

**PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA DO EXTRATO ETANÓLICO DAS INFLORESCÊNCIAS
E FOLHAS DE *Amaranthus viridis* L. (AMARANTHACEAE)**

**PHYTOCHEMICAL SCREENING EXTRACT OF ETHANOLIC INFLORESCENCES
AND LEAVES OF *Amaranthus viridis* L. (AMARANTHACEAE)**

Alisson Martins Albino¹, Saara Neri Fialho¹, Pricianny Galdino de Souza¹, Renato Abreu Lima^{2*}

1. Graduação em Ciências Biológicas, Faculdade São Lucas, Porto Velho, RO, Brasil;
2. Mestre em Desenvolvimento Regional e Meio Ambiente. Doutorando em Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia Legal (Rede Bionorte). Docente da Universidade Federal do Amazonas (UFAM) Benjamin Constant, AM, Brasil.

Autor Correspondente: *E-mail: renatoabreu07@hotmail.com

Recebido: 25/10/2015; Aceito 04/12/2015

RESUMO

A natureza é a maior fonte de inspiração para a ciência, que buscam na sua biodiversidade, meios alternativos para o aproveitamento de seus recursos naturais. E há muito tempo, os olhos do mundo estão voltados para a Floresta Amazônica tanto pela sua imensa biodiversidade e quanto pela sua tamanha importância no equilíbrio ecológico. Amaranthaceae trata-se de uma família cosmopolita com cerca de 2.360 espécies, sendo 145 delas encontradas no Brasil. *Amaranthus viridis* L. conhecida popularmente na Amazônia, como breço, é uma planta medicinal muito utilizada contra afecções em geral. Além disso, as folhas são utilizadas em forma de cataplasma e chá e são recomendadas como preventivo no tratamento de problemas hepáticos e doenças crônicas como a Leishmaniose. Assim, este trabalho teve como objetivo identificar os metabólitos secundários no extrato etanólico das inflorescências e folhas de *A. viridis*. No Laboratório de Fitoquímica da Faculdade São Lucas, as inflorescência e folhas foram higienizados e separados de acordo com o seu estado vegetativo e, posteriormente foram, pesados e ainda frescos, colocados em estufa para secagem a 50°C por 72 horas. Após esse período, os mesmos foram pesados novamente e triturados, logo após este processo o material foi embebido com o solvente etanol 95%, ficando por sete dias, em três repetições. Em seguida, o material foi filtrado e submetido ao processo de destilação simples, obtendo apenas o extrato bruto. Após isso, foram realizados testes fitoquímicos com o extrato das inflorescências e folhas baseados em precipitação e coloração dos extratos diluídos em solução e reativos específicos de alcaloides (Mayer, Wagner e Dragendorff), glicosídeos cardiotônicos (Salkowski, Kedde, Keller-Killiani e Liebermann-Burchard), cumarinas, flavonoides, taninos (condensados e hidrolisáveis) saponinas e triterpenos (Liebermann-Burchard e Salkowski). O teste fitoquímico realizado para constatação de metabólitos secundários das inflorescências e folhas de *A. viridis* exibiu resultados satisfatórios, dando-se a importância na predominância de alcaloides, que sobressaíram nos testes fitoquímicos. Conclui-se que a espécie estudada pode ser utilizada como matéria-prima devendo ser realizado o isolamento e identificação dos princípios ativos, bem como em ensaios biológicos *in vitro* e *in vivo*.

Palavras-chave: *Amaranthus viridis*, Fitoquímica, alcaloides.

