

IDENTIFICACIÓN DEL ÁCIDO ROSMARÍNICO A PARTIR DE *Cordia sebestena* (BORAGINACEAE)

MSc. Nicole Porta¹, MSc. Maybeline Danis¹, Dr. Néstor Peña¹, Dra. Dinorah Ávila¹,
Dra. Frine Ruiz¹, Dr. José Ortega F.^{1*}

¹Laboratorio de Productos Naturales. Departamento de Química, Facultad Experimental de Ciencias, Universidad del Zulia. Apartado 526. Maracaibo, Venezuela.

*Autor para la correspondencia. E-mail: jgof1970@gmail.com

Recibido: 7-2-2018 / Aceptado: 15-5-2018

RESUMEN

El ácido rosmarínico es un éster del ácido cafeico y el ácido 3,4-dihidroxifenil láctico, un fenil propanoide natural, que se encuentra principalmente en las especies de la familia Boraginaceae, la subfamilia Nepetoideae de la familia lameaceae y en algunas plantas inferiores como los helechos. Se aisló e identificó por primera vez a partir de *Rosmarinus officinalis* por dos químicos italianos, Scarpati y Oriente en 1958. Se realizó fraccionamiento ácido-base sobre el extracto hidroalcohólico crudo (ECH), con el propósito de obtener únicamente fracción de ácidos fuertes (Af). La misma se separó por cromatografía de columna para obtener la subfracción Af-1, a partir de la cual se aisló un sólido amarillo con PF 170 °C, el cual se caracterizó química y espectroscópicamente por UV, IR y RMN ¹H, ¹³C y se identificó como ácido rosmarínico.

Palabras clave: Boraginaceae, *Cordia sebestena*, fenoles, ácido rosmarínico.

IDENTIFICATION OF ROSMARINIC ACID FROM *Cordia sebestena* (BORAGINACEAE)

ABSTRACT

Different investigations on the Boraginaceae family have focused on the search for substances of proven pharmacological activity. The *Cordia sebestena* species, has not been studied as much, in a chemical and pharmacological way, so it is interesting to study this endemic plant in the western Venezuelan region. The plant material was collected in the city of Maracaibo, Zulia state. Raw hydroalcoholic extract was obtained from the fresh leaves by maceration with isopropanol-water (7: 3). By means of acid-base extraction, the fraction of strong acids was obtained. It was separated by column chromatography to obtain Af-1 subfraction, from which a yellow solid was isolated with mp 170 ° C, which was characterized chemically and spectroscopically by UV, IR and ¹H, ¹³C NMR and identified as rosmarinic acid. Rosmarinic acid is an ester of caffeic acid and 3,4-dihydroxyphenyl lactic acid, a natural phenyl propanoid, which is found mainly in the species of the family Boraginaceae, the subfamily Nepetoideae of the family Lameaceae and in some lower plants such as Ferns.

Keywords: Boraginaceae, *Cordia sebestena*, phenols, rosmaric acid.



IDENTIFICAÇÃO DO ÁCIDO ROSMARÍNICO DE *Cordia sebestena* (BORAGINACEAE)

RESUMO

O ácido rosmarínico é um éster do ácido cafeico e o ácido 3,4-dihidroxifenil láctico, um fenil propanoide natural, encontrado principalmente nas espécies da família Boraginaceae, a subfamília Nepetoideae da família Lamiales e em algumas plantas inferiores como as Samambaias. Foi isolado e identificado pela primeira vez a partir de *Rosmarinus officinalis* por dois químicos italianos, Scarpati e Oriente em 1958. O fracionamento ácido-base foi realizado no extracto hidroalcoólico bruto (ECH), com o objetivo de obter apenas uma fracção ácida forte (Af). Separou-se por cromatografia em coluna para obter a sub-fracção Af-1, da qual se isolou um sólido amarelo com PF 170 ° C, que foi caracterizado quimicamente e espectroscopicamente por UV, IR e RMN ¹H, ¹³C e identificado como Ácido Rosmarínico.

Palavras-chave: Boraginaceae, *Cordia sebestena*, fenóis, ácido rosmarínico.

