

## DETERMINAÇÃO DE $\beta$ -ASARONA EM BEBIDAS ALCOÓLICAS \*

Helena Yuco YABIKU \*\*  
Franco Maria LAJOLO \*\*\*

RIALA6/510

YABIKU, H.Y. & LAJOLO, F.M. — Determinação de  $\beta$ -asarona em bebidas alcoólicas. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 40(2):135-145, 1980.

**RESUMO:** O controle de óleo de cálamo em bebidas alcoólicas foi feito pela determinação quantitativa de  $\beta$ -asarona, seu princípio ativo, através de 2 métodos: fluorimétrico e por cromatografia em fase gasosa e sua presença ou identidade, confirmada com auxílio de espectrometria de massa. Entre 56 amostras de bebidas alcoólicas analisadas de 18 marcas diferentes, os teores de  $\beta$ -asarona variaram desde 0 a 4,96 ppm e apenas uma marca mostrou estar acima do permitido que é 1 ppm estabelecido pelo Conselho da Europa. O método de cromatografia em fase gasosa mostrou-se preferível ao método fluorimétrico e foi sugerido para ser adotado como método oficial na determinação de  $\beta$ -asarona em bebidas alcoólicas.

**DESCRITORES:**  $\beta$ -asarona em bebidas alcoólicas, determinação; aromatizante (óleo de cálamo) em bebidas alcoólicas; cálamo, óleo, em bebidas alcoólicas; bebidas alcoólicas, aromatizante; óleo de cálamo em bebidas alcoólicas.

### INTRODUÇÃO

*Acorus calamus* Linn. (família *Araceae*) originária da Ásia Oriental é uma planta encontrada nas áreas pantanosas das zonas temperadas da Europa, Ásia e norte da América, ao longo dos rios e lagos<sup>1</sup>.

Segundo CAVAZZA<sup>2</sup>, ela é classificada em 4 cariotipos ou citotipos: variedade norte-americana (diplóide), variedade européia (triplóide), variedade indiana Jammu (tetraplóide) e variedade Kashmir (hexaplóide).

Dentro do gênero *Acorus calamus* se distinguem de três a quatro quimiotipos, fato que condiciona o aparecimento de diferenças analíticas entre suas variedades. Essas diferenças residem na composição ou, mais especificamente, no teor do componente éter-fenólico, o 2,4,5-trimetoxi-1-propenilbenzeno, chamado  $\beta$ -asarona, presente no óleo essencial extraído dos rizomas<sup>3,8</sup>. Assim, a concentração da

$\beta$ -asarona no óleo oscila desde traços na variedade americana ou diplóide, até cerca de 80% na variedade indiana Jammu ou tetraplóide<sup>3</sup>.

Desde a antigüidade, as raízes e os rizomas do cálamo, variedade indiana, têm sido usados para o tratamento de várias doenças<sup>4,5,9</sup>. Seu uso com fins terapêuticos no tratamento de doenças de ossos e neuromusculares, tais como raquitismo e poliomielite, foi comunicado por BIRGGAL<sup>1</sup>.

Mais recentemente, devido às suas propriedades organolépticas, o cálamo, sob a forma de extrato hidroalcoólico, é bastante usado como substância aromatizante na formulação de bebidas alcoólicas do tipo amargo que juntamente com outros componentes formam o "bouquet" do produto.

Numerosos estudos farmacológicos têm sido realizados com o óleo volátil de origem indiana<sup>4,7,9</sup>.

\* Realizado na Seção de Aditivos do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP.  
Parcialmente financiado pela Financiadora de Estudos e Projetos, Rio de Janeiro, RJ.

\*\* Do Instituto Adolfo Lutz.

\*\*\* Do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

DANDIYA *et alii*<sup>7</sup> observaram que a potenciação de efeitos hipnóticos de certos fármacos tais como barbitúricos e etanol era obtida utilizando-se o óleo volátil proveniente da destilação a vapor dos rizomas do cálamo.

Propriedades bactericidas, antiveratrínicas, antiespasmódicas, carminativas e antiarrítmicas têm sido também atribuídas ao óleo essencial<sup>8, 9, 16, 17</sup>.

As ações farmacológicas associadas à toxicidade do óleo de cálamo foram estudadas por vários autores<sup>11, 12, 13, 19</sup>.

Estudos toxicológicos têm mostrado que tumores intestinais malignos ocorreram em ratos alimentados com dietas contendo até 5.000 ppm de óleo de cálamo.

Nos Estados Unidos, diante da constatação de efeitos tóxicos, o uso de cálamo em alimentos foi banido sob qualquer de suas formas: raízes, rizomas, extrato hidroalcoólico e óleos<sup>8</sup>. No Brasil<sup>2</sup> e em muitos países da Europa<sup>6</sup>, entretanto, o seu uso ainda é permitido em concentração máxima de 1,0 ppm. Diversas técnicas analíticas têm sido propostas na tentativa de identificar e determinar quantitativamente a  $\beta$ -asarona, principal componente do óleo, em bebidas alcoólicas<sup>16, 18, 20</sup>.

O objetivo do nosso trabalho foi verificar o nível de  $\beta$ -asarona em bebidas alcoólicas normalmente consumidas no Brasil, além de padronizar e propor a oficialização de um método para sua dosagem. A presença deste componente em bebidas foi confirmada pela cromatografia em fase gasosa associada à espectrometria de massa.