ABSTRACT

Nature is the greatest source of inspiration for science, seeking the biodiversity, alternative means for the exploitation of its natural resources. And long ago, the world's eyes are turned to the Amazon rainforest both for its immense biodiversity and as for its great importance in the ecological balance. Amaranthaceae it is a cosmopolitan family with about 2.360 species, 145 of them found in Brazil. *Amaranthus viridis* L. popularly known in the Amazon, as Bredo, is a medicinal plant widely used against diseases in general. In addition, the leaves are used as tea and poultice are recommended as a preventative treatment of liver disorders and chronic diseases such as leishmaniasis. Thus, this study aimed to identify the secondary metabolites in the ethanol extract of the flowers and leaves of *A. viridis*. In Phytochemistry Laboratory of St. Luke School, the inflorescence and leaves were cleaned and separated according to their vegetative state and subsequently were heavy and still fresh, placed in an oven for drying at 50°C for 72 hours. After this period, they were weighed again and milled, after this process, the material was soaked with 95% ethanol solvent, leaving for seven days with three replications. Then, the material was filtered and subjected to simple distillation process, only obtaining the crude extract. After that, phytochemical tests were performed with the extract of the flowers and leaves based on precipitation and coloration of the extracts diluted in solution and specific reactive alkaloids (Mayer, Wagner and Dragendorff), cardiac glycosides (Salkowski, Kedde, Keller-Killiani and Liebermann Burchard), coumarins, flavonoids, tannins (condensed and hydrolysable) saponins and triterpenes (Liebermann-Burchard and Salkowski). The phytochemical test conducted for verification of secondary metabolites of the flowers and leaves of *A. viridis* showed satisfactory results, giving the importance in the prevalence of alkaloids, which stood in phytochemicals tests. We conclude that this species can be used as a raw material should be performed to isolate and identify the active ingredients, as well as in biological assays *in vitro* and *in vivo*.

Key-words: *Amaranthus viridis*, Phytochemistry, alkaloids.

1. INTRODUÇÃO

A Amazônia ocupa um lugar de destaque no cenário internacional e sua importância é reconhecida mundialmente. Isso se deve principalmente à sua larga extensão territorial e enorme diversidade de ambientes, com 53 grandes ecossistemas e mais de 600 tipos diferentes de habitat terrestre e de água doce [1].

A humanidade retira alimento, remédios e produtos industriais da biodiversidade, entre os 10 milhões de seres que formam a fantástica riqueza biológica do Planeta, localizada principalmente nas suas

florestas tropicais. O Brasil possui a maior cobertura de florestas tropicais do mundo, especialmente concentrada na Região Amazônica. Por esta razão, aliada ao fato de sua extensão territorial, diversidade geográfica e climática, nosso país abriga uma imensa diversidade biológica, o que faz dele o principal entre os países detentores de mega diversidade do Planeta, possuindo entre 15% a 20% das 1,5 milhão de espécies descritas na Terra. Possui a flora mais rica do mundo, com cerca de 55 mil espécies de plantas superiores (aproximadamente 22% do total mundial) [2].

A Floresta Amazônica é a maior floresta tropical do mundo e ocupa uma

região de aproximadamente 6,7 milhões de km². Mais da metade (60%) da Floresta Amazônica – o que abrange uma área de 4,1 milhões de km² – se encontra em território brasileiro. Além do Brasil, a bacia hidrográfica do Amazonas compreende partes da Bolívia, Colômbia, Equador, Guianas, Peru, Suriname e Venezuela. O bioma Amazônia ocupa 49% do território nacional [1].

Amaranthus viridis L., espécie conhecida popularmente como Bredo ou Caruru pertencente à família Amaranthaceae. No Brasil são encontradas 145 espécies, distribuídas em 19 gêneros, sendo 71 espécies endêmicas de diferentes regiões e biomas brasileiros; Amaranthaceae apresenta predominância de ervas e subarbustos tropicais [3].

Apesar das plantas medicinais já fazerem parte da cultura popular, nas últimas décadas o interesse pela Fitoterapia teve um aumento considerável entre usuários, pesquisadores e serviços de saúde. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) 80% da população dos países em desenvolvimento utilizam práticas tradicionais nos seus cuidados básicos de saúde e 85% usam plantas medicinais ou preparações destas. Desde então, a OMS tem expressado a sua posição a respeito da necessidade de valorizar a utilização de plantas medicinais no âmbito sanitário e na atenção básica à saúde [4].

Algumas espécies da família Amaranthaceae são utilizadas na medicina

popular, onde são empregadas no tratamento de afecções bronquiais, diarreia e febre, e como analgésico, tônico, afrodisíaco, antidiabético e até mesmo em tratamento de doenças virais [5].