1. INTRODUCCIÓN

Los avances en la fitoquímica buscan como objetivo principal, aislar metabolitos secundarios a partir de plantas de las cuales se conozca su uso en la medicina tradicional para aliviar ciertas dolencias. En este sentido, la familia *Boraginaceae* abarca un gran número de plantas utilizadas en la medicina popular; por ejemplo, es muy conocido el uso de las hojas de la borraja (*Borrago officinalis*) contra los cálculos, gota, e ictericia y la infusión de flores del cauajaro (*Cordia alba*), como antipirético y expectorante (Pittier, 1978; Schnee, 1984). A esta familia de las *Boraginaceae*, pertenece el género *Cordia*, del cual se han identificado y estudiado alrededor de 300 especies a nivel mundial, sobre todo en regiones cálidas. En la geografía venezolana, específicamente en el estado Zulia, son comunes las especies *C. sebestena*, *C. dentata*, *C. policephala* y *C. collococca*. Este género es una fuente conocida de benzoquinonas, naftoquinonas, hidroquinonas, cromenos, triterpenos, sesquiterpenos, fenoles y flavonoides. Muchos compuestos originalmente aislados de especies de *Cordia*, han sido reportados por presentar actividades biológicas, como antifúngica, antioxidante, larvicida, antiinflamatoria y anti-andrógena, características de los compuestos encontrados en los extractos que fueron estudiados (Lawal, Mbanu & Adeniyi, 2014).

Desde el punto de vista farmacológico, los fenoles pueden fungir como antioxidantes, antimutagénicos, anticancerígenos, antialérgicos, antiinflamatorios, antivirales, antiulcerosos, antidiarréicos, antihelmínticos y antihepatotóxicos. En general, los fenoles provenientes de plantas pueden proteger de enfermedades con una etiología y fisiopatología relacionada con especies reactivas de oxígeno, puesto que los compuestos fenólicos actúan como agentes

reductores (Carvalho *et al.*, 2015). Por todas estas razones los compuestos fenólicos de origen natural han sido objeto de diversas investigaciones.

En Venezuela, existen pocos reportes sobre el contenido de fenoles totales presentes en especies del género *Cordia*. En este sentido, el objetivo de esta investigación es, evaluar el contenido fenólico de los diferentes extractos y fracciones obtenidos a partir de las hojas de *Cordia sebestena*.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Recolección del vegetal y extracción

El material vegetal (hojas) fue recolectado en febrero de 2015 a partir de un ejemplar de aproximadamente tres (3) metros y medio de alto de *C. sebestena*. Se seleccionó un espécimen sometido a condiciones de estrés ambiental (altas temperaturas, poco riego) ubicado en la Avenida 70A con Calle 81, en el Sector Ana María Campos (Coordenadas: 10° 40' 10.29" N, 71° 39' 44.80" O), Parroquia Raúl Leoni del Municipio Maracaibo, Estado Zulia, Venezuela.

Se recolectó en total 4003,81 g de material vegetal en el muestreo, oscilando el tamaño de las hojas recogidas entre 17-30 cm de largo. Una muestra del material recolectado fue tomada para su identificación taxonómica por el Lcdo. Guillermo Sthormes, del Laboratorio de Sistemática Vegetal de la Facultad de Agronomía de la Universidad del Zulia, ubicando el espécimen bajo la Referencia del Herbario No. V.037 (colectada 1995, María Dolores Pérez).

El material vegetal se sometió a un proceso de extracción y fraccionamiento, tal y como se describe a continuación: Primeramente, se tomaron 1055,57 g de material vegetal fresco, que fue procesado 24 horas luego de la recolección, sometiéndolo a un proceso de maceración en frío empleando isopropanol como solvente. Una vez finalizado el tiempo de extracción por maceración, el extracto se filtró y se evaporó a presión reducida en un rotaevaporador marca Bucci para obtener el extracto hidroalcohólico crudo (EHC). Posteriormente, se tomaron 20,31 g de EHC y se realizó el fraccionamiento sucesivo utilizando solventes como éter de petróleo, acetato de etilo y metanol, consecutivamente.

2.2. Aislamiento e identificación

A partir de 2,89 g del EHC, empleando en esta ocasión dietil éter (Riedel-de Hæn, 99%) como solvente orgánico para obtener únicamente la fracción de ácidos fuertes (Af). A partir

de la fracción Af se realizó una separación cromatográfica por columna abierta, monitoreando el proceso por cromatografía de capa fina (TLC).