## MATERIAL

Utilizaram-se 56 amostras de bebidas alcoólicas recebidas para análise de controle no Instituto Adolfo Lutz. Foram analisadas bebidas do tipo amargo tais como vermute seco ou doce, tinto ou branco, "bitter", "fernet", correspondendo a 18 marcas comerciais diferentes colhidas de diversas regiões do Estado de São Paulo.

## MÉTODO

### *Preparo das amostras de bebidas alcoólicas*

O preparo das amostras para determinação da  $\beta$ -asarona seguiu o procedimento descrito por DYER *et alii*<sup>10</sup>, com algumas modificações incluindo etapas de extração do componente tóxico das bebidas alcoólicas, purificação e posterior análise.

*Extração da  $\beta$ -asarona:* 100 ml da amostra foram transferidos para um balão de destila-

ção com ajuda de 50 ml de água. Juntaram-se alguns cacos de porcelana para evitar superaquecimento e procedeu-se à destilação simples. Coletaram-se aproximadamente 100 ml de destilado, que foram transferidos para um funil de separação de 250 ml, aos quais se adicionaram 100 ml de solução saturada de NaCl e aproximadamente 10 ml de hexana. A mistura foi então agitada vigorosamente por 10 minutos e depois foi decantada.

*Purificação:* a solução aquosa foi descartada e a porção hexânica foi lavada primeiramente com 20 ml de NaOH 1N, depois com 20 ml de HCl 1N, e finalmente com água<sup>20</sup>.

O tubo interno do funil de separação foi limpo com papel de filtro para retirar toda água e o extrato hexânico foi coletado e completado até 10 ml em balão volumétrico.

### *Determinação quantitativa*

A determinação quantitativa de  $\beta$ -asarona foi realizada por 2 métodos: fluorimétrico e por cromatografia em fase gasosa.

#### *a) Método fluorimétrico*

O extrato hexânico purificado foi transferido diretamente para uma célula fluorimétrica e sua fluorescência medida, usando como branco, a hexana. O aparelho utilizado foi o espectrofotômetro de fluorescência\* e as condições experimentais foram: comprimento de onda de excitação = 310 nm, comprimento de onda de emissão = 356 nm, largura da fenda para excitação e emissão = 10 nm, sensibilidade = 0,3, ganho = 1.

Uma curva-padrão foi preparada, registrando as intensidades das soluções-padrão de  $\beta$ -asarona, com concentrações variando de 0 a 2  $\mu\text{g/ml}$ .

O fluorímetro foi calibrado para 70% de intensidade de fluorescência relativa com padrão de  $\beta$ -asarona de 2  $\mu\text{g/ml}$ . Foi feito teste para verificar o decréscimo da fluorescência das soluções-padrão de  $\beta$ -asarona durante 3 meses.

Foi realizado teste de recuperação com soluções-padrão de  $\beta$ -asarona de concentrações de 0,2 — 0,3 — 0,5 — 1,0 — 1,5 e 2,0  $\mu\text{g/ml}$  contidas em 100 ml de etanol a 20%. O processo de extração e purificação foi realizado conforme o descrito em *Preparo das amostras de bebidas alcoólicas* (coluna 1 desta página) e as fluorescências foram registradas.

#### *b) Método de cromatografia em fase gasosa*

O aparelho utilizado foi o cromatógrafo\*\* com detector de ionização de chama e coluna de aço inoxidável, de 5 pés por 1/8 pol., empacotada com 14,7% de FFAP (Carbowax 20 M

\* Perkin-Elmer, mod. 204A e 204S.

\*\* Varian, mod. 1400.

modificado) em Chromosorb W, 80—100 "mesh".

As condições de operação foram: temperatura do detector, injetor e coluna = 230, 230 e 200 °C, respectivamente, gás de arraste = nitrogênio, fluxo do gás = 70 ml/min, sensibilidade =  $4 \times 10^{-11}$ .

*Soluções-estoque*: estearato de metila de concentração 1 mg/ml em hexana e  $\beta$ -asarona 1 mg/ml em etanol.

Na realização da curva-padrão foram preparados padrões contendo 1, 2, 3, 4 e 5 mg/l de  $\beta$ -asarona pela colocação de 100, 200, 300, 400 e 500  $\mu$ l da solução-estoque de  $\beta$ -asarona em balões volumétricos de 100 ml, contendo 90 ml de etanol a 20%. Dessa maneira, procedeu-se como no preparo das amostras.

A cada extrato hexânico obtido foram adicionados 200  $\mu$ l da solução de estearato de metila, como padrão interno.

Foram injetados diretamente no cromatógrafo 5  $\mu$ l da solução e construiu-se um gráfico colocando nas ordenadas a relação entre as alturas do componente e do padrão interno e, nas abscissas, a concentração de  $\beta$ -asarona.

#### Comprovação qualitativa

Para confirmar a presença de  $\beta$ -asarona em bebidas alcoólicas foi utilizado o espectrofotômetro de massa acoplado a cromatógrafo

gasoso\*. As condições de operação foram: coluna = SP — 2.100, energia dos elétrons = 70 e V, corrente = 30  $\mu$ A, tensão do M.E. = 2.000 V, temperatura do injetor, forno e coluna, respectivamente 240, 280, 150-220 °C, razão = 10 °C/min.

