

Caracterização de flavonoides por CLAE-UV-PDA em tintura de inflorescências de *Solidago chilensis* Meyen cultivada em Itaipava (RJ)

Flavonoids characterization using HPLC-UV-PDA in tincture produced from inflorescences of cultivated *Solidago chilensis* Meyen in Itaipava (RJ)

DOI 10.5935/2446-4775.20170011

¹OLIVEIRA, Temistocles Barroso de; ¹BASTOS, Belta Paloma Mendes; ¹KELLY, Andressa Maia; ²MONTEIRO, Sérgio da Silva; ¹VALVERDE, Simone Sacramento*

¹FIOCRUZ, Instituto de Tecnologia em Fármacos/Farmanguinhos, Manguinhos, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

²FIOCRUZ, Palácio Itaboraí Petrópolis, PIT/FIOCRUZ, Petrópolis, RJ, Brasil.

*Correspondências: simonevalverde@far.fiocruz.br

Resumo

Solidago chilensis (= *Solidago microglossa*) é uma espécie amplamente utilizada pela população e constante da lista RENISUS de espécies medicinais utilizadas nos serviços de saúde. Essa espécie é utilizada em desordens inflamatórias em substituição à *Arnica montana*. Flavonoides agem como anti-inflamatórios por diferentes mecanismos de ação, inibindo enzimas como a fosfolipase, lipoxigenase ou cicloxigenases. Flavonoides derivados da quercetina são inibidores da COX-2 e da NOS e diminuem a adesão de células inflamatórias ao endotélio vascular, sendo os principais componentes dos extratos alcoólicos e hidroalcoólicos de plantas do gênero *Solidago*. Este trabalho busca contribuir para o atendimento à saúde pública e viabilizar o desenvolvimento sustentável econômico, através da fitoterapia; para a conservação ambiental, pela utilização de inflorescências e, socialmente, visando a inclusão de novo medicamento fitoterápico no SUS. Portanto, são necessárias a validação, a padronização e a garantia da segurança e eficácia das tinturas, determinando seus marcadores químicos e/ou biológicos. A tintura de inflorescências de *S. chilensis* foi produzida de acordo com a Farmacopeia Brasileira IV (FB 4) e analisada por CLAE-UV-PDA. As substâncias eluídas foram analisadas quanto ao tempo de retenção, sua absorção em UV à 310nm e dados da literatura. Os flavonoides aqui caracterizados são amplamente descritos para o gênero *Solidago* e *Solidago chilensis* e, possivelmente, estão relacionados às ações farmacológicas observadas para essa espécie.

Palavras-chave: *Solidago chilensis*. Tintura. Desenvolvimento sustentável. Flavonoides. CLAE. SUS.

Abstract

In 2008, the RENISUS list created was considering the used medicinal species in the health services. *Solidago chilensis* (= *Solidago microglossa*) species was in this list and it is used instead of an exogenous

species, *Arnica montana*, to treat inflammatory disorders. Flavonoids act as anti-inflammatory acting by different mechanisms, inhibiting enzymes such as phospholipase, cyclooxygenase or lipoxygenase. Quercetin derivatives are inhibitors of COX-2 and NOS and decrease the adhesion of inflammatory cells to vascular endothelium, and they are the main components of alcoholic and hydroalcoholic extracts of *Solidago* genus plants. This work aims to promote public health and contribute to economic sustainable development by the use of herbal medicine, environmentally by the use of inflorescences and social development supporting the development of a phytomedicine to be included in SUS. Therefore, the validation, standardization and the safety and efficacy of tinctures must be investigated, determining their chemical and/or their biological markers. *S. chilensis* inflorescences tincture was produced according to the Brazilian Pharmacopoeia IV and it was analyzed by HPLC-UV-PDA. The eluted substances analyzed were for its retention time, UV absorption at 310nm and literature data. The characterized flavonoids in this work described were in the *Solidago* genus and in the *Solidago chilensis*. This work suggests that the characterized substances related are to the pharmacological actions observed for this species.

