

VALIDAÇÃO DE MÉTODO E DETERMINAÇÃO ESPECTROMÉTRICA DOS FLAVONOIDES DAS FOLHAS E DO VINHOTO DA CANA-DE-AÇÚCAR E COMPARAÇÃO COM MÉTODO CLAE-UV

Carolina Hyppólito Alves Ferreira e Renata Colombo*

Universidade do Estado de Minas Gerais, 38200-000 Frutal - MG, Brasil

Recebido em 21/2/11; aceito em 18/5/11; publicado na web em 29/6/11

VALIDATION OF AN ANALYTICAL METHOD AND SPECTROMETRIC DETERMINATION OF FLAVONOIDS FROM SUGARCANE LEAVES AND VINSASSE AND COMPARISON WITH AN HPLC-UV METHOD. This paper reports on a modification of the procedures originally described in the French Pharmacopoeia for the UV-visible spectrometric analysis of flavonoids, and proposes a validation of the method and its application in the determination of total flavonoids from sugarcane (*Saccharum officinarum*) leaves and vinsasse. An analysis of precision and accuracy revealed a low relative standard deviation (< 5.0%) and a good recovery percentages (99.79 and 98.34%). A comparison of the spectrometric results against those obtained by high performance liquid chromatography (HPLC-UV) demonstrated complete compatibility between the modified French Pharmacopoeia (spectrometric) and HPLC-UV methods.

Keywords: sugarcane; flavonoids; UV-VIS spectrophotometry.

INTRODUÇÃO

Técnicas cromatográficas instrumentais, tais como a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e a eletroforese capilar (EC), têm demonstrado, através do perfil metabólico de seus extratos brutos, serem importantes ferramentas para a identificação de espécies vegetais e quantificação de marcadores fitoquímicos.^{1,2} No entanto, devido às vantagens das técnicas espectrométricas, tais como o menor custo e a simplicidade operacional, documentos oficiais como as Farmacopeias Francesa, Europeia e Brasileira ainda adotam a espectrometria UV-Visível como método oficial para a análise quantitativa de vários marcadores em materiais vegetais, entre eles os flavonoides.^{3,4}

Os flavonoides (Figura 1) são muito estudados e reportados em documentos oficiais como marcadores de várias espécies vegetais^{3,4} por apresentarem atividades biológicas e farmacológicas, tais como ação antimicrobiana, anti-inflamatória, antialérgica e propriedades antioxidantes correlacionadas a efeitos protetores em doenças cardiovasculares e algumas formas de câncer.⁵

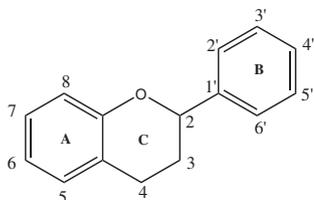


Figura 1. Estrutura básica dos flavonoides

Estudos na literatura têm demonstrado que resíduos agroindustriais como o bagaço e as folhas da cana-de-açúcar (*S. officinarum* L., Gramineae) são fontes promissoras de flavonoides.⁶⁻⁹

No Brasil, durante o processo de colheita manual as folhas da cana são queimadas e, conseqüentemente, descartadas. Com a queima desta biomassa por longo período, inúmeras partículas e gases poluentes

estão sendo enviados à atmosfera, contribuindo para potenciais impactos ambientais como o aquecimento global, a formação de ozônio troposférico, o fenômeno de acidificação (designado por chuva ácida) e a toxicidade humana.^{10,11}

No processo de industrialização da cana-de-açúcar é produzido o vinhoto, vinhaça ou restilo, um resíduo pastoso e malcheiroso que sobra após a destilação fracionada do caldo. Após décadas sendo despejado indevidamente nos solos e cursos de água pelas usinas de açúcar e álcool, atualmente é bastante utilizado como fertilizante em plantações, mas ainda é motivo de grande preocupação.¹² O vinhoto é rico em nutrientes, portanto, aumenta a produtividade dos canaviais. Em contrapartida, devido a seu uso abusivo, pode levar à salinização do solo e, ainda, tende a possibilitar a contaminação dos lençóis subterrâneos em regiões de solos muito permeáveis.^{13,14}