Os espectros de massa do padrão de  $\beta$ -asarona e os das amostras de bebidas foram comparados qualitativamente.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram registradas as intensidades de fluorescência relativa de soluções-padrão de  $\beta$ -asarona de concentrações variando de 0 a 2  $\mu$ g/ml (tabela 1).

A curva-padrão demonstrou que a intensidade da fluorescência é linearmente dependente da concentração nessa faixa de trabalho.

Verificou-se a estabilidade da solução de  $\beta$ -asarona em hexana, com leituras efetuadas de tempo em tempo, durante 3 meses.

As porcentagens de recuperação estão demonstradas na tabela 2 e ilustradas na figura 1. A média das recuperações foi de  $91,60 \pm 1,32$  onde as determinações foram efetuadas em duplicata. Deve-se salientar que a fase de extração com hexana é crítica para se obter recuperação elevada, pois a agitação deve ser contínua e vigorosa por 10 minutos.

TABELA 1

*Soluções-padrão de  $\beta$ -asarona com suas respectivas intensidades relativas de fluorescência*

$\beta$ -asarona ( $\mu$ g/ml)	Intensidade (%)
2,0	70
1,5	53
1,0	36
0,5	18
0,3	10
0,2	7

TABELA 2

*Porcentagem de recuperação das soluções-padrão de  $\beta$ -asarona pelo método fluorimétrico*

$\beta$ -asarona ( $\mu$ g/ml)	Recuperação (%)
2,0	90,72
1,5	90,57
1,0	92,36
0,5	93,06
0,3	90,00
0,2	92,86
Média $\pm$ Desvio padrão (D.P.)	91,60 $\pm$ 1,32

\* Hewlett-Packard mod. 5992A.

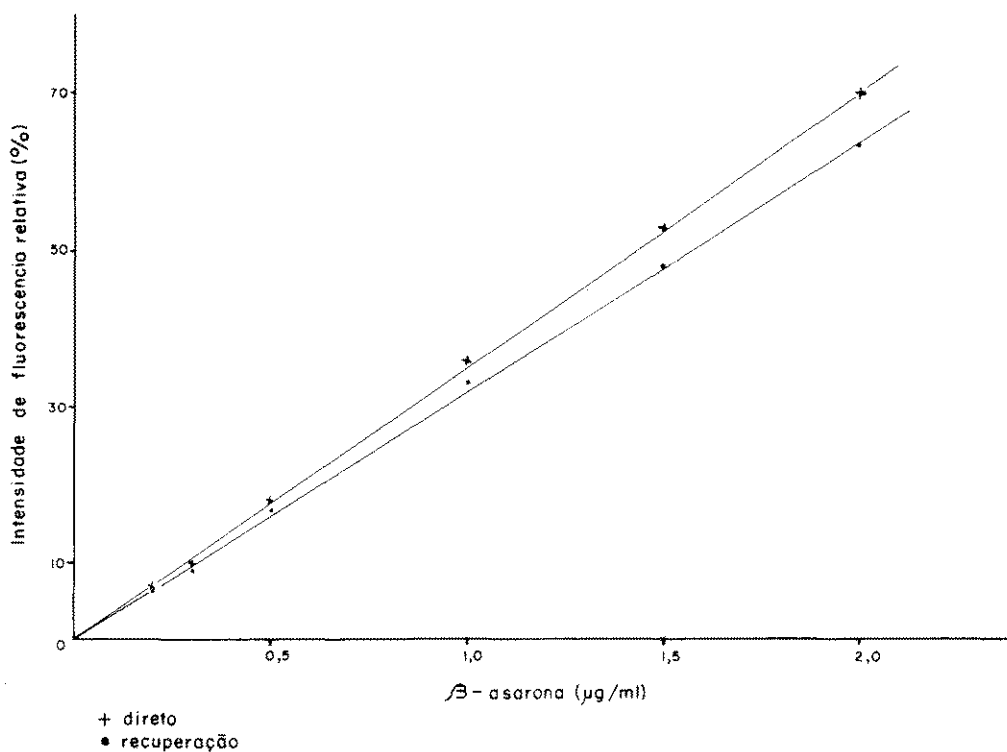


FIGURA 1 — Curvas-padrão das soluções-padrão de  $\beta$ -asarona (0 a 2  $\mu\text{g/ml}$ ) com e sem recuperação, pelo método fluorimétrico.

