

## AVALIAÇÃO QUANTITATIVA DE CARDENOLÍDEOS NO CULTIVAR EXPERIMENTAL DE *DIGITALIS LANATA* DO MACIÇO DO ITATIAIA E PERSPECTIVAS DE SEU EMPREGO INDUSTRIAL

Fernão Castro Braga

Departamento de Química - Instituto de Ciências Exatas - UFMG - Av. Antônio Carlos, 6627 - 31270-010 - Belo Horizonte - MG

Wolfgang Kreis

Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie - Friedrich-Alexander Universität, Stadtstraße 5 - D-91058 - Erlangen - Alemanha

Rubens Almeida Récio

Fundação Ezequiel Dias (FUNED) - R. Conde Pereira Carneiro, 80 - 30510-010 - Belo Horizonte - MG

Alaíde Braga de Oliveira

Faculdade de Farmácia - UFMG - Av. Olegário Maciel, 2360 - 30180-112 - Belo Horizonte - MG

Recebido em 28/11/96; aceito em 17/3/97

**QUANTITATIVE EVALUATION OF CARDENOLIDES IN A BRAZILIAN *DIGITALIS LANATA* CULTIVAR AND PERSPECTIVES OF ITS INDUSTRIAL USE.** The content of digoxin and lanatoside C (jointly quantified), lanatoside A, lanatoside B, glucoevatromonoside, odorobioside G, glucogitoroside, glucoverodoxine, glucodigifucoside and digitalinum verum was determined by HPLC in *Digitalis lanata* harvested in Brazil, as well as in clones industrially employed for the production of cardenolides. The Brazilian plants presented greater variation in the contents of cardenolides than the analyzed clones. Lanatoside C and digoxin concentrations were higher in the clones ( $6120 \pm 640$  nmol/g dry leaf) than in the Brazilian plants ( $1820 \pm 900$  nmol/g dry leaf). The concentrations of these glycosides were found to be within the range described for native species and also were similar to an European cultivar, what makes possible its industrial use for the cardenolides production.

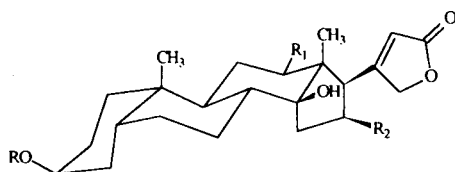
**Keywords:** *Digitalis lanata*; Brazilian cultivar; cardenolides evaluation; clones.

### INTRODUÇÃO

A *Digitalis lanata* (Scrophulariaceae), planta nativa do centro e sudeste europeus, popularmente conhecida como dedaleira, é a fonte industrial dos cardenolídeos lanatosídeo C (3) e digoxina (4) (Figura 1), empregados no tratamento da insuficiência cardíaca congestiva (ICC).

A incidência e prevalência da ICC têm aumentado nos últimos anos, estimando-se um crescimento deste quadro com o incremento da idade média da população<sup>1</sup>. Os digitálicos, os

diuréticos e os inibidores da enzima conversora da angiotensina preenchem alguns dos requisitos desejáveis em agentes de primeira linha para a terapia da ICC. No entanto, nenhum destes fármacos possui todas as características desejadas e seu uso individual não é adequado ao tratamento da ICC, justificando-se a busca por novas substâncias ativas<sup>2</sup>. No período entre 1978-1988, vários fármacos foram desenvolvidos e testados em pacientes com ICC, a uma velocidade de uma nova substância a cada mês<sup>2</sup>. Entretanto, o retorno de todo este investimento para a obtenção de novos fármacos inotrópicos suplementares



Cardenolídeo	*R	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
(1) Lanatosídeo A	Gl-β-Acdx-Dx-Dx-	H	H
(2) Lanatosídeo B	Gl-β-Acdx-Dx-Dx-	H	OH
(3) Lanatosídeo C	Gl-β-Acdx-Dx-Dx-	OH	H
(4) Digoxina	Dx-Dx-Dx-	OH	H
(5) Glicoevatromonosídeo	Gl-Dx-	H	H
(6) Odorobiosídeo G	Gl-Dtl-	H	H
(7) Glicogitorosídeo	Gl-Dx-	H	OH
(8) Glicoverodoxina	Gl-Dtl-	H	O-CHO
(9) Glicodigifucosídeo	Gl-Fuc-	H	H
(10) Digitalinum verum	Gl-Dtl-	H	OH
(11) Digitoxina	Dx-Dx-Dx-	H	H

\*Gl=glicose; Dx=digitoxose; Dtl=digitalose; Fuc=fucose; β-Acdx=β-acetildigitoxose.

