

PIRANOFLAVONAS INÉDITAS E ATIVIDADES TRIPANOCIDAS DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS DE *Conchocarpus heterophyllus*

Alessandra Regina Pepe Ambrozini, Paulo Cezar Vieira*, João Batista Fernandes e Maria Fátima das Graças Fernandes da Silva

Departamento de Química, Universidade Federal de São Carlos, CP 676, 13560-970 São Carlos - SP, Brasil

Sérgio de Albuquerque

Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Av. do Café, s/n, 14040-903 Ribeirão Preto - SP, Brasil

Recebido em 18/5/07; aceito em 14/11/07; publicado na web em 19/3/08

NEW PYRANOFLAVONES AND TRYPANOCIDAL ACTIVITY OF COMPOUNDS ISOLATED FROM *Conchocarpus heterophyllus*. The phytochemical investigation of trypanocidal extracts from leaves and stems of *Conchocarpus heterophyllus* (A. St.-Hil.) Kallunki & Pirani (Rutaceae) afforded new pyranoflavones along with the known compounds flavone, 7-methoxyflavone, 5-hydroxyflavone, haplotusine, 1-methyl-2-phenyl-4-quinolone alkaloid, β -sitosterol, stigmaterol, and β -sitosteryl benzoate. Their structures were established based on their spectral data. NMR data for the alkaloid haplotusine and the new pyranoflavones are described for the first time herein. These compounds were assayed on the tripomastigote forms of *Trypanosoma cruzi*. Among them, haplotusine and 1-methyl-2-phenyl-4-quinolone showed moderate values of IC_{50} 136.9 and 144.9 μ M, respectively.

Keywords: *Conchocarpus heterophyllus*; trypanocidal activity; pyranoflavones.

INTRODUÇÃO

A doença de Chagas, causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, é uma das mais graves endemias do Brasil. No Continente Americano, ela afeta 16-18 milhões de indivíduos, sendo que 100 milhões estão sob risco de contaminação.¹

Devido à ampla distribuição geográfica desta doença, à falta de tratamento eficaz e seguro, e às graves manifestações clínicas que ocasiona, a procura de novas substâncias para a profilaxia e/ou tratamento desta endemia se faz necessária.

Neste contexto, as plantas são valiosas fontes de novos compostos ativos e com baixa toxicidade.² De fato, segundo um levantamento recente, 61% dos 877 novos fármacos desenvolvidos durante o período de 1981-2002 são produtos naturais, ou substâncias desenvolvidas a partir deles.³

De plantas da família Rutaceae foram isolados alcalóides e lignanas com atividades tripanocidas.^{4,5} Além disso, as atividades sobre o *T. cruzi* ou sobre sua enzima GAPDH (gliceraldeído 3-fosfatodesidrogenase) de vários extratos e algumas substâncias isoladas desta mesma família foram determinadas.⁶⁻⁸

A espécie *Conchocarpus heterophyllus* (A. St.-Hil.) pertence à família Rutaceae (ordem Rutales) e era anteriormente denominada de *Angostura heterophylla* (A. St.-Hil.) Alb.⁹ Nenhum estudo fitoquímico sobre o gênero é descrito na literatura. Entretanto, do gênero *Angostura* foram isolados alcalóides acridônicos.¹⁰