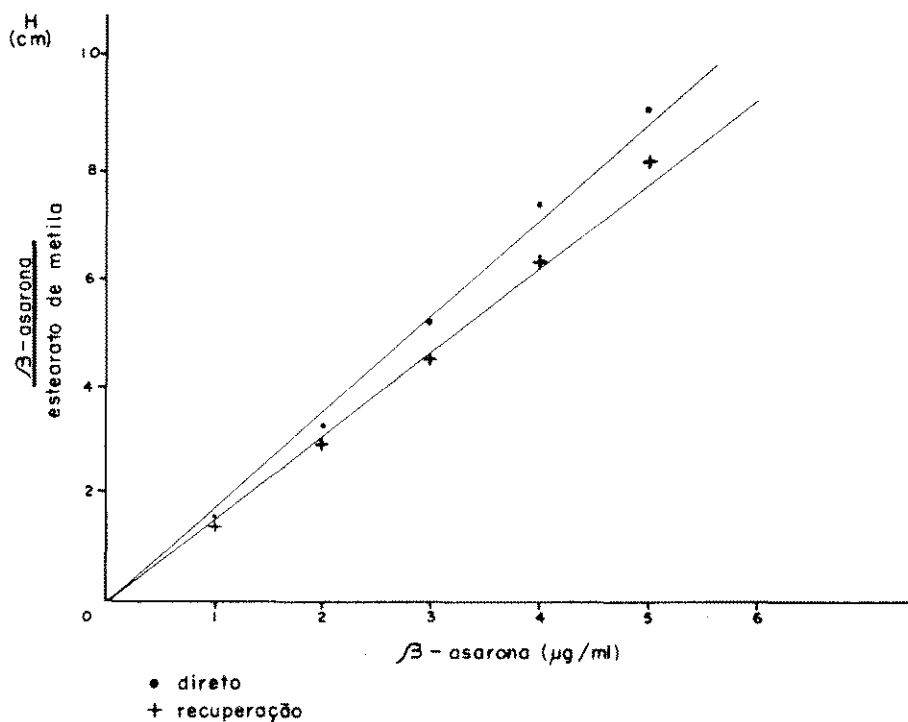


FIGURA 2 — Curvas-padrão das soluções-padrão de  $\beta$ -asarona levando em conta o estearato de metila como padrão interno. Cromatógrafo gasoso.

Os valores por nós encontrados estão muito próximos aos encontrados por WOJCIOWICZ<sup>20</sup>.

A sensibilidade do método foi diminuída em relação à do trabalho de Wojtowicz, uma vez que este autor calibrou o aparelho para dar 70% de intensidade de fluorescência relativa com padrão 1 ppm de  $\beta$ -asarona, enquanto que no presente trabalho a calibração foi feita com 2 ppm de  $\beta$ -asarona. Independentemente deste fato, a sensibilidade do método é bastante satisfatória, sendo de 0,1 ppm.

No método de cromatografia em fase gasosa, foram elaboradas duas curvas-padrão: uma, levando em conta o estearato de metila como padrão interno e a outra, sem a adição do mesmo. A escolha do estearato de metila como padrão interno, em lugar de palmitato de etila como é recomendado por DYER<sup>20</sup>, ocorreu devido à facilidade de sua aquisição.

As alturas dos picos foram medidas e relacionadas às concentrações da  $\beta$ -asarona (fig. 2 e 3).

Uma vez que a porcentagem média (87,97%) de recuperação foi a mesma para ambos os métodos, isto é, uma considerando o padrão interno e a outra, sem a sua adição (tabela 3), foi utilizada diretamente a altura do pico na dosagem de  $\beta$ -asarona em bebidas alcoólicas. Dessa maneira construiu-se uma nova curva-padrão pelo método direto, isto é, sem adição de padrão interno e já levando em conta a recuperação (fig. 4). A média foi de 88,75% e as determinações foram feitas em duplicata (tab. 4). Essa recuperação é considerada satisfatória, tendo em vista a baixa concentração da  $\beta$ -asarona presente no produto, além de serem as etapas de destilação e extração requeridas antes da determinação cromatográfica. A sensibilidade do método foi de 0,25 ppm.

TABELA 3

Porcentagem de recuperação das soluções-padrão de  $\beta$ -asarona considerando ou não a adição de padrão interno por cromatografia em fase gasosa

$\beta$ -Asarona ( $\mu\text{g/ml}$ )	Recuperação (%)	
	Sem padrão interno	Com padrão interno
1	90,91	91,08
2	89,13	89,06
3	85,71	85,71
4	85,39	85,31
5	88,70	88,70
Média	87,97	87,97

TABELA 4

Porcentagem de recuperação das soluções-padrão de  $\beta$ -asarona sem adição de padrão interno pelo método de cromatografia em fase gasosa

$\beta$ -Asarona ( $\mu\text{g/ml}$ )	Recuperação (%)	
	1. <sup>a</sup> Determinação	2. <sup>a</sup> Determinação
1	90,91	90,91
2	89,13	91,30
3	85,71	90,48
4	85,39	85,39
5	88,70	89,57
Média $\pm$ D.P.	87,97 $\pm$ 2,36	89,52 $\pm$ 2,77
Média final $\pm$ D.P.	88,75 $\pm$ 2,57	—