Figura 1. Estruturas químicas dos cardenolídeos analisados nas folhas de *Digitalis lanata* do cultivar experimental do maciço do Itatiaia e de clones.

ou substitutos dos glicosídeos digitálicos foi desapontador<sup>3</sup>. Os cardenólídeos isolados de *Digitalis*, ainda hoje, representam os fármacos mais freqüentemente prescritos para o tratamento de ICC, apesar de seu baixo índice terapêutico<sup>1</sup>.

A *Digitalis lanata* é cultivada com fins industriais nos Países Baixos, Equador e Estados Unidos<sup>4</sup>. Até o presente, a síntese de cardenólídeos digitálicos ou sua obtenção através de cultura de células não compete, economicamente, com a produção destes a partir de cultivares agrícolas de *D. lanata*. Para o estabelecimento de cultivares agrícolas selecionam-se plantas, em populações nativas, contendo teores elevados dos glicosídeos de interesse industrial. Exemplos diversos destas triagens, utilizando técnicas de radioimunoensaio, estão descritos na literatura<sup>5,6,7</sup>. Um aumento considerável nos teores de digoxina é obtido em cultivares desenvolvidos a partir dos espécimens selecionados<sup>6</sup>. O cultivo experimental de *D. lanata*, em estufa ou no campo, visando avaliar a produção de cardenólídeos, foi conduzido em países diversos como Índia<sup>8,9</sup>, Áustria<sup>10</sup>, Alemanha<sup>11</sup> e França<sup>12</sup>.

Os cardenólídeos digitálicos, consumidos no Brasil, são importados. A *D. lanata* vem sendo cultivada experimentalmente no maciço do Itatiaia, Minas Gerais, local com condições climáticas favoráveis ao desenvolvimento da espécie, objetivando-se estabelecer um cultivar a ser utilizado para futura produção industrial de cardenólídeos. O cultivar experimental consta de aproximadamente 8.000 plantas, em uma área de 7.500 m<sup>2</sup>. A adaptação da *D. lanata* neste cultivar experimental foi comprovada através do estudo da flutuação das concentrações de cardenólídeos diversos, durante o primeiro e segundo períodos vegetativos, obtendo-se resultados semelhantes àqueles descritos para plantas nativas<sup>13</sup>.

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o potencial do cultivar experimental do maciço do Itatiaia para exploração industrial. Para tanto, procedeu-se à determinação quantitativa, neste cultivar, dos cardenólídeos de interesse terapêutico, lanatosídeo C (3), digoxina (4), e digitoxina (11), e, também, de outros glicosídeos, sem aplicação terapêutica, lanatosídeos A (1) e B (2), glicoevatromonosídeo (5), odorobiosídeo G (6), glico-gitorosídeo (7), glicoverodoxina (8), glicodigifucosídeo (9) e digitalinum verum (10). As estruturas químicas dos cardenólídeos analisados estão representadas na figura 1. Estes cardenólídeos também foram quantificados em clones de *D. lanata* cultivados em estufa. Estes clones, desenvolvidos pela Boehringer (Mannheim, Alemanha), resultaram de processos de seleção e melhoramento genético, sendo utilizados industrialmente para a produção de cardenólídeos. Os dados obtidos foram comparados e forneceram um perfil do cultivar experimental do maciço do Itatiaia, representando os clones uma situação modelo a ser atingida.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A determinação dos cardenólídeos digitálicos, no presente trabalho, foi feita por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), utilizando-se o método do padrão interno<sup>14</sup>. Este método foi escolhido devido a possibilidade de se quantificar, individualmente, os cardenólídeos de interesse terapêutico e os outros glicosídeos, ao contrário das técnicas de radioimunoensaio anteriormente utilizadas, onde determinava-se a totalidade dos glicosídeos da série C<sup>5,6,7</sup>. Cromatogramas empregados para a quantificação de cardenólídeos, no presente trabalho, para plantas do cultivar experimental do maciço do Itatiaia e clones de *D. lanata*, estão representados nas figuras 2 e 3, respectivamente.

