

ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE FLOROGLUCINÓIS E DO EXTRATO HEXÂNICO DE *Hypericum brasiliense* Choysi

Hildegardo Seibert França* e Ricardo Machado Kuster

Núcleo de Pesquisa de Produtos Naturais, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 21941-590 Rio de Janeiro – RJ, Brasil

Priscila da Nóbrega Rito, Adriana Passos de Oliveira, Lenise Arneiro Teixeira e Leandro Rocha

Faculdade de Farmácia, Universidade Federal Fluminense, 24241-000 Niterói – RJ, Brasil

Recebido em 10/10/07; aceito em 11/12/08; publicado na web em 28/4/09

ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF THE PHLOROGLUCINOLS AND HEXANIC EXTRACT FROM *Hypericum brasiliense* Choysi. Three phloroglucinols were obtained from *Hypericum brasiliense*: japonicine A (1), isouliginosin B (2) and uliginosin B (3). Bioautography and disk diffusion methods were used to determine antibacterial activity of the hexanic extract. Strains of the Coagulase Negative *Staphylococcus* and American Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* clones showed a growth inhibition zone ranging from 10 to 12 mm and 7 to 15 mm, respectively. Minimal inhibitory concentration (MIC) values were used to measure antistaphylococcal activity for all phloroglucinols. Isouliginosin B and uliginosin B presented MIC values of 1.5 and 3.0 µg/mL, respectively, while japonicine A displayed MIC value of 50.0 µg/mL.

Keywords: *Hypericum brasiliense*; antibacterial activity; phloroglucinol.

INTRODUÇÃO

Os *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA, *methicillin resistant Staphylococcus aureus*) e *Staphylococcus coagulase* negativa resistente à meticilina (MRCNS, *methicillin resistant coagulase negative Staphylococcus*) são os principais patógenos hospitalares e os maiores responsáveis pelas mortes por infecção hospitalar.¹ No final dos anos 80 e início dos anos 90, a comunidade médica foi surpreendida pelo aumento do número de doenças infecciosas causadas por cepas de MRSA multirresistentes. A vancomicina é o medicamento de primeira escolha no tratamento de infecções causadas por estes microrganismos. No entanto, há relatos de cepas de MRSA resistentes a este antibiótico, nos últimos anos.²

O gênero *Hypericum* é representado por 420 espécies pertencentes à família das Clusiaceae (Guttiferae). Esta família é composta por espécies com importantes efeitos farmacológicos e biológicos tais como antibacteriano, antiviral, antioxidante, atividade citotóxica e antidepressiva.^{3,4} O *Hypericum perforatum* é a espécie medicinal mais reconhecida, amplamente estudada e utilizada no tratamento de depressão leve a moderada.⁵ Alguns estudos clínicos e experimentais propõem que o mecanismo de ação parece estar relacionado com o bloqueio não seletivo da recaptação de serotonina, noradrenalina e dopamina. Os efeitos antidepressivos são devidos especialmente à hiperforina, um derivado de floroglucinol.⁶ Outros derivados de floroglucinóis, conjugados com o ácido filicínico, demonstraram excelente atividade antiestafilocócica, podendo-se considerar o gênero *Hypericum* como uma fonte de moléculas com potencial atividade antibacteriana.⁷

No Brasil, a família Clusiaceae é representada por 21 gêneros e 183 espécies, sendo o *Hypericum brasiliense* o mais estudado.⁴ Esta planta é um arbusto bianual, encontrada nas regiões sul e sudeste do Brasil⁸ e é usada na medicina tradicional com propriedades antiespasmódicas e no tratamento de doenças infecciosas.⁹ O *H. brasiliense* é quimicamente constituído de flavonóides, xantonas e floroglucinóis derivados do ácido filicínico com significativos efeitos farmacológicos

e biológicos. Observou-se que as xantonas apresentaram efeito de inibição sobre a enzima monoamina oxidase (MAO), assim como atividade antifúngica, e o extrato hidroalcoólico mostrou atividades analgésica em ratos e antidepressiva.¹⁰

Considerando que os derivados de floroglucinóis isolados de *H. brasiliense* são responsáveis pela atividade antibacteriana,¹⁰ o objetivo deste trabalho foi o isolamento bioguiado destas substâncias por métodos cromatográficos. Em paralelo, a atividade do extrato hexano contra MRSA de diferentes regiões do continente americano, assim como MRCNS isolados de pacientes hospitalares, foi investigada. Além disto, também foram avaliadas as atividades dos floroglucinóis isolados contra *S. aureus* ATCC 29213.