Keywords: *Solidago chilensis*. Tincture. Sustainable development. Flavonoids. CLAE. SUS.

Introdução

Em 2008, o Ministério da Saúde criou a Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS), com base em lista de espécies vegetais já utilizadas nos serviços de saúde estaduais e municipais, no conhecimento tradicional e popular e em estudos químicos e farmacológicos. Nessa lista, consta a espécie *Solidago chilensis* (= *Solidago microglossa*), uma espécie nativa da América do Sul, encontrada na região sudeste do Brasil, que também cresce em outros países (Argentina). Seus rizomas frescos são utilizados na medicina tradicional como diurético, estimulante do apetite e anti-helmíntico (HIRSCHMANN, 1988; VILA et al., 2002; LORENZI e MATOS, 2002), enquanto suas partes aéreas são empregadas como anti-inflamatório (SANTOS e REIS, 1998; RAZMILIC e SCHMEDA-HIRSCHMAN, 2000). Essa espécie vem sendo usada, como sucedânea da *Arnica montana* L., por acreditar-se ter o mesmo efeito anti-inflamatório (TORRES, AKISUE e ROQUE, 1987).

Desta forma, aplicações empíricas da *S. chilensis* incluem o tratamento de doenças inflamatórias em substituição à espécie *A. montana* L.. Para o gênero *Solidago*, são descritos mono e sesquiterpenos a partir do óleo essencial, como α -pineno, limoneno, α e γ -terpineol e epi-cubebanos entre outros (KALEMBA, 1998; KASALI et al., 2002), saponinas, flavonoides como o kaempferol, quercetina e seus glicosídeos. (JIANG, HUANG e QIN, 2006; TORI et al., 1999; LU et al., 1995). Entre os constituintes químicos da espécie *Solidago chilensis* encontram-se flavonoides derivados da quercetina (como a quercitrina e a rutina) (TORRES, AKISUE e ROQUE, 1987; SABIR et al, 2012; GASTALDO, 2013) e do kaempferol (GRIZA, 2007), terpenos, principalmente diterpenos labdânicos e clerodânicos (GOSWAMI et al., 1984), como a solidagenona e, além de mono, sesqui e diterpenos presentes no óleo essencial de *S. chilensis*, como: β -cubebeno, germacreno-B e pumilóxido (GRESSLER et al., 2003; DIAS, 2001; VILA et al., 2002) e substâncias acetiladas (ANTHONSEN et al., 1969; ANTHONSEN e BERGLAND, 1973; RAZMILIC e SCHMEDA-HIRSCHMAN, 2000; KASALI et al., 2002; VALVERDE, OLIVEIRA e SOUZA, 2012). Flavonoides são descritos como agentes anti-inflamatórios atuando por diferentes mecanismos de ação,

seja através da inibição de enzimas como fosfolipases, lipoxigenases ou cicloxigenases (COX-1 e 2). Derivados da quercetina já foram descritos como inibidores da COX-2 e do óxido nítrico sintase (NOS), além de serem importantes mediadores, agindo na diminuição da adesão de células inflamatórias no endotélio vascular (AGNIHOTRI, WAKODE e AGNIHOTRI, 2010; BARROS, 2012).

Flavonoides derivados da quercetina são relatados como componentes principais dos extratos alcoólicos e hidroalcoólicos de espécies do gênero *Solidago*, corroborando para o emprego tradicional da espécie e de seus extratos (APÁTI et al., 2002; APÁTI, 2003).

Este trabalho busca contribuir para o atendimento à saúde pública e viabilizar o desenvolvimento sustentável econômico, através da fitoterapia; para a conservação ambiental, pelo cultivo da espécie e utilização de inflorescências e, socialmente, contribuindo para a inclusão de novo medicamento fitoterápico no SUS, permitindo assim, o acesso seguro da população a uma formulação farmacêutica de qualidade, com definição do perfil químico, dose e via de administração. Para tal, são necessárias a validação, a padronização e a garantia da segurança e eficácia das tinturas, a elucidação do perfil químico, de marcadores químicos e/ou biológicos.