Considerando-se o atual impacto ambiental causado pelo descarte do vinhoto e pelas queimadas nas plantações de cana-de-açúcar durante a colheita, o presente trabalho reporta o desenvolvimento de uma metodologia adequada para o estudo qualitativo e quantitativo dos flavonoides presentes nas folhas e no vinhoto da cana-de-açúcar, visando à aplicação destes resíduos agroindustriais como matéria-prima nas indústrias cosmética e farmacêutica. O método original, descrito na Farmacopeia Francesa, para a determinação espectrométrica de flavonoides, foi modificado e covalidado com o objetivo de se desenvolver uma metodologia específica para a determinação e quantificação dos flavonoides presentes na espécie *S. officinarum* e nos seus subprodutos. Este trabalho também apresenta a comparação do método espectrométrico desenvolvido com os resultados obtidos na análise por CLAE dos flavonoides da cana-de-açúcar.

PARTE EXPERIMENTAL

Material vegetal

As folhas de *S. officinarum* analisadas foram obtidas de plantações comerciais instaladas em Pirajuba, MG (Cana 1), em Altair, SP (Cana 2) e em Araraquara, SP, Brasil (Cana 3). Todo o material vegetal foi

*e-mail: colombo@iqsc.usp.br

seco em estufa à temperatura de 40 °C até peso constante, triturado e, em seguida, peneirado em tamis de 16 mesh separando-se o material com a granulometria de 1,0 mm. O material vegetal foi estocado protegido da umidade e calor.

As amostras de vinhoto foram fornecidas pela Usina Frutal Açúcar e Álcool S.A. Frutal, MG, Brasil e imediatamente congeladas para armazenamento antes de sua preparação.

Padrões, reagentes e equipamentos

O etanol e metanol utilizados foram de grau analítico (Synth, Diadema, SP, Brasil). O ácido fórmico e o acetato de etila foram de grau analítico, fornecidos pela Tedia (Fairfield, OH, USA). O cloreto de alumínio, grau P.A., foi obtido da Vetec (Rio de Janeiro, RJ, Brasil). A água ultrapura foi obtida pelo sistema Millipore Milli-Q (Millipore Corp., New Bedford, MA, USA).

Para análise por cromatografia em camada delgada (CCD) utilizou-se ácido difenilaminatetraborato (Sigma, St. Louis, MO, USA) e polietilenoglicol 400 (PEG 400, Synth, Diadema, SP, Brasil). Para a visualização das manchas fluorescentes foi utilizada uma lâmpada UV de duplo comprimento de onda 254/366 nm (Camag, Muttenz, Switzerland).

Os padrões de flavonoides utilizados (orientina, vitexina, rutina, kaempferol, diosmina e quercetina) foram obtidos da Sigma (St. Louis, MO, USA).

As análises quantitativas foram realizadas em espectrofotômetro modelo SP 220 (Biospectro), com cubeta de quartzo Equilab de 10 mm de caminho óptico.

Otimização dos parâmetros de extração

Para extração dos flavonoides das folhas da cana-de-açúcar 1,0 g de folhas secas foi submetido à maceração convencional, em temperatura ambiente com 20 mL de solução metanol/água na proporção 1:1 v/v.^{8,9} O melhor tempo de extração foi definido através do estudo da cinética de maceração, testando-se os intervalos de tempo de 1; 3; 6 e 12 h e, posteriormente, os intervalos de tempo de 1; 2; 2,5 e 5 h.

Para extração dos flavonoides do vinhoto 5 mL de vinhoto foram submetidos à agitação magnética em temperatura ambiente por 1 h com 10 mL de etanol, metanol e duas porcentagens de suas soluções hidroalcoólicas (20 e 50% v/v). Após a determinação do melhor solvente extrator foi definido o melhor tempo de extração, através do estudo da cinética de agitação, testando-se os intervalos de tempo de 5; 10; 24; 30 e 52 min.

Os extratos das folhas e do vinhoto foram concentrados em evaporador rotativo até volume de 2 mL e submetidos ao procedimento de purificação por extração em fase sólida (EFS) usando o cartucho Oasis HLB® (Waters, Milford MA, USA) de 3 mL (60 mg, 30 µm de partícula).

O cartucho foi condicionado com 1 mL de metanol seguido de 1 mL de água. No extrato das folhas os interferentes foram eluídos com 3 mL de água e a fração flavonoídica com 5 mL de metanol. No extrato do vinhoto os interferentes foram eluídos com 10 mL de água e a fração flavonoídica com 4 mL de metanol.