PARTE EXPERIMENTAL

Planta

A planta inteira de *H. brasiliense* foi coletada em Nova Friburgo, RJ, Brasil em 2001. Foi realizada uma exsiccata (nº199820) e depositada no herbário do Museu Nacional na Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Preparação do extrato e isolamento

O material vegetal (1000 g) foi extraído sucessivamente, à temperatura ambiente, com solventes de polaridade crescente iniciando com hexano, seguido por diclorometano e metanol. Os extratos foram evaporados até *secura* e armazenados em geladeira.

Devido à atividade antibacteriana, o extrato hexânico foi selecionado para o ensaio preliminar. O extrato hexano (60 g) foi submetido a uma coluna cromatográfica em sílica gel (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil) eluída com hexano e aumentando-se a polaridade com hexano/acetato de etila (2,5 a 50%), acetato de etila e acetato de etila/metanol (1,0 a 2,0%), fornecendo 93 frações. Observou-se precipitados amarelos nas frações 4 a 9 (denominadas HBW), de 10 a 26 (denominadas HBV) e de 27 a 48 (denominadas HBX). Após purificação por sucessivas recristalizações foram obtidos 1,038 g de HBW, 4,705 g de HBV e 1,166 g de HBX.

*e-mail: hildegardof@yahoo.com.br

Identificação das substâncias puras

Os dados espectrais de RMN ¹H e RMN ¹³C foram obtidos no aparelho marca Bruker Avance de 500 e 100 MHz, respectivamente. Os valores de deslocamentos químicos (δ) foram registrados em ppm, usando-se solução de CDCl₃ com TMS como padrão interno. Os espectros de massas foram obtidos em um espectrômetro de massa (EM) QP 5050 de ionização por impacto de elétrons (70 eV), o espectro de Infravermelho (IV) obtido de um Nicolet Nixus 670 FTIR e espectro de ultravioleta (UV) de um espectrofotômetro Shimadzu.

Microrganismos

Foram utilizadas 20 cepas de MRSA de três clones epidêmicos espalhados no continente americano, incluindo Clone Epidêmico Brasileiro (CEB), Clone Nova Iorque/Japonês (NI/JC) e EMRSA-16 (clone epidêmico de MRSA-16), além de outros três clones esporádicos. Todos os MRSA estudados foram fornecidos pela Dra. A. Figueiredo, do Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, UFRJ.

As cepas de MRCSN utilizadas no experimento foram obtidas da coleção do Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Farmácia, UFF, e incluem *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus simulans* e *Staphylococcus haemolyticus*, totalizando 36 cepas.

As culturas de padrões bacterianas usados foram *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Micrococcus luteus* ATCC 7468, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

Testes de susceptibilidade

Preparação do inóculo bacteriano

As suspensões bacterianas para os testes de difusão em discos foram obtidas de cultura em caldo de *S. aureus* ATCC 25923 diluídas em solução salina e ajustadas de acordo com a escala de 0,5 Mac Farland (10⁸-10⁷ UFC/mL). Para a determinação da concentração mínima inibitória usou-se *S. aureus* ATCC 29213 (específica para meios líquidos) e o inóculo foi ajustado para uma concentração final de 10⁵ UFC/mL.

Método de difusão em disco

O método de difusão em discos foi o escolhido para a determinação da atividade antibacteriana do extrato hexânico de *H. brasiliense*.¹¹ Discos de papel de filtro Whatmann (n. 3) foram impregnados com o extrato hexânico, solubilizado em hexano, em uma concentração de 100 mg/mL. Após a eliminação total do solvente (37 °C/24 h) os discos foram aplicados de maneira asséptica em placa de Petri contendo 20 mL de ágar Mueller-Hinton, inoculada de maneira confluenta com os microrganismos em análise e, em seguida, incubados a 37 °C/24 h. A leitura foi realizada com a medição do diâmetro dos halos de inibição.

Discos impregnados apenas com hexano foram submetidos às mesmas condições de secagem descritas anteriormente e adicionados como controle negativo. Discos contendo vancomicina (Sensibiodisc – Cecon, 30 µg) ou ampicilina (Cecon, 10 µg) foram utilizados como controle positivo do teste para as bactérias Gram positivas e Gram negativas, respectivamente.

