

Avaliação do efeito de polietilenoglicóis no perfil de extratos de *Mikania glomerata* Spreng., Asteraceae, e *Passiflora edulis* Sims, Passifloraceae

Jorge de Medeiros, Luiz Alberto Kanis*

Grupo de Desenvolvimento em Tecnologia Farmacêutica, Universidade do Sul de Santa Catarina.
Av. José Acácio Moreira, 787, 88704-900 Bairro Dehon, Tubarão-SC, Brasil.

RESUMO: Os polietilenoglicóis (PEG) são polímeros hidrossolúveis capazes de reduzir a constante dielétrica de solventes como a água, e assim são utilizados como cossolventes para solubilização de diferentes fármacos. Atualmente, o PEG tem sido empregado satisfatoriamente na obtenção de extratos de matérias-primas vegetais por favorecer a extração de substâncias com polaridades semelhantes às extraídas pelos solventes hidroetanólicos. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da concentração e da massa molar de PEG (400 e 4000 g/mol) sobre a extração de flavonoides totais a partir de *Passiflora edulis* Sims, Passifloraceae, (maracujá) e de cumarina a partir da *Mikania glomerata* Spreng., Asteraceae, (guaco). Este estudo revelou que o aumento da concentração de PEG promoveu um aumento na capacidade extrativa de flavonoides totais e cumarina a partir da *Passiflora edulis* e *Mikania glomerata* respectivamente, comportamento atribuído a alterações da constante dielétrica. Apesar de elevar a capacidade extrativa, os líquidos extratores contendo PEG exigiram elevada relação planta:solvente para alcançar teores extrativos semelhante ao solvente hidroetanólico utilizado, com exceção da extração de flavonoides totais com PEG 4000 g/mol a partir da *Passiflora edulis*.

Unitermos: Polietilenoglicol, extração, *Passiflora edulis*, *Mikania glomerata*.

ABSTRACT: "Evaluation of PEG effects on the extracts obtaining from *Passiflora edulis* Sims, Passifloraceae, and *Mikania glomerata* Spreng., Asteraceae". Polyethylene glycols (PEG) are hydrosoluble polymers able to reduce dielectric constant of solvents like water and are used as cosolvents to enhance the aqueous solubility of several drugs. Actually, the PEG has been successfully applied to obtain extracts of plant raw material once can facilitate the extraction of substances with polarities similar to those extracted by hydroethanol solvents. In this study, the objective was to evaluate the effect of PEG concentration and molecular weight (400 and 4000 g/mol) on the extraction of total flavonoids from *Passiflora edulis* Sims, Passifloraceae, and coumarin from *Mikania glomerata* Spreng., Asteraceae. The results showed that increasing PEG concentration promoted an increase in the extractive capacity of total flavonoid and coumarin from *Passiflora edulis* and *Mikania glomerata* respectively. This behavior was attributed to changes in dielectric constant. Despite raising the extractive capacity, the solvent containing PEG required high plant/solvent ratio to reach levels similar to hydroethanol solvents used, except for the extraction of total flavonoids from *Passiflora edulis* using PEG 4000 g/mol.

Keywords: Polyethylene glycol, extraction, *Passiflora edulis*, *Mikania glomerata*.

INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas é crescente o desenvolvimento de técnicas para extrair de plantas com fins medicinais seus ativos de maior valor (Di Stasi, 1996; Vale, 2002). O método mais comumente usado é a extração com solventes líquidos, um processo dependente de fatores como solubilidade dos constituintes fitoquímicos e fatores inerentes ao processo como, por exemplo, temperatura e agitação do meio, polaridade e toxicidade dos solventes

(Bazykina et al., 2002; Simões et al., 2003). As diferentes classes de compostos existentes nas plantas apresentam diferentes polaridades, fato que possibilita selecionar a extração de substâncias ou classes que possuem atividade biológica de interesse dependendo do sistema extração/solvente escolhido (Maciel et al., 2002; Cechinel & Yunes, 1998). A eficiência na extração de princípios ativos a partir de plantas é dependente principalmente da solubilidade destes nos solventes empregados (Gnoatto et al., 2007; Simões et al., 2003). Na maior parte dos processos de

obtenção de extratos líquidos para aplicação na indústria farmacêutica os solventes utilizados são diferentes misturas entre água e etanol. A presença do etanol favorece a extração de substâncias de polaridade intermediária devido a sua reduzida constante dielétrica (24,30) quando comparada com a água (78,36). Entretanto, com a redução dos níveis de etanol aceitos em produtos farmacêuticos, a concentração final destes nos extratos tem que ser reduzida (Anvisa, 2001; Lund, 1994). A não adição de etanol dificulta a obtenção de extratos líquidos com elevada concentração de determinados ativos, por outro lado, se adicionado e extraído posteriormente para a adequação ao teor permitido em produtos farmacêuticos é observado precipitação de substâncias extraídas, alterando a estabilidade do extrato e consequentemente inviabilizando a produção de soluções fitoterápicas.

