

Compostos fenólicos e atividade antioxidante de *Leiothrix flavescens* (Bong.) Ruhland (Eriocaulaceae)

Silva, M.A.¹; Sumitami, J.S.A.¹; Vilegas, W.¹; Santos, L.C.^{1*}

¹Departamento de Química Orgânica, Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, UNESP, Araraquara, SP, Brasil.

Recebido 01/04/2008 / Aceito 25/04/2008

RESUMO

O presente estudo químico foi realizado com extrato metanólico de *Leiothrix flavescens* (Bong.) Ruhland (Eriocaulaceae) por HSCCC. Fracionamento do extrato metanólico dos capítulos de *L. flavescens* por métodos cromatográficos preparativos e identificação das substâncias isoladas por (IV, UV, RMN) forneceu as flavonas apigenina, luteolina e 6-metoxiluteolina e o 1,3-di-O-feruloilglicerol. O extrato metanólico de *L. flavescens* foi avaliado quanto à sua atividade antioxidante utilizando-se o reagente de DPPH, enquanto que a quantificação de fenóis totais foi determinada utilizando-se o reagente de Folin-Ciocalteu. Os resultados evidenciaram que o extrato metanólico dos capítulos *L. flavescens* possui uma significativa atividade antioxidante. Estes resultados permitiram aprofundar a discussão taxonômica da família Eriocaulaceae.

Palavras-chave: Eriocaulaceae; *Leiothrix*; HSCCC; atividade antioxidante.

INTRODUÇÃO

A família Eriocaulaceae possui cerca de 1200 espécies divididas em 10 gêneros. Alguns desses gêneros são ainda distribuídos em várias categorias, tais como subgêneros, seções, subseções, séries até chegar às espécies ou até mesmo em subespécies. Esta subdivisão é aceita por quase todos os pesquisadores e é baseada quase que exclusivamente em caracteres morfológicos florais (Giulietti et al., 1996).

Espécies de Eriocaulaceae são conhecidas popularmente como "sempre vivas", por suas inflorescências de coloração paleácea e de grande durabilidade (Giulietti et al., 1988). Algumas espécies são largamente usadas para fins de decoração, sendo também produto de exportação do Brasil (Giulietti et al., 2000; Dokkedal, 2000). Este fato confere a elas alto valor comercial, principalmente no mer-

cado internacional, e seu extrativismo constitui-se importante atividade econômica nas regiões onde ocorrem (Giulietti et al., 1988). Estas plantas sobrevivem em condições especiais de clima e solo, o que leva ao aparecimento de um grande número de espécies endêmicas (Joly, 1970). Possuem ampla distribuição e apresentam a maior diversidade de espécies na América do Sul. Por exemplo, *Leiothrix* Ruhland, um dos principais gêneros da família, é exclusivo da América do Sul, com 37 espécies restritas ao Brasil (Giulietti & Hensold, 1991).

Leiothrix flavescens (Bong.) Ruhland recebe os nomes de botão-bolinha (segundo os habitantes de Diamantina), botão-íris, capim-manso, capipoatinga-amarela, gravatámanso, sempre-viva-do-campo (Giulietti et al., 1996). Tem ocorrência no Brasil, Venezuela e Peru, sendo que Minas Gerais é o centro de diversidade, com 30 espécies (Giulietti et al., 1995). Estudos químicos realizados por Dokkedal (2000) e Santos et al. (2001) relatam o isolamento e a identificação de flavonas e xantonas de seus capítulos. Estudos botânicos aliados aos dados químicos suportam até o presente momento que o gênero *Leiothrix* seja considerado grupo-irmão de *Syngonanthus* (Giulietti et al., 2000).

O presente estudo teve como objetivo realizar o estudo fitoquímico e avaliar a atividade antioxidante do extrato metanólico dos capítulos de *Leiothrix flavescens*, com a finalidade de obter mais informações que auxiliem na taxonomia do gênero.