Teste de bioautografia

Placas cromatográficas Alugram Sil G/UV₂₅₄ com suporte de alumínio foram utilizadas e 15 µL do extrato hexânico (100 mg/mL) de *H. brasiliense* foram aplicados em bandas de 1,0 cm. As placas foram transferidas para uma cuba cromatográfica contendo o

seguinte sistema de eluente: hexano e acetato de etila (95:5). Após a eluição e a eliminação total do solvente, 20 mL do meio de cultura ágar Mueller-Hinton inoculado com a bactéria em questão (*S. aureus* ATCC 25923 e MRSA, pertencente ao clone CEB) foram vertidos em uma das placas, que foi incubada a 37 °C por 24 h. Após este período, a placa foi borrifada com revelador biológico, cloreto de 2,3,5-trifenil-tetrazólio (2,5 mg/mL; Vetec) e incubada por mais 4 h nas mesmas condições descritas anteriormente. As zonas de inibição foram marcadas por coloração amarelada em um fundo vermelho.

A outra placa foi revelada com vanilina sulfúrica e as manchas observadas depois de aquecimento à 110 °C. A comparação entre as placas foi realizada, a fim de se determinar o fator de retenção dos compostos com atividade antibacteriana.

Concentração mínima inibitória (CMI)

Os valores de CMI foram determinados usando o teste de macrodiluição, de acordo com as normas da NCCLS.¹¹ As amostras foram dissolvidas em DMSO com concentração de 100 a 0,6 µg/mL e adicionadas em tubo contendo 1 mL de caldo Muller-Hinton. A suspensão bacteriana foi ajustada de modo a se obter uma concentração final de 10⁵ UFC/mL. A seguir, 1 mL da cepa bacteriana foi acrescentada a cada tubo contendo as amostras e os tubos foram incubados a 37 °C por 24 h. Tubos nos quais não houve turvação indicaram ausência de crescimento de microrganismos. A CMI foi então definida como a menor concentração da amostra capaz de inibir o crescimento bacteriano, detectado a olho nu.

Os controles do experimento foram feitos com meio de cultura inoculado com bactéria e solução salina; meio de cultura adicionado de vancomicina e bactéria e, finalmente, meio de cultura inoculado com bactéria e dimetil-sulfóxido (DMSO). Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O extrato hexânico de *H. brasiliense* foi ativo para todas as bactérias Gram positivas testadas pelo método de difusão em disco. As duas cepas de bactérias Gram negativas (*E. coli* e *P. aeruginosa*) não foram sensíveis para o mesmo extrato. O *S. aureus*, um importante patógeno Gram positivo, foi escolhido como modelo para os testes. Todas as 36 cepas de MRCSN analisadas foram inibidas pelo extrato hexânico, apresentando halos de inibição que variaram entre 10 a 12 mm (Tabela 1).

Tabela 1. Atividade antibacteriana do extrato hexânico de *H. brasiliense* (100 mg/mL) contra *Staphylococcus coagulase* negativa (CNS) utilizando o método de difusão em disco

Microrganismo (número de cepas)	Halo de inibição (mm) ^a	Vancomicina (mm)
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (16)	12	20
<i>Staphylococcus simulans</i> (14)	11	22
<i>Staphylococcus haemolyticus</i> (6)	10	19
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 ^b	12	20

^aMédia dos valores do experimento em triplicata; ^bcepa padrão utilizada no experimento

O extrato também exibiu atividade contra 20 cepas de clones esporádicos e epidêmicos de MRSA, com halos de inibição entre 9 a 15 mm (Tabela 2).

Tabela 2. Atividade antibacteriana do extrato hexânico de *H. brasiliense* (100 mg/mL) utilizando o método de difusão em disco contra diferentes clones de *S. aureus* resistentes à metilicina (MRSA) encontradas no continente americano

Clones (número de cepas)	Varição dos halos de inibição (mm)	Vancomicina (mm)
CEB ^a (13)	9 – 13	18 – 22
NI/J ^b (2)	7 – 9	19 – 20
EMRSA-16 ^c (3)	9 – 11	20 – 22
Esporádico (2)	9 – 15	20

^aCEB, MRSA oriunda do clone epidêmico brasileiro; ^bNI/JC, MRSA oriunda do clone Nova Iorque/Japonês; ^cEMRSA-16, MRSA oriunda do clone EMRSA-16 (*Epidemic methicilin resistant Staphylococcus aureus*-16), encontrado nos Estados Unidos e em alguns países da Europa.

