

Determinação espectrométrica dos flavonóides das folhas de *Maytenus* (Celastraceae) e de *Passiflora* (Passifloraceae) e comparação com método CLAE-UV

Regina de A. O. Chabariberi, Alessandra C. S. Pozzi,
Maria Luiza Zeraik, Janete H. Yariwake*

Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, Caixa Postal 780, 13560-970
São Carlos-SP, Brasil

RESUMO: Este trabalho apresenta uma modificação dos procedimentos descritos nas Farmacopéias Francesa e Européia para a análise de flavonoides de *Passiflora incarnata* L., Passifloraceae, por espectrometria UV-Visível e propõe a sua aplicação na determinação dos flavonoides totais das folhas da espinheira-santa (*Maytenus aquifolium* Mart. e *Maytenus ilicifolia* (Schrad.) Planch., Celastraceae) e do maracujá (*Passiflora edulis* Sims. e *Passiflora alata* Curtis, Passifloraceae). Os resultados obtidos por espectrometria no UV-Visível foram comparados aos obtidos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-UV), encontrando-se resultados estatisticamente similares entre os métodos espectrométrico modificado da Farmacopéia Francesa e CLAE-UV.

Unitermos: flavonoides, espectrometria UV-Visível, fitoterápicos, *Maytenus* spp., *Passiflora* spp.

ABSTRACT: “Spectrometric determination of flavonoids from *Maytenus* (Celastraceae) and *Passiflora* (Passifloraceae) leaves and comparison with an HPLC-UV method”. This paper reports on a modification of the spectrometric procedures originally described in the French and European Pharmacopoeia for the analysis of *Passiflora incarnata* L. (Passifloraceae) flavonoids, proposing its application in the determination of total flavonoids from “espinheira-santa” (*Maytenus aquifolium* Mart. and *Maytenus ilicifolia* (Schrad.) Planch., Celastraceae) and “maracujá” leaves (*Passiflora edulis* Sims and *Passiflora alata* Curtis, Passifloraceae). A comparison was made of the results obtained by the spectrometric procedure with those obtained by high performance liquid chromatography (HPLC-UV), which demonstrated complete compatibility between the modified French Pharmacopoeia (spectrometric) and HPLC-UV methods.

Keywords: flavonoids, phytomedicines, UV-visible spectrometry, *Maytenus* spp., *Passiflora* spp.

INTRODUÇÃO

O controle de qualidade de fitoterápicos é imprescindível, pois pode ocorrer problemas sérios devido à comercialização de fitoterápicos de má qualidade ou adulterados (Balmé, 1982). A padronização química de medicamentos fitoterápicos e a garantia da sua eficácia e segurança requerem métodos analíticos adequados para a detecção e quantificação dos princípios ativos (ou dos “marcadores”) e de substâncias potencialmente tóxicas (Carvalho et al., 2008). Assim, o Grupo de Análise Fitoquímica do IQSC-USP tem se dedicado ao estudo sistemático de algumas plantas medicinais brasileiras, dentre as quais *Maytenus aquifolium* Mart. e *Maytenus ilicifolia* (Schrad.) Planch. (Celastraceae), conhecidas popularmente como espinheira-santa (Diagone, 2003; Tiberti et al., 2007) e de várias espécies de *Passiflora* (Passifloraceae) conhecidas como “maracujá” (Pereira et al., 2000; Pereira et al., 2004; Pereira et al., 2005).

Maytenus aquifolium e *Maytenus ilicifolia* são plantas medicinais de uso popular tradicional. Originárias do sul do Brasil, são também encontradas no Chile, Paraguai, Uruguai e Argentina (Scheffer, 2004). A quarta edição da Farmacopéia Brasileira (2002) registra a espécie *Maytenus ilicifolia*, e estudos farmacológicos comprovaram a sua atividade contra úlceras gástricas e gastrites em animais de laboratório (Souza-Formigone et al., 1991) e em seres humanos (Carlini, 1988). Existem relatos do uso das espécies de espinheira-santa para outras doenças, Mariot & Barbieri (2007) discutem a ação farmacológica destas espécies em sua revisão da literatura.