Para ello, se empacó una columna con gel de sílice (9,8 g) y se sembraron 0,140 g de la fracción, realizando eluciones continuas con los sistemas de solventes: a) cloroformo: éter dietílico en proporciones 8:2 y b) cloroformo: metanol en proporción 1:1, para obtener un total de 19 fracciones, que fueron monitoreadas por cromatografía de capa fina reuniendo finalmente las que fuesen semejantes. La subfracción que resultó más importante para la presente investigación fue la Af-1, obtenida a partir de las fracciones 9 y 10 de la separación cromatográfica.

Ácido (2R)-3-(3,4-dihidroxifenil)-2-[(E)-3-(3,4-dihidroxifenil)prop-2-enoil]oxipropanoico (Ácido Rosmarínico)

A partir de la subfracción Af-1 (16 mg) se separó un sólido amorfo amarillo de punto de fusión 170° C, que presentó respuesta positiva al FeCl₃ y negativa frente al reactivo de Naturstoff.

UV (MeOH): λ_{\max} (nm): 289(I) 328(II). Adición de gotas de NaOH 5 % 302(I), 354(II).

IR (KBr): 3490-300 cm⁻¹ (banda ancha; ν OH de fenoles, ácido carboxílico), 1722 cm⁻¹ (ν C=O de ácido carboxílico), 1690 cm⁻¹ (ν C=O éster conjugado), 1620 cm⁻¹ (ν C=C olefínica).

RMN ¹H (CD₃OD, 300 MHz), δ (ppm): 7,54 (1H, d, J=15.9 Hz), 7,03 (1H, d, J= 2,1 Hz), 6,94 (1H, dd, J= 8,4 Hz; 2,1 Hz), 6,76 (1H, d, J= 8,1 Hz), 6,73 (1H, d, J= 2,1 Hz), 6,68 (1H, d, J= 8,1 Hz), 6,60 (1H, dd, J= 8,1 Hz; 2,1 Hz), 6,25 (1H, d, J= 15,9 Hz), 5,17 (1H, dd, J= 8,25 Hz, 4,5 Hz), 3,09 (1H, dd, J= 14,4 Hz; 4,5 Hz), 2,99 (1H, dd, J= 14,2 Hz; 8,4 Hz).

RMN ¹³C (CD₃OD, 75 MHz), δ (ppm): 173,48; 168,45; 149,73; 147,71; 146,81; 146,17; 145,28; 129,28; 127,65; 123,13; 121,80; 117,58; 116,51; 116,30; 115,24; 114,45; 74,61; 37,92.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como puede observarse, a partir de la subfracción Af-1 se logró el aislamiento de un sólido amorfo de coloración amarilla, con un punto de fusión de 170 °C. Dicho sólido presentó fluorescencia bajo luz UV (366 nm) y reacción positiva para presencia de fenoles. La respuesta negativa ante el ensayo de Naturstoff evidencia que el compuesto no presenta estructura flavonoide, por lo que posiblemente, en vista de su fluorescencia azul a 366 nm, se trate de un ácido fenólico.

En el espectro UV, para la subfracción Af-1 en metanol, se observan dos bandas importantes ubicadas a 328 y 289 nm que sufren desplazamiento batocrómico al adicionar gotas de NaOH al 5%. Ello sugiere la presencia de grupos fenólicos, ratificado por la fuerte sensibilidad del espectro UV al cambio de pH por el paso de la forma fenol a fenóxido al alcalinizar el medio, desplazando las bandas de absorción.

Se ha reportado que el espectro UV del ácido rosmarínico en metanol presenta un máximo de absorbancia a 328 nm con un hombro a 290 nm, lo cual coincide con las señales observadas para el compuesto aislado en la subfracción Af-1 (Oztürk *et al.*, 2010).

En el espectro FTIR para el compuesto encontrado en Af-1 se observan las siguientes señales: una banda ancha entre 3490-2500 cm^{-1} que corresponde a tensiones de grupos -OH de ácido carboxílico y alargamiento de grupos -OH fenólicos, una señal a 1722 cm^{-1} debido a las vibraciones de tensión para un grupo carbonilo de un ácido carboxílico, a 1690 cm^{-1} una señal que corresponde a la vibración de tensión de un carbonilo para un éster conjugado y a 1620 cm^{-1} una señal que se debe a las vibraciones de tensión de enlace olefínico.