Os extratos e as frações de folhas e caule de *C. heterophyllus* apresentaram atividade sobre as formas tripomastigotas do *T. cruzi*.⁶ Neste trabalho são descritos o isolamento, as atividades tripanocidas das substâncias obtidas de tais extratos/frações, assim como os dados de RMN do alcalóide haplotusina (**1**) e das pirano-flavonas inéditas (**2**).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O estudo químico dos extratos e frações de folhas e caule de *C. heterophyllus*, ativos sobre as formas tripomastigotas de *T. cruzi*, permitiu o isolamento de esteróides, flavonas e alcalóides 2- e 4-quinolônicos. A partir do extrato hexânico do caule de *C. heterophyllus* foram isolados os esteróides β -sitosterol e estigmaterol;¹¹ da fração diclorometânica proveniente do extrato hexânico das folhas, o benzoato de β -sitosterila¹² e uma mistura de pirano-flavonas inéditas (**2**); da fração acetato de etila deste mesmo extrato, flavona, 7-metoxiflavona¹³ e 5-hidroxiflavona;¹⁴ e da fração acetato de etila do extrato metanólico do caule, flavona, 7-metoxiflavona, haplotusina (**1**)¹⁵ e o alcalóide 2-fenil-1-metil-4-quinolona (**3**).¹⁶

Todas as substâncias foram identificadas através da análise dos seus dados espectroscópicos e comparação com os da literatura. A mistura de pirano-flavonas (**2**) está sendo descrita pela primeira vez

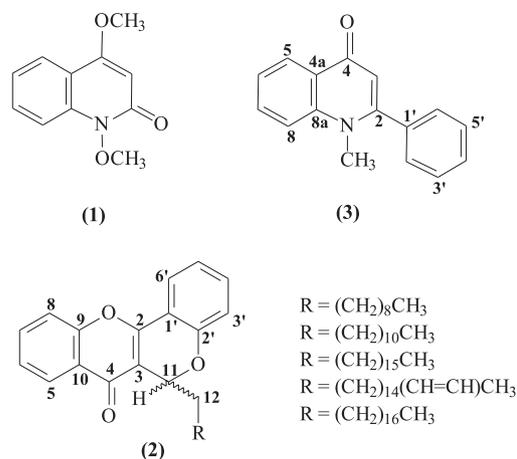


Figura 1. Substâncias obtidas de *Conchocarpus heterophyllus*

*e-mail: paulo@dq.ufscar.br

na literatura e as demais substâncias, no gênero *Conchocarpus*. Entretanto, os dados de RMN para o alcalóide haplotusina (**1**) não estavam descritos.¹⁵

No espectro de RMN ¹H do alcalóide **1** foram observados quatro sinais relativos a hidrogênios aromáticos [8,00 (*d*), *J* = 8,0 Hz), 7,73 (*m*), 7,68 (*m*) e 7,34 δ (*ddd*, *J* = 8,0, 6,4 e 1,6 Hz)], cujas multiplicidades indicaram a presença de um anel aromático *orto*-dissubstituído na substância **1**. Adicionalmente, um singlete em 6,08 δ, integrado para um hidrogênio, revelou a identidade dessa substância como um alcalóide 4-*R*-2-quinolônico, que é de ocorrência bastante ampla em plantas da família Rutaceae.¹⁷ Entretanto, apesar do alcalóide **1** ser do tipo 4-*R*-2-quinolônico, apresenta a ligação *N*-OCH₃, que é bastante incomum. A presença desse grupo foi deduzida a partir do sinal em 63,73 δ no espectro de RMN ¹³C.

As atribuições dos dados de RMN para o alcalóide haplotusina (**1**) (Tabela 1) foram realizadas através da análise dos mapas de contorno de HSQC e HMBC.

Tabela 1. Dados de RMN (CD₃OD, 9,8 T) da haplotusina (**1**)

C	HSQC		HMBC	
	c	H (¹ J _{C-H})	H (² J _{C-H})	H (³ J _{C-H})
2	n.d.			
3	96,89	6,08 <i>s</i>		
4	164,63		6,08	4,01 e 8,00
4a	116,92			6,08, 7,34 e 7,68
5	124,54	8,00 <i>d</i> (<i>J</i> = 8,0 Hz)		7,73
6	124,20	7,34 <i>ddd</i> (<i>J</i> = 8,0; 6,4 e 1,6 Hz)		7,68
7	133,34	7,73 <i>m</i>		8,00
8	113,14	7,68 <i>m</i>		8,00
8a	138,15			7,73 e 8,00
4-OCH ₃	57,06	4,01 <i>s</i>		
<i>N</i> -OCH ₃	63,73	4,02 <i>s</i>		