Como alternativa existe a possibilidade de utilização de outros cossolventes ou carreadores hidrofílicos como, por exemplo, propilenoglicol, sorbitol, glicerol e os polietilenoglicóis (Rodrigues et al., 2004; Ardisson et al., 2002; Aboy et al., 2000). O PEG é um polímero derivado do etilenoglicol disponível em várias massas molares, apresenta ótima solubilidade em água, é biodegradável e não tóxico (Harris, 1992); classificado também como um surfactante não-iônico, e empregado como cossolvente para inúmeros fármacos (Chaudhari et al., 2007; Chen et al., 2005). Estudos tem demonstrado que a adição de PEG em sistemas contendo drogas hidrofóbicas tem influenciado significativamente na solubilização das mesmas em meio aquoso, fato associado principalmente a sua reduzida constante dielétrica quando comparada aos outros cossolvente já citados (Chaudhari et al., 2007; Liu et al., 2005), entretanto, poucos são os estudos que avaliam o efeito deste polímero na extração de ativos a partir de plantas medicinais.

Neste trabalho foi estudado o efeito da concentração de PEG de duas massas molares no solvente extrator água sobre o teor dos marcadores químicos 1,2 benzopirona (cumarina) de extratos obtidos a partir da *Mikania glomerata* Spreng., Asteraceae, e flavonoides totais de extratos obtidos a partir da *Passiflora edulis* Sims, Passifloraceae (Anvisa, 2004).

MATERIAL E MÉTODOS

Os reagentes e solventes utilizados foram água ultrapura (Millipore-USA), acetonitrila, metanol e ácido Fórmico (Vetec Química Fina LTDA); ácido acético, ácido oxálico e ácido bórico (CAQ Ltda), etanol (Quimex Ltda); polietilenoglicol 400 e 4000 g/mol (Importadora Química Delaware Ltda). Padrões secundários de 1,2-benzopirona (cumarina) e isovitexina (Chromadex S.A-USA). Folhas secas de *Mikania glomerata* Spreng., Asteraceae, e *Passiflora edulis* Sims, Passifloraceae (Quimer Ltda).

Processos extrativos

Maceração dinâmica: Amostras de *Mikania glomerata* e *Passiflora edulis* foram mantidas em maceração sob agitação constante por 24 h na presença de água, mistura água:etanol 1:1 (v/v) e solução aquosa de PEG nas concentrações de 5, 15 e 30% de massas molares 400 e 4000 g/mol. As relações planta:solvente (m:v) testadas foram respectivamente 1:4, 1:6, 1:8, 1:10 e 1:12.

Determinação do teor de cumarina nos extratos

O teor de cumarina nos extratos de *Mikania glomerata* foi determinado por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), utilizando equipamento composto por bomba Shimadzu-LC 10AD; sistema de dados LC-Work Station Class LC-10; detector UV Shimadzu-SPD 10A e forno CTO10AS. Fase móvel acetonitrila:água (40:60 v/v), fluxo 1,0 mL/min, temperatura de 40 °C, detecção em 274 nm, coluna Supelcosil LC₁₈, 15 cm x 4,6 mm, 5 µm, injetor manual, volume injetado de 20 µL (Silva et al., 2008; Celeghini et al., 2001).