As concentrações médias dos cardenólídeos analisados no cultivar experimental do maciço do Itatiaia e nos clones de *D. lanata* constam da tabela 1. As concentrações são expressas em nmol/g em folha seca, com os respectivos desvios-padrão. Os dois grupos de dados foram submetidos a um teste *t*, obtendo-se diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,01$ ) entre

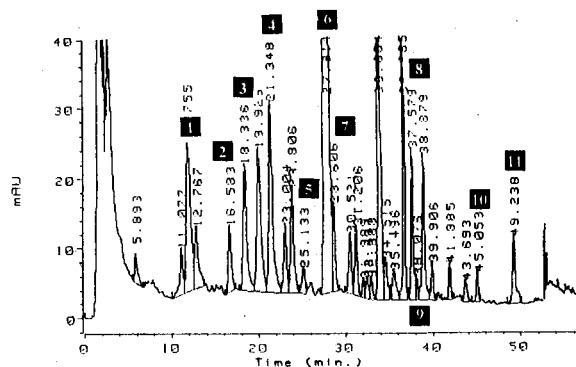


Figura 2. Cromatograma, obtido por HPLC, do extrato das folhas de *Digitalis lanata* do cultivar experimental do maciço do Itatiaia. Condições cromatográficas: vide parte experimental. Identificação dos picos: 1, digitalinum verum; 2, glicoverodoxina; 3, glicogitorosídeo; 4, glicodigifucosídeo; 5, odorobiosídeo G; 6, lanatosídeo C e digoxina; 7, glicoevatromonosídeo; 8,  $\beta$ -metildigoxina (padrão interno); 9, lanatosídeo B; 10, lanatosídeo A; 11, digitoxina.

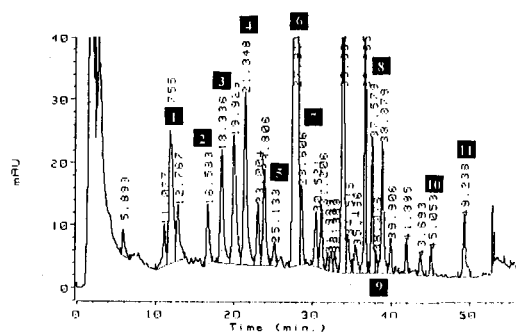


Figura 3. Cromatograma, obtido por HPLC, do extrato das folhas de clones de *Digitalis lanata*, desenvolvidos pela indústria farmacêutica para a produção de cardenólídeos. Condições cromatográficas: vide parte experimental. Identificação dos picos: 1, digitalinum verum; 2, glicoverodoxina; 3, glicogitorosídeo; 4, glicodigifucosídeo; 5, odorobiosídeo G; 6, lanatosídeo C e digoxina; 7, glicoevatromonosídeo; 8,  $\beta$ -metil-digoxina (padrão interno); 9, lanatosídeo B; 10, lanatosídeo A; 11, digitoxina.

os teores dos cardenólídeos quantificados, com exceção das concentrações de glicoevatromonosídeo, glicoverodoxina e digitalinum verum ( $p > 0,05$ ). Estes resultados indicam haver uma diferença significativa nas concentrações dos cardenólídeos avaliados, entre as plantas do cultivar experimental e os clones de *D. lanata*.

A variabilidade química intra-específica de cada grupo também pode ser avaliada pela tabela 1, através dos valores percentuais dos desvios-padrão. De uma forma geral, as plantas do cultivar experimental apresentaram maior variabilidade química intra-específica do que os clones de *D. lanata*, evidenciado pelos valores mais elevados dos desvios-padrão percentuais, com exceção do lanatosídeo B. A grande variação individual nas concentrações de cardenólídeos no cultivar experimental já era esperada, uma vez que estas plantas não foram submetidas a nenhum processo de seleção, sendo constituídas por indivíduos com uma ampla base genética. Avaliações anteriores em populações nativas e cultivares de *D. lanata*, de diferentes origens, indicaram uma alta variabilidade intra-específica nos teores dos cardenólídeos quantificados<sup>5,6,7,12,15</sup>, de forma similar aos resultados descritos neste trabalho. Os clones de *D. lanata*, por sua vez, apresentaram uma maior homogeneidade química, representada pelos menores valores dos desvios-padrão percentuais, uma vez

**Tabela 1.** Concentrações médias de cardenólídeos em folhas de *Digitalis lanata* do cultivar experimental do maciço do Itatiaia e em clones empregados industrialmente para a produção de cardenólídeos da série C.