Material e Métodos

Solidago chilensis (SCM) foi cultivada no Quilombo do Tapera (Município de Itaipava-RJ) (22°23'10.19"S; 43°3'27.14"W) (FIGURA 1) por Sérgio da Silva Monteiro (Assessor Técnico Sênior – Palácio Itaboraí – PIT/Fiocruz). As famílias residentes no referido quilombo recebem assistência técnica através do projeto desenvolvido pelo PIT/Fiocruz (Projeto de Arranjo Produtivo Local de plantas medicinais – APL / Petrópolis) para o cultivo de espécies vegetais de interesse medicinal, como a *Solidago chilensis*, que foi introduzida pelo já mencionado assessor técnico Sérgio da Silva Monteiro que confere cursos e treinamento *in loco* para essas famílias. Através desse projeto, a Fiocruz se mobiliza com os pesquisadores envolvidos para melhorar as condições de vida e saúde dos habitantes e promover sua sustentabilidade socioambiental (FIT, 2014). A exsiccata de SCM foi depositada no Herbário da UFRJ, sob o nº tomo RFA 39.930. As inflorescências foram coletadas (5,230 g) no auge da sua floração (verão de 2016) e três amostras de $\cong 1,2$ g foram retiradas para determinação de sua umidade por meio de medidor com fonte de calor infravermelho produzido por resistência encapsulada em quartzo (Marte®; modelo ID 50), e apresentaram $\cong 33,56\%$ de umidade. Posteriormente, as inflorescências foram submetidas à secagem em estufa e pulverização em moinho de facas, sendo a droga seca e finamente dividida, tamisada. (BRASIL, 2011).

O pó das inflorescências foi então submetido à extração por maceração com álcool a 66°GL, produzido a partir de álcool etílico absoluto (Tedia®) com teor alcoométrico definido por alcoômetro centesimal, para a produção da tintura (EB) de acordo com a Farmacopeia Brasileira IV, onde 10 mL de tintura simples correspondem a 1 g de droga seca (FB 4, 2010).

A tintura foi submetida à evaporação sob pressão reduzida em rotaevaporador (Büchi® R-124) para a análise por CLAE-UV-PDA (Cromatografia em Alta Eficiência acoplada à Espectrofotometria por Ultravioleta e com Detector por Arranjo de Fotodiodos), de acordo com metodologia reportada (APÁTI et al., 2002; APÁTI, 2003) para caracterização de flavonoides e substâncias fenólicas em *Solidago canadensis*, espécie medicinal oficial na América do Norte e Europa. Essa análise foi realizada com

coluna LiChrospher 100 RP-18 (Merck®) para escala analítica com 250 mm de comprimento, 4 mm de diâmetro e 5 µm de tamanho de partícula, usando C18 como fase estacionária e detector PDA, tipo SPD-M20A. Foi utilizada uma mistura binária como sistema eluente, composta por ácido acético: água (1:40) (eluente B) e acetonitrila (eluente A). A análise foi efetuada a 25°C, com fluxo de 1,0 mL.min⁻¹ com gradiente de eluição iniciado por 15% do eluente A e 85% do eluente B e mantida pelos primeiros 15 min. Seguida de um gradiente linear de 35% do eluente A por 30 min, com transição para 100% do eluente A nos dois minutos seguintes (APÁTI et al., 2002; APÁTI, 2003). As amostras foram diluídas na proporção de 10 mg/mL e alíquotas de 10 µL foram injetadas. As substâncias eluídas foram analisadas quanto à sua absorção em UV à 310 nm e dados obtidos da literatura. Foi observada a reprodutibilidade no perfil cromatográfico do EB de SCM mesmo em injeções repetidas sem alteração da pressão. A pureza do sinal do marcador químico quercetina foi medida pelo detector (PDA) e foi igual a 1,0, o que mostra a seletividade do método utilizado. A seletividade é um parâmetro importante para garantir que a quantificação das substâncias de interesse (agliconas e glicosídeos de flavonoides) não seja afetada pela presença dos demais metabólitos secundários ou outros produtos que possam estar presentes. Para tanto, foram consideradas a resolução dos sinais obtidos e a não interferência dos solventes envolvidos na análise por CLAE.