As folhas de maracujá são empregadas por sua ação calmante em casos de insônia e irritabilidade; estas propriedades são atribuída às espécies *Passiflora incarnata* L. e *Passiflora alata* Curtis, Passifloraceae, (Oga et al., 1984). Porém, constatou-se que no comércio brasileiro frequentemente há substituição de *Passiflora alata* por outras espécies, dentre as quais *P. edulis* fo. *flavicarpa* O.

Deg.; este fato significa fraude, pois não existem trabalhos que comprovem a validade do uso desta última como hipnótico/sedativo (Pereira et al., 2000). *Passiflora edulis* Sims, conhecida vulgarmente por maracujá amarelo, é a matéria-prima para o suco de maracujá industrializado no Brasil (Mercadante et al., 1988).

Técnicas cromatográficas instrumentais, tais como a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e a cromatografia de camada delgada de alta eficiência (CCDAE; em inglês, HPTLC) demonstraram ser importantes ferramentas para a identificação de material vegetal de espécies de *Passiflora*, através do uso de flavonoides como marcadores (Pereira et al., 2004). A CLAE também demonstrou ser uma opção eficiente para a análise quantitativa de flavonoides de *Passiflora* (Pereira et al., 2004) e de *Maytenus* (Diagone, 2003; Yariwake et al., 2005). No entanto, documentos oficiais como as Farmacopéias Francesa, Européia e Brasileira ainda adotam a espectrometria UV-Visível como método de escolha para a análise quantitativa de flavonoides em material vegetal. Para o trabalho de rotina, as técnicas espectrométricas apresentam importantes vantagens em comparação com a CLAE, tais como o menor custo e a simplicidade operacional.

Dentro desse contexto, este trabalho apresenta uma modificação do método originalmente descrito nas Farmacopéias Francesa e Européia para a determinação espectrométrica de flavonoides em *Passiflora incarnata* (European Pharmacopoeia, 2000; Pharmacopée Française, 1992) com o objetivo de desenvolver uma metodologia adequada para as espécies de relevância no Brasil, *Passiflora alata* e *Passiflora edulis*. Propõe-se também o uso deste método para as espécies *Maytenus aquifolium* e *Maytenus ilicifolia*, uma vez que não há procedimento para a análise quantitativa de flavonoides destas espécies na literatura, e a monografia sobre *M. ilicifolia* da Farmacopéia Brasileira propõe apenas a dosagem de taninos totais (Farmacopéia Brasileira, 2002). Este trabalho também apresenta a comparação do método espectrométrico com os resultados obtidos na análise por CLAE dos flavonoides da espinheira-santa e do maracujá.

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal

O material vegetal utilizado como referência para o desenvolvimento do método analítico foi gentilmente fornecido pela Dra. Ana Maria Soares Pereira (Unaerp, Ribeirão Preto-SP, Brasil), e foi obtido de espécimens originários de cultivo conforme boas práticas agrícolas na fazenda da Unaerp, Ribeirão Preto-SP, Brasil. As folhas de *Maytenus aquifolium* Mart. e *Maytenus ilicifolia* (Schrad.) Planch. (Celastraceae) foram coletadas em dezembro/2000, as folhas de *Passiflora alata* Curtis foram coletadas em março de 1999 e as de *Passiflora edulis* Sims

(Passifloraceae) em junho de 1998. As folhas foram secas em estufa a 40 °C, por dois dias, pulverizadas e tamizadas (0,5-1,0 mm) antes de serem armazenadas em frascos fechados, protegidos da luz.

Reagentes e soluções

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico: metanol (Mallinckrodt), etanol (Mallinckrodt e Merck), ácido fórmico 98-100% (Merck), ácido acético glacial (Synth), ácido acético anidro (Merck), cloreto de alumínio (Merck), ácido bórico (Vetec) e ácido oxálico (Merck). Como padrão de flavonoide, utilizou-se rutina 95% (Sigma). Utilizou-se água deionizada em sistema Milli-Q (Millipore).

Extração do material vegetal e análise espectrométrica

Procedimento modificado da Farmacopéia Francesa (F.F.)

