
Especificidade	Fingerprint	As amostras possuem o mesmo perfil cromatográfico	97,70% (tr 42,00)	98,18% (tr 43,20)	
			98,18% (tr 43,20)	Conforme	
			Conforme	Conforme	
			Conforme	Conforme	
			Conforme	Conforme	
	Linearidade	Curva	$r^2 \geq 0,99$	$r^2 = 0,9966$	
	Precisão	Repetibilidade	DPR $\leq 5\%$	Analista 01 DPR = 1,43%	DPR = 1,38%
				Analista 02 DPR = 1,59%	DPR = 1,45%
				Intermediária DPR $\leq 5\%$	DPR = 1,71%
Exatidão	Adição de padrões	Recuperação 95 a 105%	Conc 80% 102,80%	99,67%	
			Conc 100% 99,57%	101,31%	
			Conc 120% 99,32%	100,96%	
Robustez	Composição da fase móvel	DPR $\leq 5\%$	DPR = 0,19%		
	Troca de coluna	DPR $\leq 5\%$	DPR = 1,21%		
	Estabilidade da solução final	DPR $\leq 5\%$	DPR = 3,78%		

DPR = desvio padrão relativo, tr = tempo de retenção, r^2 = coeficiente de correlação e conc = concentração segundo ANVISA.

Tabela 2. Teores em fenólicos de ácido clorogênico e rutina na análise de CLAE em amostras de *N. officinale* obtidas por diferentes processos extrativos

	<i>Nasturtium officinale</i>			
	Alcoolatura (mg/g)	Dupla maceração (mg/g)	Soxhlet analítico (mg/g)	Soxhlet farmacotécnico (mg/g)
Ácido clorogênico (tr = 20,7)	0,006	0,033	0,060	0,054
Ácido cafeico (tr = 22,5)	0,013	0,218	0,362	0,342
d-Rutina (tr = 24,7)	0,024	0,125	0,205	0,196
d-Ácido clorogênico (tr = 27,7)	0,112	1,656	2,746	2,611
d-Ácido clorogênico (tr = 34,27)	0,033	0,282	0,438	0,420
Rutina (tr = 37,2)	0,016	0,185	0,290	0,276
d-Rutina (tr = 38,4)	0,097	1,382	2,256	2,145
d-Rutina (tr = 40,7)	0,058	1,062	1,736	1,656
d-Rutina (tr = 42)	0,257	3,169	5,255	5,023
d-Rutina (tr = 43,2)	0,057	1,272	2,071	1,982
Total de d-Ácido clorogênico	0,164	2,189	3,606	3,427
Total de d-Rutina	0,509	7,195	11,813	11,278
Total de fenólicos	0,673	9,381	15,419	14,705

d- = derivado de; tr = tempo de retenção em relação à especificidade ou de ácido clorogênico ou rutina.

A extração em Soxhlet modificado com aplicação farmacotécnica obteve 1000 mL de extrato, com teor de 34,25% de sólidos da composição extraída (Tabela 3) e 14,705 mg g⁻¹ de fenólicos calculados em ácido clorogênico e rutina (Tabela 2).

Os extratos obtidos por dupla maceração e Soxhlet farmacotécnico tiveram a finalidade de simular o processo industrial. Os sistemas convencionais trabalham geralmente com maceração a frio desconsiderando os efeitos de solvatação, saturação do solvente com a constante de solubilização da composição química do vegetal a quente.

A extração em Soxhlet analítico modificado teve a finalidade de permitir o esgotamento total de extraíveis da droga para comparar a composição, fórmula percentual e o teor total dos analitos em estudo. Verificou-se um teor de 35,23% de sólidos da composição extraída (Tabela 3) e 15,419 mg g⁻¹ de fenólicos calculados em ácido clorogênico e rutina (Tabela 2).

Para verificação da termoestabilidade, preparou-se amostra padrão com ácido clorogênico e rutina em amido pelo processo Soxhlet modificado analítico e verificou-se por CLAE que 99,1% do ácido clorogênico e rutina adicionados no amido foram recuperados e não se detectou compostos da decomposição ou stress térmico do processo. Na extração do ácido clorogênico e rutina adicionados no material vegetal seco, obteve-se 99,3% de recuperação, sem apresentar compostos da decomposição no processo e inércia química com a composição do agrião pelo processo Soxhlet modificado analítico.

Todos os processos empregados no presente estudo apresentaram a mesma composição da alcoolatura utilizada como padrão e os processos Soxhlet reproduziram a mesma fórmula percentual de extraíveis, devido ao esgotamento total dos compostos.