Determinação do teor de flavonoides totais nos extratos

A determinação de flavonoides totais nos extratos de *Passiflora edulis* foi realizada pela complexação com ácido bórico conforme método descrito na British Pharmacopoeia (2004) para *Passiflora incarnata*. Para obtenção da solução teste 0,5 mL dos extratos foram evaporados até secura sob pressão reduzida, e o resíduo dissolvido com 10 mL de uma mistura de 10 volumes de metanol R e 100 volumes de ácido acético glacial. O resíduo dissolvido foi transferido para balão volumétrico de 25 mL, adicionando 10 mL de uma solução a 25 g/L de ácido bórico R e 20 g/L de ácido oxálico R em ácido fórmico anidro R e o volume foi completado com ácido acético anidro. Para solução de compensação foi repetido o procedimento citado acima sem a adição da solução de ácido bórico e ácido oxálico. Decorridos 30 min as soluções obtidas tiveram suas absorvâncias determinadas em 401 nm utilizando um espectrofotômetro UV/Vis Hitachi modelo U-2010. O cálculo do teor de flavonoides totais expressos como vitexina foi determinado tomando como referência a absortividade específica de 628.

Capacidade extrativa de cumarina e flavonoides totais

Para determinar a quantidade total de cumarina na matéria prima vegetal *Mikania glomerata*, amostra de 1 g de planta foi mantida em agitação constante com 100 mL de etanol 50% por 24 h. A quantificação foi realizada por CLAE conforme descrito em "Determinação do teor de cumarina nos extratos". Para *Passiflora edulis* 0,200 g foram mantidos em refluxo com etanol 60% durante 30

min, o extrato obtido foi filtrado e o volume completado para 100 mL com o mesmo solvente. O teor de flavonoides totais foi determinado conforme item “Determinação do teor de flavonoides totais nos extratos”.

A capacidade extrativa de flavonoides totais e cumarina para cada solvente extrator foi calculada em função da quantidade total destes na matéria prima vegetal segundo as equações 1 e 2 respectivamente.

$$\% = \frac{A \times 686,4 \times FD}{m} \quad \text{Eq. (1)}$$

$$\% = A \times 16,2 \times 10^{-6} \times FD \quad \text{Eq. (2)}$$

Onde, na equação 1, *A* é a absorvância obtida, *FD* é o fator de diluição da amostra, *m* é a massa da planta (mg). Para equação 2, *A* corresponde a área do cromatograma.

Perfil cromatográfico dos extratos de *Passiflora edulis*

Foram obtidos os perfis cromatográficos por CLAE dos extratos de *Passiflora edulis* na relação planta:solvente 1:12 com os solventes apresentados no item “Processos extrativos”. Foi utilizado sistema gradiente adaptado de Muller et al. (2005) de fase móvel: A (água:ácido acético 0,5%), B (metanol 58%:acetonitrila 42%) (v/v). Com programação tempo (min): concentração de B (%) = 1 min: 25%; 16 min: 38%; 18 min: 45%; 20 min: 25%; fluxo 0,7 mL/min, temperatura de 40 °C, detecção em UV 340 nm, coluna Supelcosil LC₁₈, 15 cm x 4,6 mm, 5 µm, volume injetado de 20 µL.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Figura 1 estão apresentados os percentuais de cumarina extraída a partir do total existente na matéria-prima vegetal de *Mikania glomerata* Spreng., Asteraceae, obtidos por maceração dinâmica com água, etanol:água (1:1), e soluções aquosas de PEG com massas molares de 400 e 4000 g/mol (Figuras 1A e 1B respectivamente) em função da relação planta:solvente.

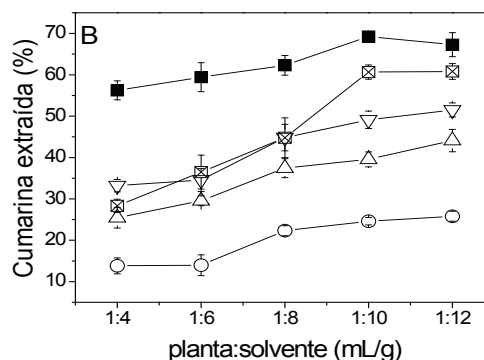
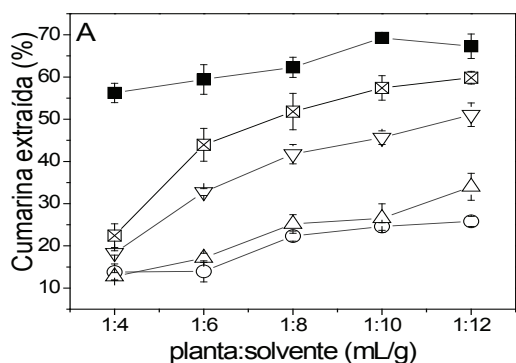


Figura 1. Teor de cumarina extraído a partir da *Mikania glomerata* em função do volume de solvente. A: PEG 400 g/mol; B: PEG 4000 g/mol. Etanol:água (1:1) (■); Água (○); PEG 5% (△); PEG 15% (▽); PEG 30% (⊠).