n.d. = não detectado

A mistura de pirano flavonas (**2**) foi identificada através de EM e RMN, em uma e duas dimensões. Seu espectro de RMN ¹H apresentou sinais relativos a oito hidrogênios aromáticos [8,23 (*dd*, *J* = 7,9 e 1,6 Hz), 7,84 (*dd*, *J* = 7,8 e 1,6 Hz), 7,69 (*ddd*, *J* = 8,4, 7,2 e 1,6 Hz), 7,55 (*d*), *J* = 8,4 Hz), 7,42 (*m*), 7,40 (*m*), 7,07 (*ddd*, *J* = 7,8, 7,8 e 0,9 Hz) e 6,98 δ (*d*), *J* = 8,2 Hz)], cujas multiplicidades indicaram a existência de dois anéis aromáticos *orto*-dissubstituídos. Este fato foi confirmado pela análise do espectro de COSY ¹H-¹H.

O espectro de RMN ¹H apresentou ainda um sinal em 5,69 δ (1H, *dd*, *J* = 9,5 e 3,4 Hz) e vários sinais na região mais blindada [1,85 e 1,70 (*m*), 1,25 e 0,88 δ (*t*)]. Observou-se também que os hidrogênios em 1,85 e 1,70 δ acoplavam entre si e com o hidrogênio em 5,69 δ (*dd*). O mapa de contorno de HSQC permitiu a determinação dos deslocamentos químicos dos carbonos (Tabela 2) ligados aos hidrogênios descritos anteriormente.

Os experimentos de RMN ¹³C indicaram, excetuando-se a região mais blindada, a existência de 8 CH aromáticos e 7 carbonos quaternários, o que sugeriu a natureza de **2** como um flavonóide, mais especificamente como uma flavona. Além disso, definiu-se que tal flavona deveria ser substituída em 3, já que não existia o sinal de H-3 (geralmente em 6,8 δ) e em 2', pois só existiam dois anéis aromáticos *orto*-dissubstituídos. Por consequência, foi determinado que entre os

anéis B e C da flavona havia ocorrido ciclização, com formação de um anel pirano. Este tipo de ciclização é observada em flavonóides prenilados.¹⁸ Entretanto, nunca foi descrita na literatura a ocorrência de ciclização de uma flavona para uma pirano flavona através de uma cadeia policetílica, como é o caso de **2**. A presença do anel pirano foi confirmada através das correlações (²*J* e ³*J*) de H-11 (5,69 com C-2 (155,95) e C-3 (114,45)). Vale ressaltar, que os carbonos quaternários em 155,95; 155,69 e 154,71, por serem coincidentes na projeção do mapa de contorno de HMBC, foram atribuídos (Tabela 2) por comparação com a 2'-metoxiflavona.¹³ O carbono carbonílico em 174,85 foi determinado como C-4 através de sua correlação (³*J*) com H-5 (8,23).

Tabela 2. Dados de RMN (CDCl₃, 9,8 T) da mistura de pirano flavonas (**2**)

C	HSQC		HMBC	
	δ _C	H (¹ J _{C-H})	H (² J _{C-H})	H (³ J _{C-H})
2	155,95			5,69
3	114,45		5,69	
4	174,85			8,23
5	125,82	8,23 <i>dd</i> (7,9 e 1,6 Hz)		7,69
6	125,12	7,42 <i>m</i>	7,69 e 8,23	7,55
7	133,55	7,69 <i>ddd</i> (8,4; 7,2 e 1,6 Hz)	7,42	8,23
8	118,03	7,55 <i>d</i> (8,4 Hz)		7,42
9	154,71			
10	124,22			7,42 e 7,55
11	73,78	5,69 <i>dd</i> (9,5 e 3,4 Hz)	1,85	
12	33,99	1,70 <i>m</i> e 1,85 <i>m</i>		
1'	116,20			6,98 e 7,07
2'	155,69			
3'	117,88	6,98 <i>d</i> (8,2 Hz)		7,07
4'	133,73	7,40 <i>m</i>	7,07	7,84
5'	121,44	7,07 <i>ddd</i> (7,8; 7,8 e 0,9 Hz)		
6'	123,70	7,84 <i>dd</i> (7,8 e 1,6 Hz)	7,07	