A espécie *Amaranthus viridis* L. é descrita popularmente como tendo benefícios ao combate a Leishmaniose. No Brasil, a importância da leishmaniose visceral reside não somente na sua alta incidência e ampla distribuição, mas também na possibilidade de assumir formas graves e letais quando associada ao quadro de má nutrição e infecções concomitantes [6].

As leishmanioses são antropozoonoses consideradas um grande problema de saúde pública, representam um complexo de doenças com importante espectro clínico e diversidade epidemiológica. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que 350 milhões de pessoas estejam expostas ao risco com registro aproximado de dois milhões de novos casos das diferentes formas clínicas ao ano [7].

Sabendo que bredo é utilizado na Amazônia, como planta medicinal no tratamento de leishmaniose, dar-se a importância do trabalho fitoquímico para a identificação dos metabólitos secundários no extrato etanólico das inflorescências e folhas de *A. viridis*.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

As folhas e inflorescências de *A. viridis* foram coletadas no município de Porto Velho-RO, nas coordenadas geográficas S 08° 39' 54,9''S; 063° 49' 16,7''W. Após a coleta, as folhas e inflorescências foram pesadas ainda frescos e em seguida colocados, para desidratarem em estufa elétrica a 50°C durante três dias, a partir das folhas e inflorescências devidamente secas, os mesmos foram triturados. E a partir do pó resultante, foi colocado em frascos e adicionado um volume de 1.450mL de etanol 95%, nas folhas e 800 mL nas inflorescências por sete dias, em três repetições. Posteriormente, o extrato foi filtrado e submetido ao processo de destilação simples.

Em seguida, foram realizados a partir do extrato da planta, testes fitoquímicos com o extrato etanólico das folhas e inflorescências baseados em precipitação e coloração dos extratos diluídos em solução e reativos específicos para cada teste conforme metodologia proposta por [8]:

2.1 ALCALOIDES

Para realizar o ensaio utilizou-se 2,0 mL da solução etanólica, sendo adicionados 2,0 ml de ácido clorídrico (10%), onde aqueceu mistura por 10 minutos. Após o resfriamento, o extrato foi dividido em três tubos de ensaios e colocaram-se oito gotas,

utilizando pipeta de Pasteur, dos seguintes reativos de reconhecimento:

Tubo 1 - Reativo de Mayer: observando formação de precipitado branco ou leve turvação branca.

Tubo 2 - Reativo de Dragendorff: observando formação de precipitado de coloração laranja a vermelho.

Tubo 3 - Reativo de Wagner: observando formação de precipitado de coloração alaranjado.

2.2 GLICOSÍDIOS CARDIOTÔNICOS

A 2,0 mL de solução do extrato foi adicionado 3,0 mL de solução de acetato de chumbo a 10% e 2,0 mL de água destilada. Aqueceu a mistura em banho-maria durante 10 minutos. Em seguida, o extrato foi filtrado e agitado com 10,0 mL de clorofórmio, separando a fase clorofórmica em quatro tubos de ensaio. Após a evaporação do clorofórmio, obteve-se a formação de resíduos nos tubos, os quais foram acrescidos dos seguintes reagentes:

Tubo 1: Realizou-se a reação de Salkowski para a determinação de núcleo esteroidal. Coloração indo do amarelo para o roxo é um resultado positivo.

Tubo 2: 1,0 mL de Reativo de Kedde.

Coloração rosa ou azul-violeta ao visível indica cardenólidos, os bufadienólidos não reagem. A cor se atenua em poucos minutos.

Tubo 3: Realizou-se a reação de Keller-Kiliani (ácido acético glacial, numa gota de cloreto férrico III a 5% em metanol e ácido sulfúrico concentrado). Colorações intensas é resultado positivo.

Tubo 4: Realizou-se a reação de Liebermann-Burchard (1,0 mL da amostra/algumas gotas de ácido acético + 3,0 mL anidrido acético/ácido sulfúrico (50:1, v/v). Resultado positivo: coloração verde, azul esverdeado, roxo a azul.

Tubo 5: Realizou-se a reação de Baljet (1,0 mL da amostra/oito gotas de ácido acético + 3,0 mL de clorofórmio). Resultado positivo: coloração laranja, roxo ou vermelho.