Cromatografia em camada delgada (CCD)

Os extratos dos flavonoides foram analisados utilizando placas de Sílica-Gel 60G (Vetec, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) nas dimensões de 10 cm x 6 cm x 0,5 mm e solução de acetato de etila/ácido fórmico/água (6:1:1 v/v) como eluente.⁸ Após a eluição as placas foram secas à temperatura ambiente e borrifadas com reagente difenilaminatetraborato/polietilenoglicol (PEG 400), para detecção

dos flavonoides, que apareceram como manchas fluorescentes sob radiação UV (366 nm).¹⁵

Para comparação das manchas fluorescentes dos flavonoides presentes no vinhoto e nas folhas da cana, foram analisadas soluções dos padrões orientina, vitexina, rutina, kaempferol, diosmina e quercetina, preparadas em metanol na concentração de 250 mg L⁻¹.

Análise por espectrofotometria ultravioleta (UV-VIS)

Preparo das amostras de folhas de cana-de-açúcar e do vinhoto e análise espectrofotométrica

A metodologia foi adaptada da Farmacopeia Francesa.⁴ Os flavonoides das folhas foram extraídos por maceração de 1,0 g de folhas com 20,0 mL de metanol e água (1:1 v/v) por 2 h:10 min à temperatura ambiente. A seguir, foram realizadas a filtração e o procedimento de purificação do extrato para eliminação dos interferentes. Após o procedimento de purificação a fração flavonoídica (5 mL em metanol), foi diluída para 25 mL com solução metanol/água na proporção 1:1 (solução mãe). Foram retiradas duas alíquotas de 3,0 mL, sendo uma delas diluída para 10 mL com metanol (solução de compensação) e a segunda misturada a 2,4 mL de cloreto de alumínio 2% (m/v) mais 4,6 mL de metanol (solução analisada). Os flavonoides do vinhoto foram extraídos agitando-se 5 mL de vinhoto com 10 mL de etanol por 17 min. A seguir, foi realizada a filtração e o extrato filtrado foi submetido ao procedimento de purificação para eliminação dos interferentes. O extrato resultante (4,0 mL em metanol) foi diluído para 25 mL com etanol (solução mãe). Foram retiradas duas alíquotas de 7,2 mL, sendo uma delas diluída para 10 mL com metanol (solução de compensação) e a segunda misturada a 2,4 mL de cloreto de alumínio 2% (m/v) mais 0,4 mL de etanol (solução analisada).

Após a adição de cloreto de alumínio, as soluções de compensação (branco) e as soluções de análise foram deixadas em repouso por 25 min e, em seguida, analisadas por UV-VIS no comprimento de onda de 398 nm, contra a solução de compensação.

Validação por espectrofotometria UV-VIS

O método utilizado para a quantificação dos flavonoides totais por espectrofotometria UV-VIS foi adaptado da Farmacopeia Francesa⁴ e validado segundo os parâmetros seletividade, linearidade e intervalo, repetitividade, precisão intermediária, limites de detecção e quantificação, recuperação e robustez.

A validação do método foi realizada conforme o preconizado na Resolução RE nº 899 e com as recomendações da ICH (*The International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use*).^{16,17}

Seletividade

A seletividade do método foi avaliada através da medida de absorbância da solução de compensação de cada extrato e/ou de cada solução do padrão analítico, visando eliminar os efeitos dos interferentes e efeito de matriz.

Linearidade e intervalo

O método do padrão externo foi utilizado para a construção de uma curva de calibração de rutina, em triplicata. Uma solução estoque de rutina foi preparada pesando-se 4,1 mg de rutina (pureza 97,6%) e dissolvendo-se em 25 mL de metanol, obtendo-se a concentração final de 160 mg L⁻¹. Soluções de 6 concentrações diferentes (0,64; 1,6; 6,4; 16; 32 e 56 mg L⁻¹) foram preparadas a partir da diluição da solução estoque com 2,4 mL de solução de cloreto de alumínio 2% (v/v) em água e metanol para acertar o volume final. As soluções foram analisadas no espectrofotômetro UV-VIS. A equação da

reta e o coeficiente de linearidade foram determinados através da regressão linear.