Folhas pulverizadas (0,3 g) foram extraídas com etanol:água 60% v/v (20 mL) sob refluxo (60 min). O extrato foi resfriado à temperatura ambiente e filtrado; o resíduo (material vegetal) foi re-extraído seguindo o mesmo procedimento. Ambos os extratos hidroetanólicos foram reunidos e o volume ajustado para 50,0 mL em balão volumétrico com etanol:água 60% v/v, obtendo-se a solução de trabalho. Uma alíquota de 0,8 mL da solução de trabalho foi transferida para um balão volumétrico de 10 mL e o volume ajustado com metanol p.a. (Solução 1). Uma segunda alíquota de 0,8 mL da solução de trabalho foi transferida para um outro balão volumétrico de 10 mL, adicionou-se 0,8 mL de solução $AlCl_3$ 2% m/v e o volume ajustado com metanol p.a. (Solução 2). Após 25 min da adição da solução de $AlCl_3$, a absorvância foi medida em espectrofotômetro Hitachi U-2000 a $\lambda = 413$ nm para os extratos de *Maytenus* e $\lambda = 427$ nm para os extratos de *Passiflora*, usando a Solução 1 como branco. O procedimento descrito para a preparação das Soluções 1 e 2 foi também seguido para obtenção da curva analítica, usando como padrão soluções de rotina em etanol:água 60% v/v nas concentrações de 37,5; 75,0; 112,5; 150,0 e 187,0 mg.L⁻¹ para análise dos extratos de *Maytenus* e de 100,0; 140,0; 180,0; 220,0 e 260,0 mg.L⁻¹ para análise dos extratos de *Passiflora*.

Procedimento modificado da Farmacopéia Européia (F.E.)

Folhas pulverizadas (0,2 g) foram extraídas com etanol:água 60% v/v (40 mL) sob refluxo (30 min). O extrato foi resfriado à temperatura ambiente e filtrado; o resíduo (material vegetal) foi re-extraído seguindo o mesmo procedimento. Ambos os extratos hidroetanólicos foram reunidos e o volume ajustado para 100,0 mL em balão

volumétrico com etanol:água 60% v/v, obtendo-se a solução de trabalho. Uma alíquota de 5,0 mL da solução de trabalho foi seca em rotaevaporador e o resíduo foi dissolvido em 0,9 mL metanol + 9,1 mL ácido acético glacial e transferido para um balão volumétrico de 25,0 mL; adicionou-se 10 mL de ácido fórmico e o volume foi completado com ácido acético anidro (Solução 1). Uma segunda alíquota de 5,0 mL da solução de trabalho foi seca em rotaevaporador e o resíduo dissolvido em 0,9 mL metanol + 9,1 mL ácido acético glacial. A mistura foi transferida para um balão volumétrico de 25 mL, em seguida adicionou-se 10 mL de uma solução consistindo de 0,25 g de ácido bórico + 0,20 g de ácido oxálico, diluídos em ácido fórmico e completou-se o volume com ácido acético anidro (Solução 2). Após 30 min da adição da solução de AlCl_3 , a absorvância foi medida em espectrofotômetro Hitachi U-2000 a $\lambda = 419$ nm para os extratos de *Maytenus* e $\lambda = 430$ nm para os extratos de *Passiflora*, usando a Solução 1 como branco. O procedimento descrito para a preparação das Soluções 1 e 2 foi também seguido para obtenção da curva analítica, usando como padrão soluções de rotina em etanol:água 60% v/v nas concentrações de 15,0; 30,0; 45,0; 60,0 e 75,0 mg.L^{-1} para análise dos extratos de *Maytenus* e de 5,0; 10,0; 20,0; 30,0 e 40,0 mg.L^{-1} para análise dos extratos de *Passiflora*.

Validação

As metodologias descritas foram validadas quanto à precisão (repetibilidade e precisão intermediária), exatidão, linearidade e sensibilidade, segundo os critérios propostos pelo ICH (ICH, 1996). A precisão foi avaliada pela repetibilidade, na qual foram examinadas três amostras individuais em um único dia, e pela precisão intermediária, a qual foi determinada em três dias diferentes. A exatidão foi avaliada por ensaios de recuperação. O teste de recuperação consiste na adição de quantidades conhecidas da substância padrão (rotina) à amostra analisada. Todas as análises foram realizadas em triplicata. A linearidade foi determinada para a curva analítica da rotina em cinco diferentes valores de concentração (descritos no item Extração do material vegetal e análise espectrométrica) e todas as análises foram realizadas em triplicata. A sensibilidade do método foi determinada através da inclinação da curva analítica (Ribani et al., 2004).