Se ha reportado que el espectro IR para el ácido rosmarínico muestra señales entre 3350-3550 cm^{-1} correspondiente a los grupos -OH de la molécula, el carbonilo ácido a 1740 cm^{-1} y el del éster conjugado a 1720 cm^{-1} (Mehrabani *et al.*, 2005), señales similares a las encontradas en la caracterización espectroscópica del compuesto proveniente de la subfracción Af-1.

En el espectro de ^1H RMN para el compuesto aislado en Af-1 se observan señales, tanto en la zona aromática, como en la alifática. En la zona aromática se aprecia una señal doblete a 7,54 ppm que integra para un protón, con una constante de acoplamiento de 15,9 Hz, característica para un acoplamiento tipo trans de una olefina. El segundo protón, que exhibe una constante de acoplamiento trans de 15,6 Hz, se observa como un doblete a 6,25 ppm, a campo más alto por encontrarse adyacente a un carbono carbonílico que provoca apantallamiento de la señal. Ambas señales indican pues, la presencia de una olefina adyacente a un carbono carbonílico, en la que los protones se encuentran en una configuración *trans*.

Siguiendo el análisis de las señales presentes en la zona aromática, puede observarse un doblete a 7,03 ppm que integra para un protón y presenta una constante para un acoplamiento meta de 2,1 Hz. Este protón por su lado presenta una señal a 6,94 ppm, que se observa como un doblete de doblete que integra para un protón, con constantes de

acoplamiento de 8,4 Hz y 2,1 Hz, características de acoplamientos orto y meta. A 6,76 ppm se observa un doblete que integra para un protón y exhibe una constante de 8,1 Hz, atribuido a un acoplamiento tipo orto. Por otra parte, se observa a 6,73 ppm un doblete que integra para un protón y exhibe una constante de acoplamiento de 2,1 Hz, característica para un segundo acoplamiento meta. A 6,68 ppm se observa un doblete que integra para un protón y tiene una constante de acoplamiento de tipo orto de 8,1 Hz. Finalmente, a 6,60 ppm se observa un doblete de dobletes, con constantes de acoplamiento de 8,1 Hz y 2,1 Hz, características de acoplamientos tipo orto y meta.

A campo más alto, pueden observarse las señales de protones sobre carbonos alifáticos, que corresponden a un acoplamiento de un sistema ABX. A un desplazamiento de 5,17 ppm se observa un doblete de dobletes, con constantes de acoplamiento de 8,25 Hz y 4,5 Hz, asignables a la parte X del sistema ABX, es decir, al protón ubicado sobre un carbono quiral, que presenta acoplamientos vecinales con los protones ubicados sobre el carbono adyacente a éste. Por otro lado, a 3,09 y 2,99 ppm se observan las señales que corresponden a la parte AB del sistema ABX, con constantes de acoplamientos vecinales de 14,4 Hz y 14,2 Hz y geminales de 4,5 Hz y 8,4 Hz, asignables a los protones diastereotópicos ubicados sobre el carbono adyacente al carbono quiral.

En el espectro ^{13}C RMN se observa un total de dieciocho (18) señales. A 173,48 ppm y 168,45 ppm se observan las señales características para carbonos de grupos carbonilo para las funciones ácido carboxílico y éster, respectivamente. Entre 149,73 ppm y 145,28 ppm se observan 5 señales asignadas a los átomos de carbono aromático sobre los que se ubican los grupos catecol, (149,73 ppm, 147,71 ppm, 146,17 ppm, 145,28 ppm), así como también un carbono olefínico (146,81 ppm). Entre 129,28 ppm y 114,45 ppm se observan señales correspondientes a carbonos del tipo aromático, y una señal para un segundo carbono olefínico se observa a 115,24 ppm. A campo más alto, en 74,61 ppm y 37,92 se observan las señales atribuibles a los átomos de carbono alifático.

Cabe destacar, que las señales de ^1H y ^{13}C coinciden con las reportadas en la literatura, para el ácido rosmarínico, aislado a partir de la fracción soluble en acetato de etilo de *C. sinensis* (Mehrabani et al., 2005), tal y como se muestra en las **Tablas 1 y 2**. Además de coincidir las señales espectrales, el compuesto aislado en la fracción de acetato de etilo a partir de *C. sinensis* (Mehrabani et al., 2005) presentó propiedades físicas similares a las encontradas en la presente investigación para el sólido aislado de la subfracción Af-1.