Precisão

A repetitividade (precisão intracorrída) do método foi verificada por 9 determinações, contemplando o intervalo linear do método e utilizando-se 3 concentrações dos extratos das folhas e do vinhoto. As amostras foram preparadas e analisadas em triplicata. As diferentes concentrações dos extratos foram obtidas pesando-se 0,5; 1,0 e 1,5 g das folhas e 0,5; 5,0 e 8,0 mL do vinhoto e seguindo-se o procedimento descrito no item Preparo das amostras. As análises foram realizadas no mesmo dia, utilizando o mesmo equipamento e com o mesmo analista. A precisão intermediária (precisão intercorridas) foi determinada pela análise, em triplicata, de 2 amostras de folhas e 2 de vinhoto preparadas em 2 dias diferentes e por dois analistas diferentes, de acordo com o procedimento descrito no item Preparo das amostras. A precisão do método analítico foi expressa em função do desvio padrão relativo (DPR), obtido através do desvio padrão e da concentração média determinada da série de medidas.

Recuperação

Para realização do teste de recuperação foram adicionadas soluções do padrão de rutina às amostras de 1 g das folhas e de 5 mL do vinhoto, que posteriormente foram submetidas ao processo de preparo de amostra já descrito. No final, obtiveram-se extratos com alta (40 mg L^{-1}), média ($11,2 \text{ mg L}^{-1}$) e baixa ($0,64 \text{ mg L}^{-1}$) concentrações de rutina. Cada extrato foi preparado e analisado em triplicata, sendo as medidas de absorbância realizadas em função das suas respectivas soluções de compensação (extrato sem adição de padrão).

A exatidão foi expressa pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente (C) e a concentração teórica (SC) correspondente, de acordo com a Equação 1:

$$E\% = \frac{Cx100}{SC} \quad (1)$$

Limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ)

Foram calculados a partir do desvio padrão da resposta e o coeficiente angular.

Robustez

Foi determinada por meio da análise dos extratos de vinhoto e das folhas preparados de acordo com o item Preparo das amostras, variando-se os parâmetros: volume da solução de cloreto de alumínio adicionada (2,4; 2,0 e 3,0 mL); grau de pureza/ lote de metanol (grau analítico/811257, grau espectroscópico/903073 e grau pesticida/905448R) e, comprimento de onda em que as amostras foram analisadas (398, 396 e 400 nm).

Análises estatísticas

A análise estatística dos dados foi realizada através de análise de variância ANOVA unifatorial, onde os resultados são considerados significativos quando a probabilidade é inferior a 5% ($p < 0,05$ intervalo de confiança de 95%), teste t de Student com nível de significância $\alpha = 0,05$ (intervalo de confiança de 95%). A avaliação estatística dos resultados foi realizada através do Software Microsoft Office Excel®, versão 2003.

Quantificação dos flavonoides

Os extratos das folhas e do vinhoto foram preparados de acordo com o item Preparo das amostras e analisados em triplicata.

A quantificação foi realizada utilizando-se a curva de calibração e os resultados foram reportados em mg de flavonoides totais (expressos em rutina)/g de folhas frescas e em mg de flavonoides totais (expresso em rutina)/mL de vinhoto.

Os teores de flavonoides encontrados para as folhas da cana-de-açúcar foram correlacionados com resultado descrito na literatura utilizando CLAE.⁸ A mesma amostra de folhas de cana-de-açúcar utilizada no trabalho descrito na literatura (Cana 3) foi analisada pelo método UV-VIS. O extrato foi preparado de acordo com o item Preparo das amostras e analisado em triplicata.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Extração dos flavonoides das folhas e do vinhoto da cana-de-açúcar

Para se obter o melhor tempo de extração dos flavonoides das folhas da cana com a maceração convencional foi realizado o estudo de cinética da maceração. Os rendimentos das frações flavonoídicas obtidas no intervalo de extração de 1 a 12 h mostraram que o melhor tempo de extração estava compreendido entre 2 e 3 h (Figura 2).

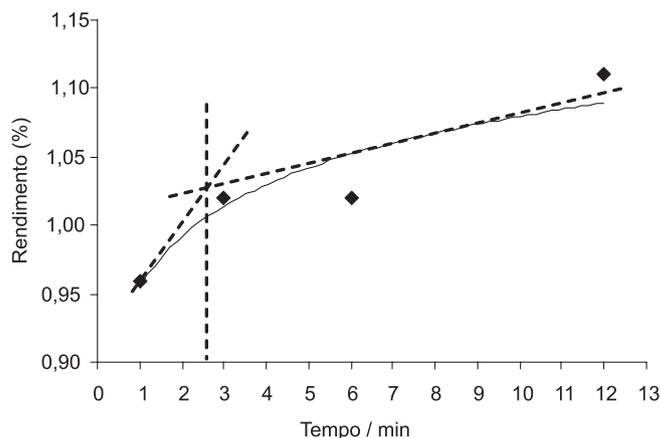


Figura 2. Curva da cinética de maceração das folhas da cana-de-açúcar utilizando o intervalo de tempo de 1 a 12 h

O estudo da cinética de maceração utilizando intervalos de tempo menores determinou que o melhor tempo de extração foi de 2 h:10 min (Figura 3).