Os resultados obtidos por espectrometria no UV-Visível foram também comparados, usando o teste *t* de Student (nível de confiança de 95%) (Miller & Miller, 2002), com os dados quantitativos obtidos por CLAE seguindo métodos descritos em trabalhos anteriores (Pereira et al., 2004; Diagone, 2003).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os procedimentos originalmente descritos na Farmacopéia Francesa (Pharmacopée Française, 1992)

e na Farmacopéia Européia (European Pharmacopoeia, 2000) necessitaram de algumas modificações para se obter melhores resultados. Uma alteração foi o comprimento de onda utilizado para medição da absorvância: para a análise de *Passiflora incarnata* L. (Passifloraceae) a literatura indica leitura em 394 nm (F.F.) ou em 401 nm (F.E.). Porém, após a reação de complexação, obteve-se os valores de $\lambda_{\text{máx}} = 412$ nm (F.F.) e 419 nm (F.E.) para os extratos de *Maytenus* (Celastraceae), enquanto que para os extratos de *Passiflora* obteve-se $\lambda_{\text{máx}} = 427$ nm (F.F.) e 430 nm (F.E.). Assim, conforme descrito em Material e Métodos, optou-se pela leitura de absorvância nos máximos de absorção, que é o procedimento mais correto para análise quantitativa. *Maytenus aquifolium* Mart. e *Maytenus ilicifolia* (Schrad.) Planch. contém flavonoides *O*-glicosídeos e suas agliconas (Tiberti et al., 2007), enquanto que os flavonoides de *Passiflora* são predominantemente *C*-glicosilados (Pereira et al., 2005); estas diferenças estruturais justificam as diferenças de valores de $\lambda_{\text{máx}}$ observados entre as espécies.

Outra modificação dos métodos espectrométricos descrito nas farmacopéias foi a escolha da rotina como substância de referência para construção da curva analítica e cálculo do teor de flavonoides totais. A utilização da rotina é justificada por ser um flavonol diglicosilado (derivado de quercetina), cuja estrutura química é próxima dos flavonoides glicosilados presentes nas espécies estudadas. Outro motivo está relacionado ao seu menor custo, comparado à vitexina (padrão indicado nas Farmacopéias Francesa e Européia) e outros padrões de flavonoides.

Os parâmetros de validação são apresentados na Tabela 1. O parâmetro de linearidade foi obtido por meio da curva analítica do padrão rotina, e constatou-se que ambos os métodos são lineares, apresentando valores de coeficiente de correlação (r^2) próximo de um, mas o método da Farmacopéia Francesa apresentou maior linearidade e maior sensibilidade para as espécies de *Maytenus* e de *Passiflora*. Ambos os métodos também se apresentaram precisos, e tanto a repetibilidade quanto a precisão intermediária apresentaram coeficiente de variação (CV) inferior a 5%. Os valores de recuperação entre 70 e 120% são aceitáveis segundo os limites propostos (ICH, 1996).

Os resultados da análise dos flavonoides totais presentes nas amostras de referência das espécies de *Maytenus* e de *Passiflora* foram comparados com os resultados obtidos por CLAE na análise destas mesmas amostras (Tabela 2). Foi aplicado o teste *t* de Student no nível de confiança de 95%, para comparação estatística entre os resultados e encontraram-se diferenças significativas entre os resultados obtidos pelas duas metodologias (F.F. e F.E.), para as mesmas espécies. O teor de flavonoides pelo método da Farmacopéia Européia foi maior, e uma hipótese é que outros constituintes químicos dos extratos de *Maytenus* e de *Passiflora* poderiam sofrer reação de complexação com o ácido bórico; outra hipótese é que hidroxilas catecóllicas em 3' e 4' não são a única posição complexada. Já na comparação entre o método espectrométrico e a análise

por CLAE, a Farmacopéia Francesa apresentou resultados estatisticamente idênticos ($p = 0,05$; teste- t) aos obtidos por CLAE.

Tabela 1. Curva analítica do padrão analítico rotina e parâmetros de validação das metodologias estudadas.