Identificación del Ácido Rosmarínico a partir de *Cordia Sebestena* (Boraginaceae)

Tabla 1. Datos espectroscópicos comparativos de RMN ¹H de la subfracción Af-1 de *C. sebestena* y la fracción de acetato de etilo de *C. sinensis* (Mehrabani *et al.*, 2005).

Desplazamiento (δ). Solvente: CD ₃ OD		Protón al que se atribuye señal
Subfracción Af-1	Reportado ¹⁹	
7,54, d, J=15,9 Hz	7,51, d, J=15,5 Hz	7'
7,03, d, J= 2,1 Hz	7,03, d, J= 2,0 Hz	2'
6,94, dd, J= 8,4 Hz; 2,1 Hz	6,91, dd, J= 8,0 Hz; 2,0 Hz	6'
6,76, d, J= 8,1 Hz	6,77, d, J= 8,0 Hz	5'
6,73, d, J= 2,1 Hz	6,72, d, J= 2,0 Hz	2
6,68, d, J= 8,1 Hz	6,68, d, J= 8,0 Hz	5
6,60, dd, J= 8,1 Hz,; 2,1 Hz	6,63, dd, J= 8,0 Hz,; 2,0 Hz	6
6,25, d, J= 15,9 Hz	6,27, d, J= 15,5 Hz	8'
5,17, dd, J= 8,25 Hz, 4,5 Hz	5,09, dd, J= 10,0 Hz, 3,5 Hz	8
3,09, dd, J= 14,4 Hz; 4,5 Hz	3,10, dd, J= 14,5 Hz; 3,5 Hz	7a
2,99, dd, J= 14,2 Hz; 8,4 Hz	2,94, dd, J= 14,5 Hz; 10,0 Hz	7b

Debido a las evidencias químicas y espectroscópicas observadas para el compuesto aislado en la subfracción Af-1, se concluye que el compuesto en cuestión es el ácido rosmarínico:

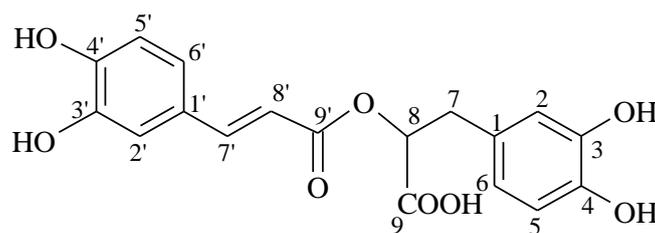


Figura 1. Ácido rosmarínico

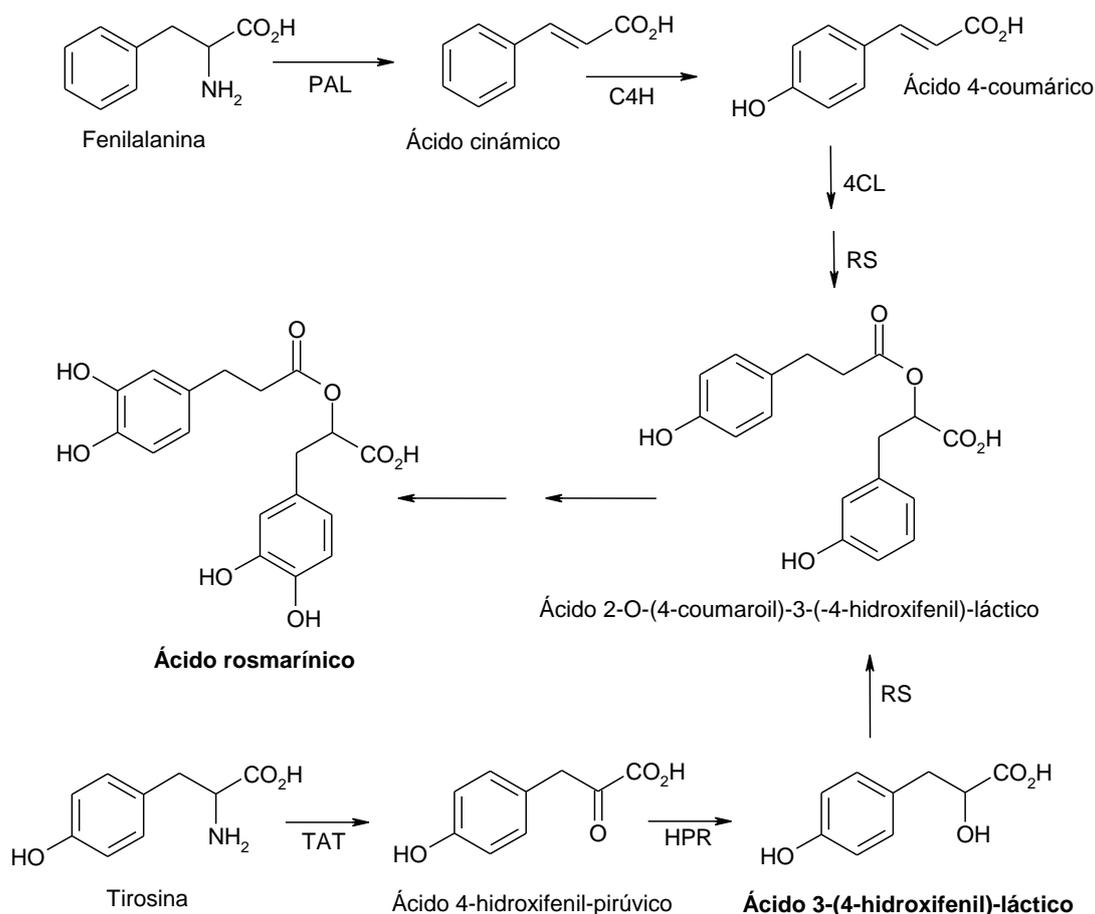
Tabla 2. Datos espectroscópicos comparativos de RMN ^{13}C de la subfracción Af-1 de *C. sebestena* y la fracción de acetato de etilo de *C. sinensis* (Mehrabani *et al.*, 2005).