Na Figura 1 verifica-se a especificidade do *fingerprint* entre as amostras e os padrões desta metodologia.

PARTE EXPERIMENTAL

Material vegetal

O material vegetal foi coletado em dezembro de 2005, identificado pelo Dr. G. Hatschbach e registrado no Museu Botânico de Curitiba sob o número 248503. Este material vegetal foi pré-estabilizado em condições ambientes e estabilizado em estufa ventilada a 45 °C, por um período de 20 h. A padronização granulométrica foi realizada em um moinho de facas, com tamis de 8 mm.

Condições cromatográficas

Todos os reagentes e solventes foram adquiridos em grau P.A. ou HPLC (Merck®). A água utilizada no preparo das soluções foi obtida por sistema de purificação e filtração Milli-Q (Millipore). Os padrões de ácido clorogênico e rutina utilizados foram adquiridos da Sigma®.

Tabela 3. Teor de sólidos obtidos nos processos de extração do *Nasturtium officinale*

Processo de extração	massa de planta (g)	volume etanol adicionado (mL)	volume final (mL)	massa de sólidos (g)	% sólidos no extrato	% sólidos na planta	rendimento (35,33=100%)
Alcoolatura	500	530	700 (300**)	7,42 (3,18*)	1,06	2,12 (35,33***)	70 (30 =perda)
Dupla maceração	500	1500	1000	110	11	22	62,3
Analítico	10	200	100	3,53	3,53	35,23	99,7
Farmacotécnico	500	3000	1000	171,5	17,15	34,25	96,9

* = perda de sólidos no resíduo da alcoolatura, ** = perda no resíduo de alcoolatura, *** = referência de esgotamento.

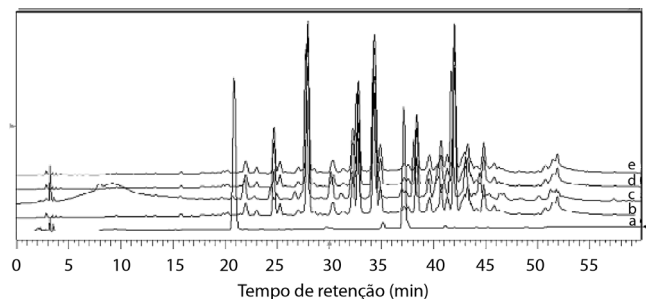


Figura 1. Multicromatograma do *fingerprint* entre as amostras e o padrão, onde (a) padrões de ácido clorogênico e rutina; (b) amostra da alcoolatura; (c) amostra do extrato obtido por dupla maceração; (d) amostra do extrato obtido por Soxhlet modificado analítico; (e) amostra do extrato obtido por Soxhlet modificado farmacotécnico

A análise qualitativa preliminar foi realizada por meio de cromatografia em camada delgada, utilizando-se cromatoplaças de sílica gel F₂₅₀ (Merck®), de dimensões 10 cm por 10 cm, onde 10 µL de cada amostra foi aplicada, intercalando com referências solubilizadas em metanol (1 mg mL⁻¹). As fases móveis e seus respectivos reveladores foram utilizados de acordo com a literatura.^{6,11}

As análises qualitativas e quantitativas foram realizadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), em aparelho Merck-Hitashi® composto de bomba L7100, degaseificador de solventes L7812, válvula de injeção Rheodyne® 7725i com *loop* de 20 µL, forno L-7300, detector DAD L7450, em 325 nm para ácido clorogênico e 350 nm para a rutina, interface L7000 conectada ao sistema operacional Windows® NT e tratamento dos dados pela *ChemiStation Lachrom*®. Utilizou-se a coluna analítica Phenomenex C₁₈ (4 x 250 mm, 5 µm).

A metodologia empregada para análise foi desenvolvida por Carvalho⁶ e validada de acordo com a resolução 899 de 29 de maio de 2003 da ANVISA (metodologia enquadrada na categoria I – validação de método analítico quantitativo para uma substância entre outros componentes)¹⁰ e foi otimizada para fenólicos,^{6,12,13} num gradiente ternário, utilizando como fase móvel A 0,2% de ácido fosfórico em ácido sulfúrico 0,01 M, fase móvel B metanol e fase C acetonitrila. O gradiente de eluição foi: 0-3 min a 1,2 mL min⁻¹ de fluxo com 100% A; 3-5 min a 1,2 mL min⁻¹ de fluxo para 7% B e 3% C; 5-15 min a 1,2 mL min⁻¹ de fluxo para 16% B e 3% C; 15-40 min a 1,2 mL min⁻¹ de fluxo para 26% B e 15% C; 40-47 min a 1,3 mL min⁻¹ de fluxo para 26% B e 15% C; 47-48 min a 1,3 mL min⁻¹ de fluxo para 30% B e 30% C; 48-54 min a 1,3 mL min⁻¹ de fluxo para 30% B e 30% C; 55-60 min a 1,2 mL min⁻¹ de fluxo para 100% A.

