

Atividade Antiespasmódica de Soluções extrativas de Folhas de *Mikania glomerata* Sprengel (guaco)

Ana Lúcia ABOY¹, George González ORTEGA¹, Pedro Ros PETROVICK¹,
Augusto LANGELOH² e Valquiria Linck BASSANI^{1*}

¹ Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, UFRGS,
Av. Ipiranga 2752; CEP 90610-000 Porto Alegre/RS, Brasil.

² Departamento de Farmacologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS,
Rua Professor Sarmento Leite, 500/202, CEP 90046-9000- Porto Alegre/RS, Brasil.

RESUMO. Dois métodos de extração, percolação e refluxo e dois líquidos extratores, etanol (96%, v/v) e mistura hidroetanólica (50%, v/v) foram utilizados para obter quatro soluções extrativas de folhas de *Mikania glomerata* visando a investigar a atividade antiespasmódica. As quatro soluções extrativas apresentaram antagonismo do tipo misto (competitivo e não-competitivo) observados nas curvas concentração efeito (CCE) produzidas pela acetilcolina (ACh) em jejuno de rato e histamina (Hist) em íleo isolado de porquinho da Índia. A solução extrativa etanólica obtida por percolação (SEEP) ou por refluxo (SEER) foram mais potentes do que as soluções extrativas hidroetanólicas (concentração inibitória 50%, CI₅₀ de 0,082 mg/mL e 0,103 mg/mL respectivamente para a Hist e ACh). As soluções extrativas hidroetanólicas obtidas por percolação (SEHEP) e refluxo (SEHER) foram menos potentes (CI₅₀ de 0,324 mg/mL e 3,594 mg/mL para a Hist e ACh). SEEP apresentou o maior teor de cumarina (2,065 mg/mL), no entanto, o efeito da atividade antiespasmódica observada nas preparações farmacêuticas não pode ser relacionado com o conteúdo de cumarina presente nas soluções extrativas, visto que a substância de referência não afetou as curvas CCE de Hist e ACh.

SUMMARY. "Antispasmodic Activity of Leaf Extracts of *Mikania glomerata* Sprengel (guaco)". Two extraction methods, percolation and reflux and two extractive solutions, ethanolic (96%, v/v) and hydroethanolic (50%, v/v) were prepared in view to investigate the antispasmodic activity of *Mikania glomerata* extracts. The four extract behaves as a mixed antagonist (competitive and non-competitive) against concentration-response curves (CRC) elicited by acetylcholine (ACh) on rat jejunum and histamine (Hist) on guinea pig isolated ileum. Ethanolic extracts obtained by percolation (SEEP) or reflux (SEER) were more potent than hydroethanolic extracts (Inhibitory concentration 50%, CI₅₀, of 0,082 mg/mL and 0,103 mg/mL respectively for Hist and ACh). Hydroethanolic extract obtained by percolation (SEHEP) followed by hydroethanolic extract obtained under reflux (SEHER) were the weakest (CI₅₀ of 0,324 and 3,594 mg/ml for histamine and ACh). The highest coumarine content (2,065 mg/mL) was obtained in SEEP. However, the antispasmodic effect observed in both pharmacological preparation could not be related to their coumarine content since the reference substance did not affect ACh or Hist CRC.

INTRODUÇÃO

Mikania glomerata Sprengel (*Asteraceae*), popularmente conhecida como guaco, é uma planta nativa do Sul do Brasil, amplamente utilizada na medicina popular com vistas na obtenção de ação broncodilatadora, antiasmática, expectorante e antitussígena¹⁻³. Usualmente administrada na forma de xarope, tintura, extrato fluido,

decocto ou infuso, estas preparações têm suas atividades farmacológicas, freqüentemente, relacionadas com a presença de cumarina (1,2-benzopirona)⁴⁻⁶. Em sua composição química é relatada a presença de cumarina, lupeol, ácido caurenóico, ácido cinamoilgrandiflorico^{1,7,8}, estigmast-22-en-3-ol^{7,8}, e ácido 15- α -isobutiriloxicaur-16-en-19-óico^{9,10}. No que se refere aos es-

PALAVRAS CHAVES: Atividade antiespasmódica, Cumarina, Guaco, *Mikania glomerata* Sprengel, Soluções extrativas.