Desplazamiento (δ). Solvente: CD_3OD		Carbono al que se atribuye señal
Subfracción Af-1	Reportado ¹⁹	
173,48; 168,45	177,64; 169,24	9; 9'
149,73; 145,28	149,50; 144,93	4'; 4
147,71; 146,17	146,85; 146,08	3'; 3
146,8; 137,92	146,79; 38,93	7'; 7
129,28; 127,65	131,29; 128,12	1; 1'
123,13; 121,80	123,04; 121,89	6'; 6
117,58; 114,45	117,63; 115,27	2; 2'
116,51; 116,30	116,60; 116,34	5'; 5
115,24; 74,61	115,77; 77,79	8'; 8

El ácido rosmarínico es un éster del ácido cafeico (ácido 3,4-dihidroxicinámico) y ácido 3,4-dihidrofenoiláctico. Sus estudios biogénicos iniciaron en el año 1970 y se ha demostrado que los dos aminoácidos fenilalanina y tirosina forman parte del mecanismo de biosíntesis (**Figura 2**), donde la parte de ácido cafeico se forma a partir de la fenilalanina y el ácido 3,4-dihidrofenoiláctico proviene de la tirosina (Al-Musayeib *et al.*, 2011).

Su estructura química fue descrita por Scarpati y Oriente en el año 1958 y se aisló a partir de la *Rosmarinus officinalis* (Lamiaceae) a lo cual se debe su nombre (Petersen & Simmonds, 2003). Este metabolito se encuentra comúnmente en especies de la familia de la *Boraginaceae* y en la subfamilia *Nepetoideae* de la *Lamiaceae* (Petersen, 2013) y de hecho éste es considerado como un marcador quimiotaxonómico para la familia *Boraginaceae*, existiendo incluso reportes de aislamientos para las especies del género *Cordia* (Bhatt *et al.*, 2013).

Identificación del Ácido Rosmarínico a partir de *Cordia Sebestena* (Boraginaceae)



PAL: Fenilalanina-amonioliasa; C4H: Cinámico-4-hidroxilasa; 4CL: 4-coumárico-CoA-ligasa; TAT: Tirosina-aminotransferasa; HPR: Hidroxifenilpiruvato-reductasa

Figura 2. Ruta biosintética propuesta para la formación del ácido rosmarínico (Geller et al., 2010).