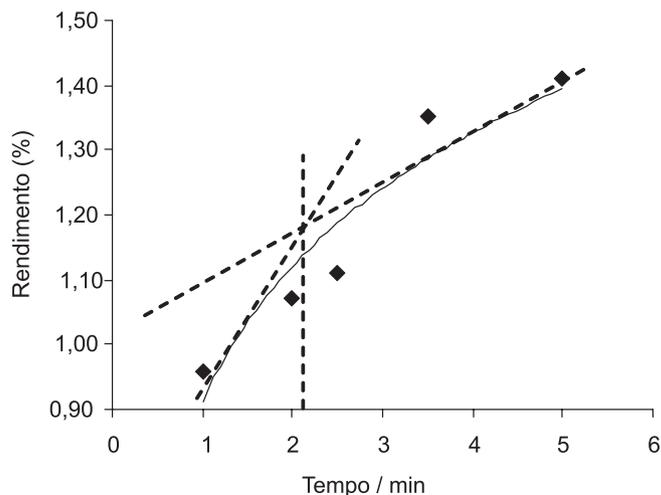


Figura 3. Curva da cinética de maceração das folhas da cana-de-açúcar utilizando o intervalo de tempo de 1 a 5 h

Para a extração dos flavonoides do vinhoto inicialmente foi estudada a seletividade dos solventes etanol (EtOH), metanol (MeOH) e das misturas EtOH/H₂O e MeOH/H₂O. Os extratos obtidos foram diretamente analisados por CCD, onde foi possível observar manchas de fluorescência alaranjada, verde e azul, atribuídas aos flavonoides. O extrato etanólico apresentou maior intensidade na coloração das manchas, significando maior concentração de flavonoides. Com relação aos rendimentos dos extratos flavonoídicos, a extração com EtOH apresentou o maior rendimento sendo, portanto, definido com o solvente extrator dos flavonoides do vinhoto. O estudo da cinética de agitação mostrou que o melhor tempo de agitação foi de 17 min, de acordo com a Figura 4.

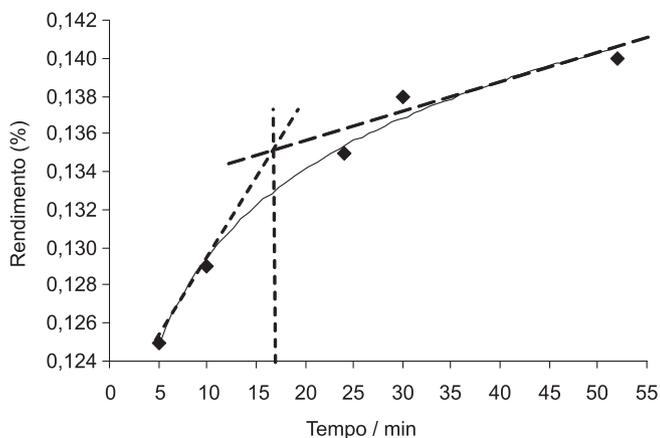


Figura 4. Curva da cinética de agitação do vinhoto da cana-de-açúcar utilizando o intervalo de tempo de 5 a 52 min

Análise por CCD

As análises por CCD revelaram a presença de vários flavonoides no extrato do vinhoto e das folhas. O fator de retenção (Rf) e as cores de fluorescência pontual (laranja, verde e amarelo) sugeriram a presença de flavonoides C- glicosilados, como a vitexina e orientina, e também agliconas, derivadas de apigenina, luteolina e kaempferol.

Validação do método e quantificação dos flavonoides nas amostras de cana-de-açúcar

A especificidade do método foi obtida utilizando-se as soluções de compensação durante cada leitura no espectrofotômetro, eliminando-se interferentes e o efeito de matriz.