KEY WORDS: Antispasmodic activity, Coumarin, Guaco, *Mikania glomerata* Sprengel, Herbal medicines.

* Autor a quem a correspondência deverá ser enviada: E-mail: valqui@farmacia.ufrgs.br

tudos de atividade farmacológica do vegetal, a literatura aponta para as atividades antiespasmódica, antiedematogênica, broncodilatadora, espasmolítica, vasodilatadora, antiofídica e antimicrobiana. No entanto os relatos indicam a utilização de condições de extração diversas^{2,3,5,11-20} sendo, freqüentemente, mencionada como substância ativa a cumarina. O presente trabalho tem como objetivo comparar a atividade antiespasmódica de soluções extrativas de *Mikania glomerata*, avaliando a influência do método de extração, a natureza do líquido extrator e o teor de cumarina sobre esta atividade.

MATERIAL E MÉTODOS

Substâncias químicas e de referência

As substâncias utilizadas e procedência foram: cloreto de acetilcolina, cloreto de histamina e cumarina (1,2 benzopirona) da Sigma Chemical Co.; KCl, CaCl₂.2H₂O, NaHCO₃ e dextrose da Merck; MgCl₂ (Riedel de Haën A.G.); NaH₂PO₄ (Baker Chemical); NaCl (Grupo Química) e metanol grau CLAE (Carlo Erba).

Material vegetal

Partes aéreas de *Mikania glomerata* foram fornecidas pelo Centro de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas da Universidade Estadual de Campinas e uma excicata, sob o número ICN 115.000.051 foi depositada no herbário da UFRGS. As folhas foram selecionadas para a preparação das soluções extrativas sendo secas em estufa de ar circulante, sob temperatura de 30 ± 2 °C.

Preparação e caracterização das soluções extrativas concentradas

A preparação e caracterização das soluções extrativas foram realizadas segundo metodologia descrita por Aboy *et al.*²¹ e concentradas. Quatro soluções extrativas de folhas de *Mikania glomerata* foram preparadas utilizando-se um método de extração a quente, o refluxo⁶ e um a frio, a percolação. Uma mistura hidroetanólica 50% (v/v) ou etanol 96% (v/v), foram utilizados como líquidos extratores em ambos os métodos extrativos. A relação planta:solvente de 1,5:10 (m/v) foi utilizada para a preparação de todas as soluções extrativas. Cerca de quarenta gramas de cada solução extrativa foram concentradas, sob pressão reduzida, em evaporador rotatório, em temperatura de 40 ± 2 °C, até redução da massa inicial à metade. As soluções extrativas, obtidas por percolação, de acordo com o proce-

dimento descrito na Farmacopéia Brasileira 1 ed.²², e concentradas, sob pressão reduzida, foram codificadas como solução extrativa hidroetanólica (SEHEP) ou etanólica (SEEP) de acordo com o líquido extrator utilizado. As soluções extrativas, obtidas por refluxo durante 30 minutos, foram concentradas em evaporador rotatório e designadas como solução extrativa hidroetanólica (SEHER) ou etanólica (SEER). Estas soluções foram caracterizadas quanto a densidade e aos teores de resíduo seco e de cumarina e avaliadas no que se refere à atividade antiespasmódica.

Avaliação de densidade

A densidade das soluções extrativas concentradas foram medidas em picnômetro, em temperatura de 25 °C²³.

Avaliação do teor de resíduo seco

O resíduo seco foi avaliado, segundo metodologia descrita por Hartke & Mustcher²⁴, utilizando 20 g das soluções extrativas concentradas. Os resíduos secos foram expressos em percentagem (% m/m) utilizando a média de três determinações.

Avaliação do teor de cumarina por meio de cromatografia líquida de alta eficiência

O teor de cumarina nas soluções extrativas concentradas foi avaliado utilizando metodologia descrita por Aboy *et al.*²¹. As soluções extrativas concentradas foram diluídas 400 vezes na fase móvel (MeOH:H₂O, 47:53 v/v), em triplicata, filtradas através de membrana Durapore de 0,22 µm e 20 µL foram injetados no cromatógrafo, em triplicata. A concentração de cumarina nas soluções extrativas concentradas foi calculada pela equação da reta $y = 164184x - 1151$, utilizando-se as áreas médias de três injeções e de três amostras. Cumarina (1,2-benzopirona) foi utilizada como padrão externo.

