



Avaliação *in vitro* da atividade antioxidante do extrato hidroalcoólico de folhas de bardana

Adriene R. Lima, Valéria C. Barbosa, Plínio R. Santos Filho, Cibele M.C.P. Gouvêa*

Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Alfenas, Rua Gabriel Monteiro da Silva, 714, Centro, 37130-000, Alfenas, MG, Brasil

Artigo

RESUMO: A atividade antioxidante do extrato hidroalcoólico de folhas de bardana (EEB), das frações acetato de etila (ACE) e hexano (HEX) foi avaliada por meio de testes *in vitro*. O EEB e frações inibiram a peroxidação lipídica em homogeneizado de cérebro de rato, com IC₅₀ de 0,136 ± 0,015; 0,218 ± 0,049 e 0,628 ± 0,092 mg/mL para o EEB, ACE e HEX respectivamente. O EEB, ACE e HEX apresentaram atividade seqüestrante de radicais DPPH, com IC₅₀ de 0,029 ± 0,006; 0,089 ± 0,003 e 0,837 ± 0,160 mg/mL respectivamente. A capacidade antioxidante total do EEB foi significativamente maior (p<0,001) que a das frações sendo de 267,20; 55,49 e 50,02 mM de ácido ascórbico, respectivamente, para o EEB, ACE e HEX. O EEB apresentou 7,88 ± 0,25 % (m/m) de compostos fenólicos, que foi significativamente (p<0,001) diferente das ACE e HEX. Os resultados indicam que os extratos analisados apresentam atividade antioxidante, sendo que o EEB foi o mais eficiente. Este é o primeiro trabalho demonstrando a atividade antioxidante de folhas de bardana.

Unitermos: *Arctium lappa*, Asteraceae, antioxidante, TBARS, DPPH.

ABSTRACT: “*In vitro* evaluation of the antioxidant activity of the hydroalcoholic extract of leaves of bardana”. The antioxidant activity of the hydroalcoholic extract of leaves of bardana (EEB), the ethyl acetate (ACE) and hexane (HEX) fractions were evaluated by *in vitro* assays. The EEB and fractions inhibited the lipid peroxidation in rat brain homogenate, with IC₅₀ of 0.136 ± 0.015; 0.218 ± 0.049 and 0.628 ± 0.092 mg/mL for EEB, EAC and HEX respectively. The EEB, ACE and HEX presented DPPH radical scavenging-activity, with IC₅₀ of 0.029 ± 0.006; 0.089 ± 0.003 and 0.837 ± 0.160 mg/mL respectively. The total antioxidant capacity of the EEB was significantly (p<0.001) higher than the fractions, being 267.20; 55.49 and 50.02 mM of ascorbic acid, respectively for EEB, ACE and HEX. The ethanol extract presented 7.88 ± 0.25 % (w/w) of phenolic compounds that was significantly (p<0.001) different from the ACE and HEX fractions. The results indicate that the analyzed extracts present antioxidant activity, and the EEB was the most efficient. This is the first report on the antioxidant activity of bardana leaves.

Keywords: *Arctium lappa*, Asteraceae, antioxidant, TBARS, DPPH.

INTRODUÇÃO

A bardana (*Arctium lappa* Linne) é uma planta perene, originária da Europa, pertencente à família Asteraceae. Esta planta é conhecida mundialmente e propaga-se espontaneamente por todo o Brasil. Caracteriza-se por apresentar folhas grandes e flores arroxeadas, podendo chegar a 2,5 metros de altura. É também conhecida como erva-dos-tinheiros, pegamassa, capricho-de-carneiro e capricho-grande (Holetz et al., 2002).