A identificação dos compostos foi realizada pela *ChemiStation Lachrom*® com base nos tempos de retenção das amostras e comparação com os tempos dos padrões, dados de literatura e de seus espectros introduzidos na biblioteca eletrônica (*Reverse Library Search Results*).^{6,14-16}

Para a construção da curva analítica da solução padrão^{6,12,13} foram utilizados níveis de concentração em ácido clorogênico sendo 5, 10, 20, 40, 45, 50, 55 e 60 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e rutina com 10, 20, 40, 80, 90, 100, 110 e 120 $\mu\text{g mL}^{-1}$ segundo norma.¹⁰

Os processos de extração foram comparados com dois grupos fenólicos, fenilpropanóides com ácido clorogênico (2) e flavonóides com rutina^{14,17,18} (1). Para o preparo da solução padrão com ácido clorogênico e rutina, adicionou-se 20 mg de ácido clorogênico e 40 mg de rutina em um balão volumétrico de 100 mL e seu volume foi completado com etanol 85%.^{6,9,10} Para análise por CLAE, as amostras de padrões foram diluídas com solução mista da fase móvel A: fase móvel B (1:1 v/v) e co-injetadas em todas as análises dos processos de extração.

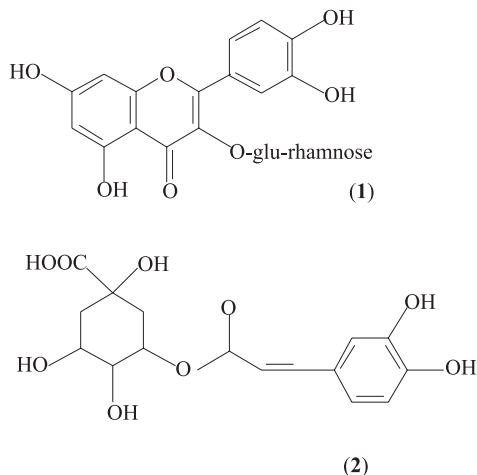


Figura 2. Fórmulas estruturais – rutina (1) e ácido clorogênico (2)

Métodos de extração e análises

As extrações foram realizadas com solventes P.A. e em triplicata.

Alcoolatura e dupla maceração

Para a obtenção de alcoolatura foram triturados, por 2 min, 500 g da planta inteira fresca e 550 mL de etanol a 96%. Em seguida, esta solução foi submetida a uma maceração a frio, por 72 h e filtração a vácuo. A preparação da alcoolatura foi realizada de acordo com normas estabelecidas pela farmacopéia.^{15,16} A alcoolatura foi concentrada, onde 250 mL foram concentrados para 40 mL e seu volume ajustado para 50 mL com etanol a 85%.

Para extração por dupla maceração, 500 g do material vegetal foram maceradas em 1000 mL de etanol 85% (850 mL de etanol 96% e 150 mL de água) em um percolador de 3 L. Após 72 h, procedeu-se à eluição que resultou na obtenção da primeira fração de 500 mL do extrato. O resíduo foi novamente extraído por maceração, durante 72 h, após adição de 500 mL de etanol 85%, produzindo a segunda fração de 500 mL do extrato. Pela reunião destas duas frações foram obtidos 1000 mL de extrato bruto etanólico.

O teor de sólidos da alcoolatura e da dupla maceração foi determinado por meio de perda por estufa a 45 °C, por 3 h, utilizando-se uma alíquota de 10 mL de amostra, em triplicata. Para análise de fenólicos por CLAE, 500 μL de alcoolatura e 300 μL da dupla maceração foram diluídos em 500 e 900 μL , respectivamente, em solução mista de fase móvel A e fase móvel B (1:1 v/v) em tubo Eppendorf de 1,5 mL.

Soxhlet modificado farmacotécnico

No Soxhlet modificado com aplicação farmacotécnica, há substituição do sistema de percolação por uma placa de teflon perfurada

(Figura 3) e recoberta com algodão, com o objetivo de filtrar a solução extratora eluída.