Testes Farmacológicos

Animais e preparação dos órgãos isolados

Porquinhos da Índia (média de 500 g) fornecidos pelo Laboratório Regional de Apoio Animal, RS e ratos Wistar machos (média de 270 g) provenientes do Centro de Experimentação de Animais do Laboratório da UFRGS foram sacrificados por concussão cerebral e exangüinados por seccionamento dos vasos cervicais. O fígado dos porquinhos e o jejuno dos ratos foram identificados e removidos, separados de outros tecidos, lavados internamente com solução de Tyro-

de aquecida e cortados em segmentos, com aproximadamente 2 cm de comprimento.

Avaliação da atividade antiespasmódica

Os fragmentos de tecido foram preparados e montados em banho de órgão isolado de 10 mL de capacidade contendo uma solução aquecida a 37 °C de solução de Tyrode com a seguinte composição (mmol/L): NaCl 136,9; KCl 2,68; CaCl₂ 1,80; MgCl₂ 1,05; NaH₂PO₄ 0,42; NaHCO₃ 11,9 e dextrose 5,5. O registro das contrações isotônicas foi realizado com alavanca de inscrição tangencial em cilindro esfumado movido por quimógrafo DTF, com ampliação de 6 vezes e submetido a uma carga de 1 g. Após um período de equilíbrio de 30 min, foram registradas curvas concentração-efeito (CCE) cumulativas com acetilcolina (ACh) no jejuno ou histamina (Hist) na ausência (controle) e na presença de concentrações crescentes das soluções extrativas ou do padrão de cumarina, incubadas durante 20 min. CCE controle também foram obtidas na presença de 100 µL de etanol. Os resultados foram expressos na forma de porcentagem do efeito máximo (E_{máx}) observada na respectiva CCE controle. A afinidade intrínseca relativa (pD₂) e a DE₅₀ dos agonistas ACh e Hist foi estimada, graficamente a partir dos experimentos individuais, como a concentração que induz 50% do E_{máx} através da relação pD₂ = -log DE₅₀. A atividade das soluções extrativas foi calculada empregando o método gráfico de Schild para determinar (I) a concentração de solução extrativa capaz de reduzir o E_{máx} do agonista em 50% (componente de antagonismo não competitivo), representado por CI₅₀ e (II) a concentração de extrato que reduz a afinidade do agonista em um fator 2 (antagonismo competitivo), representado por CI₂²⁵⁻²⁷.

Análise estatística

Os resultados foram expressos pela média ± s (variância) ou epm (erro padrão da média) e seu significado estatístico analisado pelo teste *t*-student ou pela análise de variância (ANOVA), método de Student Newman-Keuls²⁸. Diferenças com *p* < 0,05 foram consideradas significativas.

RESULTADOS

A Tabela 1 apresenta a densidade das soluções extrativas concentradas que situaram-se entre 1 e 2. A densidade das soluções extrativas hidroetanólicas foram mais elevadas quando comparadas com as soluções extrativas etanóli-

Soluções extrativas concentradas	Densidade (g/mL) ± s	CV (%)
SEHEP	1,9002 ± 0,012	0,13
SEHER	1,8905 ± 0,001	0,09
SEEP	1,6393 ± 0,001	0,10
SEER	1,6437 ± 0,008	0,09

Tabela 1. Densidade das soluções extrativas concentradas de folhas de *Mikania glomerata*. SEHEP = solução extrativa hidroetanólica preparada por percolação e concentrada; SEHER = solução extrativa hidroetanólica preparada por refluxo e concentrada; SEEP = solução extrativa etanólica preparada por percolação e concentrada; SEER = solução extrativa etanólica preparada por refluxo e concentrada; s = desvio padrão; CV % = coeficiente de variação percentual.

cas, independente do método extrativo usado, denotando uma clara influência do solvente utilizado, o que era esperado.

Teores de resíduo seco mais elevados foram encontrados para as soluções extrativas hidroetanólicas, sendo entre 46 e 38% superiores aos apresentados pelas soluções extrativas obtidas com etanol 96% (v/v), preparadas respectivamente por percolação e refluxo (Tabela 2).