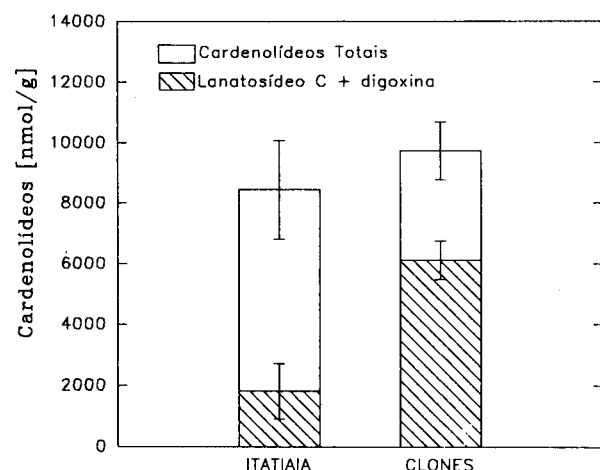
Cardenólídeo	<sup>a</sup> Cultivar Itatiaia	desvio-padrão %	<sup>b</sup> Clones	desvio-padrão %	Valor p
Lanatosídeo A	1080±710	66	80±20	25	p < 0,01
Lanatosídeo B	290±220	76	30±40	133	p < 0,01
Lanatosídeo C + digoxina	1820±900	49	6120±640	10	p < 0,01
Glicoevatromonosídeo	240±200	83	290±50	17	p > 0,05
Odobiosídeo G	90±90	100	170±40	24	p < 0,01
Glicogitorosídeo	1860±690	37	790±110	14	p < 0,01
Glicoverodoxina	280±130	46	320±60	19	p > 0,05
Glicodigifucosídeo	2170±740	34	1250±340	27	p < 0,01
Digitalinum verum	580±340	59	600±110	18	p > 0,05
Digitoxina	20±40	200	70±40	57	p < 0,01
Total	8450±1640	19	9730±960	10	p < 0,01

<sup>a</sup>Valores correspondentes à média de 49 plantas analisadas em triplicata; <sup>b</sup>valores correspondentes à média de 25 clones analisados em triplicata. Os espécimens analisados, em ambos os grupos, tinham 12 meses de idade. As concentrações de cardenólídeos estão expressas em nmol/g em folha seca ± desvio-padrão.

que este material resultou da clonagem de plantas selecionadas, sendo constituído por uma base genética estreita.

Os teores médios de lanatosídeo C e digoxina, determinados em conjunto, nas plantas do cultivar experimental do maciço do Itatiaia são inferiores àqueles dos clones (Tabela 1). O gráfico da figura 4 representa os teores destes glicosídeos na concentração total de cardenólídeos analisados, em ambos os grupos. Enquanto nas plantas do cultivar experimental lanatosídeo C e digoxina constituem 22% do total, este percentual atinge 62% nos clones. Esta considerável diferença é fruto da triagem de milhares de plantas nativas, ao longo de anos, e pesquisas de inter-cruzamento e micropropagação para a obtenção de espécimens com uma base genética estreita. Deve-se salientar, mais uma vez, que as plantas do cultivar experimental do maciço do Itatiaia não foram submetidas a qualquer processo de seleção ou aprimoramento genético.

A concentração de alguns cardenólídeos como glicodigifucosídeo, glicogitorosídeo e lanatosídeo A é bastante elevada nas plantas do cultivar experimental. Estes glicosídeos não possuem aplicação terapêutica e seus teores foram substancialmente reduzidos nos clones, como resultado do processo de melhoramento.



**Figura 4.** Concentrações médias de lanatosídeo C e digoxina no teor médio total de cardenólídeos analisados em *Digitalis lanata*, em plantas do cultivar experimental do maciço do Itatiaia (n = 49) e clones desenvolvidos pela indústria farmacêutica (n = 25). Cada amostra foi determinada em triplicata; as barras verticais representam o desvio-padrão.