A espectrometria de massas com ionização por *electrospray* no modo positivo permitiu que fossem identificadas algumas das pirano flavonas presentes na mistura **2**. Através desta técnica analítica, determinou-se o tamanho e as insaturações presentes na cadeia alquílica das diferentes pirano flavonas que constituíam a mistura (Tabela 3). Entretanto, a posição da dupla ligação não pode ser determinada. Portanto, a mistura **2** é constituída por pirano flavonas inéditas que se distinguem no tamanho e nas insaturações da cadeia alquílica (*R*).

As substâncias isoladas foram testadas sobre as formas tripomastigotas do *T. cruzi* nas concentrações de 500, 250 e 100 μg/mL e os valores de IC₅₀ foram calculados a partir dos valores de porcentagem de lise parasitária (% L.P.) obtidos nessas concentrações.

Tabela 3. Determinação da cadeia alquílica *R* das pirano flavonas (**2**)

pico [M+H] ⁺ em <i>m/z</i>	fórmula molecular	<i>R</i>
391	C ₂₆ H ₃₀ O ₃	(CH ₂) ₈ CH ₃
419	C ₂₈ H ₃₄ O ₃	(CH ₂) ₁₀ CH ₃
489	C ₃₃ H ₄₄ O ₃	(CH ₂) ₁₅ CH ₃
501	C ₃₄ H ₄₄ O ₃	(CH ₂) ₁₄ (CH=CH)CH ₃
503	C ₃₄ H ₄₆ O ₃	(CH ₂) ₁₆ CH ₃

ções. Os resultados (Tabela 4) mostram que dentre as substâncias testadas, as mais ativas foram os alcalóides **1** e **3**, apresentando valores de IC_{50} de 136,9 e 144,9 M, respectivamente. Entretanto, as substâncias testadas não mostraram ser potentes agentes tripanocidas, principalmente quando comparadas ao quimio-profilático violeta de genciana, cujo IC_{50} é de 83 M, e com a lignana (-)-metilpluviatolideo, que na concentração de 67,5 M ocasionou 99% de lise parasitária.⁴

Apesar deste fato, os resultados dos testes tripanocidas sugeriram que as substâncias isoladas podem ser os princípios ativos das frações e extratos de *C. heterophyllus*, que foram ativos sobre as formas tripomastigotas do *T. cruzi*.⁶

Tabela 4. Atividade tripanocida das substâncias isoladas de *C. heterophyllus*

substância	Concentração (g/mL)	%L.P.	IC_{50} (M)
-sitosterol e estigmasterol ¹¹	100	19,10	-
	250	20,90	
	500	40,00	
benzoato de -sitosterila	100	26,33	748
	250	27,23	
	500	64,73	
flavona ⁶	100	34,5	9.531
	250	38,6	
	500	48,6	
7-metoxiflavona ⁶	100	12,1	1.084
	250	31,8	
	500	38,6	
piranoflavonas (2)	100	26,33	-
	250	44,20	
	500	61,61	
haplotusina (1)	100	29,01	136,9
	250	49,55	
	500	72,32	
2-fenil-1-metil-4-quinolona (3)	100	26,78	144,9
	250	33,92	
	500	70,09	

L.P. = lise parasitária

PARTE EXPERIMENTAL

Materiais e equipamentos

Os espectros de RMN ¹H, ¹³C e dos experimentos 2D foram obtidos em espectrômetros DRX-200 e ARX-400 da Bruker. Foram utilizados CDCl₃ ou CD₃OD como solventes e tetrametilsilano (TMS) como padrão interno.