Soluções extrativas concentradas	Resíduo seco (% m/m) ± s	CV (%)
SEHEP	5,429 ± 0,03	0,68
SEHER	4,444 ± 0,02	0,47
SEEP	2,975 ± 0,02	0,71
SEER	3,068 ± 0,01	0,47

Tabela 2. Teor de resíduo seco nas soluções extrativas concentradas de folhas de *Mikania glomerata*. SEHEP = solução extrativa hidroetanólica preparada por percolação e concentrada; SEHER = solução extrativa hidroetanólica preparada por refluxo e concentrada; SEEP = solução extrativa etanólica preparada por percolação e concentrada; SEER = solução extrativa etanólica preparada por refluxo e concentrada; s = desvio padrão; CV % = coeficiente de variação percentual.

Os teores de cumarina nas soluções extrativas concentradas, medidos por CLAE foram maiores nas soluções obtidas por percolação independente do solvente utilizado, confirmando os resultados descritos em trabalho anterior²¹

Soluções extrativas concentradas	Teor de cumarina (mg/mL) ± s	CV (%)
SEHEP	1,585 ± 0,030	1,90
SEHER	1,378 ± 0,043	3,12
SEEP	2,065 ± 0,037	1,83
SEER	1,350 ± 0,026	1,98

Tabela 3. Teor de cumarina em soluções extrativas de folhas de *Mikania glomerata* avaliado por cromatografia líquida de alta eficiência. SEHEP = solução extrativa hidroetanólica preparada por percolação e concentrada; SEHER = solução extrativa hidroetanólica preparada por refluxo e concentrada; SEEP = solução extrativa etanólica preparada por percolação e concentrada; SEER = solução extrativa etanólica preparada por refluxo e concentrada; s = desvio padrão; CV % = coeficiente de variação percentual.

(Tabela 3), demonstrando uma clara influência da utilização do calor sobre a perda deste marcador químico.

A atividade antiespasmódica do padrão de cumarina e das quatro soluções extrativas sobre as contrações provocadas por ACh e Hist, respectivamente, no jejuno de rato e íleo de porquinho da Índia estão representadas nas figuras 1, 2 e 3. As CCE de ACh e Hist não foram afetadas significativamente pela presença de etanol no líquido nutritivo, na concentração de 10 mmol/mL. Este resultado assegura que o efeito observado com as soluções extrativas etanólicas e hidroetanólicas resultam das substâncias ativas extraídas e não do solvente.

A *Mikania glomerata* é utilizada na medicina

popular por sua ação broncodilatadora, antiastmática, expectorante e antitussígena sendo a cumarina, freqüentemente, apontada como uma das principais substâncias envolvidas na atividade farmacológica^{2,3,5,6,11,12,14,15,17-20}. A figura 1 apresenta as CCE de ACh e Hist obtidas na presença de até 0,365 mg/mL de cumarina. Não houve alteração estatisticamente significativa ($p > 0,05$) das CCE de ambos os agonistas. Este resultado difere do obtido por Leite *et al.*^{5,6} que observaram, em condições experimentais semelhantes, inibição do $E_{máx}$ de ACh de até 40% em jejuno de rato e em íleo de porquinho da Índia de 90%.

As soluções extrativas hidroetanólicas e etanólicas de *Mikania glomerata* revelaram um acentuado efeito antiespasmódico nas CCE de ACh e Hist em jejuno de rato e íleo de porquinho da Índia (Figuras 2 e 3). O efeito antiespasmódico (*i.e.*, antagonista) foi do tipo misto, as CCE foram deslocadas para a direita e sofreram redução do $E_{máx}$. Empregando o método gráfico de Schild foi possível comparar as potências relativas das quatro soluções extrativas através da CI_{50} e da CI_2 (Tabela 4). As soluções extrativas etanólicas (SEEP e SEER) foram as que apresentaram maior potência, não havendo diferença significativa relacionada com o método de obtenção percolação ou refluxo, nem quanto ao agonista ou preparação farmacológica empregada, ACh no jejuno ou Hist no íleo. A concentração de 0,014 mg/mL de SEER provocou um deslocamento das CCE de Hist de 2 vezes para a direita e a concentração de 0,082 mg/mL reduziu seu $E_{máx}$ em 50%. Entre as soluções extrati-