Outras espécies de bactérias, tais como *M. luteus*, *E. faecalis* e *B. subtilis* apresentaram halos entre 11 a 15 mm frente ao mesmo extrato (Tabela 3).

Tabela 3. Atividade antibacteriana do extrato hexânico de *H. brasiliense* (100 mg/mL) frente a bactérias Gram positivas não estafilocócicas

Bactéria (número de cepas)	Varição dos halos de inibição (mm)	Vancomicina (mm)
<i>Enterococcus faecalis</i> (3)	11-15	19-21
<i>Micrococcus luteus</i> (1)	15	28
<i>Bacillus subtilis</i> (1)	15	24

O ensaio bioautográfico do extrato frente a *S. aureus* 25923 e para a cepa CEB revelou zonas de inibição cujos valores de Rfs foram 0,52; 0,84 e 0,90. Em comparação com a outra placa cromatográfica, revelada com vanilina sulfúrica seguida por aquecimento, as substâncias com os mesmos Rfs apresentaram coloração vermelha característica de floroglucínóis. Os floroglucínóis ativos foram isolados por coluna cromatográfica e identificados por IV, RMN ¹H, RMN ¹³C e EM. A fração HBW foi identificada como japonicina (1), a fração HBX como uliginosina B (2) e HBX como isouliginosina B (3). As substâncias 1 e 3 já foram isoladas de *H. brasiliense*¹⁰ e a substância 2 foi relatada pela primeira vez nesta espécie, porém, esta substância, já foi descrita inicialmente no *H. uliginosum*¹² (Figura 1).

Os valores de CMI para as três substâncias obtidas frente ao *S. aureus* ATCC 29213 foram de 50,0 µg/mL para o composto 1; 3,0 µg/mL para o 3 e 1,5 µg/mL para a substância 2. Resultados similares foram observados quando testados frente a *S. epidermidis*, sendo o CMI de 3,0 µg/mL para os compostos 2 e 3 e 25,0 µg/mL para o composto 1 (Tabela 4).

Nas últimas décadas, diversos antibacterianos vêm sendo pouco efetivos no combate às doenças infecciosas, devido à alta incidência de infecções causadas por bactérias multirresistentes.¹ Como resultado, o tratamento das infecções bacterianas tem se tornado um desafio para os profissionais da saúde, cientistas e governantes, assim como para as indústrias farmacêuticas.

Como alternativa terapêutica, as plantas medicinais são extremamente importantes na busca de novas moléculas com propriedades

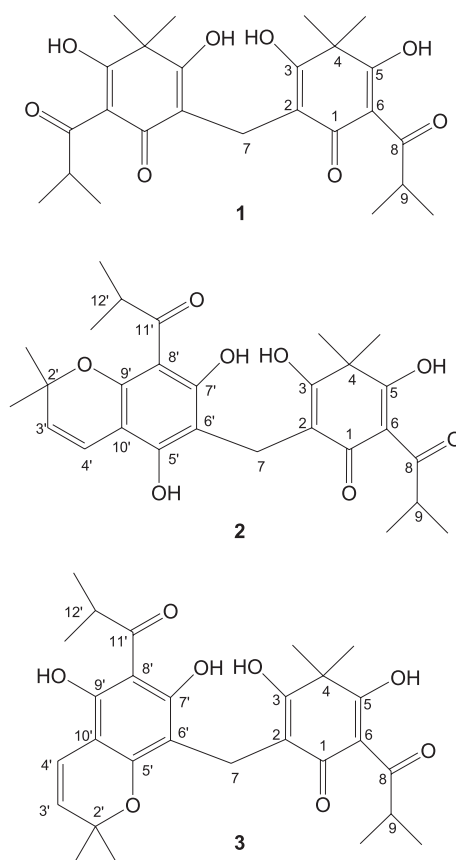


Figura 1. Estrutura química dos derivados de floroglucínóis isolados de *H. brasiliense*: Japonicina (1), uliginosina B (2) e isouliginosina B (3)

Tabela 4. Concentração mínima inibitória (CMI) dos floroglucínóis isolados de *H. brasiliense* contra *S. aureus* e *S. epidermidis*