No Brasil é cultivada em todo o território, tem crescimento vigoroso, sendo considerada uma espécie daninha em pomares e terrenos baldios na região sul. Antigamente era utilizada em mistura com outras ervas, para clarear a pele e tem hoje aplicações como depurativo e antiinflamatório (Holetz et al., 2002). Tem sido cultivada há muito tempo no Japão e Taiwan, onde é consumida *in natura* (Morita et al., 1993) e utilizada como bebida para hipertensão, gota, arteriosclerose, hepatite e outras

desordens inflamatórias (Lieber, 1994). As raízes são utilizadas, popularmente, como diurético e antipirético (Lin et al., 2002). A infusão das folhas também é utilizada com a mesma finalidade (Grases et al., 1994).

Trabalhos têm demonstrado que a bardana inibe a enzima conversora de angiotensina (Barbosa-Filho et al., 2006). Também, apresenta efeito hepato-protetor na administração crônica de etanol, contra carcinógenos e na prevenção de tumorigênese, provavelmente por apresentar lignanas com atividade antioxidante (Morita et al., 1984; Lin et al., 1996; Lin et al., 2000). Lin et al. (1996) relataram que *A. lappa* tem atividade antiinflamatória e seqüestrante de radicais livres. Tais efeitos têm sido atribuídos a alguns compostos predominantes em raízes e frutos da planta, como lignanas arctigenina (Umehara et al., 1996) e arctiina (Hirose et al., 2000). Wang e Yang (1993) relataram também a presença de daucosterol, matairesinol e lapaol em raízes e frutos. A importância dessa planta levou sua inclusão na Farmacopéia Brasileira primeira edição (Brandão et al., 2006).

* E-mail: cibelegouvea@hotmail.com, Tel. + 55-35-32991483

Os estudos prévios utilizam raízes e frutos de bardana e não há trabalhos demonstrando se as folhas de bardana apresentam atividade antioxidante. Assim, o presente trabalho teve como objetivo preparar e fracionar o extrato hidroalcoólico de folhas de bardana para avaliação, *in vitro*, da sua atividade antioxidante.

MATERIAL E MÉTODOS

Preparo e fracionamento do extrato de bardana

As folhas de bardana (*Arctium lappa* L., Asteraceae), coletadas em julho de 2005, no horto florestal da Universidade Federal de Lavras, foram secas em estufa com circulação de ar a 30 °C. A seguir, foram utilizadas 100 g de folhas secas para extração com etanol, por percolação, empregando-se uma mistura hidroalcoólica a 70% (v/v) (5 vezes de 20 min cada). O material foi filtrado e o filtrado foi concentrado em evaporador rotatório sob pressão reduzida, à temperatura de até 50 °C, até o volume final de 100 mL, obtendo-se o extrato etanólico bruto de bardana (EEB). Uma fração hexano (HEX) foi preparada por partição com n-hexano. A 50 mL de EEB foi adicionado n-hexano, em funil de separação, até a fase hexânica apresentar-se incolor. A fase hidroalcoólica resultante do processo anterior foi, então, particionada com acetato de etila em funil de separação, até que a fase acetato de etila se apresentasse incolor, resultando na fração acetato de etila (ACE) (Gegenheimer, 1990). O EEB e frações foram liofilizados. Para a utilização nos testes de atividade antioxidante, o EEB liofilizado foi ressuspense em água destilada ou solução salina e as frações em DMSO a 1% (v/v).

Determinação *in vitro* da peroxidação de lipídios de cérebro de ratos

A peroxidação lipídica foi determinada em homogeneizado de cérebro de rato, avaliando-se a formação de substâncias reativas com ácido tiobarbitúrico (TBARS), como descrito por Buege e Aust (1978). Foram utilizados 15 ratos machos Wistar, com 270 ± 20 g, obtidos no Biotério da UNIFAL-MG. O trabalho está de acordo com os princípios éticos na experimentação animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA) da UNIFAL-MG, em reunião no dia 8 de março de 2004.