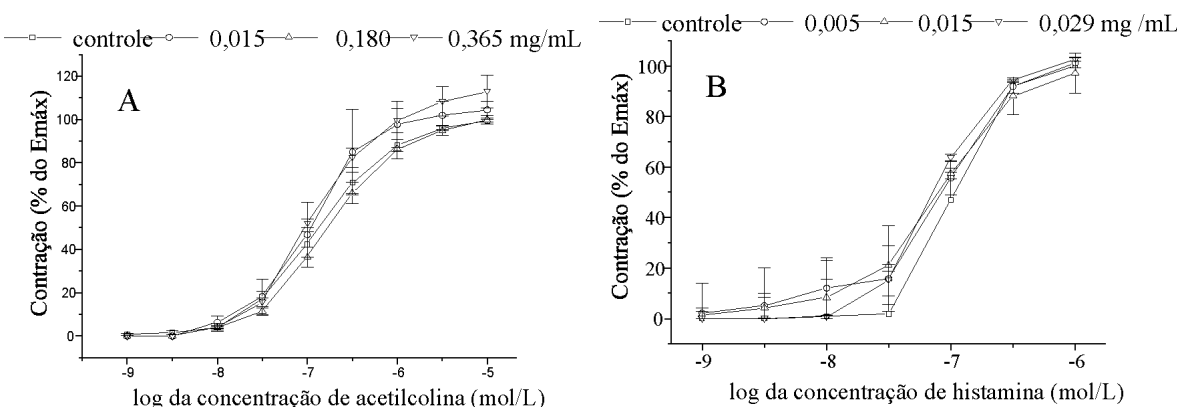


Figura 1. Curvas log concentração-efeito (CCE) cumulativas induzidas por ACh (em A) em jejuno isolado de ratos ou induzidas por histamina (em B) em íleo isolado de porquinho da Índia. As curvas controle foram obtidas na ausência de cumarina e as demais na presença de concentrações crescentes de cumarina conforme indicado, incubado por 15 a 20 min e mantido durante a CCE. Cada ponto representa a média de 3 ou 4 experimentos ± erro padrão da média. Observa-se que a cumarina teve efeito discreto, não significativo ($p > 0,05$) sobre as CCE.