Tubo 6: Realizou-se a reação de Raymond (Filtraram-se o extrato e adicionaram-se 2 gotas de solução de cloreto férrico a 10% + duas gotas de acetato de chumbo a 10%). Resultado positivo: coloração indo do amarelo ao roxo.

2.3 CUMARINAS

Em um tubo de ensaio colocou-se 2,00 mL da solução etanólica, tampou-se com papel de filtro impregnado em solução 10% de NaOH e levou-se a banho de água a 100°C por alguns 10 minutos. Removeu-se o papel-filtro e examinou-se sob luz ultravioleta. A

fluorescência amarela ou verde indica a presença de cumarinas.

2.4 FLAVONOIDES

Esta pesquisa baseia-se na modificação da estrutura do flavonoide em presença de ácido. Colocou-se em um tubo, 2,0 mL do extrato etanólico, sendo adicionadas duas gotas de acetato de chumbo a 10%. A presença de um precipitado corado indica positividade da reação.

2.5 TANINOS

A 2,0 mL do extrato etanólico, adicionou-se 10 mL de água destilada. Filtraram-se e adicionaram-se duas gotas, utilizando a pipeta de Pasteur, da solução de cloreto férrico a 10%. Coloração azul indica possível presença de taninos hidrolisáveis, e coloração verde de taninos condensados.

2.6 SAPONINAS

Neste ensaio, com 2,0 mL da solução etanólica, foi adicionado 5,0 mL de água destilada fervendo. Após resfriamento, agitou-se vigorosamente, deixando em repouso por 20 minutos. Classifica-se a presença de saponinas pela formação de espumas.

2.7 TRITERPENOS

Neste ensaio, com 2,0 mL da solução etanólica, foi adicionado 5,0 mL de clorofórmio. Após filtração, o extrato foi dividido em duas porções. Em cada um dos tubos realizaram-se as reações de Liebermann-Burchard e Salkowski. Os triterpenos desenvolvem coloração estável e os esteroides desenvolvem coloração mutável com o tempo.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Para a identificação dos metabólitos secundários, foram obtidas para o procedimento do estudo desde a coleta até o extrato, as seguintes quantidades de extrato vegetal das inflorescências e folhas de *A. viridis* (Tabela 1).

Tabela 1. Demonstração do rendimento dos materiais vegetais

Material vegetal	Peso fresco (g)	Peso seco (g)	Rendimento do extrato (mL)
Folhas	967,36	149,08	40,00
Inflorescências	371,66	66,36	33,00

g: gramas / mL: mililitro

Com base no experimento realizado com as folhas, observou-se a presença de alcaloides utilizando os reagentes Mayer e Dragendorff, glicosídeos cardiotônicos utilizando os reagentes Kedde, Keller-killiani, Salkowski e Raymond-Marthoud, cumarinas voláteis, flavonoides, taninos (condensados), saponinas, triterpenos. Porém, resultados negativos foram para alcaloides (Wagner),

glicosídeos cardiotônicos (Baljet), taninos (hidrolisáveis), e derivados antracênicos livres com todos os reagentes (Tabela 2).

Tabela 2. Teste para reconhecimento de metabólitos secundários das folhas de *A. viridis* L.

Metabólitos secundários	Extrato etanólico	Coloração/Precipitação
Alcaloides		
Reagente de Mayer	Positivo	Laranja
Reagente de Wagner	Negativo	Laranja
Reagente De Dragendorff	Positivo	Laranja
Glicosídeos Cardiotônicos		
Reagente de Kedde	Positivo	Verde
Reagente de Keller-Killiani	Positivo	Verde
Reagente de Lieberman	Positivo	Marron
Reagente de Salkowski	Positivo	Verde
Reagente de Baljet	Negativo	Marron
Reagente de Raymond-Marthoud	Positivo	Laranja
Cumarinas		
	Positivo	Com fluorescência
Flavonoides		
	Positivo	Marron
Taninos		
Hidrolisáveis	Negativo	Verde
Condensados	Positivo	Verde
Saponinas		
	Positivo	Presença de espuma
Triterpenos e/ou Esteroides		
Reagente Liebermann-Buchard	Negativo	Laranja/uma camada
Salkowski	Negativo	Mais de uma camada