MATERIAL E MÉTODOS

Planta

Partes aéreas de *Leiothrix flavescens* (Sano 4798) foram coletadas e identificadas em maio de 2006, em Santana do Riacho (Serra do Cipó), Estado de Minas Gerais, pelo Prof. Dr. Paulo Takeo Sano. A exsicata encontra-se depositada no herbário do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo.

*Autor Correspondente: Lourdes Campaner dos Santos - Departamento de Química Orgânica - Instituto de Química - Universidade Estadual Paulista, UNESP - Rua Francisco Degni, s/nº - CEP: 14801-970 - Araraquara - SP, Brasil. - Telefone: 055 (16) 3301-6657 - Fax: 055 (16) 3322-7932 - e-mail: loursant@iq.unesp.br.

Preparo dos Extratos

Partes aéreas da espécie investigada foram previamente secas em estufa a 40 °C por quatro dias. Após secagem, foram separadas em capítulos, escapos e folhas e trituradas em moinho de facas para realização do processo de extração. Cada parte foi extraída seqüencialmente por maceração com solventes orgânicos (hexano, diclorometano) e por percolação com metanol. Em seguida, os extratos foram filtrados e concentrados em rotoevaporador sob pressão reduzida à temperatura de 45°C fornecendo as seguintes massas: extrato hexano 2,5 g (0,8%); extrato diclorometano 3,6 g (1,2%) e extrato metanólico 17,6 g (5,9%).

Cromatografia em Contracorrente de Alta Velocidade (High Speed Countercurrent Chromatography, HSCCC)

Equipamento P.C. Inc. equipado com coluna de politetrafluoroetileno (PTFE) de 130 m x 1,6 mm de d.i. O valor de β variou de 0,5 na parte interna da coluna a 0,85 na parte externa da coluna. O volume total da coluna foi de 325 mL. A rotação da coluna foi mantida em 850 rpm. As amostras foram introduzidas no HSCCC através de um injetor P.C. Inc. com *loop* de 16 mL, com auxílio de uma bomba FMI Q2 da Waters.

Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os experimentos de 1D: ^1H , ^{13}C e 2D: *g*COSY (Gradient Correlate Spectroscopy), *g*HMQC (Gradient Heteronuclear Through Multiple Quantum Coherence), *g*HMBC (Gradient Heteronuclear Multiple Bond Correlations) e TOCSY (Total Correlation Spectroscopy) foram realizados em espectrômetro de ressonância magnética nuclear de 11.7 Tesla (Varian® Inova). As amostras foram solubilizadas em dimetilsulfóxido deuterado (Sigma).

Espectrometria de Massas Electrospray (ESI-EM)

Os espectros de massas das substâncias isoladas foram registrados em equipamento Fisons VG Platform de quadrupolo simples. A amostra foi transferida para a fonte de eletrospray por uma bomba Rheo 4000 (Flux Instruments) com fluxo de 30 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ através de injetor Rheodyne com *loop* de 1 μL . Foi usado nitrogênio como gás secante e também para nebulização da amostra, com fluxo de 250 L/h e 17 L/h, respectivamente. A temperatura de interface foi mantida em 70°C. A região analisada variou de *m/z* 100 a 1200 Da, sendo que foi tomada a medida dos sinais em 180 s para produzir cada espectro de massas.

Infravermelho (IV)

Os espectros no infravermelho foram registrados em espectrômetro Jasco, modelo FT/IR - 4100.

Ultravioleta (UV)

Espectrofotômetro marca Hach, modelo DR/4000 U.

Cromatografia por Permeação em Gel

O fracionamento por cromatografia por permeação em gel foi realizado em colunas de vidro com 80cm de altura por 2 cm de diâmetro interno, empacotada com Sephadex® LH-20 (Pharmacia). O solvente foi bombeado para a coluna com o auxílio de uma bomba peristáltica (Pharmacia) com fluxo de 0,5 mL min^{-1} . As frações, com aproximadamente 10 mL cada uma, foram coletadas em um coletor automático Redifrac (Pharmacia).