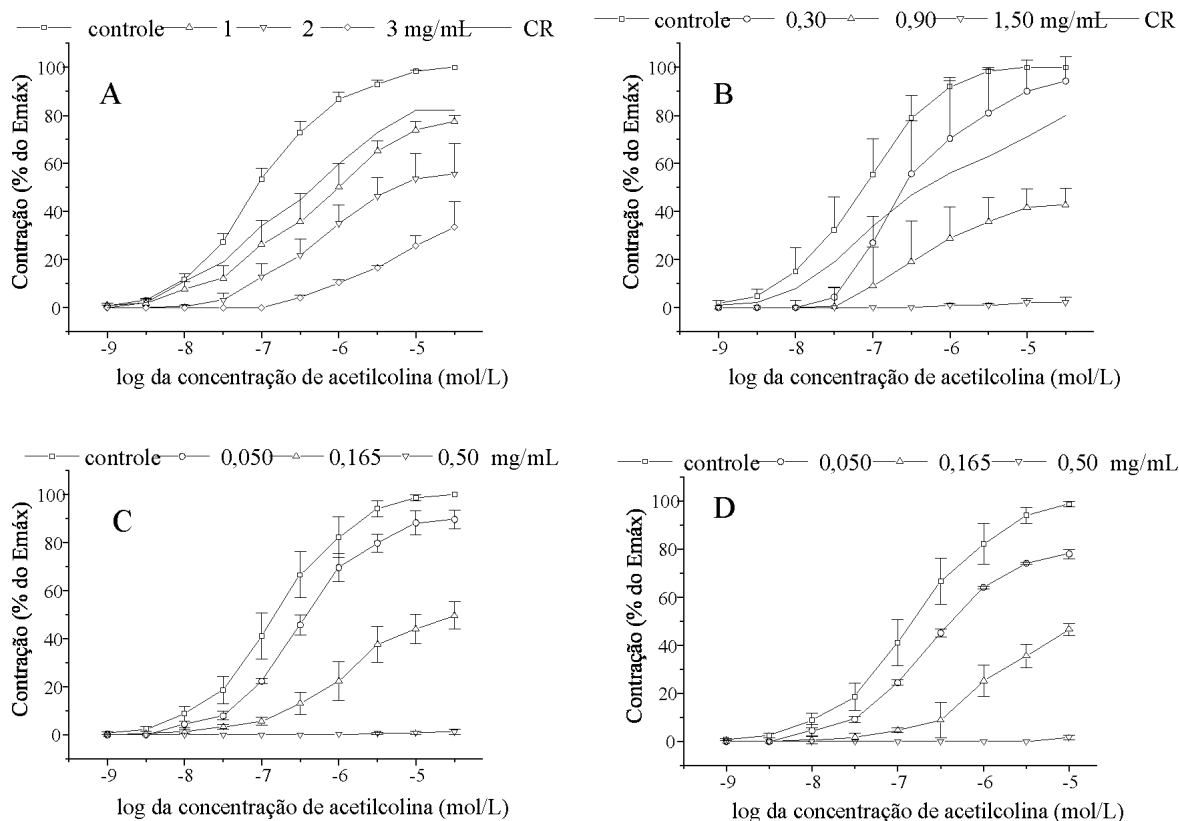


Figura 2. Curvas log. concentração-efeito cumulativas obtidas com ACh em jejuno de rato na ausência (controle) e na presença de concentrações crescentes das soluções extrativas concentradas de *Mikania glomerata* nas concentrações indicadas na legenda. Em A solução extrativa hidroetanólica obtida por percolação (SEHEP); em B solução extrativa hidroetanólica obtida por refluxo (SEHER); em C solução extrativa etanólica obtida por percolação (SEEP); em D solução extrativa etanólica obtida por refluxo (SEER). A concentração das soluções extrativas foram calculadas em resíduo seco. Cada ponto representa a média de 4 ou 5 experimentos \pm erro padrão da média.

	Componente Competitivo				Componente não competitivo			
	ACh		Histamina		ACh		Histamina	
Solução extrativa	CI ₂ (mg/mL)	RP ¹	CI ₂ (mg/mL)	RP ¹	CI ₅₀ (mg/mL)	RP ¹	CI ₅₀ (mg/mL)	RP ¹
SEHEP	0,742	1	0,718	1	1,589	1	3,594	1
SEHER	0,342	0,46	0,022	0,03	0,646	0,41	0,324	0,10
SEEP	0,038	0,05	0,014	0,02	0,103	0,06	0,096	0,03
SEER	0,084	0,11	0,014	0,02	0,121	0,08	0,082	0,02

Tabela 4. Valores de concentração inibitória que desloca as CCE de agonista para a direita num fator 2 (CI₂) - componente competitivo do antagonismo- e da concentração que reduz o efeito máximo das CCE do agonista em 50% (CI₅₀) - componente não competitivo - calculados para as soluções extrativas de *Mikania glomerata* através da aplicação da equação da reta pelo método gráfico de Schild e Schild modificado, respectivamente. ¹RP é a relação de concentrações das soluções extrativas necessárias para obter o mesmo nível de efeito.

vas testadas, a menor potência foi apresentada pela solução extrativa hidroetanólica obtida por percolação (SEHEP), que contém um dos maiores teores de cumarina 1,585 mg/mL. Para esta solução foram necessárias 0,742 mg/mL para

provocar um deslocamento das CCE de ACh de 2 vezes para a direita e 1,589 mg/ml para reduzir seu E_{máx} em 50% (Tabela 4). Analisando a atividade contra a ACh, a relação de potência das soluções extrativas quanto ao antagonismo