O homogeneizado de cérebro foi preparado como descrito por Paula et al. (2005), com modificações. O cérebro foi coletado, pesado e homogeneizado em 3 volumes de PBS 0,1 M, pH 7,4, contendo 3,5-ditert-butil-4-hidróxi tolueno (BHT) 0,06% (m/v). Após a centrifugação da amostra, a 10.000 g, por 15 min, o sobrenadante foi coletado e a concentração de proteínas das amostras foi determinada pelo método de Peterson (1977). Alíquotas de homogeneizado contendo 2 mg

de proteínas foram colocadas em tubos de ensaio com concentrações diferentes do EEB e frações, separadamente. O volume das amostras foi completado para 1 mL com PBS e estas foram incubadas a 37 °C, por 30 min. A seguir foram adicionados 0,5 mL de ácido clorídrico a 25% (v/v) e 0,5 mL de ácido tiobarbitúrico a 1% (p/v). A mistura foi aquecida em água fervente por 15 min e resfriada em banho de gelo por 10 min. Foram acrescentados 2 mL de butanol e os tubos foram agitados vigorosamente em vórtex. Após a centrifugação a 10.000 g, por 15 min as TBARS foram determinadas por Abs₅₃₅, utilizando-se o malonaldeído (MDA) como padrão ($\epsilon = 1,56 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). O EEB e frações incubados sem homogeneizado de cérebro foram utilizados como branco, para cada concentração testada. Os resultados foram expressos como $\eta\text{mol MDA/mg proteína}$ em cada amostra. A atividade antioxidante foi calculada como porcentagem de inibição da peroxidação de lipídeos, segundo a equação:

Inibição da peroxidação lipídica

$$(\%) = \left(\frac{C_c - C_t}{C_c} \right) \times 100,$$

Onde, C_c é a concentração de MDA do controle, que não foi incubado com o EEB e frações e C_t a concentração nas amostras incubadas com diferentes concentrações do EEB e frações.

A concentração do extrato (mg/mL) necessária para inibir 50% da peroxidação lipídica (IC_{50}) foi calculada.

Atividade seqüestrante de radicais DPPH

A atividade seqüestrante de radicais DPPH (1,1-difenil-1,2-picril hidrazil) foi determinada de acordo com o método de Yen e Wu (1999), com modificações. Concentrações diferentes dos EEB e frações foram adicionadas a 200 μL de solução etanólica de DPPH (0,5 mM) e o volume final foi ajustado para 1 mL. A preparação foi incubada no escuro, sob temperatura ambiente por 30 min. Decorrido o tempo, a absorbância de cada solução foi determinada a 517 nm. As atividades seqüestrantes de DPPH do EEB e frações foram expressas em porcentagem, segundo a equação:

Atividade seqüestrante de DPPH

$$(\%) = 100 - \left[\left(\frac{A_c - A_t}{A_c} \right) \times 100 \right]$$

Onde, A_c é a absorbância do controle, que não foi incubado com o EEB e frações e A_t a absorbância das amostras incubadas com diferentes concentrações do EEB e frações.

A concentração do extrato (mg/mL) necessária para atingir 50% de atividade seqüestrante de radicais DPPH (IC_{50}) foi calculada.

Capacidade antioxidante total

A capacidade antioxidante total foi determinada pelo método do fosfomolibdênio, que se baseia na determinação espectrofotométrica da redução do Mo^{+4} a Mo^{+5} , com formação subsequente de fosfato de Mo^{+5} , que apresenta absorção máxima a 695 nm (Prieto et al., 1999). Aliquotas de 0,1 mL dos extratos (10 mg/mL) dissolvidas em água destilada (EEB) ou DMSO a 1% (frações) foram combinadas, em tubo eppendorf, com 1 mL da solução reagente (ácido sulfúrico 600 mM, fosfato de sódio 28 mM e molibdato de amônio 4 mM). Os tubos foram fechados e incubados a 95 °C por 90 min. Após resfriamento, à temperatura ambiente, foi determinada a absorbância a 695 nm. Foi utilizado ácido ascórbico como padrão e a capacidade antioxidante total foi expressa em equivalentes de ácido ascórbico.