Cromatografia em Camada Delgada Comparativa (CCDC)

Placas de Sílica gel UV 254 com base de alumínio, 200 μm , Sorbent Technologies.

Fracionamento do Extrato Metanólico dos Capítulos de *L. flavescens*

O extrato metanólico dos capítulos de *L. flavescens* foi submetido à partição líquido-líquido com solventes de polaridade crescente. Aproximadamente 3,0 g do extrato metanólico foram dissolvidos em 30 mL de água e particionado três vezes com acetato de etila, obtendo-se 1,4 g da fração acetato de etila e 1,6 g da fração aquosa. As frações obtidas na partição foram analisadas por CCDC usando como fase móvel o sistema de solvente clorofórmio:metanol:*n*-propanol:água (5:6:1:4, v/v/v/v) e padrões de rutina, quercetina, luteolina e apigenina. Utilizou-se como revelador luz UV (254 e 366 nm), bem como misturas de anisaldeído/ ácido sulfúrico e NP/PEG (Wagner et al., 1984).

Fracionamento dos Constituintes da Fração Acetato de Etila por HSCCC

O sistema de solventes utilizado foi hexano:acetato de etila:metanol:água, 1:5:1:5 (v/v/v/v). Os solventes foram misturados em um funil de separação e deixados em repouso por doze horas. A fase inferior do sistema de solvente foi usada como fase estacionária e a superior, como fase móvel. O bombeamento das fases foi no sentido cauda → cabeça da coluna, com um fluxo de 1 mL min^{-1} . A rotação da coluna foi mantida em 850 rpm. O volume de fase estacionária eluída da coluna depois de estabelecido o equilíbrio hidrodinâmico foi de 40 mL, restando 87,7% da fase estacionária retida dentro da coluna cromatográfica. A amostra (500,0 mg) foi dissolvida em 16 mL de uma mistura de 1:1 (v/v) da fase móvel e da fase estacionária e injetada no *loop* do equipamento. A fase móvel foi bombeada e a separação foi realizada em 850 rpm, com fluxo de 1 mL min^{-1} , gerando 155 frações de 3 mL cada. As frações foram analisadas por CCDC usando o sistema de solventes clorofórmio:metanol:*n*-

propanol:água (5:6:1:4, v/v/v/v) como eluente e reveladas com os reveladores anteriormente indicados. As frações 23-31 (270,0 mg) forneceram sólidos amarelos que revelam como flavonóides quando pulverizadas com reagente NP/PEG. As substâncias foram purificadas por meio de cromatografia de permeação em gel em coluna de Sephadex LH-20 eluída com metanol.

Atividade Antioxidante por DPPH

O potencial antioxidante do extrato metanólico dos capítulos de *L. flavescens* e dos padrões de ácido gálico foi avaliado por meio de um ensaio espectrofotométrico utilizando-se uma solução de DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazila) 0,004% em metanol, o qual foi misturado à solução da amostra em análise. A cada 1 mL da amostra nas diferentes concentrações foram adicionados 2 mL da solução de DPPH. Após 30 minutos de reação, as soluções foram analisadas em espectrofotômetro a 517 nm. A solução referência foi preparada adicionando-se 2 mL da solução de DPPH acrescida de 1 mL de metanol. Os valores medidos das absorbâncias foram plotados em um gráfico de variação da absorbância (% Δ) versus concentração da amostra.

Quantificação de Fenóis Totais

A quantificação espectrométrica de compostos fenólicos foi realizada utilizando-se o reagente de Folin-Ciocalteu (Zieliski & Kozowska, 2000; Genovese et al.,

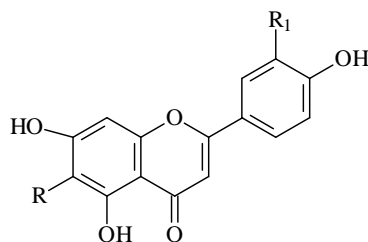
2003). A curva de calibração foi obtida utilizando seis diluições das soluções de ácido gálico comercial (Merck). As soluções-padrão foram submetidas ao mesmo procedimento descrito por Sousa et al. (2007). As leituras da absorbância (760 nm) em função da concentração do padrão foram feitas em triplicata.