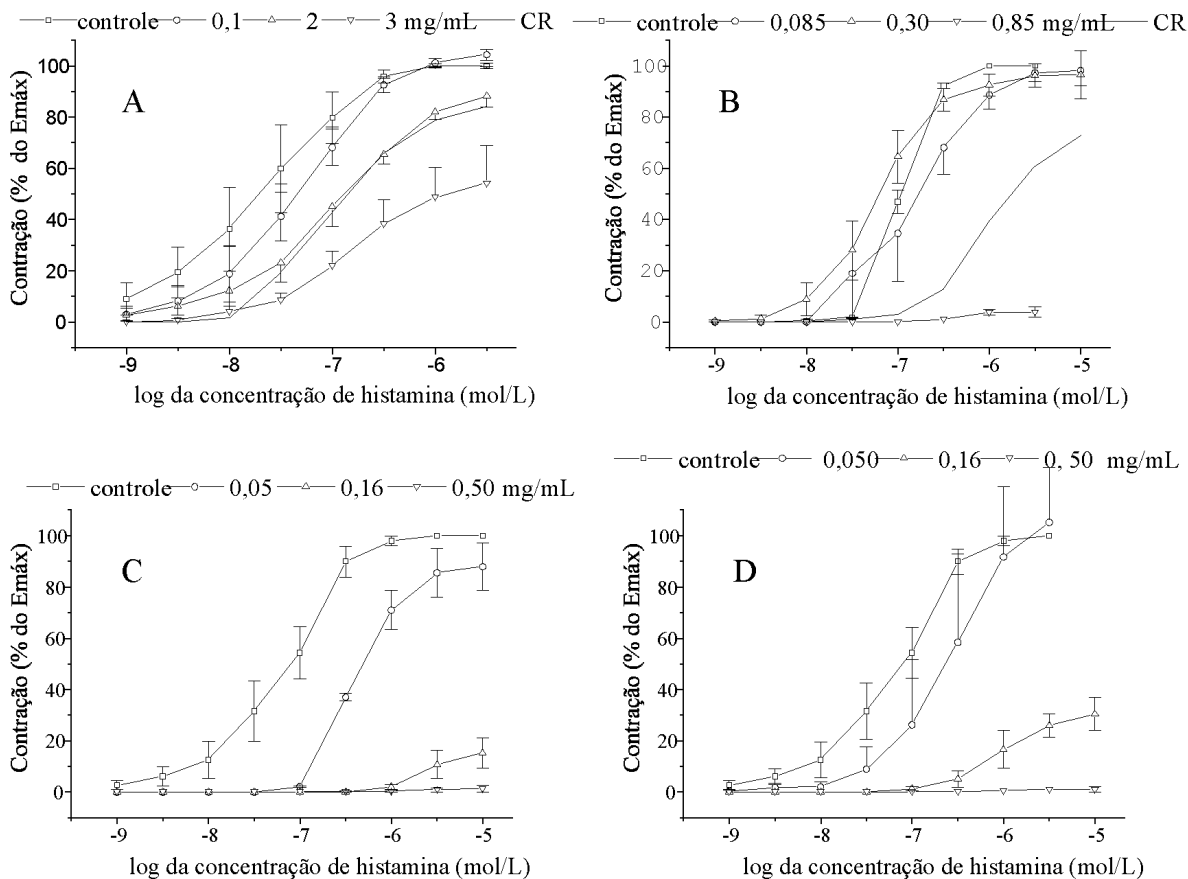


Figura 3. Curvas log. concentração-efeito cumulativas obtidas com histamina, em íleo de porquinho da Índia, na ausência (controle) e na presença de concentrações crescentes das soluções extrativas concentradas de *Mikania glomerata* nas concentrações indicadas na legenda. Em A solução extrativa hidroetanólica obtida por percolação (SEHEP); em B solução extrativa hidroetanólica obtida por refluxo (SEHER); em C solução extrativa etanólica obtida por percolação (SEEP); em D solução extrativa etanólica obtida por refluxo (SEER). A concentração das soluções extrativas foram calculadas em resíduo seco. Cada ponto representa a média de 4 ou 5 experimentos \pm erro padrão da média.

não competitivo e considerando a SEHEP como unitária foi de 1:0,41:0,06:0,08 respectivamente para SEHEP:SEHER:SEEP:SEER (Tabela 4). Outras relações de potência são apresentadas na Tabela 4.

CONCLUSÕES

A investigação farmacológica comparativa das soluções extrativas hidroetanólicas e etanólicas de *Mikania glomerata*, em órgãos isolados revelou uma acentuada atividade antiespasmódica concentração-dependente, maior com as soluções obtidas com emprego do etanol como líquido extrator do que com a mistura hidroetanólica, independente do método de extração empregado, percolação ou refluxo. A concentração de cumarina e o teor de resíduo seco, isoladamente, não representaram um parâmetro correlacionado com a potência antiespasmódica

das soluções extrativas, nas condições experimentais utilizadas. Os resultados revelam ainda a importância da avaliação biológica de soluções extrativas vegetais para comprovar a eficácia destas e concluir sobre atividade de constituintes.