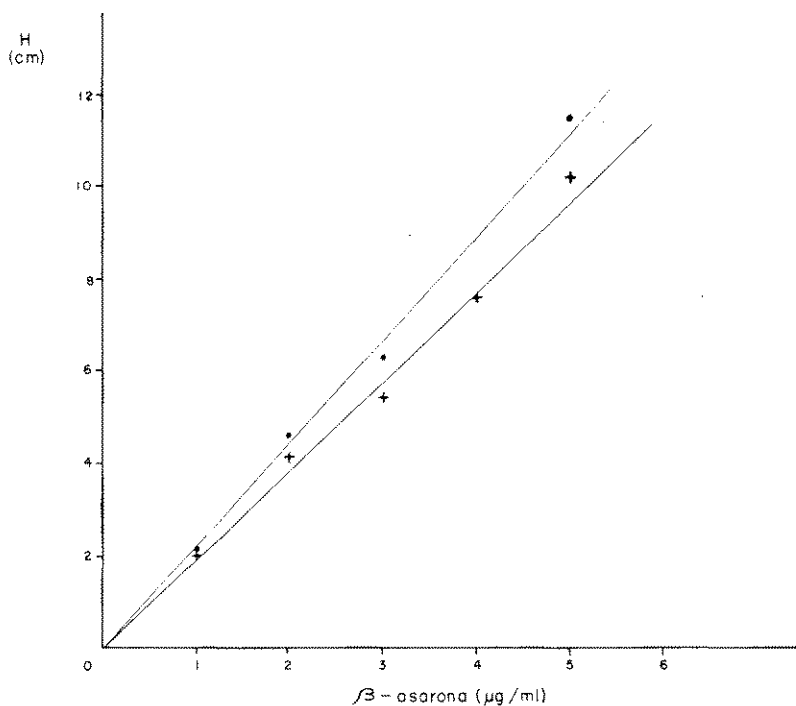


FIGURA 3 — Curvas-padrão das soluções-padrão de  $\beta$ -asarona sem adição de padrão interno. Cromatógrafo gasoso.

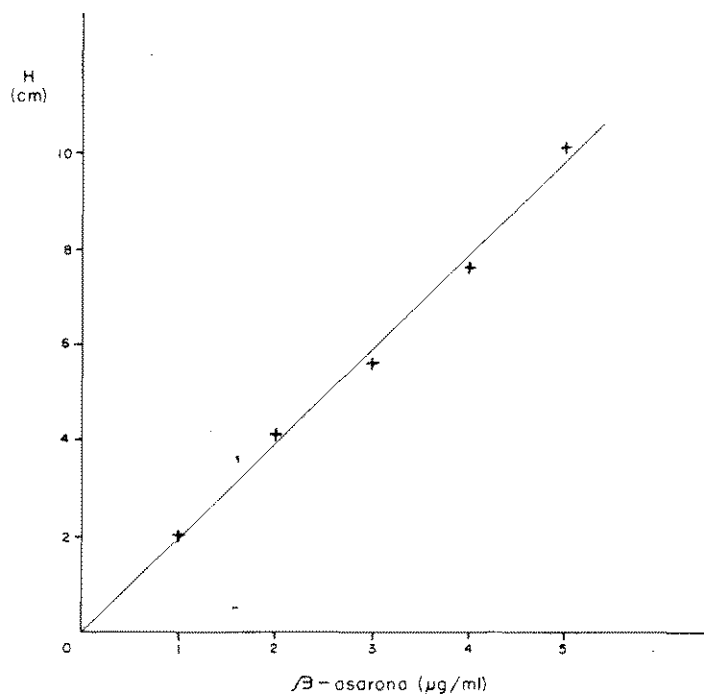


FIGURA 4 — Curva-padrão de soluções-padrão de  $\beta$ -asarona sem adição de padrão interno, levando em conta a recuperação. Cromatógrafo gasoso.

Os teores de  $\beta$ -asarona encontrados nas bebidas alcoólicas analisadas variaram de 0  $\mu\text{g/ml}$  até um máximo de 4,96  $\mu\text{g/ml}$ . As amostras de 1 a 49, por apresentarem baixas concentrações de  $\beta$ -asarona, foram dosadas apenas pelo método fluorimétrico, conforme mostra a tabela 5, enquanto que as amostras

de 50 a 56 foram determinadas pelos dois métodos e em duplicata (tabela 6). Estas últimas amostras, todas da mesma marca, apresentaram níveis de  $\beta$ -asarona mais elevados, além de estarem acima do limite permitido pela legislação<sup>2</sup>.

TABELA 5

*Teor de  $\beta$ -asarona encontrado em bebidas alcoólicas, método fluorimétrico*

Amostras	$\beta$ -Asarona encontrado ( $\mu\text{g/ml}$ )
1	0,08
2	0,21
3	0,26
4	0,03
5	0,11
6	0,06
7	0,09
8	0,13
9	0,05
10	0,06
11	0,16
12	0,12
13	0,12
14	0,03
15	0,03
16	0,05
17	0,01
18	0,03
19	0,01
20	0,04
21	0,06
22	0,08
23	0,01
24	0,11
25	0,01
26	0,03
27	0,03
28	0,02
29	0,01
30	0,01
31	0,00
32	0,01
33	0,01
34	0,00
35	0,00
36	0,02
37	0,01
38	0,00
39	0,00
40	0,02
41	0,09
42	0,01
43	0,01
44	0,01
45	0,02
46	0,01
47	0,00
48	0,00
49	0,95

Pela tabela 6 verificamos que, pelo método fluorimétrico, obtêm-se valores superiores aos encontrados pela cromatografia em fase gasosa. Uma das possíveis explicações para o fato é o aumento da intensidade de fluorescência devida a compostos no extrato hexânico que também possuem fluorescência no comprimento de onda estabelecido. Por essa razão, apesar de menos sensível, o método cromatográfico é preferível.

A identidade da  $\beta$ -asarona nas amostras analisadas foi confirmada por espectrometria de massa onde os picos mais importantes do padrão de  $\beta$ -asarona e das amostras apresentaram abundâncias relativas semelhantes.