FIGURA 1 – *Solidago chilensis* em cultivo no município de Itaipava, RJ.



Fonte: Foto tirada por Temístocles Barroso de Oliveira, durante a coleta em fevereiro de 2016.

Resultados e Discussão

A tintura produzida apresentou como características organolépticas gerais: líquido de cor verde; odor e sabor aromático, levemente amargo; densidade de 0,905; pH ácido (medido através de potenciômetro digital - peagâmetro mPA-210 Tecnopon®) e leve turvação com água. Todas as análises foram realizadas conforme orientação da FB 4 (2010) para tintura mãe, obtida a partir de material vegetal seco. A tintura apresentou $\geq 1,93\%$ de resíduo sólido/total. Todos os parâmetros observados na tintura produzida estão em conformidade com a FB 4, FHB 3 (FARMACOPEIA HOMEOPÁTICA BRASILEIRA 3ª Edição, ANVISA) e (BRASIL, 2011; FB 4, 2010).

A análise por meio de CLAE-UV-PDA permitiu a caracterização de 6 flavonoides: kaempferol-3-O- α -L-rutinosídeo (nicotiflorina), quercetina-3-O- β -D-galactosídeo (hiperosídeo), quercetina-3-O- β -D-glucosídeo (isoquercitrina), quercetina-3-O- β -D-ramnosídeo (quercitrina), kaempferol-3-O- α -L-ramnosídeo (afzelina) e quercetina, através do monitoramento por normalização interna, co-injeção de quercetina, análise dos espectros no UV, uma vez que todos os derivados observados no EB de SCM apresentam espectros no UV característicos da sua aglicona (quercetina ou kaempferol) além do ácido clorogênico, identificado

através do seu tempo de retenção na metodologia utilizada, dados da literatura e espectro no UV, todos também já descritos para o gênero (FIGURAS 2 e 3; TABELA 1) (APÁTI et al., 2002; APÁTI, 2003; JIANG, HUANG e QIN, 2006; LORENZI e MATOS, 2002; TORRES, AKISUE e ROQUE 1985; VILA et al., 2002). Todas as análises foram realizadas em triplicata.

FIGURA 2 – CLAE-UV-PDA de tintura de *Solidago chilensis*.