Determinação de fenólicos totais

A concentração de fenólicos totais dos extratos foi determinada como descrito por Woisk e Salatino (1998). Amostras de 0,1 g do EEB e frações foram misturadas com 0,5 mL de reagente Folin-Ciocalteu diluído em água (1:10). Depois de 8 min, foram adicionados 0,4 mL de solução de carbonato de sódio a 4% (m/v) e os tubos foram mantidos no escuro à temperatura ambiente por 2 h. Decorrido o tempo a absorbância foi determinada a 740 nm. A concentração de fenólicos foi calculada utilizando-se ácido gálico como padrão.

Análise estatística

Os dados obtidos para os experimentos realizados representam a média seguida do erro padrão da média (EPM) e foram comparados por análise de variância pelo teste ANOVA, seguido do teste de Tukey-Kramer, quando $p < 0,05$.

RESULTADOS

Peroxidação lipídica em cérebro de ratos

Os resultados mostraram que o EEB e frações diminuíram a formação de MDA, indicando que houve inibição da peroxidação lipídica em cérebro de ratos. A inibição máxima obtida foi de 84,00 % com o EEB; 82,82 % com a fração ACE e de 67,74 % com a HEX e a IC_{50} foi de $0,136 \pm 0,015$; $0,218 \pm 0,049$ e $0,628 \pm 0,092$ mg/mL, respectivamente (Figura 1).

Atividade seqüestrante de radicais DPPH

O EEB e frações demonstraram atividade seqüestrante de radicais DPPH. O EEB apresentou atividade significativamente maior que as frações ($p < 0,05$). A atividade máxima para o EEB foi de 90,79

%; para a fração ACE foi de 90,05 % e para a HEX foi de 87,98 % e a IC_{50} foi de $0,029 \pm 0,006$; $0,089 \pm 0,003$ e $0,837 \pm 0,160$ mg/mL respectivamente (Figura 2).

Capacidade antioxidante total

A capacidade antioxidante total do extrato foi significativamente maior ($p < 0,001$) que a das frações. A capacidade antioxidante total do EEB, ACE e HEX foi, respectivamente, de 267,20; 55,49 e 50,02 mM de ácido ascórbico (Tabela 1).

Fenólicos totais

O EEB apresentou $7,88 \pm 0,25$ % (m/m) de compostos fenólicos, que foi significativamente ($p < 0,001$) diferente das frações ACE e HEX (Tabela 1).

DISCUSSÃO

Desde o início da vida no planeta, a toxicidade do oxigênio atmosférico tem sido o principal desafio à sobrevivência dos organismos vivos. O O_2 participa de reações de óxido-redução e é o aceptor final de H^+ no metabolismo normal de mamíferos. As oxidações biológicas geram espécies reativas de oxigênio e radicais livres que podem provocar lesões celulares, muitas vezes irreparáveis. O estresse oxidativo leva a danos a lipídeos, DNA, proteínas e organelas celulares, como mitocôndria e membranas, provocando alterações da estrutura e função celulares, que levam ao desenvolvimento de câncer, envelhecimento precoce, doenças cardiovasculares, degenerativas, neurológicas entre outras. A produção contínua de radicais livres durante os processos metabólicos levou ao desenvolvimento de muitos mecanismos de defesa antioxidante responsáveis pela inibição e redução das lesões causadas pelos radicais livres nas células (Gouvêa, 2004).

Os antioxidantes não-enzimáticos incluem o ácido ascórbico, vitamina E, carotenóides, compostos fenólicos e polifenólicos, além de outros (Bianchi e Antunes, 1999). A atividade antioxidante de compostos vegetais pode ser atribuída a vários mecanismos, como a prevenção da peroxidação lipídica e capacidade seqüestrante de radicais livres (Kaur; Geetha, 2006).