Foram adicionados 500 g de material vegetal no extrator, 1500 mL de etanol 85% sobre o material vegetal para umectação (por 30 min) e 1500 mL de etanol a 85% (1275 mL de etanol 96% e 225 mL de água) no balão de fundo chato (para conexão com o sistema Soxhlet, utiliza-se balão com junta 24/40 ou 29/42). O processo de extração foi mantido por 5 h (para conexão com o condensador, utiliza-se junta 71/60). Em seguida, concentrou-se o extrato do balão para aproximadamente 800 mL. O extrato foi transferido para um balão volumétrico e completado o volume com etanol (85%) para 1000 mL.

O teor de sólidos dos extratos foi determinado por meio de perda por estufa a 45 °C por 3 h, utilizando alíquota de 10 mL de amostra, em triplicata.

Para análise de fenólicos por CLAE, 150 μL de amostra foram diluídas em 1350 μL de solução mista de fase móvel A e fase móvel B (1:1 v/v) em tubo Eppendorf de 1,5 mL.

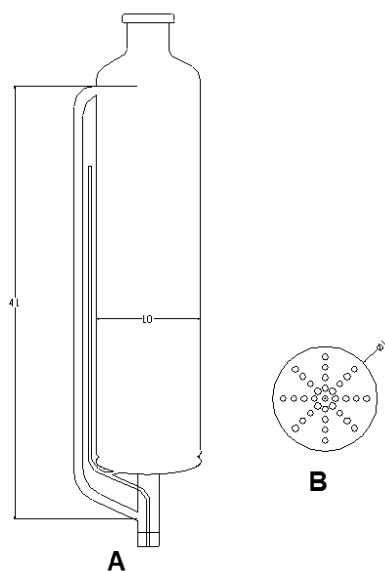


Figura 3. Soxhlet modificado farmacotécnico, onde A = sistema Soxhlet (10 cm de diâmetro e 41 cm de altura) e B = placa de teflon (10 cm de diâmetro)

Soxhlet analítico modificado

A preparação do extrato analítico foi feita adicionando-se 10 g do material vegetal num cartucho de vidro tipo Pyrex® com base de vidro sinterizado G3 (Figura 4), 50 mL de etanol 85% (85 mL de etanol 96% e 15 mL de água) deixando o sistema em repouso por 30 min, para umectação da droga. Em seguida, 150 mL de etanol 85% foram adicionados ao balão de fundo chato (para conexão com o sistema Soxhlet, utiliza-se balão com junta 24/40) e conectou-se ao extrator. Esse procedimento ficou ativo por 4 h (para conexão com o condensador, utiliza-se junta 45/50). O extrato obtido foi concentrado para 80 mL e seu volume completado para 100 mL com etanol 85%.

O teor de sólidos dos extratos foi determinado por meio de perda por estufa a 45 °C por 3 h, utilizando alíquotas de 10 mL de amostra, em triplicata.

Para o preparo da amostra padrão, os padrões, ácido clorogênico e rutina foram extraídos em Soxhlet modificado com aplicação de 20 mg de ácido clorogênico e 40 mg de rutina num cartucho de vidro tipo Pyrex® com base de vidro sinterizado G3, contendo 10 g de amido. Foram adicionados 50 mL de etanol (85%) deixando o sistema em repouso por 30 min, para umectação do material vegetal. Em seguida, 150 mL de etanol 85% foram adicionados ao balão de fundo chato e conectou-se ao extrator. Esse procedimento ficou ativo por 4 h. O

extrato obtido foi concentrado para 80 mL e seu volume completado para 100 mL com etanol (85%).

Para verificação da inércia e termoestabilidade, 10 g de material vegetal, 20 mg de ácido clorogênico e 40 mg de rutina foram utilizados em processo idêntico ao de preparação do extrato analítico e amostra padrão. Para análise de fenólicos por CLAE, 300 µL de amostra padrão, 500 µL do extrato analítico e 300 µL de extrato, para verificação da inércia e termoestabilidade, foram diluídos em 900, 500 e 900 µL, respectivamente, em solução mista de fase móvel A e fase móvel B (1:1 v/v) da CLAE, em tubo Eppendorf de 1,5 mL.