Os espectros de massa do padrão e de uma das amostras estão ilustrados nas figuras 5 e 6, respectivamente. Os picos mais importantes, em ordem decrescente de abundância relativa do padrão e da amostra, estão representados comparativamente na tabela 7.

Os teores de  $\beta$ -asarona encontrados no presente trabalho, na sua maioria encontram-se dentro do limite estabelecido pela legislação do Council of Europe<sup>8</sup>. Apenas uma marca de bebida alcoólica, dentre as várias analisadas, se acha acima do permitido, que é de 1 ppm (amostras de n.º 50 a 56).

Outros autores tais como MERAT *et alii*<sup>10</sup>, analisando 12 amostras de bebidas alcoólicas, encontraram baixos teores de  $\beta$ -asarona desde quantidades não detectáveis até 0,35 ppm.

LIDDLE & SMEDT<sup>16</sup> também não detectaram  $\beta$ -asarona em 12 amostras de vermute analisadas.

Admitindo que um homem com peso de 50 kg consuma 1 litro de bebida alcoólica por dia, considerando que 1 litro contém 1 ml de extrato hidroalcoólico, e admitindo o seu peso específico igual a 1,0, ele estará ingerindo 20 mg de extrato por kg de peso corpóreo por dia.

Segundo FOSTER<sup>12</sup>, o extrato hidroalcoólico da variedade européia contém 0,11% de  $\beta$ -asarona. Assim sendo a ingestão de  $\beta$ -asarona seria de 0,022 mg/kg de peso corpóreo por dia.

O limite máximo de  $\beta$ -asarona em bebidas alcoólicas estabelecido pelo Conselho da Europa no valor de 1 ppm, corresponde a 0,02 mg/kg/dia para a ingestão de 1 litro de bebida. Constata-se, pois, que este valor é bastante próximo do estabelecido por FOSTER<sup>11, 12</sup>.

O maior teor de  $\beta$ -asarona encontrado no presente trabalho foi de 4,96 mg/l (amostra 53, tabela 6) o que representaria um valor cerca de 5 vezes superior ao limite máximo estabelecido. Não podemos porém sugerir uma alteração do valor limite máximo estabelecido para 5 ppm embora FOSTER<sup>11, 12</sup>, nas experiências com ratos albino Wistar e rações contendo até 7,04 mg/kg peso corpóreo ao dia de  $\beta$ -asarona, não tenha observado nenhum efeito sobre os mesmos, pois esse mesmo autor concluía pela necessidade de maiores estudos face à carência de um maior número de informações.

De fato, parece mais prudente manter-se o nível mínimo tendo em vista efeitos como potenciação com medicamentos, sensibilidade de indivíduos com desvios a nível do sistema nervoso central, além do conhecimento de possível efeito cancerígeno.

TABELA 6

Teor de  $\beta$ -asarona encontrado em bebidas alcoólicas. Método fluorimétrico e por cromatografia em fase gasosa

Amostras	$\beta$ -asarona ( $\mu\text{g/ml}$ )		Média $\pm$ D.P.
	Método fluorimétrico	Método de cromatografia em fase gasosa	
50	3,33	3,14	3,24 $\pm$ 0,13
51	2,30	2,07	2,34 $\pm$ 0,37
52	3,40	3,22	3,31 $\pm$ 0,13
53	5,35	4,57	4,96 $\pm$ 0,55
54	5,20	4,60	4,90 $\pm$ 0,42
55	2,05	1,81	1,93 $\pm$ 0,17
56	4,55	4,90	4,73 $\pm$ 0,25



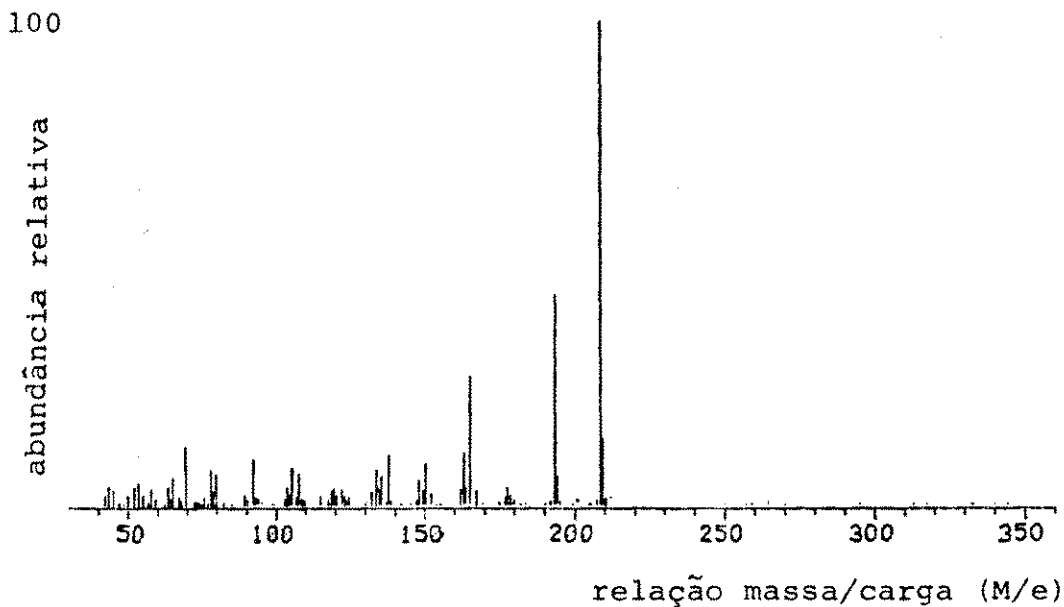


FIGURA 5 — Espectro de massa do padrão de  $\beta$ -asarona. Cromatógrafo gasoso — espectrômetro de massa.