Os resultados demonstram que o máximo de cumarina extraída com o solvente água é aproximadamente 20% do total existente na planta e isto ocorre apenas na condição de uma parte de planta para doze partes de solvente, fato atribuído a baixa solubilidade da cumarina em água (Cohen, 1979) Inserir referência. A adição de 50% de etanol ao líquido extrator promove um incremento considerável na capacidade extrativa da cumarina, alcançando 55% quando na relação planta:solvente de 1:4 e aumentando para 65% quando na relação 1:10. A adição de 5% de PEG 400 g/mol à água não promoveu grandes mudanças sobre a extração de cumarina, contudo, a adição de 15 e 30% levou a um aumento significativo na capacidade extrativa sendo este progressivo em função do aumento da quantidade do solvente. O aumento da massa molar do PEG 400 para 4000 g/mol demonstrou incrementar significativamente ($p < 0,01$) a extração de cumarina na concentração de 5% do polímero. A adição de 15 e 30% de PEG 4000 g/mol promoveu aumento significativo ($p < 0,01$) da extração de cumarina quando comparado ao PEG 400 g/mol somente na relação planta:solvente 1:4, nas demais relações não foram observadas diferenças significativas.

O teor de flavonoides totais expressos como vitexina determinado para cada solvente foi realizado utilizando a técnica descrita na British Farmacopéia devido o ácido bórico formar complexo com flavonoides que possuem o grupo catecol, como a vitexina, orientina e isovitexina, flavonoides encontrados na *Passiflora edulis* Sims, Passifloraceae (Hostettman et al., 1984).

Na Figura 2 estão apresentados os resultados do teor de flavonoides totais de extratos obtidos a partir das folhas de *Passiflora edulis* em função da variação da relação planta:solvente e de diferentes solventes extrativos.

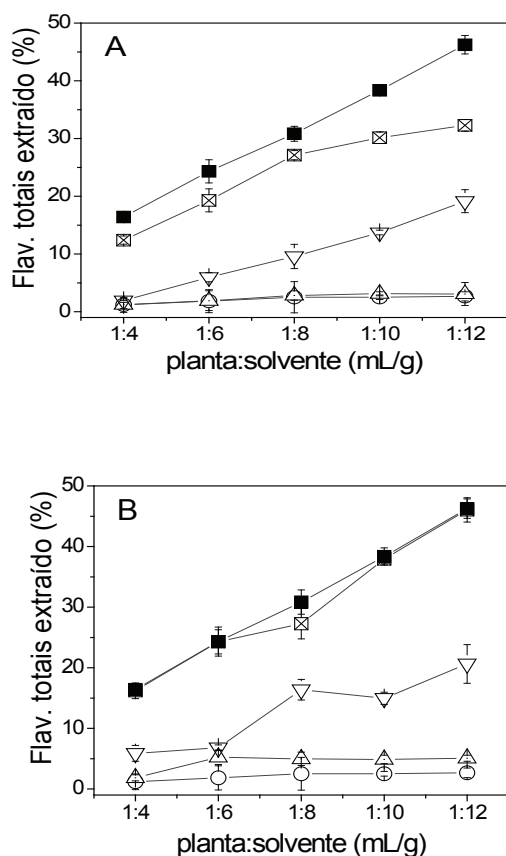


Figura 2. Teor de flavonoides totais extraídos a partir de *Passiflora edulis* em função do volume de solvente. PEG 400 g/mol (A); PEG 4000 g/mol (B). Etanol:água (1:1) (■); Água (○); PEG 5% (Δ); PEG 15% (▽); PEG 30% (⊠).

Assim como para a cumarina a quantidade de flavonoides extraída aumenta com o aumento do teor de ambas massas molares de PEG no solvente extrator. A água mostrou-se como o pior solvente para extração dos flavonoides e a adição de 5% de PEG de ambos os pesos moleculares testados não promoveram aumento significativo ($p < 0,01$) na capacidade extrativa em nenhuma relação planta:solvente, entretanto, o aumento para 30% de PEG de massa molar 4000 g/mol demonstrou resultados semelhantes ao obtido com etanol:água (1:1).