RESULTADOS

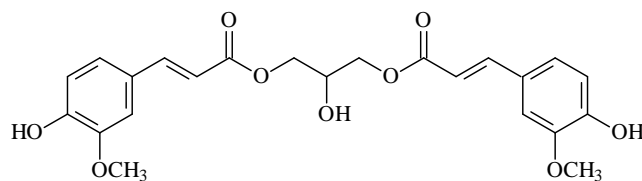
Fracionamento das substâncias presentes nos capítulos de *L. flavescens* por HSCCC seguido por purificação por cromatografia de permeação em gel forneceu a apigenina (**1**, 10,0 mg) luteolina (**2**, 10,0 mg), 6-metoxiluteolina (**3**, 10,0 mg) e 1,3-O-diferuloilglicerol (**4**, 15,0 mg), (Figura 1). Todas as substâncias foram identificadas por IV, UV, ESI-EM, RMN mono e bi-dimensionais e seus dados foram comparados com os da literatura (Agrawal 1989; Cooper et al., 1978; Delaporte et al., 2006; Santos et al., 2004).

Avaliação da atividade antioxidante do extrato metanólico dos capítulos de *L. flavescens*, pelo método do DPPH (517 nm, 30 min de reação) (Figura 2), demonstrou que o extrato bruto é mais ativo na concentração acima de 80,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ quando comparada com o padrão do ácido gálico.

Quantificação dos compostos fenólicos usando o reagente de Folin-Ciocalteu demonstrou que a concentração dos fenóis totais presentes em 1 g do extrato metanólico é de 47,0 mg.



Substância	R	R ₁
1	H	H
2	H	OH
3	OCH ₃	OH



4

Figura 01. Substâncias isoladas do extrato metanólico dos capítulos de *Leiothrix flavescens* por HSCCC.

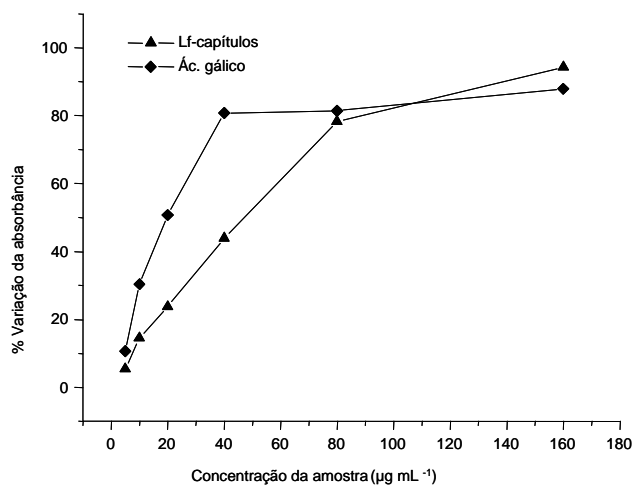


Figura 02. Gráfico da capacidade sequestradora de radicais livres do extrato metanólico.

DISCUSSÃO

O estudo fitoquímico do extrato metanólico dos capítulos de *L. flavescens* levou ao isolamento das flavonas apigenina (1), luteolina (2) e 6-metoxiluteolina (3), bem como do 1,3-*O*-diferuloilglicerol (4), este último isolado pela primeira vez em espécies de Eriocaulaceae.

A ocorrência de diglicerídeos fenólicos naturais é restrita às espécies de Gramineae (Cooper et al., 1978 e Koshino et al., 1988), Liliaceae (Shimomura et al., 1987; Shimomura et al., 1988a; Shimomura et al., 1988b; Mimaki et al., 1989; Jang et al., 2004), Sparganiaceae (Shirota et al., 1986) e Bromeliaceae (Queiroga et al., 2004). A única ocorrência de diglicerídeos em espécies de Eriocaulaceae foi descrita por Santos et al. (2004), que isolou de *Paepalanthus microphyllus* o 1,3-di-*O*-cafeoilglicerol.