Espécie	Método	Equação da curva $y = a + bx$	Repetibilidade ^a CV (%)	Precisão Intermediária ^a CV (%)	Recuperação CV (%)
<i>M. aquifolium</i>	F.F. (UV-Vis)	$y = 0,0209 + 0,02783x$ ($r^2 = 0,9993$)	13,76 (1,80)	14,25 (4,10)	71,0 (2,2)
<i>M. ilicifolia</i>			14,62 (2,40)	14,64; (4,10)	74,0 (4,2)
<i>M. aquifolium</i>	F.E. (UV-Vis)	$y = 0,0039 + 0,03697x$ ($r^2 = 0,9987$)	17,88 (2,70)	20,25 (10,40)	119,0 (8,5)
<i>M. ilicifolia</i>			19,63 (0,73)	20,16 (5,30)	98,0 (12,0)
<i>P. edulis</i>	F.F. (UV-Vis)	$y = -0,0123 + 28,3125x$ ($r^2 = 0,9982$)	32,49 (3,18)	32,51 (0,95)	78,2 (2,1)
<i>P. alata</i>			14,44 (4,14)	14,20 (1,49)	75,7 (3,0)
<i>P. edulis</i>	F.E. (UV-Vis)	$y = 0,05687 + 21,6061x$ ($r^2 = 0,9958$)	56,78 (1,42)	56,16 (0,95)	115,7 (7,3)
<i>P. alata</i>			27,43 (11,11)	26,78 (2,61)	100,6 (8,5)

F.F.= Farmacopéia Francesa; F.E.= Farmacopéia Européia; CV (%) – coeficiente de variação percentual da triplicata; ^aResultado expresso em rotina (mg de flavonóide/g de planta seca)

Tabela 2. Teor de flavonoides totais expressos em rotina (mg de flavonóide/g de planta seca), obtido por espectrometria no UV-Visível e por CLAE-UV/DAD.

Espécies	Método	Teor de flavonóides totais (TFT)				CV (%)
		TFT ₁	TFT ₂	TFT ₃	Média	
<i>M. aquifolium</i>	F.F. (UV-Vis)	13,76	14,90	14,10	14,25 ^a	4,1
	F.E. (UV-Vis)	17,88	21,15	21,71	20,25	10,4
	CLAE ^I	13,56	13,51	12,81	13,30 ^a	2,6
<i>M. ilicifolia</i>	F.F. (UV-Vis)	15,25	14,06	14,62	14,64 ^b	4,0
	F.E. (UV-Vis)	19,45	21,40	19,63	20,16	5,3
	CLAE ^I	13,73	13,56	14,26	13,85 ^b	3,1
<i>P. edulis</i>	F.F. (UV-Vis)	10,23	11,56	10,52	10,77 ^c	6,49
	*F.E. (UV-Vis)	56,78	55,85	55,86	56,16	0,95
	CLAE ^{II}	11,12	11,07	10,97	11,05 ^c	0,69
<i>P. alata</i>	F.F. (UV-Vis)	10,75	10,59	8,31	9,88 ^d	13,81
	*F.E. (UV-Vis)	27,43	26,04	26,86	26,78	2,61
	CLAE ^{II}	11,23	11,49	11,02	11,25 ^d	2,09

F.F.= Farmacopéia Francesa; F.E.= Farmacopéia Européia; TFT- Teor de flavonóides totais; CV (%) - coeficiente de variação percentual; ^{a,b,c,d} Resultados estatisticamente idênticos ($p = 0,05$; teste- t); *granulometria das plantas < 0,5 mm; ^IDados descritos na literatura (Diagone, 2003) e obtidos com as mesmas amostras analisadas por UV-Visível; ^{II}Dados descritos na literatura (Pereira et al., 2004) e obtidos com as mesmas amostras analisadas por UV-Visível.

Com base nestes resultados e considerando que a espectrometria no UV-Visível apresenta a importante vantagem de ser uma técnica simples, rápida, de baixo custo e que utiliza menos quantidade de solvente em comparação à CLAE, conclui-se que o método espectrométrico modificado da Farmacopéia Francesa, conforme descrito neste trabalho, pode ser uma alternativa para a quantificação de flavonoides de folhas de *Maytenus aquifolium* Mart., *Maytenus ilicifolia* (Schrad.) Planch. (Celastraceae), *Passiflora alata* Curtis e *Passiflora*

edulis Sims (Passifloraceae) em trabalhos que exigem a análise de grande número de amostras, tais como em ensaios agrônômicos (estudos de melhoramento vegetal) ou no controle de qualidade de flavonoides em extratos vegetais.

AGRADECIMENTOS

FAPESP, CNPq e CAPES.