A fim de se estimar a possibilidade de emprego industrial do cultivar experimental do maciço do Itatiaia, a curto prazo, compararam-se os teores dos cardenólídeos determinados com aqueles descritos na literatura para *D. lanata* nativa ou cultivada em estufa. Para tanto, os teores dos cardenólídeos determinados no cultivar experimental e em clones de *D. lanata*, expressos em nmol/g em folha seca, foram convertidos em concentrações percentuais de cardenólídeos em folha seca, para comparação com dados da literatura.

Na tabela 2 estão dispostos os resultados obtidos no presente estudo, as concentrações de plantas europeias cultivadas em estufa<sup>16,17</sup>, os teores descritos para *D. lanata* nativa<sup>18</sup> e para plantas nativas e cultivares<sup>15</sup>. A comparação destes valores não indica diferenças acentuadas entre as concentrações de cardenólídeos do cultivar experimental do maciço do Itatiaia e teores de cultivares europeus e de plantas nativas. Os teores de lanatosídeo C e digoxina foram determinados em conjunto, no presente trabalho, porque estes são os cardenólídeos de interesse industrial. O teor médio de digoxina, descrito na literatura para plantas nativas e cultivadas, é bastante baixo (0,005-0,02%)<sup>15</sup>, justificando-se, deste modo, a comparação dos teores conjuntos de digoxina e lanatosídeo C, no presente estudo, com as concentrações de lanatosídeo C em *D. lanata* de origens diversas (Tabela 2).

A concentração média de lanatosídeo C (determinada em conjunto com digoxina) do cultivar do maciço do Itatiaia encontra-se dentro da faixa descrita para plantas nativas e próximas do teor de um cultivar europeu (Tabela 2), indicando a possibilidade, no estágio atual, de sua utilização para a produção industrial de cardenólídeos. A melhoria da qualidade do cultivar deve ser buscada em um estágio posterior, a partir da multiplicação e micropropagação de plantas com altos teores, selecionadas dentro da população avaliada<sup>13</sup>.

O isolamento destes cardenólídeos, em escala industrial, é uma tarefa laboriosa, devido ao grande número de cardenólídeos existentes nas folhas de *D. lanata*, e às concentrações reduzidas de lanatosídeo C e digoxina. No entanto, encontra-se descrito um processo de baixo custo para o isolamento de lanatosídeo C, cuja aplicação seria viável em uma produção piloto<sup>19</sup>.

Em resumo, verificou-se no trabalho relatado que o cultivar experimental de *D. lanata* do maciço do Itatiaia apresenta uma concentração média de lanatosídeo C (em conjunto com digoxina) comparável àquelas de plantas nativas e de um cultivar europeu, sendo, portanto, viável a sua utilização para a produção industrial de cardenólídeos.

**Tabela 2.** Teores médios percentuais de cardenolídeos em *Digitalis lanata* de origens diversas.

Glicosídeos	Cultivar	Clones <sup>b</sup>	Cultivar <sup>16</sup>	Cultivar <sup>15</sup>	Nativas + Cultivadas <sup>14</sup>	Plantas Nativas <sup>17</sup>
Cardíacos	Itaitaia <sup>a</sup>					
LA	0,105	0,008	0,172	0,110	0,08 - 0,24	0,05 - 0,25
LB	0,029	0,003	0,061	0,033	0,01 - 0,05	0,01 - 0,05
LC*	0,179	0,603	0,222	0,194	0,08 - 0,24	0,10 - 0,30
Gev	0,016	0,019	0,051	0,007	0,02 - 0,06	0,01 - 0,05
OG	0,060	0,011	0,061	0,117	0,001 - 0,003	nr
Ggr	0,127	0,054	0,116	0,045	0,02 - 0,12	0,02 - 0,10
Gvdx	0,020	0,022	0,168	0,125	0,02 - 0,10	0,01 - 0,14
Gdf	0,152	0,087	0,094	0,152	0,01 - 0,03	0,01 - 0,15
DV	0,040	0,041	0,058	0,073	0,02 - 0,12	0,02 - 0,12
Dt	0,005	0,006	0,011	nr	0,005 - 0,02	nr

<sup>a</sup> n = 49, determinadas em triplicata; <sup>b</sup> n = 25, determinadas em triplicata. \*Calculado em conjunto com digoxina para as plantas do cultivar experimental e os clones. nr: Valores não relatados. LA, lanatosídeo A; LB, lanatosídeo B; LC, lanatosídeo C; Gev, glicoevatromonosídeo; OG, odorobiosídeo G; Ggr, glicogitorosídeo; Gvdx, glicoverodoxina; Gdf, glicodigifucosídeo; DV, digitalinum verum; Dt, digitoxina.