Os ácidos cafeico e ferúlico, além de outros derivados hidroxicinâmicos, são importantes protetores contra herbívoros e patógenos para as plantas (Bazzalo et al., 1985). Eles possuem também outras atividades biológicas relevantes, tais como antioxidante e sequestradora de radicais livres (Braca et al., 2003).

Quanto à presença de outras substâncias fenólicas em espécies de *Leiothrix*, Dokkedal (2000) identificou as flavonas luteolina-*C*-glicosídeo, luteolina-7-*O*-glicosídeo, luteolina-7-*O*-triglicosídeo, luteolina-7-*O*-diarabinosídeo, nepetina, nepetina-7-*O*-glicosídeo e nepetina-7-*O*-arabinosídeo. Este estudo possibilitou além de distinguir os gêneros *Leiothrix* e *Eriocaulon*, sugerir a nível infragenérico que *Leiothrix* é um gênero mais evoluído. Santos et al., (2001) isolou as flavonas: 3',4',5,6-tetraidroxi-7-metoxiflavona, 3',4',5-triidroxi-7-metoxi-6-*C*-glucopiranosilflavona, 4',5-diidroxi-3',6-dimetoxi-7-*O*-β-D -glucopiranosilflavona, 3',4',5,7-tetraidroxi-6-*C*-glucopiranosilflavona, 3',4',5,6,7,8-hexaidroxi-7-metoxiflavona. A identificação dessas flavonas corrobora com a diferenciação química entre *Leiothrix* e *Paepalanthus* realizada por Giulietti et al. (2000). Esses autores verifica-

ram que, enquanto em *Paepalanthus* existem flavonóis 6 e 7 metoxilados, *Leiothrix* produz predominantemente flavonas e seus derivados.

O isolamento das flavonas 1 e 2 e da flavona-6-*O*-oxigenada 3 dos capítulos de *L. flavescens*, neste trabalho reforça a discussão iniciada por Dokkedal (2000) e Giulietti et al. (2000), que consideram que a presença de flavonas é um caráter marcante para definir o clado *Leiothrix-Syngonathus*.

Esses dois gêneros são considerados evolutivamente próximos, não apenas devido aos seus caracteres anatômicos e morfológicos, mas também pela presença dessa classe de metabólitos secundários.

O habitat relativamente inóspito no qual sobrevivem essas espécies é um desafio constante para a defesa dessas espécies. Condições de luz e calor intensos exigem o desenvolvimento de um arsenal químico adequado para a propagação das espécies, tais como substâncias com capacidade antioxidante, capazes de neutralizar a ação de radicais livres.

Diversas substâncias fenólicas são importantes antioxidantes, uma vez que possuem esqueleto carbônico propício para a estabilização de radicais livres. Um exemplo é a posição e o grau de hidroxilação dos flavonóides (Larrauri et al., 1996). Essas substâncias já são extensamente conhecidas pelas suas potentes propriedades antioxidantes (Saija et al., 1995; Van den Berg et al., 2000).

A avaliação da atividade antioxidante do extrato metanólico dos capítulos de *L. flavescens* demonstrando que o extrato bruto é mais ativo, quando comparada com o padrão do ácido gálico, pode ser explicada devido à presença dessas substâncias fenólicas identificadas.

A quantificação de fenóis totais evidenciou que o extrato metanólico dos capítulos de *L. flavescens* tem um teor de fenóis totais de 47,0 mg por grama de extrato bruto da espécie estudada. Os dados dessa quantificação corroboram com os dados apresentados no ensaio de DPPH, sugerindo que a atividade antioxidante deve estar relacionada à presença dessas substâncias fenólicas.

AGRADECIMENTOS

Auxílio FAPESP (LCS. Processo n.2006/53273-0) e Bolsas: CNPq/PIBIC (JSAS) e CAPES (MAS).