A extração de substâncias a partir de matérias primas vegetais ocorre principalmente pela solubilização destas no solvente extrator processo que é governado principalmente pela constante dielétrica do solvente e também por interações que podem ocorrer entre este e a substância a ser extraída (Simões et al., 2003; Florence & Atwood, 2003). A variação do teor extrativo de cumarina e flavonoides totais na relação planta:solvente 1:12, em função do teor de PEG 400 g/mol no solvente extrator e respectivas constantes dielétricas estão apresentados na Tabela 1. As constantes dielétricas da água (78,36), etanol (24,30) e PEG 400 (12,40) foram coletadas da literatura e

para as misturas de solventes (ϵ_m) foram calculadas a partir da relação $\epsilon_m = \epsilon_a f_a + \epsilon_p f_p$, onde ϵ e f são a constante dielétrica e fração de volume do solvente e cossolvente respectivamente e os subscritos “a” e “p” são água e PEG respectivamente (Babu et al., 2008; Lund, 1994). O PEG 4000 g/mol, é um polímero de estado físico sólido nesta massa molar e é classificado como um carreador hidrofílico, razão pela qual não existe a constante dielétrica deste polímero nesta massa molar.

Tabela 1. Teor extrativo de cumarina e flavonoides totais a partir do guaco e maracujá respectivamente na relação planta:solvente 1:12 e constantes dielétricas dos líquidos extratores.

Solvente	Constante dielétrica	Cumarina extraída <i>M. glomerata</i> (%)	Flavonoides totais extraídos da <i>P. edulis</i> (%)
Etanol:água (1:1)	51,33	67,3±0,9	46,2±0,5
Água	78,36	25,8±1,3	2,7±0,3
PEG 400 5%	75,06	34,0±0,9	3,1±0,3
PEG 400 15%	68,46	51,1±0,7	19,1±2,10
PEG 400 30%	58,77	59,8±1,4	32,3±0,4
PEG 4000 5%	*	44,1±1,3	5,1±0,6
PEG 4000 15%	*	51,5±0,8	20,6±0,3
PEG 4000 30%	*	60,8±1,2	46,0±0,4

*não determinados

Os resultados apresentados na Tabela 1 demonstram que a adição de PEG 400 g/mol a água promove uma redução da constante dielétrica teórica deste solvente, alterando de 78,36 para 58,77 quando da adição de 30% de PEG 400 g/mol. Tanto a capacidade extrativa dos flavonoides totais como da cumarina a partir das plantas estudadas demonstraram-se dependente desta propriedade.

A capacidade extrativa de flavonoides do solvente extrator água foi dez vezes menor que para a cumarina, substância classificada como “pouco solúvel em água”, indicativo de que a maioria dos flavonoides apresentam baixa solubilidade em água. Os principais flavonoides existentes na *Passiflora edulis* são os glicosídeos isovitexina, vitexina, isoorientina, orientina e rutina, moléculas polares, mas classificadas como “pouco solúveis” em água, e em maior quantidade flavonoides de polaridade intermediária como as luteolinas, moléculas classificadas como “muito pouco solúveis”, mas em geral todos apresentam boa solubilidade em solventes como o etanol e metanol e em combinações desses solventes com água, fato justifica a elevada extração com etanol:água (1:1) e a reduzida extração com água, apenas 2,7% (Oyvind & Kenneth, 2006; Pereira et al., 2004; Pereira & Vilegas, 2000; Farmacopéia Brasileira, 1988). A adição de 30% de PEG 400 e 4000 g/mol a água promoveu uma extração 2,3 vezes maior que água pura de cumarina

para ambas as massas molares, porém para a extração de flavonoides totais o efeito foi mais expressivo, alcançando uma extração 12,0 e 17,0 vezes maior respectivamente.

O PEG é um polímero que forma uma mistura homogênea com água, comportamento atribuído ao fato de sua estrutura (HO-(CH₂CH₂O)_n-H) possuir hidroxilas e átomos de oxigênio, que por interações via ligação de hidrogênio facilitam sua miscibilidade com este solvente (Chaudhari et al., 2007). As regiões polares do PEG são afastadas por regiões hidrofóbicas de Carbono-Hidrogênio as quais quando ligadas a água acabam reduzindo o momento dipolar desta (Chaudhari et al., 2007) e ainda proporcionam a formação de cavidades no solvente que acomodam o solutos de menor polaridade (Florence & Atwood, 2003) que pretendem ser extraídos.