## PARTE EXPERIMENTAL

**Condições de cultivo da *Digitalis lanata* no maciço do Itaitaia.** A multiplicação da *D. lanata* no cultivar experimental do maciço do Itaitaia vem sendo feita pelo sistema de semeadura em estufas (viveiros), usando bandejas Plantmax contendo substrato estéril (matéria orgânica e vermiculita). O transplante das mudas para o campo ocorre quando as plantas têm de 6 a 8 folhas. A distância entre as plantas no campo é de 25 a 30 cm. Após o transplante das mudas para o campo, as plantas são cultivadas sem nenhum processo de irrigação ou adubação.

**Condições de cultivo dos clones de *Digitalis lanata*.** Os clones foram cultivados em estufa na Universidade de Tübingen, Alemanha, com fotoperíodo de 16 horas, e temperaturas diurnas de 20°C e noturnas de 15°C.

**Coleta e secagem do material vegetal utilizado nas análises.** Quarenta e nove (49) espécimens de *D. lanata* do cultivar experimental e vinte e cinco clones (25) foram selecionados ao acaso. As plantas foram amostradas no período anterior à floração, com 12 meses de idade. Cerca de 20 (vinte) folhas da porção intermediária da roseta foram coletadas para análise. Após a coleta, as folhas foram lavadas em água e secas em estufa a 40°C, durante 72 horas. Em seguida, as folhas foram pulverizadas em moinho de facas e o pó obtido foi submetido à extração para a determinação quantitativa dos cardenolídeos.

**Extração dos cardenolídeos para determinação quantitativa.** A extração dos cardenolídeos foi feita de acordo com o método descrito na ref. 14, introduzindo-se algumas modificações. Foram pesados, exatamente, cerca de 300 mg de pó das folhas secas de *D. lanata*, adicionando-se, em seguida, 100 µL de uma solução metanólica de β-metildigoxina a 1,00 mg/mL, como padrão interno. O material vegetal foi extraído com MeOH 70% (20,0 mL), sob refluxo, a 80°C, durante 10 minutos. Após resfriamento, o extrato foi transferido para um tubo de centrifuga, adicionando-se água bidestilada (40,0 mL). Em seguida, adicionou-se solução aquosa a 15% de Pb(OAc)<sub>2</sub> (5,0 mL) para precipitação de clorofilas, sendo o excesso deste reagente eliminado pela adição de solução aquosa a 10% de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (5,0 mL). A mistura foi centrifugada a 8.000 r.p.m, durante 10 min. Uma alíquota do sobrenadante clarificado (10,0 mL) foi filtrada em coluna de Adsorbex-Polyspher RP-18 (Merck), previamente condicionada com MeOH (2 mL) e H<sub>2</sub>O (2 mL). A eluição da coluna foi efetuada sob pressão reduzida produzida por trompa de vácuo. Em seguida, a coluna foi lavada com H<sub>2</sub>O (2 mL), para eliminação de impurezas polares, e os cardenolídeos foram

eluídos com MeOH (2 mL). O eluato foi levado a resíduo em bloco de aquecimento (40°C) e, então, retomado com MeOH (700 µL). Esta solução, após centrifugação a 12.000 r.p.m., durante 10 min, foi empregada nas análises por HPLC. Empregou-se MeOH LiChroSolv (Merck) em todas as etapas, com exceção da extração inicial. Cada amostra de *D. lanata* foi extraída e analisada em triplicata.