O espectro de massas foi obtido por injeção direta em um equipamento Micromass Quattro LC, utilizando-se como método de ionização *electrospray* no modo positivo.

Obtenção do material vegetal, dos extratos e frações

A obtenção do material vegetal, dos extratos e frações de folhas e caule de *C. heterophyllus* estão descritos em Ambrozín *et al.*⁶

Isolamento das substâncias

A mistura dos esteróides -sitosterol e estigmasterol foi obtida do extrato AHCH. Este extrato foi inicialmente submetido à cromatografia líquida em coluna (x h = 4,7 x 23,9 cm), utilizan-

do-se sílica gel (230-400 mesh) e eluição gradiente [hexano MeOH], originando 8 frações. Da quarta fração (AHCH4; 521,3 mg) foi obtida a mistura de esteróides (120,6 mg), através de cromatografia em coluna (x h = 3,8 x 29,3 cm) de sílica gel (230-400 mesh) e eluição gradiente [hexano MeOH].

A fração AHFHD (2,0 g) foi submetida à cromatografia líquida em coluna (x h = 4,1 x 44,8 cm), utilizando-se sílica gel (230-400 mesh) e eluição gradiente [hex:CH₂Cl₂ MeOH], originando 7 frações. A quarta fração (AHFHD4; 309,1 mg) foi cromatografada em sephadex LH-20 (x h = 3,0 x 47,0 cm) e eluída com MeOH, dando origem a 5 frações. A quinta fração (AHFHD4,5; 5,9 mg) foi identificada como o benzoato de -sitosterila. A fração AHFHD5 (375,6 mg) foi submetida à cromatografia líquida em coluna e à cromatografia em camada delgada preparativa. Tais técnicas permitiram a obtenção de 2,8 mg da mistura de piranoflavonas **2**.

Da fração AHFHA foram obtidas a flavona e a 7-metoxiflavona, segundo procedimento descrito em Ambrozín *et al.*⁶ Desta fração também foi isolada a 5-hidroxiflavona. A fração AHFHA (7,5 g) foi inicialmente submetida à cromatografia líquida em coluna (x h = 8,0 x 5,9 cm), utilizando-se florisil como fase estacionária e eluição gradiente (hexano MeOH), obtendo-se 6 frações. A fração 3 (AHFHA3; 1,6 g) foi cromatografada em coluna de sílica gel (230-400 mesh) (x h = 3,9 x 25,2 cm), com eluição gradiente (hex:AcOEt (9:1) MeOH), dando origem a seis frações. A sexta fração (AHFHA3,6; 31,4 mg) foi recromatografada em coluna de sephadex LH-20 (x h = 3,2 x 49,2 cm) e eluída com MeOH, originando 6 frações, das quais a sexta (AHFHA3,6,5; 5,2 mg) foi identificada como 5-hidroxiflavona.

A fração AHCMA (2,4 g) foi submetida à cromatografia líquida em coluna (x h = 3,2 x 53,0 cm), utilizando-se sílica gel 60 (230-400 mesh) como fase estacionária e eluição gradiente (CH₂Cl₂:MeOH (9,5:0,5) MeOH), para dar origem a 4 frações. A primeira fração (AHCMA1; 872,0 mg) foi cromatografada em coluna de sílica gel 60 (230-400 mesh), com eluição gradiente (hex:AcOEt (7:3) MeOH), obtendo-se 8 frações. Da quarta fração (AHCMA1,4; 15,5 mg) foi isolada a haplotusina (**1**) (5,3 mg), através de cromatografia em coluna (x h = 2,5 x 58,0 cm) de sílica gel (230-400 mesh), com eluição isocrática (hex:AcOEt (1:1)). Da oitava fração (AHCMA1,8; 129,2 mg) foi isolado o alcalóide 2-fenil-1-metil-4-quinolona (**3**) (22,1 mg), por cromatografia em coluna (x h = 2,5 x 58,0 cm) de sílica gel (230-400 mesh), com eluição gradiente (hex:AcOEt (1:1)).