Babu et al. (2008), sugere que a solubilização de substâncias de baixa solubilidade em água neste cossolvente é governada principalmente por interações hidrofóbicas que ocorrem com o grupo metileno do polímero, entretanto, a maior efetividade dos PEG na extração dos flavonoides pode estar associada não somente à ligações hidrofóbicas ou redução da tensão interfacial soluto-solvente, mas também devido à presença de elevado número de hidroxilas nas estruturas dos flavonoides, fato que facilita a formação de ligações de hidrogênio com o PEG.

O PEG 4000 g/mol é classificado como um carreador hidrofílico e sua diferença com PEG 400 g/mol é o número de unidades de etileno glicol na cadeia polimérica. O aumento de unidades favorece formação de regiões de menor polaridade, o que reduz ainda mais a tensão interfacial entre solutos menos solúveis com o meio aquoso, efeito observado para extração dos flavonoides na concentração de 30%, porém não para extração de cumarina.

Na produção de extratos além da eficiência extrativa dos ativos é importante que o perfil químico do extrato não seja significativamente alterado quando comparado com os solventes usualmente utilizados na produção do extrato. Os flavonoides, substâncias de interesse para o desenvolvimento de produtos a partir do gênero *Passiflora*, apresentam intensa absorção aproximadamente em 350 nm devido à presença de ligações duplas conjugadas com os anéis aromáticos (Markham, 1982). Desta forma, a obtenção do perfil cromatográfico nesta região do espectro serve para qualificar e comparar os extratos obtidos. Na figura 3 estão apresentados os cromatogramas obtidos por CLAE para os diferentes extratos de *Passiflora edulis*, na relação planta:solvente 1:12 em 340 nm.

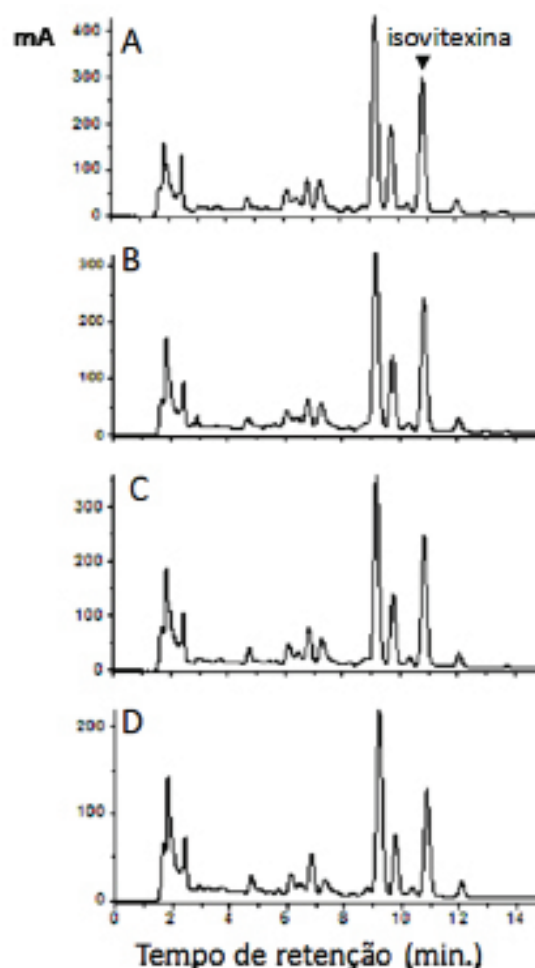


Figura 3. Perfis cromatográficos dos extratos de *Passiflora edulis* na relação planta:solvente 1:12. A-Extrato etanol:água (1:1); B-Extrato com PEG 4000 30%; C-Extrato com PEG 400 30%; D-Extrato aquoso.

Os resultados demonstram semelhanças qualitativas nos perfis cromatográficos obtidos neste comprimento de onda entre o extrato hidroetanólico e aqueles obtidos com PEG/água para *Passiflora edulis*. Este comportamento é indicativo de que os flavonoides que absorvem neste comprimento de onda e que são extraídos com solventes hidroetanólicos também podem ser extraídos com misturas de água/PEG. Foram observadas alterações quantitativas das substâncias químicas detectadas neste comprimento de onda, fato associado à alteração da constante dielétrica do líquido extrator.