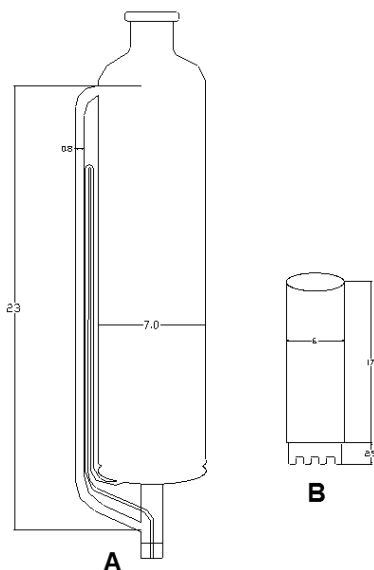


Figura 4. Soxhlet analítico modificado, onde A = sistema Soxhlet (7 cm de diâmetro e 23 cm de altura) e B = cartucho de vidro com base de vidro sinterizado G3 (6 cm de diâmetro e 19,5 cm de altura - destes, 2,5 cm correspondem à altura da base)

CONCLUSÕES

Neste trabalho verificou-se a termoestabilidade no sistema Soxhlet modificado, ou seja, no processo extrativo não ocorreu variação da composição do mesmo, com o efeito da temperatura. A termoestabilidade foi avaliada por CLAE e o teor de fenólicos, calculado em ácido clorogênico e rutina, comprovou que o processo é termoestável ao efeito da temperatura e que atende às normas da ANVISA. Este processo mostrou-se limpo, rápido, reprodutível e com alto rendimento em extraíveis em relação ao teor de sólidos, apresentando no extrator o resíduo do material vegetal incorporado com o etanol destilado do final do processo.

No processo analítico obteve-se 35,23% de sólidos a partir de 10 g de planta para 200 mL de solvente extrator (1:20) e no farmacotécnico, 34,25% de sólidos a partir de 500 g para 3000 mL de solvente extrator (1:6). Isto sugere que o processo farmacotécnico necessitaria de pelo menos o dobro de tempo em cada sistema de extração para se equiparar ao analítico, tornando-se inviável em custo de energia e tempo disponível do equipamento e na utilização industrial, devido ao custo final do produto.

AGRADECIMENTOS

Aos colaboradores H. Dias Jr. e F. S. F. Smolarek, ao Departamento de Farmácia da Universidade Federal do Paraná e ao CNPq.

REFERÊNCIAS

1. Blumenthal, M.; Goldberg, A.; Brinckmann, J.; *Herbal Medicine - Integrative Medicine Communications*, 1st ed., American Botanical Council: Austin, 2000.
2. Gil, V.; Macleod, A.-J.; *Phytochemistry* **1980**, *19*, 1657.
3. Loggia, R. D.; *Piante Officinali per Infusi e Tisane*, 3rd ed., Organizzazione Editoriale Medico Farmacutica: Milano, 1993.
4. Bahramikia, S.; Yazdanparast, R.; *J. Ethnopharmacol.* **2008**, *4*, 115.
5. Yazdanparast, R.; Bahramikia, S.; Ardestani, A.; *Chem. Biol. Interact.* **2008**, *172*, 176.
6. Carvalho, J. L. S.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade Federal do Paraná, Brasil, 2001.
7. Katalinic, V.; *J. Chromatogr.* **1997**, *775*, 359.
8. Anterola, A. M.; Lewis, N. G.; *Phytochemistry* **2002**, *61*, 221.
9. Engelen-Eigles, G.; Holden, G.; Cohen, J. D.; Gardner, G.; *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 328.
10. <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=15132&word=>, acessada em Julho 2007.
11. Wagner, H.; Blatt, S.; *Plant Drugs Analysis*, 2nd ed., Springer-Verlag: Berlin, 2001.
12. Alves, S. T.; Dias, R. C. E.; Benassi, M. T.; Scholz, M. B. S.; *Quim. Nova* **2006**, *29*, 1164.
13. Ribani, M.; Bottoli, C. B. G.; Collins, C. H.; Jardim, I. C. S. F.; Melo, L. F. C.; *Quim. Nova* **2004**, *27*, 771.
14. Mabry, T. J.; Markham, K. R.; Thomas, M. B.; *The Systematic Identification of Flavonoids*, Springer-Verlag: Berlin, 1970.
15. *Farmacopéia Brasileira*, 2^a ed., Indústria Gráfica Siqueira: São Paulo, 1959.
16. *Farmacopéia Brasileira*, 4^a ed., Atheneu: São Paulo, 1988-1996.
17. Burns, J.; Fraser, P. D.; Bramley, P. M.; *Phytochemistry* **2003**, *62*, 939.
18. <http://www.drastic.org.uk>, acessada em Julho 2006.