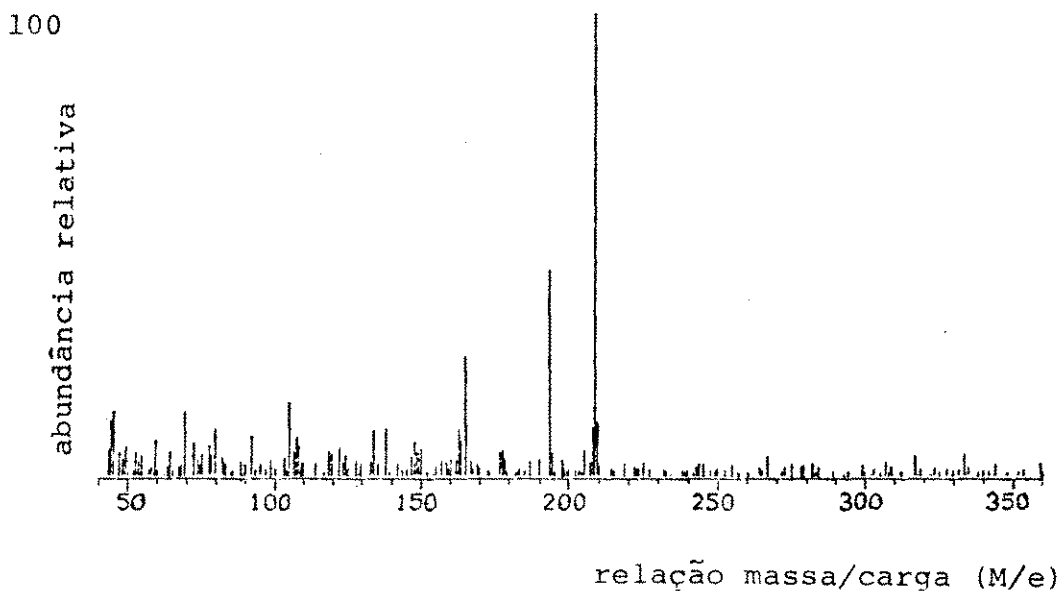


FIGURA 6 — Espectro de massa do extrato hexânico de uma das bebidas alcoólicas analisadas. Cromatógrafo gasoso — espectrômetro de massa.

TABELA 7

Abundância relativa dos picos mais importantes da  $\beta$ -asarona e do extrato hexânico de uma das bebidas alcoólicas analisadas, obtidos por espectrometria de massa

$\beta$ -asarona		Amostra (extrato hexânico de bebida alcoólica)	
Picos (m/e)	Abundância	Picos (m/e)	Abundância
208	100,0	208	100,0
193	43,7	193	54,4
165	26,5	165	29,8
209	14,6	149	18,3
69	12,1	105	17,2
162	11,0	162	15,4
137	10,3	209	14,6
91	8,9	137	13,1
150	3,4	161	10,3
105	8,0	177	10,2

### CONCLUSÕES

1. Os teores de  $\beta$ -asarona encontrados em bebidas alcoólicas variaram desde 0 até um máximo de 4,96  $\mu\text{g/ml}$ . Algumas amostras encontram-se acima de 1 ppm, limite permitido pela legislação do Council of Europe<sup>6</sup>.

2. Sugerimos que o método de cromatografia em fase gasosa seja adotado como método oficial na determinação de  $\beta$ -asarona em bebidas alcoólicas, uma vez que é mais específico do que o método fluorimétrico e que

ambos mostraram praticamente a mesma sensibilidade.

### Agradecimentos

Agradecemos à Dra. Walkyria H. Lara, Chefe da Seção de Aditivos do Instituto Adolfo Lutz, pela possibilidade oferecida na execução dos trabalhos experimentais, ao Dr. Isao Kayano, da Firmenich & Cia. Ltda., pelo fornecimento do padrão de óleo de cálamus, e ao Dr. Jelson Gigonetto, da Hewlett-Packard do Brasil Ind. & Com. Ltda., pelo auxílio prestado na execução do espectro de massa.

RIALAG/510

YABIKU, H.Y. & LAJOLO, F.M. — Determination of  $\beta$ -asarone in alcoholic beverages. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 40(2):135-145, 1980.

**ABSTRACT:** In order to evaluate the presence of calamus oil in alcoholic beverages, a quantitative determination of its active principle  $\beta$ -asarone was performed, by means of two different methods: fluorometric and gas liquid chromatography, and accomplished with atomic mass spectrophotometric analysis. In 56 samples of alcoholic beverages of 18 different brands, only one demonstrated to be in higher content than the permitted limit of 1 ppm, determined by Europe Council. The  $\beta$ -asarone contents varied from 0 to 4.96 ppm. It was suggested to employ the gas liquid chromatography technique as official method for determination of  $\beta$ -asarone in alcoholic beverages, since it is more specific than fluorimetric method.