ABSTRACT

Phenolic compounds and antioxidant activity in extract of Leiothrix flavescens (Bong.) Ruhland (Eriocaulaceae)

This paper describes a chemical investigation (by high-speed counter-current chromatography) of an extract in methanol of the capitula (flower-heads) of the endemic Brazilian herb *Leiothrix flavescens* (Bong.) Ruhland (Eriocaulaceae). Fractionation of this extract by preparative chromatography and identification of the

isolated compounds by spectrometric methods (IR, UV, ESI-MS, NMR) led to the identification of flavones (apigenin, luteolin and 6-methoxyluteolin) and 1,3-di-*O*-feruloyl glycerol. The antioxidant activity of the extract was determined by DPPH reduction and the total phenolic content by the Folin-Ciocalteu assay. It was found that the methanolic extract of *L. flavescens* possesses strong antioxidant activity. Additionally, the chemical profile provided useful data for a discussion of the taxonomy of the Eriocaulaceae.

Keywords: Eriocaulaceae, *Leiothrix*, HSCCC, antioxidant activity.

REFERÊNCIAS

- Agrawal, PK. *Carbon 13 of Flavonoids*, New York: Elsevier, 1989.
- Bazzalo ME, Heber EM, Martinez MA, DelPero, Caso OH. Phenolic compounds in stems of sunflower plant inoculated with sclerotinia-sclerotiorum and their inhibitory effects on the fungus. *Phytopathol Z* 1985; 23:322.
- Braca A, Politi M, Sanogo R, Sanou H, Morelli I, Pizza C, De Tommasi N. Chemical composition and antioxidant activity of phenolic compounds from wild and cultivated *Sclerocarya birrea* (Anacardiaceae) leaves. *J Agric Food Chem* 2003; 51:6689-95.
- Cooper R, Gottlieb HE, Lavie D. New diglycerides from *Aegilops ovata*. *Phytochemistry* 1978; 17:1673-5.
- Delaporte RH, Guzen KP, Laverde Jr A, Santos AR, Sarragiotto MH. Phenylpropanoid glycerols from *Tillandsia streptocarpa* Baker (Bromeliaceae). *Biochem Syst Ecol* 2006; 34:599-602.
- Dokkedal AL. *Estudo fitoquímico e implicações taxonômicas de Paepalanthus Kunth (Eriocaulaceae)*. [Tese] Araraquara: Instituto de Química, UNESP, 2000.
- Genovese MI, Santos RJ, Hassimotto NMA, Lajolo FM. Determinação do conteúdo de fenólicos totais em frutas. *Rev Bras Ciênc Farm* 2003; 39(3):167-9.
- Giulietti N, Giulietti AM, Pirani JR, Menezes NL. Estudo de sempre-vivas: importância econômica do extrativismo em Minas Gerais, Brasil. *Acta Bot Bras* 1988; 1:179-93.
- Giulietti AM, Hensold N. Synonymization of the genera *Comanthera* and *Carptotepala* with *Syngonanthus* (Eriocaulaceae). *Annals Miss Bot Garden* 1991; 78:460-4.
- Giulietti AM, Amaral MCE, Bittrich V. Phylogenetic analysis of inter-and infrageneric relationships of *Leiothrix* Ruhland (Eriocaulaceae). *Kew Bull* 1995; 50(1):55-71.
- Giulietti AM, Wanderley MGL, Longhi-Wagner HM, Pirani JR, Parra LR. Estudos em sempre-vivas: taxonomia com ênfase nas espécies de Minas Gerais, Brasil. *Acta Bot Bras* 1996; 10:329-77.
- Giulietti AM, Scatena VL, Sano PT, Parra LR, Queiroz LP, Harley RM, Menezes NL, Yseppon AMB, Salatino A, Vilegas W, Santos LC, Ricci CW, Bomfim MCP, Miranda EB. Multidisciplinary studies on neotropical Eriocaulaceae. In: Wilson KL, Morrison DA. (eds.). *Monocots: systematics and evolution*. Melbourne: CSIRO Publishing, 2000.
- Jang DS, Cuendet M, Fong HHS, Pezzuto JM, Kinghorn AD. Constituents of *Asparagus officinalis* evaluated for inhibitory activity against cyclooxygenase-2. *J Agric Food Chem* 2004; 52(8):2218-22.
- Joly AB. *Conheça a vegetação brasileira*. São Paulo: EDUSP/Polígono, 1970. 181p.
- Koshino H, Terada, S, Yoshihara, T, Sakamura S, Shimanuki T, Sato T, Tajimi A. Three phenolic acid derivatives from stromata of *Epichloe typhina* on *Phleum pratense*. *Phytochemistry* 1988; 27(5):1333-8.
- Larrauri JA, Goni I, Martin-Carron N, Ruperez P, Saura-Calixto F. Measurement of health promoting properties in fruit dietary fibres: Antioxidant capacity, fermentability and glucose retardation index. *J Scienc Food Agric* 1996; 71:515-9.
- Mimaki Y, Sashida Y, Shimomura H. Lipid and steroidal constituents of *Lilium auratum* var. *platyphyllum* and *L. tenuifolium*. *Phytochemistry* 1989; 28(12):3453-8.
- Queiroga MA, Andrade LM, Florêncio KC, Agra MF, Silva MS, Barbosa-Filho JM, Cunha EVL. Chemical constituents from *Tillandsia recurvata*. *Fitoterapia* 2004; 75:423-5.
- Saija A, Scalese M, Lanza M, Marzullo D, Bonina F, Castelli F. Flavonoids as antioxidant agents: importance of their interaction with biomembrane. *Free Radic Biol Med* 1995; 19(4):481-6.
- Santos LC, Piacente S, Riccardis F, De Eletto AM, Pizza C, Vilegas W. Xanthonés and flavonoids from *Leiothrix flavescens* e *Leiothrix curvifolia*. *Phytochemistry* 2001; 56(8):853-6.
- Santos LC, Sannomiya M, Piacente S, Pizza C, Sano PT, Vilegas W. Chemical profile of the polar extract of *Paepalanthus microphyllus* (Guill.) Kunth (Eriocaulaceae). *Rev Bras Ciênc Farm* 2004; 40(3):433-5.
- Shimomura H, Sashida Y, Mimaki Y. Phenolic glycerides from *Lilium auratum*. *Phytochemistry* 1987; 26(3):844-5.