A linearidade do método foi avaliada através da curva de calibração construída, utilizando a rotina como padrão externo. A resposta do UV-VIS mostrou que para o intervalo escolhido (0,64-56,0 mg L⁻¹) o método é linear. A equação da reta foi $y = 0,0317x + 0,0080$ com o coeficiente de correlação de 0,9999 e o CV < 2% para as análises em triplicata.

A metodologia desenvolvida demonstrou-se precisa tanto para análise dos flavonoides no vinhoto quanto nas folhas da cana-de-açúcar. No ensaio de repetitividade os valores de DPR encontrados para as três concentrações analisadas foram de 3,79; 3,39 e 0,19% para o vinhoto e 0,65; 0,17 e 0,22% para as folhas da cana. O valor máximo aceitável foi de 5%, de acordo com os critérios da ANVISA.¹⁶ A análise ANOVA demonstrou que não há diferenças estatísticas entre as análises de cada concentração realizadas em instantes sucessivos, com o mesmo equipamento e mesmo analista.

No ensaio de precisão intermediária, os valores de DPR foram de 1,44% para o extrato do vinhoto e 0,11% para o extrato das folhas.

O valor máximo aceitável foi de 5%, de acordo com os critérios da ANVISA.¹⁶ O teste t de Student demonstrou não haver diferenças estatísticas entre as análises realizadas em dias diferentes e por analistas diferentes para o nível de significância $\alpha = 0,05$.

Nas análises da exatidão do método, a recuperação média encontrada foi de $99,79 \pm 1,19\%$ e $98,34 \pm 1,94\%$ de rotina para os extratos do vinhoto e das folhas, respectivamente. O intervalo aceitável foi de 80-120%, de acordo com os critérios da ANVISA.¹⁶ Através do teste t de Student, pode-se afirmar que o valor encontrado é estatisticamente igual a 100% para o nível de significância $\alpha = 0,05$.

Os valores de LD e LQ para o método foram de 0,19 e 0,58 mg L⁻¹, respectivamente.

Os dados experimentais obtidos no teste de robustez indicaram que as pequenas variações realizadas no método não influenciaram significativamente os resultados ($p < 0,05$), conforme apresentado nas Tabelas 1 e 2.

Tabela 1. Resultados da robustez para o extrato do vinhoto

Parâmetros avaliados	DPR (%)	Valor -P	F	F crítico
Volume de AlCl ₃ (mL)	2,0	0,67	0,651	9,552
	2,4			
	3,0			
Grau de pureza/lote de metanol	Grau analítico/811257	0,92	0,646	0,508
	Grau espectroscópico/903073			9,552
	Grau pesticida/905448R			
Comprimento de onda (nm)	396	0,29	0,645	0,510
	398			9,552
	400			

* DPR = desvio padrão relativo obtido pela média de três determinações ($n = 3$)

Tabela 2. Resultados da robustez para o extrato das folhas da cana-de-açúcar

Parâmetros Avaliados	DPR (%)	Valor-P	F	F crítico
Volume de AlCl ₃ (mL)	2,0	0,93	0,716	0,375
	2,4			9,552
	3,0			
Grau de pureza/lote de metanol	Grau analítico/811257	1,18	0,719	0,369
	Grau espectroscópico/903073			9,552
	Grau pesticida/905448R			
Comprimento de onda (nm)	396	0,99	0,712	0,381
	398			9,552
	400			

* DPR = desvio padrão relativo obtido pela média de três determinações ($n = 3$)

Quantificação dos flavonoides

O método validado foi utilizado para a análise quantitativa dos flavonoides no vinhoto e nas folhas da cana-de-açúcar cultivada nos estados de Minas Gerais e São Paulo. O teor de flavonoides encontrado para as folhas da Cana 3 foi correlacionado com resultado descrito na literatura utilizando CLAE.⁸ Na comparação, o método espectrométrico apresentou resultado similar ao obtido por CLAE. Os resultados estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Teor de flavonoides nos resíduos agroindustriais da cana-de-açúcar

Amostras	Método	Teor de flavonoides (média ± desvio padrão) ^a (mg flavonoides totais/g folhas frescas)
Cana 1	F.F. (UV-VIS)	1,615 ± 0,092
Cana 2	F.F. (UV-VIS)	1,551 ± 0,001
Cana 3	F.F. (UV-VIS)	1,563 ± 0,022
Cana 3 ^b	CLAE	1,705 ± 0,003
Amostra	Método	Teor de flavonoides (média ± desvio padrão) ^a (mg flavonoides totais/ mL de vinhoto)
Vinhoto		0,176 ± 0,010

^a n = 3; dados são expressos como mg rutina/g ou mL de amostra; ^b dados descritos na literatura⁸ e obtidos com as mesmas amostras analisadas por UV-VIS; F.F.= metodologia por UV-VIS modificada da Farmacopeia Francesa; CLAE = método descrito na literatura⁸ utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência.