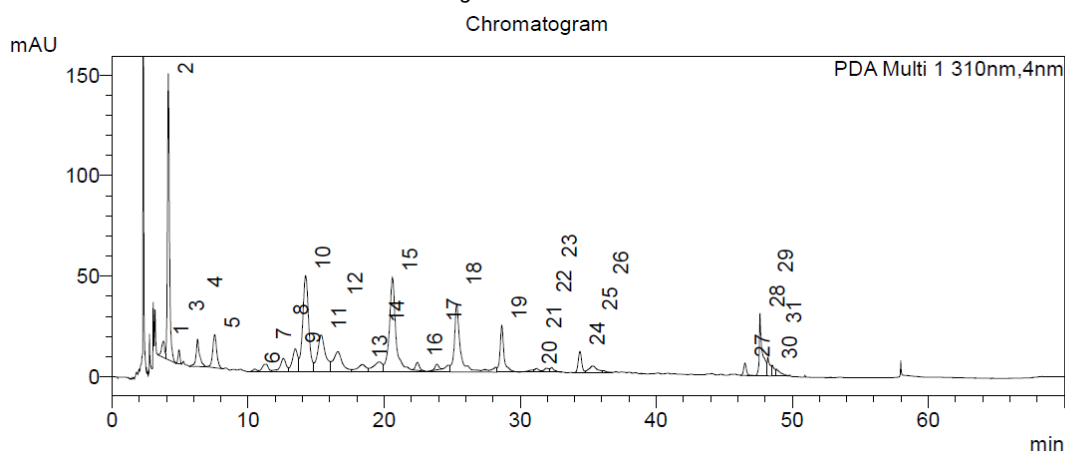
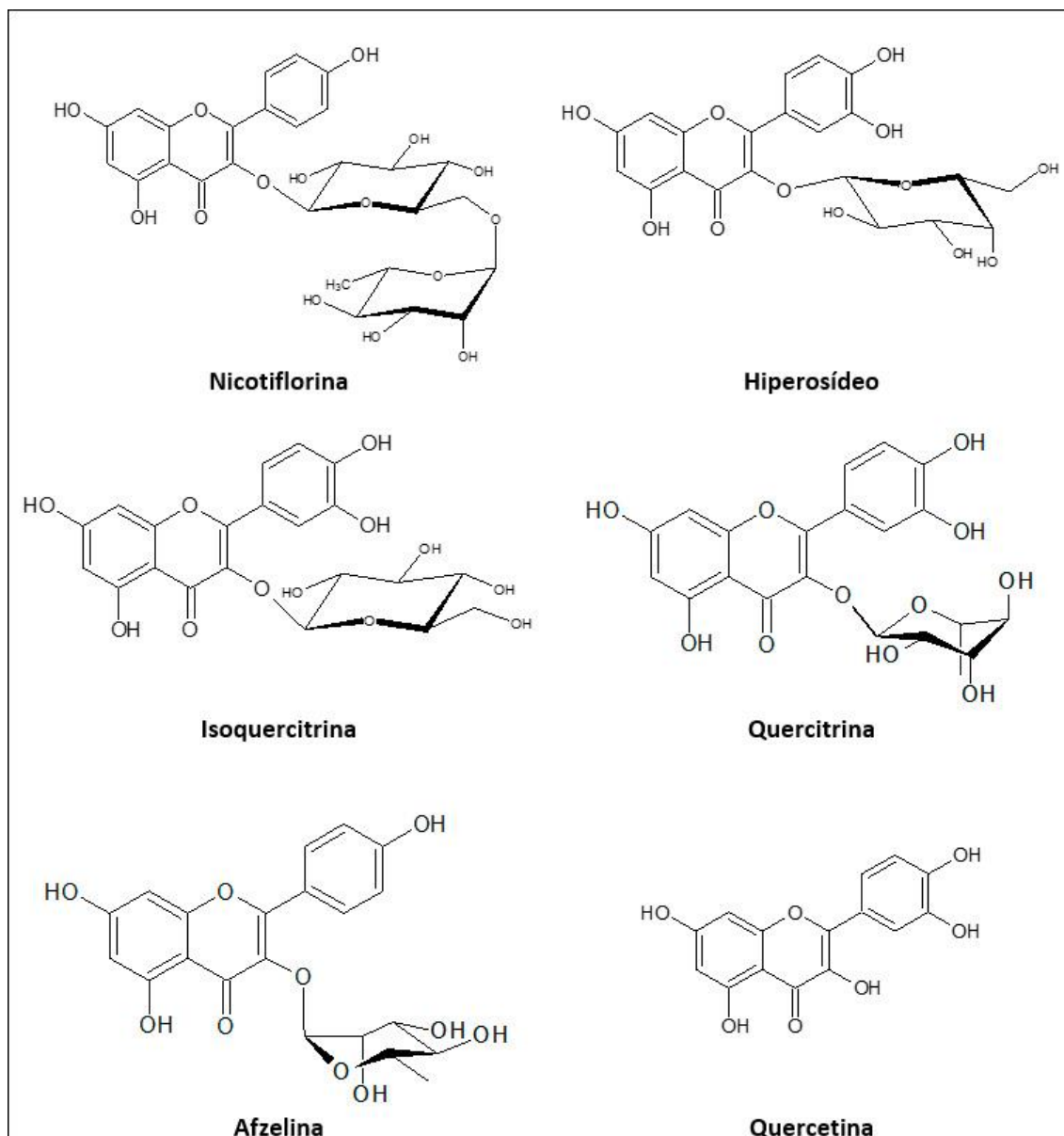


TABELA 1 – Flavonoides e ácido clorogênico (AC) caracterizados por CLAE-UV-PDA.