**Análises por HPLC.** As análises foram realizadas em um cromatógrafo Hewlett-Packard 1090 série II com detector de *diode-array* (Walbronn, Alemanha). Empregou-se uma coluna ODS C-18 (100 × 2,1 mm d.i.) (Hewlett-Packard, Grom, Alemanha) com temperatura de 40°C, fluxo de 0,2 mL/min e comprimento de onda de 220 nm. Um gradiente de H<sub>2</sub>O (A) e 84% CH<sub>3</sub>CN (B) foi empregado para eluição: 0-5 min 85% A, 15% B; 5-10 min 80% A, 20% B; 10-12 min 80% A, 20% B; 12-25 min 73% A, 27% B; 25-35 min 55% A, 45% B; 35-50 min 40% A, 60% B; 50-52 min 5% A, 95% B. Acetonitrila grau LiChroSolv foi obtida da Merck (Darmstadt, Alemanha); a água foi purificada através do sistema Milli-Q<sup>50</sup> (Millipore, Eschborn, Alemanha).

**Identificação dos cardenolídeos.** Os cardenolídeos foram identificados pela comparação dos tempos de retenção com aqueles de padrões de cardenolídeos e pelos seus espectros no UV, obtidos no detector de *diode-array*.

**Padrões de cardenolídeos.** Digoxina e lanatosídeos A, B e C foram obtidos da Roth (Karlsruhe, Alemanha); digitalinum verum, glicogitorosídeo, glicodigifucosídeo, glicoevatromonosídeo, odorobiosídeo G, glicoverodoxina e digitoxina foram obtidos da Boehringer (Mannheim, Alemanha). β-metildigoxina (padrão interno) foi uma doação do Prof. Kreis, da Universidade de Erlangen, Alemanha.

**Análise estatística.** A análise de variância entre os dois grupos de plantas (teste *t*) foi realizada em computador, empregando-se o programa SigmaPlot, versão 4.02 (Jandel Co., EUA).

## AGRADECIMENTOS

Ao CNPq pelas bolsas de especialização (RHA/E) e doutorado (F. C. B.), e de pesquisador IA (A. B. O.).

## REFERÊNCIAS

1. Yusuf, S.; Garg, R.; Held, P.; Gorlin, R.; *Am. J. Cardiol.* **1992**, *69*, 64G.
2. Packer, M.; *Circulation* **1989**, *79*, 198.

3. Repke, K. R. H.; Megges, R.; Weiland, J.; Schön, R.; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, *34*, 282.
4. Evans, W. C.; *Trease and Evans' Pharmacognosy*; Baillière Tindall; London, 1989; p 510.
5. Weiler, E. W.; Zenk, M. H.; *Phytochemistry* **1976**, *15*, 1537.
6. Weiler, E. W.; Westekemper, P.; *Planta Med.* **1979**, *35*, 316.
7. Lethola, T.; Huhtikangas, A.; Hiltunen, R.; Schantz, M.; *Planta Med.* **1981**, *42*, 250.
8. Balbaa, S. I.; Hilal, S. H.; Haggag, M. Y.; *Planta Med.* **1970**, *18*, 254.
9. Rajukkannu, K.; Dhakshinamoorthy, M.; Arumugam, R.; Duraisamy, P.; *J. Agric. Sci.* **1981**, *96*, 255.
10. Kartnig, T.; Hiermann, A.; *Sci. Pharm.* **1980**, *48*, 193.
11. Stuhlfauth, T.; Klug, K.; Fock, H. P.; *Phytochemistry* **1987**, *26*, 2735.
12. Brugidou, C.; Jacques, M.; Cosson, L.; Jarreaux, F. X.; Ogerau, T.; *Planta Med.* **1988**, *54*, 262.
13. Braga, F. C.; Kreis, W.; Récio, R. A.; Oliveira, A. B.; *Phytochemistry* **1997**, *45*, 473.
14. Wiegrebe, H.; Wichtl, M.; *J. Chromatogr. A* **1993**, *630*, 402.
15. Kaiser, F.; *Arch. Pharmaz.* **1966**, *299*, 263.
16. Wichtl, M.; Freier, R.; *Dtsch. Apoth. Ztg.* **1978**, *118*, 798.
17. Wichtl, M.; Mangkudidjojo, M.; *Pharm. Ztg.* **1984**, *129*, 686.
18. Wichtl, M.; Bühl, W.; Huesmann, G.; *Dtsch. Apoth. Ztg.* **1987**, *127*, 2391.
19. Braga, F. C.; Kreis, W.; Oliveira, A. B.; *J. Chromatogr. A* **1996**, *756*, 287.