CONCLUSÃO

Considerando que a espectrometria no UV-VIS é o método oficial para a análise quantitativa de flavonoides em diversos extratos vegetais, conclui-se que o método espectrométrico modificado da Farmacopeia Francesa, descrito neste trabalho, pode ser aplicado para a quantificação de flavonoides do vinhoto e das folhas de *S. officinarum* em trabalhos que exigem a análise de grande número de amostras, tais como em ensaios agrônomicos (estudos de melhoramento vegetal) ou no controle de qualidade de seus extratos vegetais.

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pela bolsa de IC, à Universidade do Estado de Minas Gerais pela infraestrutura concedida para o desenvolvimento do projeto, à Profa. Dra. J. H. Yariwake pela colaboração e ao Engenheiro Agrônomo Dr. N. R. Chagas Filho pelo fornecimento do material vegetal.

REFERÊNCIAS

- Xu, F.; Liu, Y.; Song, R.; Dong, H.; Zhang, Z.; *Nat. Prod. Commun.* **2010**, *5*, 893.
- Chi, L.; Li, Z.; Dong, S.; He, P.; Wang, Q.; Fang, Y.; *Microchim. Acta* **2009**, *167*, 179.
- Farmacopéia Brasileira*, 4^a ed., Atheneu: São Paulo, 2003.
- Pharmacopée Française*, 8^a ed., Ministère de la Santé Publique et de la Population: Paris, 1965.
- Havsteen, B.; *Biochem. Pharmacol.* **1983**, *32*, 1141; Ielpo, M. T. L.; Basile, A.; Miranda, R.; Moscatiello, V.; Nappo, C.; Sorbo, S.; Laghi, E.; Ricciardi, M. M.; Ricciardi, L.; Vuotto, M. L.; *Fitoterapia* **2000**, *71*, S101; Kesarkar, S.; Bhandage, A.; Deshmukh, S.; Shevkar, K.; Abhyankar, M.; *J. Pharm. Res.* **2009**, *2*, 1148; Pietta, P. G.; *J. Nat. Prod.* **2000**, *63*, 1035; Braz Filho, R.; *Quim. Nova* **2010**, *33*, 229.
- Smith, P.; Paton, N. H.; *Sugar Technol. Rev.* **1985**, *12*, 117.
- McGhie, T. K.; *J. Chromatogr. A* **1993**, *634*, 107.
- Colombo, R.; Yariwake, J. H.; Lanças, F. M.; *J. Chromatogr. A* **2006**, *1103*, 118.
- Colombo, R.; Yariwake, J. H.; Ndjoko, K. H.; Hostettmann, K.; Queiroz, E. F.; *Phytochem. Anal.* **2006**, *17*, 337.
- Magalhães, D.; Bruns, R. E.; Vasconcellos, P. C.; *Quim. Nova* **2007**, *30*, 577.
- <http://www.adital.com.br/SITE/noticia.asp?lang=PT&cod=26600>, acessada em Dezembro 2010.
- Ribeiro, B. T.; Lima, J. M.; Curi, N.; Oliveira, G. C.; Lima, P. L. T.; *Quim. Nova* **2011**, *34*, 5.
- Silva, M. A. S.; Griebeler, N. P.; Borges, L. C.; *Rev. Bras. Eng. Agric. Ambient.* **2007**, *11*, 108.
- <http://marte.dpi.inpe.br/col/ltd.inpe.br/sbsr/2004/11.19.16.07/doc/2297.pdf>, acessada em Junho 2011.
- Poukens-Renwart, P.; Tits, M.; Wauters J. N.; Angenot, L.; *J. Pharm. Biomed. Anal.* **1992**, *10*, 1085.
- ANVISA; *Resolução da Diretoria Colegiada 899*, de 29/5/2003, *Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos*, Ministério da Saúde: Brasília, 2003; <http://portal.anvisa.gov.br>, acessada em Junho 2011.
- ICH; *Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1)*; International Conference on Harmonization (ICH) of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, Geneva, 2005.