Sinal	Rt (min)	Área	Área %	λ_{max} (nm)	Flavonoides + AC
1	3,79	121889	1,1	250; 325	ácido clorogênico
5	7,55	345234	3,2	265; 365	nicotiflorina
6	10,50	24053	0,2	245; 355	hiperosídeo
7	11,31	115082	1,1	260; 360	isoquercitrina
12	16,60	457152	4,3	254; 355	quercitrina
14	19,64	220222	2,0	265; 345	afzelina
19	28,65	468593	4,4	245; 355	quercetina

FIGURA 3 – Flavonoides caracterizados na tintura de *Solidago chilensis*.



Conclusão

Neste trabalho foi utilizado material vegetal obtido de cultivo sustentável de *Solidago chilensis* e dedicado ao projeto desenvolvido no LaQMed-Farmanguinhos, com coleta de órgãos renováveis, sem comprometer o ciclo de vida do vegetal (inflorescências), mostrando que é possível pesquisar com sustentabilidade, além da importância do projeto desenvolvido pela Fiocruz na comunidade Quilombola. Os flavonoides caracterizados na tintura obtida de inflorescências de *Solidago chilensis* são potencialmente anti-inflamatórios e antioxidantes e, provavelmente estão relacionados às ações farmacológicas descritas para essa espécie. O ácido clorogênico caracterizado neste trabalho, também apresenta ação antioxidante. A quercetina foi identificada através de padrão adquirido comercialmente (Sigma-Aldrich®) e as demais substâncias, pela análise dos seus tempos de retenção, espectros no UV e dados obtidos da literatura. Este estudo contribuiu para o controle de qualidade da referida tintura na composição de cremes e géis de arnica

brasileira (*Solidago chilensis*), pelo município do Rio de Janeiro, espécie descrita no Memento Terapêutico Fitoterápico do Rio de Janeiro.

Referências

AGNIHOTRI, S.; WAKODE, S.; AGNIHOTRI, A. An overview on anti-inflammatory properties and chemo-profiles of plants used in traditional medicine. *Indian Journal of Natural Products and Resources* [Formerly, *Natural Product Radiance* (NPR)]. v.1, n.2, p.150-67. India. 2010. [\[Link\]](#)

ANTHONSEN, T.; BERGLAND, G. Constituents of *Solidago* species III. The Constitution and Stereochemistry of Diterpenoids from *Solidago missouriensis* Nutt. *Acta Chemica Scandinavica*, v.27, n.3, p. 1073-1082. 1973. [\[Link\]](#)

ANTHONSEN, T.; MCCABE, P.H.; MCCRINDLE, R.; MURRAY, R.D.H. Constituents of *Solidago* Species-I: The Constitution and Stereochemistry of Diterpenoids from *Solidago canadensis* L. Elsevier. *Tetrahedron*, v.25, p. 2233-2239. USA. 1969. ISSN 0040-4020. [\[CrossRef\]](#)

APÁTI, P.; SZENTMIHÁLYI, K.; BALÁZS, A.; BAUMANN, D.; HAMBURGER, M.; KRISTON, T.S.Z.; SZOKE E.; KERY, A. HPLC analysis of the flavonoids in pharmaceutical preparations from Canadian goldenrod (*Solidago canadensis*). Springer. *Chromatographia* Supp., v.56, p. S-65-S-68. USA. 2002. ISSN 1612-1112. [\[CrossRef\]](#)

APÁTI, P.G. *Antioxidant constituents in Solidago canadensis L. and its traditional phytopharmaceuticals*. Thesis Doctor. Hungarian Academy of Sciences, Chemical Research Centre. Institute of Chemistry. Budapest. 2003. [\[Link\]](#)

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE FARMACÊUTICOS HOMEOPATAS (ABH). *Manual de normas técnicas para farmácia homeopática*. 3ª ed. São Paulo. 2003.