O extrato aquoso, etanólico e metanólico de raízes e frutos de bardana têm demonstrado atividade antioxidante (Lin et al., 1996; Lin et al., 2000; 2002). Contudo, a atividade antioxidante das folhas ainda não está estabelecida. Neste estudo avaliou-se a atividade antioxidante do extrato hidroalcoólico de folhas de bardana (EEB) e frações, *in vitro*, abordagem mais indicada para verificação da atividade antioxidante potencial de um extrato vegetal.

Nesse trabalho verificou-se que o EEB e frações diminuíram a peroxidação lipídica. A lipoperoxidação é caracteristicamente uma reação em cadeia iniciada

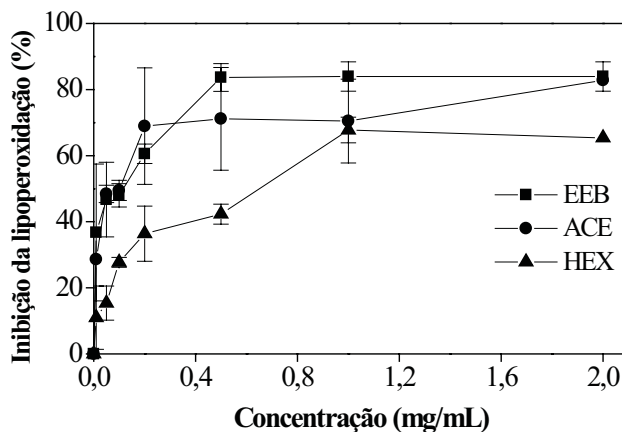


Figura 1. Porcentagem de inibição da peroxidação lipídica em cérebro de ratos do extrato hidroalcoólico de bardana (EEB), fração acetato de etila (ACE) e fração hexano (HEX). A IC_{50} foi de $0,136 \pm 0,015$; $0,218 \pm 0,049$ e $0,628 \pm 0,092$ mg/mL para o EEB, ACE e HEX respectivamente. Os resultados representam a média \pm erro padrão da média (n=3).

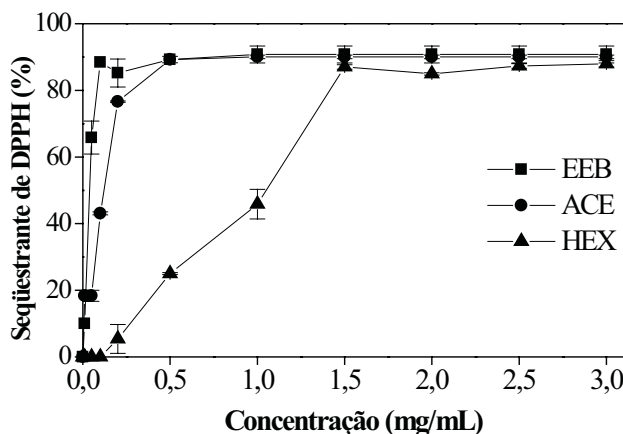


Figura 2. Atividade seqüestrante de radicais DPPH do extrato hidroalcoólico de bardana (EEB), fração acetato de etila (ACE) e fração hexano (HEX). A IC_{50} foi de $0,029 \pm 0,006$; $0,089 \pm 0,003$ e $0,837 \pm 0,160$ mg/mL para o EEB, ACE e HEX respectivamente. Os resultados representam a média \pm erro padrão da média (n=3).

Tabela 1. Capacidade antioxidante total e conteúdo de compostos fenólicos do extrato hidroalcoólico de bardana (EEB), da fração acetato de etila (ACE) e fração hexano (HEX).

Fração	Capacidade antioxidante total (mM de ácido ascórbico)	Fenólicos totais (% m/m)
EEB	267,2 ^a	7,88 \pm 0,25 ^a
ACE	55,49 ^b	1,02 \pm 0,05 ^b
HEX	50,02 ^b	0,59 \pm 0,05 ^b

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ($p < 0,001$) pelo teste de Tukey-Kramer.

pela abstração de um átomo de hidrogênio de um ácido graxo poliinsaturado por um radical livre. A peroxidação lipídica pode formar radicais que propagam a reação peroxidativa e carbonilas tóxicas como o malonaldeído, que é citotóxico e pode lesar o DNA (Esterbauer, 1993). Assim, o extrato de bardana pode ser um auxiliar na prevenção e combate aos danos celulares causados pela peroxidação lipídica.