Ensaio tripanocida

Os ensaios com as formas tripomastigotas de *T. cruzi* foram realizados no Departamento de Análises Clínicas, Bromatológicas e Toxicológicas da FCFRP-USP, segundo procedimento descrito em Vieira *et al.*⁷

Para os ensaios foram utilizadas cepas "Y" de *T. cruzi*, que são mantidas através de passagens seriadas em camundongos, por meio de repiques semanais, no Laboratório de Parasitologia do Departamento de Ciências da Saúde da FCFRP-USP.

Os ensaios biológicos das substâncias foram realizados utilizando-se sangue de camundongos albinos *Swiss*, infectados pela cepa "Y" do *T. cruzi*, o qual foi obtido por punção cardíaca no pico da parasitemia (sétimo dia). Esse sangue foi diluído em sangue de animal sadio, de forma a se obter uma concentração final de 2x10⁶ formas tripomastigotas por mL de sangue. Os ensaios foram realizados em microplacas de titulação (96 poços), onde o sangue infectado e as misturas (ou substâncias) a serem avaliadas foram solubilizados (em triplicata), e o material foi incubado por 24 h a 4 °C. Após este tempo, a contagem das formas tripomastigotas foi

realizada segundo a técnica descrita por Brener.¹⁹ Como controles, foram utilizados sangue de camundongo infectado, sem a adição de nenhuma substância; sangue infectado contendo a mesma concentração de DMSO utilizada no preparo das soluções e, sangue infectado contendo violeta de genciana (controle positivo), na concentração de 1:4.000.

As substâncias foram ensaiadas nas concentrações de 500, 250 e 100 µg/mL, para a obtenção dos valores de IC₅₀.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. J. R. Pirani, pela coleta e identificação da espécie vegetal, e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo financiamento do trabalho.