BARROS, M.C.T.C. *Preparação de novos derivados flavonoides com potencial atividade biológica*. Dissertação de mestrado em Química Farmacêutica Industrial, apresentada na Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra. Coimbra. 2012. [\[Link\]](#)

BRASIL. ANVISA. *Farmacopéia Homeopática Brasileira*. 3ª ed. São Paulo. 2011. [\[Link\]](#)

DIAS, G.C.D. *Estudo Fitoquímico da Espécie Vegetal Solidago microglossa D.C*. Dissertação de Mestrado em Química. UFSM. 56p. Santa Maria. 2001. [\[Link\]](#)

BRASIL. ANVISA. *Farmacopeia Brasileira*. 4ª ed. São Paulo: Atheneu, 2010. (Parte I). [\[Link\]](#)

FIT. Fórum Itaboraí: Política, Ciência e Cultura na Saúde. Relatório de atividades, 2014. Disponível em: [\[Link\]](#). Acessado em: 03/10/2016.

GASTALDO, B. C. *Ação de Constituintes de Solidago chilensis Meyen (arnica brasileira) nos mecanismos de cicatrização de feridas em ratos*. Dissertação de Mestrado, apresentada na Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Departamento de Farmácia. USP. 108p. 2013. [\[CrossRef\]](#)

GOSWAMI, A.; BARUA, R. N.; SHARMA, R. P.; BARUAH, J. N.; KULANTHAIVEL, P.; HERZ, W. Clerodanes from *Solidago virgaurea*. Elsevier. *Phytochemistry*, v.23, n.4, p. 837-841. 1984. ISSN 0031-9422. [[CrossRef](#)]

GRESSLER, V.; DIAS, G. O. C.; SIMIONATTO, E.; DESSOY, E. C. S. M.; MOREL, A. F. *Isolamento de sesquiterpeno a partir do óleo volátil de Solidago microglossa D.C.* XI Encontro de Química da Região Sul (XI SBQ SUL), Pelotas, RS, 5 a 7 de novembro de 2003. QO-100. [[Link](#)]

GRIZA, F. T. *Análise do perfil fitoquímico e avaliação de efeitos biológicos de Solidago chilensis MEYEN.* Dissertação de Mestrado apresentada no Programa de pós-graduação em Genética e Toxicologia aplicada, Universidade Luterana do Brasil, Canoas, 97f. 2007. [[Link](#)]

HIRSCHMANN, S. G. A Labdan Diterpene from *Solidago chilensis* roots. *Planta Medica*, v.54, p. 179-180. USA. 1988. ISSN 0032-0943. [[CrossRef](#)]

JIANG, T.; HUANG, B. K.; QIN, L. P. A Survey of Chemical and Pharmacological studies on *Solidago*. *Journal of Chinese Integrative Medicine*, v. 4, n.4, p. 430-435. 2006. ISSN 2095-4964. [[CrossRef](#)]

KALEMBA, D. Constituents of the Essential Oil of *Solidago virgaurea* L. Wiley. *Flavour and Fragrance Journal*, v. 13, p. 373-376. USA. 1998. ISSN 1099-1026. [[CrossRef](#)]

KASALI, A. A.; EKUNDAYO, O.; PAUL, C.; KONIG, W. A. Epi-Cubebanes from *Solidago canadensis*. Elsevier. *Phytochemistry*, v. 59, p. 805-810. USA. 2002. ISSN 0031-9422. [[CrossRef](#)]

LORENZI, H.; MATOS, F.J. *Plantas Medicinais do Brasil.* Instituto Plantarum de Estudos da Flora Ltda. SP. p.170-171. 2002.