A avaliação da capacidade sequestrante de radicais DPPH mostrou que o EEB e frações apresentam atividade antioxidante, sendo o EEB mais potente. O mecanismo de redução de radicais livres DPPH envolve a doação de hidrogênio. Neste sistema tanto a estrutura planar como espacial do composto antioxidante é importante. Baseado em dados da literatura é possível inferir que a potente atividade antioxidante de extratos polares é dada pela presença de substâncias com hidroxilas (Harborne e Williams, 2001; Mensor et al., 2001). Os resultados deste trabalho indicam que o extrato de folhas de bardana e frações apresentam capacidade para doar hidrogênio, pois apresentaram atividade sequestrante de DPPH.

Os compostos fenólicos presentes em vegetais têm recebido considerável atenção por serem os principais componentes com atividade antioxidante, embora não sejam os únicos. A atividade antioxidante de compostos fenólicos tem sido atribuída às suas propriedades de óxido-redução, que desempenham importante papel na adsorção ou neutralização de radicais livres (Basile et al., 2005). O EEB e frações apresentam compostos fenólicos, o que pode contribuir, pelo menos em parte, para a atividade antioxidante demonstrada neste estudo. O conteúdo de fenólicos foi maior no EEB, o que pode contribuir para atividade antioxidante mais potente que as frações. Ainda, a complexação do Fe^{+2} a compostos fenólicos pode reduzir a disponibilidade deste metal envolvido na reação de Fenton e que participa tanto na iniciação como na propagação da peroxidação lipídica. Dessa forma, o conteúdo de compostos fenólicos do EEB pode ter contribuído para o melhor efeito deste extrato na inibição da peroxidação lipídica, verificada no presente trabalho.

Concluindo, o extrato de folhas de bardana apresenta atividade antioxidante, podendo atuar como sequestrante ou por meio da redução de radicais livres e inibição da peroxidação lipídica, o que pode contribuir para a prevenção ou redução do desenvolvimento de patologias associadas ao estresse oxidativo. Para que os dados do presente trabalho sejam confirmados é importante que seja realizado estudo *in vivo* com o EEB e posterior fracionamento do extrato para determinação das substâncias ativas.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. José Eduardo Brasil Filho da UFPA, por ter cedido as folhas de bardana.