REFERÊNCIAS

- Balmé, F 1982. *Plantas Mediciniais*. São Paulo: Hemus.
- Carlini ELA 1988. *Estudo da ação anti-úlceras gástrica de plantas brasileiras: Maytenus ilicifolia (espineira-santa) e outras*. Brasília: CEME/AFIP.
- Carvalho ACB, Balbino EE, Maciel A, Perfeito JPS 2008. Situação do registro de medicamentos fitoterápicos no Brasil. *Rev Bras Farmacogn* 18: 314-319.
- Diagone CA 2003. *Desenvolvimento de métodos cromatográficos (HPLC/DAD e eletroforético CZE/DAD) para análise de flavonóides em "espineira-santa" (Maytenus aquifolium Martius e Maytenus ilicifolia Martius)*. São Carlos, 259p. Tese de Doutorado, Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo.
- European Pharmacopoeia 2000. 3. ed. Supplement Strasbourg: Council of Europe.
- Farmacopéia Brasileira 2002. 4. ed. São Paulo: Atheneu. *International Conference on Harmonization (ICH) 1996. Guideline Q2B-Validation of Analytical Procedures: Methodology. International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use*. Genebra, Suíça.
- Mariot MP, Barbieri RL 2007. Metabólitos secundários e propriedades medicinais da espineira-santa (*Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss. e *M. aquifolium* Mart.). *Rev Bras Plantas Med* 9: 89-99.
- Mercadante AZ, Britton G, Rodriguez-Amaya DB 1998. Carotenoids from yellow passion fruit (*Passiflora edulis*). *J Agr Food Chem* 46: 4102-4106.
- Miller JN, Miller JC 2002. *Estadística y Quimiometria para Química Analítica*. Madrid: Pearson Educación S.A.
- Oga S, Freitas PCD, Silva ACG, Hanada S 1984. Pharmacological trials of crude extract of *Passiflora alata*. *Planta Med* 50: 303-306.
- Pereira CAM, Vilegas JHY 2000. Constituintes químicos e farmacologia do gênero *Passiflora* com ênfase a *P. alata* Dryander, *P. edulis* Sims e *P. incarnata* L. *Rev Bras Plantas Med* 3: 1-12.
- Pereira CAM, Yariwake JH, Lanças FM, Wauters JN, Tits M, Angenot L 2004. HPTLC densitometric determination of flavonoids from *Passiflora alata*, *P. edulis*, *P. incarnata* and *P. caerulea* and comparison with HPLC method. *Phytochem Analysis* 15: 241-248.
- Pereira CAM, Yariwake JH, McCullagh M 2005. Distinction of the flavone C-glycoside pairs orientin/isorientin and vitexin/isovitexin using LC-MS exact mass measurement and in-source CID. *Phytochem Analysis* 16: 295-301.
- Pharmacopée Française 1992. 10. ed. Paris: Ministère de la Santé.
- Ribani M, Bottoli CBG, Collins CH, Jardim ICSF, Melo LFC 2004. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Quim Nova* 27: 771-780.
- Schefer MC 2004. Produção de espineira-santa (*Maytenus ilicifolia* Mart. Ex Reiss) na região metropolitana de Curitiba, Paraná, Brasil. In: Alexiades MN, Shanley P (org) *Productos forestales, medios de subsistencia y conservación*. Indonésia: Centro para la Investigación Forestal Internacional, p. 329-349.
- Souza-Formigoni MLO, Oliveira MGM, Monteiro MG, Da Silveira NG, Braz S, Carlini EA 1991. Antiulcerogenic effects of two *Maytenus* species in laboratory animals. *J Ethnopharmacol* 34: 21-27.
- Tiberti LA, Yariwake JH, Ndjoko K, Hostettmann K 2007. Identification of flavonols in leaves of *Maytenus ilicifolia* and *M. aquifolium* (Celastraceae) by LC/UV/MS analysis. *J Chromatogr B* 846: 378-384.
- Yariwake JH, Lanças FM, Cappelaro EA, Vasconcelos EC, Tiberti LA, Pereira AMS, Franca SC 2005. Variabilidade sazonal de constituintes químicos (triterpenos, flavonóides e polifenóis) das folhas de *Maytenus aquifolium* Mart (Celastraceae). *Rev Bras Farmacogn* 15: 162-168.