LU, T.; VARGAS, D.; FRANZBLAU, S.G.; FISCHER, N.H. Diterpenes from *Solidago rugosa*. Elsevier. *Phytochemistry*. v.38, n.2, p. 451-456.USA. 1995. ISSN 0031-9422. [[CrossRef](#)]

RAZMILIC, I. B.; SCHMEDA-HIRSCHMAN, G. Activity of Solidagenone and their Semisynthetic Derivatives on the Glucocorticoid-Mediated Signal Transduction. *Planta Medica*, v.66, p. 86-88. USA. 2000. ISSN 0032-0943. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

SABIR, S. M.; AHMAD, S. D.; HAMID, A.; KHAN, M. Q.; ATHAYDE, M. L.; SANTOS, D. B.; BOLIGON, A. A. Antioxidant and hepatoprotective activity of ethanolic extract of leaves of *Solidago microglossa* containing polyphenolic compounds. *Food Chemistry*, v. 131, p. 741-747. USA. 2012. ISSN 0308-8146. [[CrossRef](#)]

SANTOS, M. A. P.; REIS, M. C. P. *Relato de uma experiência de incentivo ao uso popular da planta medicinal dentro de uma prática médica generalista numa comunidade adstrita.* Livro de Resumos, 07.015, XV Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, Águas de Lindóia, São Paulo. 1998.

TORI, M.; KATTO, A.; SONO, M. Nine new clerodane diterpenoids from rhizomes of *Solidago altissima*. Elsevier. *Phytochemistry*, p.487-493. USA. 1999. ISSN 0031-9422. [[CrossRef](#)]

TORRES, L. M. R.; AKISUE, M. K.; ROQUE, N. F. Quercitrina em *Solidago microglossa* DC, A Arnica do Brasil. *Revista Farmácia e Bioquímica da USP*, v.23, p.33-40. São Paulo. 1987. ISSN 0370.4726. [[Link](#)]

VALVERDE, S. S.; OLIVEIRA, T. B.; SOUZA, S. P. *Solidago chilensis* Meyen (Asteraceae). *Revista Fitos*, v.7, n.3, p. 131-136. Rio de Janeiro, 2012. ISSN 2446.4775. [\[Link\]](#)

VILA, R.; MUNDINA, M.; TOMI, F.; FURLÁN, R.; ZACCHINO, S.; CASANOVA, J.; CAÑIGUERAL, S. Composition and Antifungal Activity of the Essential Oil of *Solidago chilensis*. *Planta Medica*, v.68, n.2. p. 164-167. USA. 2002. ISSN 0032-0943. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

Conflito de interesses: O presente artigo não apresenta conflitos de interesse.

Histórico do artigo: Submissão: 15/09/2016 | Aceite: 27/10/2017 | Publicação: 25/09/2017

Como citar este artigo: OLIVEIRA, B. T.; BASTOS, M. P. B.; KELLY, M. A.; MONTEIRO, S. S.; VALVERDE, S. S. Caracterização de flavonoides por CLAE-UV-PDA em tintura de inflorescências de *Solidago chilensis* Meyen cultivada em Itaipava (RJ). *Revista Fitos*. Supl. p. 17-25. Rio de Janeiro. 2017. e-ISSN 2446.4775. Disponível em: <<http://revistafitos.far.fiocruz.br/index.php/revista-fitos/article/view/397>>. Acesso em: 11 maio 2017.

Licença CC BY 4.0: Você está livre para copiar e redistribuir o material em qualquer meio; adaptar, transformar e construir sobre este material para qualquer finalidade, mesmo comercialmente, desde que respeitado o seguinte termo: dar crédito apropriado e indicar se alterações foram feitas. Você não pode atribuir termos legais ou medidas tecnológicas que restrinjam outros autores de realizar aquilo que esta licença permite.