Fenólicos e atividade antioxidante de Leiothrix

- Shimomura H, Sashida Y, Mimaki Y, Iitaka Y. Studies on the chemical constituents of *Lilium henryi* Baker. *Chem Pharm Bull* 1988a; 36(7):2430-46.
- Shimomura H, Sashida Y, Mimaki Y, Kudo Y, Maeda K. New phenylpropanoid glycerol glucosides from the bulbs of *Lilium* species. *Chem Pharm Bull* 1988b; 36(12):4841-8.
- Shirota O, Sekita S, Satake M, Ni Y, Weiyi H. Chemical constituents of Chinese folk medicine "San Leng", *Sparganium stoloniferum*. *J Nat Prod* 1986; 59(3):242-5.
- Sousa CMM, Silva HR, Viera Jr GM, Ayres MCC, Costa CLS, Araújo DS, Cavalcante LCD, Barros EDS, Araújo PBM, Brandão MS, Chaves MH. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. *Quím Nova* 2007; 30(2):351-5.
- Wagner H, Bladt S, Zgainsky E. *Plant drug analysis: a thin layer chromatography*. Berlin: Springer-Verlag; 1984. 320p.
- Van den Ber R, Haenen GRMM, Van den Berg H, Vander VW, Bast A. The predictive value of the antioxidant capacity of structurally related flavonoids using the trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay. *Food Chem* 2000; 703:391-5.
- Zieliski H, Kozowska H. Antioxidant activity and total phenolics in selected cereal grains and their different morphological fractions. *J Agric Food Chem* 2000; 48:2008-16.