Este metabolito es conocido por poseer actividad antioxidante, antiinflamatoria, antibacteriana y ha mostrado inhibición sobre la transcriptasa reversa y la proteasa del VIH. En cuanto a su incidencia en el género *Cordia* se ha demostrado la presencia del ácido rosmarínico en flores de *C. dentata* (Bhatt et al., 2013), en el extracto etanólico a partir de hojas de *C. americana* (Geller et al., 2010) también se ha identificado extractos de *C. verbenácea* señalándose que este metabolito es en efecto marcador quimiotaxonómico para esta especie (Matos et al., 2015). Se ha identificado la presencia de ácido rosmarínico en el extracto de acetato de etilo de *C. sinensis* (Mehrabani et al., 2005) y en *C. sebestena* se ha logrado aislar a partir del extracto de acetato de etilo de los frutos (Dai et al., 2010). En la presente investigación, se ha aislado a partir de hojas de *C. sebestena*, lo cual no se encuentra aún reportado en la literatura, representado ello en un aporte en referencia a estudios fitoquímicos para la especie.

4. CONCLUSIONES

El estudio fitoquímico del extracto hidroalcohólico proveniente de las hojas de *Cordia sebestena* permitió la identificación del ácido rosmarínico con componente principal de dicho extracto y que pudiera ser responsable de la actividad antioxidante atribuida a esta especie.

5. AGRADECIMIENTO

Nuestro agradecimiento al Consejo de desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad del Zulia (CONDES-LUZ) por el financiamiento parcial de este trabajo a través del proyecto VAC-CONDES-CC-0615-14 y al Laboratorio de Resonancia Magnética Nuclear del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC) por el estudio espectroscópico realizado.

6. REFERENCIAS

- Al-Musayeb, N., Perveen, S., Fatima, I., Nasir, M., Hussain, A. (2011). Antioxidant, Anti-Glycation and Anti-Inflammatory Activities of Phenolic Constituents from *Cordia sinensis*. *Molecules*, 16: 10214-10226.
- Bhatt, R., Mishra, N., Kumar, P. (2013). Phytochemical, pharmacological and pharmacokinetics effects of rosmarinic acid. *Journal of Pharmaceutical and Scientific Innovation*, 2 (2): 28-34.
- Carvalho, D., Costa, H., Gonçalves, T., Ramos, M., Sanches-Silva, A. (2015). Advances in phenolic compounds analysis of aromatic plants and their potential applications. *Trends in Food Science & Technology*, 45 (2): 336-354.
- Dai, J., Sorribas, A., Yoshida, W., Williams, P. (2010). Sebestenoids A–D, BACE1 inhibitors from *Cordia sebestena*. *Phytochemistry*, 71: 2168–2173.
- Geller, F., Schmidt, C., Göttert, M.; Fronzab, M., Schattel, V., Heinzmann, B., Werz, O., Flores, E., Merfort, I., Laufer, S. (2010). Identification of rosmarinic acid as the major active constituent in *Cordia Americana*. *Journal of Ethnopharmacology*, 128, 561-566.
- Lawal, T., Mbanu, A., Adeniyi, A. (2014). Inhibitory activities of *Ceiba pentandra* (L.) Gaertn. and *Cordia sebestena* Linn. on selected rapidly growing mycobacteria. *African Journal of Microbiology Research*, 8 (24), 2387-2392.
- Matos, D., Tironi, F., Martins, D., Fagg, C., Netto, N., Simeoni, L., Magalhães, P., Silveira, D., Fonseca-Bazzo, Y. (2015). Determinação de ácido rosmarínico em *Cordia verbenacia* por cromatografia líquida: aplicabilidade em estudo sazonal. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais.*, 17 (4) supl. II, 857-864.
- Mehrabani, M., Shams-Ardakani, M., Ghannadi, A., Ghassemi, N., Sajjadi, S. (2005). Production of rosmarinic acid in *Echium amoenum* Fisch. And C.A. Mey. *Cell Cultures, Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 2: 111-115.
- Öztürk, M., Duru, M., İnce, B., Harmandar, M., Topçu, G. (2010), A new rapid spectrophotometric method to determine the rosmarinic acid level in plant extracts. *Food Chemistry*, 123: 1352-1356.
- Petersen, M. (2013). Rosmarinic acid: new aspects. *Phytochemistry Reviews*, 1: 21-25.
- Petersen, M., Simmonds, M. (2003). Molecules of interest: Rosmarinic Acid. *Phytochemistry*, 62, 121-125.
- Pittier, H. (1978). *Manual de las Plantas Usuales de Venezuela*. Editorial Ariel, España. pp. 333-425.
- Schnee, L. (1984). *Plantas comunes de Venezuela*. Ediciones UCV, Venezuela. pp. 806.