REFERÊNCIAS

- Barbosa-Filho JM, Martins VKM, Rabelo LA, Moura MD, Silva MS, Cunha EVL, Souza MFV, Almeida RN, Medeiros IA 2006. Natural products inhibitors of the angiotensin converting enzyme (ACE). A review between 1980-2000. *Rev Bras Farmacogn* 16: 421-446.
- Basile A, Ferrara L, Del Pozzo M, Mele G, Sorbo S, Bassi P, Montesano D 2005. Antibacterial and antioxidant activities of ethanol extract from *Paullinia cupana* Mart. *J Ethnopharmacol* 102: 32-36.
- Bianchi MLP, Antunes LMG 1999. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. *Rev Nutr* 12: 123-130.
- Brandão MGL, Cosenza GP, Moreira RA, Monte-Mor RLM 2006. Medicinal plants and other botanical products from the Brazilian Official Pharmacopoeia. *Rev Bras Farmacogn* 16: 408-420.
- Buege JA, Aust SD 1978. Microsomal lipid peroxidation. *Meth Enzymol* 52: 302-310.
- Esterbauer H 1993. Cytotoxicity and genotoxicity of lipid-oxidation products. *Am J Clin Nutr* 57: 779S-785S.
- Gegenheimer P 1990. Preparation of extracts from plants. *Methods Enzymol* 182: 174-193.
- Gouvêa CMCP 2004. Oxidações biológicas e atividade vegetal. In: *Fitoterápicos anti-inflamatórios: aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas*. Carvalho, J.C.T. coord. Ribeirão Preto: Tecmedd, p. 101-124.
- Grases F, Melero G, Costa-Bauza A, Prieto R, March JG 1994. Urolithiasis and phytotherapy. *Int Urol Nephrol* 26: 507-511.
- Harborne JB, Williams CA 2001. Anthocyanins and other flavonoids. *Nat Prod Rep* 18: 310-333.
- Hirose M, Yamaguchi T, Lin C, Kimoto N, Futakuchi M, Kono T, Nishibe S, Shirai T 2000. Effects of arctiin on PhIP-induced mammary, colon and pancreatic carcinogenesis in female Sprague-Dawley rats and MeIQx-induced hepatocarcinogenesis in male F344 rats. *Cancer Lett* 155: 79-88.
- Holetz FB, Pessini GL, Sanches NR, Cortez DA, Nakamura CV, Filho BP 2002. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. *Mem I Oswaldo Cruz* 97: 1027-1031.
- Kaur IP, Geetha T 2006. Screening methods for antioxidants-a review. *Mini Rev Med Chem* 6: 305-312.
- Lieber CS 1994. Alcohol and the liver: 1994 update. *Gastroenterology* 106: 1085-1105.
- Lin SC, Chung TC, Lin CC, Ueng TH, Lin YH, Lin SY, Wang L 2000. Hepatoprotective effects of *Arctium lappa* on carbon tetrachloride- and acetaminophen-induced liver damage. *Am J Chin Med* 28: 163-173.
- Lin SC, Lin CH, Lin CC, Lin YH, Chen CF, Chen IC, Wang LY 2002. Hepatoprotective effects of *Arctium lappa* Linne on liver injuries induced by chronic ethanol consumption and potentiated by carbon tetrachloride. *J Biomed Sci* 9: 401-409.
- Lin CC, Lu JM, Yang JJ, Chuang SC, Ujiie T 1996. Anti-inflammatory and radical scavenge effects of *Arctium lappa*. *Am J Chin Med* 24: 127-137.
- Mensor LL, Menezes FS, Leitão GG, Reis AS, Santos TC, Coube CS 2001. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical

- method. *Phytother Res* 15: 27-30.
- Morita K, Kada T, Namiki M 1984. A desmutagenic factor isolated from burdock (*Arctium lappa* Linne). *Mutat Res* 129: 25-31.
- Morita T, Ebihara K, Kiriyama S 1993. Dietary fiber and fat-derivatives prevent mineral oil toxicity in rats by the same mechanism. *J Nutr* 123: 1575-1585.
- Paula FBA, Gouvea CMCP, Alfredo PP, Salgado I 2005. Protective action of a hexane crude extract of *Pterodon emarginatus* fruits against oxidative and nitrosative stress induced by acute exercise in rats. *BMC Complement Altern Med* 5: 17
- Peterson GL 1977. A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Anal Biochem* 83: 346-356.
- Prieto P, Pineda M, Aguilar M 1999. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. *Anal Biochem* 269: 337-341.
- Umehara K, Nakamura M, Miyase T, Kuroyanagi M, Ueno A 1996. Studies on differentiation inducers: VI. Lignan derivatives from *Arctium fructus*. *Chem Pharm Bull* 44: 2300-2304.
- Wang HY, Yang JS 1993. Studies on the chemical constituents of *Arctium lappa* L. *Yao Xue Xue Bao* 28: 911-917.
- Woisk RG, Salatino A 1998. Analisis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. *J Apicult Res* 37: 99-105.
- Yen G, WU J. 1999 Antioxidant and radical scavenging properties of extracts from *Ganoderma tsugae*. *Food Chem* 65: 375-379.