Os cromatogramas dos extratos obtidos a partir da *Mikania glomerata* utilizando PEG, assim como para a *Passiflora edulis*, demonstraram perfil químico semelhante ao obtido com o solvente hidroetanólico, conforme Figura 4. Entretanto, além das diferenças quantitativas na extração de cumarina, também foi observado um aumento da extração de substâncias mais hidrofílicas que aparecem entre um e dois minutos nos cromatogramas dos extratos obtidos com PEG de ambas massas molares.

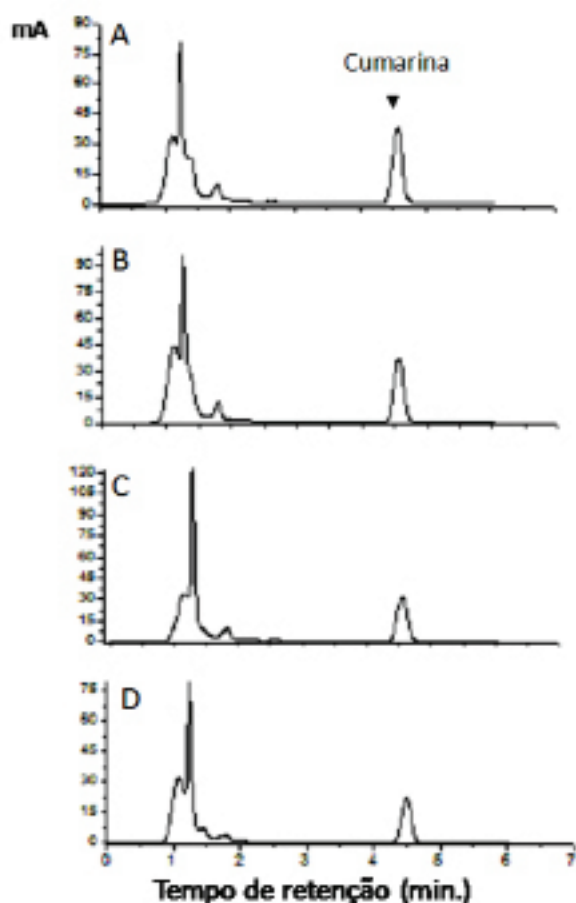


Figura 4. Perfis cromatográficos dos extratos de *Mikania glomerata* na relação planta:solvente 1:12, A-Extrato etanol:água (1:1); B-Extrato com PEG 4000 30%; C-Extrato com PEG 400 30%; D-Extrato aquoso.

CONCLUSÃO

Os resultados confirmam a potencialidade de utilização do PEG para obtenção de extratos vegetais líquidos, fato atribuído a capacidade do PEG em reduzir a constante dielétrica do líquido extrator. Os extratos de *Mikania glomerata* Spreng., Asteraceae, e *Passiflora edulis* Sims, Passifloraceae, obtidos empregando PEG apresentaram teor de marcador químico e eficiência de extração semelhante aqueles obtidos pelo solvente hidroetanólico, com a vantagem de serem isentos de etanol.