REFERÊNCIAS

- Dias, J. C. P.; Silveira, A. C.; Schofield, C. J.; *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **2002**, *97*, 603.
- Phillipson, J. D.; Wright, C. W.; *T. Roy. Soc. Trop. Med. H.* **1991**, *85*, 18.
- Newman, D. J.; Cragg, G. M.; Snader, K. M.; *J. Nat. Prod.* **2003**, *66*, 1022.
- Bastos, J. K.; De Albuquerque, S.; Silva, M. L. A.; *Planta Med.* **1999**, *65*, 541.
- Fournet, A.; Barrios, A. A.; Munoz, V.; Hocquemiller, R.; Roblot, F.; Cavé, A.; Richomme, P.; Bruneton, J.; *Phytother. Res.* **1994**, *8*, 174; Ferreira, M. E.; Nakayama, H.; Rojas de Arias, A.; Schinini, A.; de Bilbao, N. V.; Serna, E.; Lagoutte, D.; Soriano-Agaton, F.; Poupon, E.; Hocquemiller, R.; Fournet, A.; *J. Ethnopharmacol.* **2007**, *109*, 258.
- Ambrozin, A. R. P.; Vieira, P. C.; Fernandes, J. B.; Da Silva, M. F. G. F.; De Albuquerque, S.; *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **2004**, *99*, 227.
- Vieira, P. C.; Mafezoli, J.; Pupo, M. T.; Fernandes, J. B.; Da Silva, M. F. G. F.; De Albuquerque, S.; Oliva, G.; Pavão, F.; *Pure Appl. Chem.* **2001**, *73*, 617.
- Tomazela, D. M.; Pupo, M. T.; Passador, E. A. P.; Da Silva, M. F. G. F.; Vieira, P. C.; Fernandes, J. B.; Rodrigues Filho, E.; Oliva, G.; Pirani, J. R.; *Phytochemistry* **2000**, *55*, 643; Pavão, F.; Castilho, M. S.; Pupo, M. T.; Dias, R. L. A.; Correa, A. G.; Fernandes, J. B.; Da Silva, M.F.G.F.; Mafezoli, J.; Vieira, P. C.; Oliva, G.; *FEBS Lett.* **2002**, *520*, 13; Moraes, V. R. S.; Tomazela, D. M.; Ferracin, R. J.; Garcia, C. F.; Sannomiya, M.; Soriano, M. P. C.; Da Silva, M. F. G. F.; Vieira, P. C.; Fernandes, J. B.; Rodrigues Filho, E.; Magalhães, E. G.; Magalhães, A. F.; Pimenta, E. F.; De Souza, D. H. F.; Oliva, G.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2003**, *14*, 380; Mafezoli, J.; Vieira, P. C.; Fernandes, J. B.; Da Silva, M. F. G. F.; De Albuquerque, S.; *J. Ethnopharmacol.* **2000**, *73*, 335; Ambrozin, A. R. P.; Mafezoli, J.; Vieira, P. C.; Fernandes, J. B.; Da Silva, M. F. G. F.; Ellena, J. A.; De Albuquerque, S.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2005**, *16*, 434.
- Kallunki, J. A.; Pirani, J. R.; *Kew Bulletin* **1998**, *53*, 257.
- Vieira, P. C.; Kubo, I.; Kujime, H.; Yamagiwa, Y.; Kamikawa, T.; *J. Nat. Prod.* **1992**, *55*, 1112.
- Mafezoli, J.; *Tese de Doutorado*, Universidade Federal de São Carlos, Brasil, 2001.
- Barrero, A. F.; Sanchez, J. F.; Alvarez-Manzaneda, E. J.; Dorado, M. M.; Haidour, A.; *Phytochemistry* **1993**, *32*, 1261.
- Kingsbury, C. A.; Looker, J. H.; *J. Org. Chem.* **1975**, *40*, 1120.
- Ternai, B.; Markham, K. R.; *Tetrahedron* **1976**, *32*, 565.
- Rasakova, D. M.; Bessanova, I. A.; Yunusov, S. Y.; *Khim. Prir. Soedin.* **1984**, *5*, 635; Brown, N. M. D.; Grundon, M. F.; Harrison, D. M.; Surgenor, S. A.; *Tetrahedron* **1980**, *36*, 3579.
- Biavatti, M. W.; Vieira, P. C.; Da Silva, M. F. G. F.; Fernandes, J. B.; Victor, S. R.; Pagnocca, F. C.; De Albuquerque, S.; Caracelli, I.; Zuckerman-Schpector, J.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2002**, *13*, 66.
- Waterman, P. G.; *Biochem. Syst. Ecol.* **1999**, *27*, 395; Mester, I. Em *Chemistry and Chemical Taxonomy of the Rutales*; Waterman, P. G.; Grundon, M. F., eds.; Academic Press: Nova Iorque, 1983, p. 31-96.
- Lu, C. M.; Lin, C. N.; *Phytochemistry* **1994**, *35*, 781; Lin, C. N.; Shieh, W. L.; *Phytochemistry* **1992**, *31*, 2922; Lin, C. N.; Shieh, W. L.; *Phytochemistry* **1991**, *30*, 1669; Lin, C. N.; Chiu, P. H.; Fang, S. C.; Shieh, B. J.; Wu, R. R.; *Phytochemistry* **1996**, *41*, 1215; Achmad, S. A.; Hakim, E. H.; Juliawaty, L. D.; Makmur, L.; Suyatno, A. N.; Ghisalberti, E. L.; *J. Nat. Prod.* **1996**, *59*, 878.
- Brener, Z.; *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* **1962**, *4*, 389.