Agradecimentos. Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro (Bolsas de Produtividade em Pesquisa e de Mestrado).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Lucas, V.(1942) *Rev. Flora Med.* **9**:101-32.
2. Oliveira, F., G. Akisue & M.K. Akisue (1985) *An. Farm. Quím.* **25**: 50-4.

3. Soares, M.R., V.M. Silva, V.C. Magalhães, G.R.F. Araujo & S.S. Costa (1990) *Anais do XI Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil* p. 82
4. Oliveira, F., G. Akisue, M.K. Akisue, B. Mancini & M. Chumzum (1986/1987) *Rev. Ciênc. Farm.* **8/9**: 11-24
5. Leite, M.G.R., M.A.M. Silva, L.K.A. Moreira, G.S.B. Viana & F.J.A. Matos (1992) *Anais do XII Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil* p.21
6. Leite, M.G.R., C.L. Souza, M.A.M. Silva & L.K.A. Moreira (1993) *Rev. Bras. Farm.* **74**: 12-5
7. Oliveira, F., M.A. Alvarenga, G. Akisue & M.K. Akisue (1984) *Rev. Farm. Bioquím.* **20**: 169-83
8. Santos, T.C. (1992) *Anais do XII Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil* p.149
9. Santos, T.C., C.B. Tomassini, E. Sanchez & L.M. Cabral (1996) *Anais do XII Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil* p.149
10. Veneziani, R.C.S. & D.C.R. Oliveira (1999) *Biochem. Syst. Ecol.* **27**: 99-102
11. Ruppelt, B.M., E.F.R. Pereira, L.C. Gonçalves & N.A. Pereira (1990) *Rev. Bras. Farm.* **71**: 57-8
12. Moura, R.S., R.F.G. Araujo, V.N. Silva & V.C. Magalhães (1990) *Anais do XI Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil* p. 81
13. Leite, M.G.R., M.A.M. Silva, L.K.A. Moreira, G.S.B. Viana & F.J.A. Matos (1992) *Anais do XII Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil* p. 21
14. Criddle, D.N., M.R. Soares & C.S. Lopes (1996) *Anais do XIV Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil* p. 110.
15. Martins, A.F., J.B. Calixto & Y.S. Medeiros (1996) *Anais do XIV Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil* p. 81
16. Negreiros, D.P., J.B. Calixto & Y.S. Medeiros (1996) *Anais do XIV Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil* p. 81
17. Oliveira, D.M., J.B. Calixto & Y.S. Medeiros (1996) *Anais do XIV Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil* p. 82
18. Soares, M.R., L.C.R.M. Carvalho, C.S. Lopes, D.N. Criddle & A.C. Pinto (1996a) *Anais do XIV Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil* p. 114
19. Soares, M.R., L.C.R.M. Carvalho, C.S. Lopes & S.M.A. Vieira (1996b) *Anais do XIV Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil* p. 87
20. Soares, M.R., C.S. Lopes, L.C.R.M. Carvalho, A.C. Pinto & J.M. Janssen (1997) *Anais do II Congresso Mundial de Plantas Aromaticas y Medicinales para el Bienestar de la Humanidad* p. 325
21. Aboy, A.L., G.G. Ortega, P.R. Petrovick, A. Langeloh & V.L. Bassani (2000) *Rev. Bras. Ciênc. Farm.* **36**: 165-72
22. Farmacopéia dos Estados Unidos do Brasil (1929) 1 ed, Nacional, São Paulo, págs. 1-1147
23. Farmacopéia Brasileira (1988) 4 ed, Atheneu, São Paulo, págs. 1-400
24. Hartke, K. & E. Mustchler (1987) *Deutsches Arzneibuch*, Stuttgart, Wissenschaftliche, págs. 305-6
25. Ariens, E.J. & J.M. Van Rossum (1957) *Arch. Int. Pharmacodyn.* **110**: 275-99
26. Calixto, J.B., R.A. Yunes, A.S.O. Neto, R.M.R. Valle & G.A. Rae (1984) *Brazil. J. Med. Biol. Res.* **17**: 313-21
27. Pilot da Silva, L. & A. Langeloh (1994) *Acta Farm. Bonaerense* **13**: 35-40.
28. Farrant, T. (1997) *Practical Statistics for the Analytical Scientist*. British, LCG Teddington, págs. 1-98.