REFERÊNCIAS

- Aboy AL, Ortega GG, Petrovick PR, Langeloh A, Bassani VL 2000. Desenvolvimento tecnológico de soluções extrativas de *Mikania glomerata* Sprengel (Asteraceae), guaco. *Rev Bras Cienc Farm* 36: 165-172.
- Agência Nacional de Vigilância Sanitária 2001. RE nº 543 de 19 de abril. Determina a imediata proibição da presença do etanol na composição dos referidos medicamentos. Diário Oficial da União, de 20 abril 2001.
- Agência Nacional de Vigilância Sanitária 2004. RDC nº 89, de 16 de março. Determina a publicação da Lista de registro simplificado de fitoterápicos. Diário Oficial, Brasília, 18 de março de 2004.
- Ardissou L, Godoy JS, Ferreira LAM, Stehmann JR, Brandão MGL 2002. Preparação e caracterização de extratos glicólicos enriquecidos em taninos a partir das cascas de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (Barbatimão). *Rev Bras Farmacogn* 12: 27-34.
- Babu PRS, Subrahmanyam CVS, Thimmasetty RM, Valliappan K, Kedarnath SA 2008. Solubility Enhancement of Cox-II inhibitors by cosolvency approach. *J Pharm Sci* 7: 119-126.
- Bazykina NI, Nikolaevskii AN, Filippenko TA, Kaloerova VG 2002. Optimization of conditions for the extraction of natural antioxidants from raw plant materials. *Pharm Chem J* 36: 100-103.
- British Pharmacopoeia 2004. London: Her Majesty's Stationery Office.
- Cechinel FV, Yunes RA 1998. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais: conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. *Quim Nova* 21: 99-105.
- Celeghini RMS, Vilegas JHY, Lanças FM 2001. Extraction and quantitative HPLC analysis of coumarin in hidroalcoholic extracts of *Mikania glomerata* Sprengel (guaco). *J Braz Chem Soc* 12: 706-709.
- Chaudhari P, Sharma P, Barhate N, Kulkarni P, Mistry C 2007. Solubility enhancement of hydrophobic drugs using synergistically interacting cyclodextrins and cosolvente. *Curr Sci India* 92:1586-1591.
- Chen J, Spear SK, Huddleston JG, Rogers RD 2005. Polyethylene glycol and solutions of polyethylene glycol as green reaction media. *Green Chem* 7: 64-82.
- Cohen AJ 1979. Critical review of the toxicology of coumarin with special reference to interspecies differences in metabolism and hepatotoxic response and their significance to man. *Food Chem Toxicol* 17: 277-289.
- Di Stasi LC 1996. *Plantas medicinais: arte e ciência. Um guia de estudo interdisciplinar*. São Paulo: Unesp.
- Farmacopéia Brasileira 1988. 4. ed. São Paulo: Livr. Atheneu.
- Florence AT, Attwood D 2003. *Princípios físico-químicos em farmácia*. São Paulo: EDUSP.
- Gnoatto SCB, Bassani VL, Coelho GC, Schenkel EP 2007. Influência do método de extração nos teores de metilxantinas em erva-mate (*Ilex paraguariensis* a. St.-Hil., Aquifoliaceae). *Quim Nova* 30: 304-307.
- Harris JM 1992. Poly (ethylene glycol). In: Harris JM (org). *Chemistry: Biotechnical and Biomedical Applications*. New York: Plenum Press, p. 1-14.
- Hostettmann K, Domon B, Schaufelberger D, Hostettmann M 1984. On line high-performance liquid chromatography ultraviolet-visible spectroscopy of phenolic compounds in plant extracts using post-column derivatization. *J Chromatogr* 2: 137-147.
- Liu C, Liu C, Goud K, Desai H 2005. Enhancement of dissolution rate of valdecoxib using solid dispersion with PEG 4000. *Drug Dev Ind Pharm* 1: 1-10.
- Lund W 1994. *The pharmaceutical Codex: principles and practice of pharmaceuticals*. London: The Pharmaceutical.
- Maciel MAM, Pinto AC, Veiga JVF 2002. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. *Quim Nova* 25: 430-431.

- Markham KR 1982. *Techniques of flavonoids identification*. New York: Academic Press.
- Muller SD, Coelho M, Vasconcelos SRB, Biavatti MW 2005. LC and UV determination of flavonoids from *passiflora alata* medicinal. *J Pharm Biomed Anal* 37: 399-403.
- Oyvind MA, Kenneth RM 2006. *Flavonoids: chemistry, biochemistry and applications*. New York: CRC Press.
- Pereira CAM, Vilegas JHY 2000. Constituintes químicos e farmacologia do gênero *Passiflora alata* Dryander, *P. edulis* Sims e *P. incarnata* L. *Rev Bras Plant Med* 3: 1-12.
- Pereira CAM, Yariwake JH, Lanças FM, Wauters JN, Tits M, Angenot L 2004. A HPTLC densitometric determination of flavonoids from *Passiflora alata*, *P. edulis*, *P. incarnate* and *P. caerulea* and comparison with HPLC method. *Phytochem Analysis* 15: 241-248.
- Rodrigues PO, Gonçalves TC, Silva WB 2004. Influência de diferentes sistemas de solventes no processo de extração de *Calendula officinalis* L. (Asteraceae). *Acta Farm Bonaer* 23: 27-31.
- Silva CR, Gomes VS, Kulkamp IC, Kanis LA 2008. Método espectroscópico para determinação de cumarina em xarope de *Mikania glomerata* Sprengel. *Rev Bras Farmacogn* 18: 594-599.
- Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann G, Petrovick PR 2003. Desenvolvimento de medicamento. In: Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann G, Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR (org) 2003. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS/UFSC p. 300-315.
- Vale NBD 2002. A farmacobotânica ainda tem lugar na moderna anestesiologia? *Rev Bras Anesthesiol* 52: 368-380.