Com base no experimento realizado com as inflorescências, observou-se a presença de alcaloides com todos os reagentes testados, glicosídeos cardiotônicos utilizando os reagentes (Keller-Killiani, Salkowski, Baljet, Raymond-Marthoud), cumarinas voláteis, flavonoides, taninos condensados,

saponinas, triterpenos e derivados antracênicos livres utilizando o reagente Börntraeger. Porém, resultados negativos foram para glicosídeos cardiotônicos (Kedde), taninos (hidrolisáveis) e derivados antracênicos livres (antroquinonas livres) (Tabela 3).

Tabela 3. Teste para reconhecimento de metabólitos secundários das inflorescências de *A. viridis* L.

Metabólitos secundários	Extrato etanólico	Coloração/Precipitação
Alcaloides		
Reagente de Mayer	Positivo	Laranja
Reagente de Wagner	Positivo	Marron
Reagente De Dragendorff	Positivo	Laranja
Glicosídeos Cardiotônicos		
Reagente de Kedde	Negativo	Branca
Reagente de Keller-Killiani	Positivo	Verde
Reagente de Lieberman	Negativo	Vermelho
Reagente de Salkowski	Positivo	Verde
Reagente de Baljet	Positivo	Laranja
Reagente de Raymond-Marthoud	Positivo	Laranja
Cumarinas		
	Positivo	Com fluorescência
Flavonoides		
	Positivo	Marron
Taninos		
Hidrolisáveis	Negativo	Verde
Condensados	Positivo	Verde
Saponinas		
	Positivo	Presença de espuma
Triterpenos e/ou Esteroides		
Reagente Liebermann-Buchard	Negativo	Laranja/uma camada
Salkowski	Negativo	Mais de uma camada

As tabelas acima mostram o resultado das análises fitoquímica qualitativas que evidenciou a presença e/ou ausência das classes de metabólitos secundários, esses metabólitos é de fundamental importância para perpetuação da espécie vegetal, atuam com defesa de possíveis predadores naturais.

Os metabólitos secundários, geralmente de estrutura complexa, baixo peso

molecular, possuem atividades biológicas marcantes e, diferentemente dos metabólitos primários, apresentam-se em baixas concentrações e em determinados grupos de plantas [9].

Já foram considerados como produtos de excreção do vegetal no passado. No entanto, sabe-se que muitas dessas substâncias estão diretamente envolvidas nos

mecanismos que permitem a adequação do produtor a seu meio. Assim, despertam grande interesse, não só pelas atividades biológicas exercidas pelas plantas em resposta aos estímulos do meio ambiente, mas também pela imensa atividade farmacológica que possuem. Muitos são de importância comercial não apenas na área farmacêutica, mas também nas áreas alimentar, agrônômica, perfumaria e outras [10].

Acredita-se que os flavonoides presentes em chás fazem deles alimentos funcionais. Os efeitos benéficos são geralmente atribuídos às catequinas e teaflavinas [11].

Estudos *in vitro* demonstraram que os alcaloides presentes nas vagens têm ação direta sobre células gliais gerando efeitos tóxicos e inflamatórios e ainda sugerem que alcaloides que compõem uma fração obtida por cromatografia do extrato total de alcaloides são os que apresentam maior potencial biológico [12].

Os taninos ocorrem em uma ampla variedade de vegetais, são classificados em hidrolisáveis e condensados. O ácido tânico é um tanino hidrolisável, que é quebrado por enzimas. São utilizados para estabilização da cerveja, curtimento de pele e produção de resinas. Atualmente, são empregados em processos biotecnológicos para produção de enzimas como a tanase, que hidrolisa ésteres e ligações laterais de taninos hidrolisáveis produzindo ácido gálico e glicose [13].

Os terpenos são compostos metabólicos recorrentes nesta espécie, além dos ésteres diterpenos, também foram isolados triterpenos tetracíclicos e pentacíclicos tanto do látex quanto das folhas da planta, dentre eles o eufol, o tirucalol, o euforbol, e o germanicol [14].