**DESCRIPTORS:**  $\beta$ -asarone in alcoholic beverages, determination; flavor (calamus oil) in alcoholic beverages; calamus oil in alcoholic beverages; alcoholic beverages, flavor; oil, calamus, in alcoholic beverages.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BIRGGAL, E. apud OPDYKE, D.L.J. — Monographs on fragrance raw materials. *Food cosmet. Toxicol.*, 15:611-38, 1977.
2. BRASIL. Leis, decretos, etc. — Decreto n.º 55.871 de 26 de março de 1965. *Diário Oficial*, Brasília, 9 abr. 1965. Seção 1, pt. 1, p. 3610. Modifica o Decreto n.º 50.040 de 24 de janeiro de 1961, referente a normas reguladoras do emprego de aditivos para alimentos, alterado pelo Decreto n.º 691, de 13 de março de 1962.
3. CAVAZZA, G. — Les chimiotypes parmi les plantes aromatiques cas du calamus polyploide. *Ann. Falsif. Expert. chim.*, 69: 833-44, 1976.
4. CHOPRA, I.C.; JAMWAL, K.S. & KHAJURIA, B.N. — Pharmacological action of some common essential oil-bearing plants used in indigenous medicine. Part I. Pharmacological action of *Acorus calamus*, *Curcuma zedoaria*, *Xanthoxylum alatum* and *Angelica archangelica*. *Indian J. med. Res.*, 42:381-4, 1954.
5. CODE of Federal Regulations. 21. Food and Drugs. Washington, D.C., Govt. print. off., 1977. Parts 100 to 199, p. 649, paragr. 189.110.
6. COUNCIL OF EUROPE — *Natural flavouring substances, their sources, and added artificial flavouring substances*. Strasbourg, 1974. p. 34.
7. DANDIYA, P.C.; BAXTER, R.M. & CULLUMBINE, H. — Studies on *Acorus calamus* (I) — "Phytochemical investigation". *Can. pharm. J.*, 91:63-607 — 63-610, 1958.
8. DANDIYA, P.C.; BAXTER, R.M.; WALKER, G.C. & CULLUMBINE, H. — Studies on *Acorus calamus*, part II: investigation of volatile oil. *J. Pharm. Pharmacol.*, 11: 163-8, 1959.
9. DANDIYA, P.C. & CULLUMBINE, H. — Studies on *Acorus calamus* (III): some pharmacological actions of the volatile oil. *J. Pharmacol. exp. Ther.*, 125:353-9, 1959.
10. DYER, R.H.; MARTIN, G.E. & BUSCEMI, P.C. — Gas-liquid chromatographic determination of  $\beta$ -asarone in wines and flavors. *J. Assoc. off. agric. Chem.*, 59:675-7, 1976.
11. FOSTER D. SNELL, INC. — *A report on 90-day calamus feeding studies with the hydroalcoholic extract of Acorus calamus european variety*. New Jersey, 1969.
12. FOSTER D. SNELL, INC. — *Supplementary report liver lesions project 10002-001*. New Jersey, 1969.
13. GROSS, M.A.; JONES, W.I.; COOK, E.L. & BOONE, C.C. — Carcinogenicity of oil of calamus. *Proc. am. Assoc. Cancer Res.*, 8:24, 1967. [Abstr. 93].
14. GUENTHER, E. — *The essential oils*. New York, Van Nostrand, 1952. v. 6, p. 109-17.
15. LARRY, D. — Gas-liquid chromatographic determination of  $\beta$ -asarone a component of oil of calamus, in flavors and beverages. *J. Assoc. off. agric. Chem.*, 56: 1281-3, 1973.
16. LIDDLE, P.A.P. & SMEDT, P. — Détection et dosage de quatre composés limites par diverses législations dans les boissons alcooliques. *Ann. Falsif. Expert. Chim.*, 69:857-64, 1976.
17. MADAN, B.R.; ARORA, R.B. & KANTI KAPILA, M.B. — Anticonvulsant, antiepileptic and antiarrhythmic actions of *Acorus calamus* Linn. An Indian indigenous drug. *Arch. int. Pharmacodyn. Théor.*, 124:201-11, 1960.
18. MERAT, E.; MARTIN, E.; DURET, M. & VOGEL, J. — Extraction and gas chromatographic determination of  $\beta$ -asarone and  $\alpha$  —  $\beta$  — thujone in aperitifs. *Mitt. Geb. Lebensmittelunters. Hyg.*, 67(4): 521-6, 1976 apud *Chem. Abstr.*, 86:153870j, 1977.
19. TAYLOR, J.M.; JONES, W.I.; HAGAN, E.C.; GROSS, M.A.; DAVIS, D.A. & COOK, E.L. — Toxicity of oil of calamus (*Jammu variety*). *Toxicol. appl. Pharmacol.*, 10: 405, 1967. [Abstr. 72].
20. WOJTOWICZ, E.J. — Spectrofluorometric determination of  $\beta$ -asarone in sweet and dry vermouths. *J. agric. Food Chem.*, 24: 526-8, 1976.

Recebido para publicação em 5 de julho de 1980.