As cumarinas constituem uma classe de metabólitos secundários derivados do ácido cinâmico, encontrados em abundância no reino vegetal, nos fungos e bactérias. A esta classe de compostos atribui-se uma grande variedade de atividades biológicas, como a antimicrobiana, a antiviral, a anti-inflamatória, a antiespasmódica e antitumoral [15].

4. CONCLUSÃO

Conclui-se que o extrato das inflorescências e folhas de *A. viridis* apresenta metabólitos secundários de grande valor medicinal podendo servir como matéria-prima para a produção de fármacos devido à presença de alcaloides, glicosídeos cardiotônicos, taninos e triterpenos. No entanto esperasse que outros trabalhos possam ser realizados com intuito de isolar tais princípios ativos para que assim sejam testados *in vitro* e *in vivo* sobre células hospedeiras de leishmaniose.

5. REFERÊNCIAS

- [1] MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. **ARPA Biodiversidade. Programa Áreas protegidas da Amazônia Arpa – Fase II.** Brasília - DF, 2010.
- [2] MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. **Biodiversidade Brasileira Avaliação e identificação de áreas e ações prioritárias para conservação, utilização sustentável e repartição dos benefícios da biodiversidade nos biomas brasileiros. Secretaria de Biodiversidade e Florestas.** Brasília - DF, 2002.
- [3] FANK-DE-CARVALHO, S.M.; MARCHIORETTO, M.S.; BÁO, S.N. Anatomia foliar, morfologia e aspectos ecológicos das espécies da família Amaranthaceae da Reserva Particular do Patrimônio Natural Cara Preta, em Alto Paraíso, GO, Brasil. **Biota Neotropical**, v.10, n.4, p.77-86, 2010.
- [4] ROSA, C.; CÂMARA, S.G.; BÉRIA, J.U. Representações e intenção de uso da fitoterapia na atenção básica à saúde. **Ciências & Saúde Coletiva**, v, 16, n. 1, p. 311-318, 2011.
- [5] ANDRÉ, A.C.G.M.; DIAS, D.A.; PEREIRA, P.S.; ABREU, L.C.P.; FRANÇA, S.C. Estudo comparativo da produção de metabólitos secundários em cultura de células e na planta *in natura* de *Gomphrena globosa* (Amaranthaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.13, p.22-24, 2003.
- [6] GONTIJO, C.M.F.; MELO, M.N. Leishmaniose Visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v.7, n.3, p.338-349, 2004.
- [7] MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. Secretaria de Vigilância em Saúde.** Brasília – DF, 2010.
- [8] RADÍ, P.A.; TERRONES, M.G.H. Metabólitos secundários de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmácia**, v.20, n.2, p18-22,2007.
- [9] BERG, J.M.T.; LUBERT, J. **Bioquímica.** 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 545p. 2008.
- [10] SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMAN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** Florianópolis: editora da UFSC, 1102p, 2007.
- [11] MATSUBARA, S.; RODRIGUES, D. **Teores de catequinas e teafloavinas em chás comercializados no Brasil.** Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/cta/v26n2/30189.pdf> Acesso em: 10 set. 2008.
- [12] SILVA, A.M.M.; SILVA, A.R.; PINHEIRO, A.M.; FREITAS, S.R.V.B.; SILVA, V. D.A.; SOUZA, C.S.; VELOSO, E.S.; ELBACHÁ, R.S.; COSTA, M.F.D.; COSTA, S.L. Alkaloids from *Prosopis juliflora* leaves induce glial activation, cytotoxicity and stimulate production. **Toxicon**, v.49, p.601-614,2007.
- [13] BATTESTIN, V.; MATSUDA, L.; MACEDO, G. Fontes e aplicações de taninos e tanases em alimentos. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v.15, n.1, p.63-72, 2004.
- [14] HASSAN, E.M.; MOHAMMED, M.M.D.; MOHAMED, S.M. Two new phorbol-type diterpene esters from *Synadenium grantii* Hook f. leaves. **Records of Natural Products**, v.6, n.3, p.255-262, 2012.
- [15] LOGHKIN, A.V.; SCKANYAN, E.I. Natural coumarin: methods of isolation and analysis. **Pharmacology Chemical**, v. 40, n.2, p.337-346, 2006.