Substâncias	<i>S. aureus</i> ^a ATCC 29213 (µg/mL)	<i>S. epidermidis</i> (µg/mL)
Japonicina A	50.0	25.0
Isouliginosina B	1.5	3.0
Uliginosina B	3.0	3.0
Vancomicina	1.5	1.5

^aEste experimento foi realizado com cepas *S. aureus* ATCC29213, sendo padrão de qualidade do teste de CMI.

antibacterianas. O gênero *Hypericum* mostrou ser uma alternativa com grande potencial para este problema. Derivados de floroglucínóis são descritos na literatura como substâncias promissoras com alta atividade antibacteriana.^{7,13} Neste artigo, o teste de susceptibilidade por difusão em disco, impregnado com extrato hexânico de *H. brasiliense*, foi usado inicialmente por ser uma técnica simples.

As cepas de MRSA pertencentes ao clone NI/J apresentaram halos de inibição menores que o CEB. Tal resultado foi inesperado, uma vez que cepas de CEB, no Brasil, são mais resistentes que NI/J.^{14,15} No entanto, cepas oriundas de CEB com resistência à vancomicina ainda não foram relatadas até o presente momento. As cepas originadas de NI/J, apesar de serem mais sensíveis para a maioria dos antibióticos usados na terapêutica clínica, já foram descritas como resistentes à vancomicina.¹⁶ Por outro lado, cepas de MRSA pertencentes a outros clones e MRCNS demonstraram boa susceptibilidade para o extrato analisado.

Trabalhos sobre o gênero *Hypericum* vêm confirmando a ausência de atividade frente às bactérias Gram negativas.¹⁷ Isso pode ocorrer devido à presença de uma estrutura na membrana externa das bactérias Gram negativas incapacitando a passagem de moléculas através desta estrutura. Recentemente, van Klink relatou uma relação estrutural-atividade de alguns floroglucínios e suas tricetonas correspondentes, mostrando que estas substâncias são mais ativas contra bactérias Gram positivas que Gram negativas e que as atividades estão relacionadas com as características hidrofóbicas e interações intramoleculares de ligações de hidrogênio.¹⁸

O teste de bioautografia revelou que substâncias com diferentes Rfs foram responsáveis pela inibição do crescimento de *S. aureus* ATCC 25923 e um MRSA pertencente ao clone CEB. O isolamento bioguiado, a purificação e identificação por EM e RMN de ¹H e ¹³C levaram à obtenção das substâncias **1**, **2** e **3**, responsáveis pelas propriedades antibacterianas. A uliginosina B (**2**) foi isolada a partir do *H. uliginosum* e mostrou ser ativa frente às bactérias Gram positivas¹² incluindo *S. aureus*.¹⁹ As substâncias **1** e **3** apresentaram atividades também contra *B. subtilis*.¹⁰

Os valores de CMI dos floroglucínios pelo método de macrodiluição demonstraram atividade antibacteriana contra *S. aureus* ATCC 29213 semelhantes à vancomicina para as substâncias **2** e **3**. Estes resultados também foram observados para *S. epidermidis*. Conseqüentemente, tais resultados demonstram que a fração hexânica de *H. brasiliense* tem grande potencial para fornecer substâncias com atividade contra bactérias multirresistentes.

AGRADECIMENTOS

Ao suporte da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação Carlos Chagas de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). Ao Laboratório de Biologia Molecular de Bactérias (IM-UFRJ) pelas cepas de MRSA.

REFERÊNCIAS

1. von Eiff, C.; Peters, G.; Heilmann, C.; *Lancet Infect. Dis.* **2002**, *2*, 677.
2. Chang, S.; Sievert, D. M.; Hageman, J. C.; Boulton, M. L.; Tenover, F. C.; Downes, F. P.; Shah, S.; Rudrik, J. T.; Pupp, G. R.; Brown, W. J.; Cardo, D.; Fridkin, S. K.; *N. Engl. J. Med.* **2003**, *348*, 1342.
3. Taylor, R. S. L.; Manandhar, N. P.; Hudson, J. B.; Towers, G. H. N.; *J. Ethnopharmacol.* **1996**, *52*, 157; Heilmann, J.; Winkelmann, K.; Sticher, O.; *Planta Med.* **2003**, *69*, 202.
4. Wanderley, M. G. L.; *Flora fanerogâmica do estado de São Paulo*, 1ª ed., Rima: São Paulo, 2003.
5. Bladt, S.; Wagner, H.; *J. Geriatr. Psychiatry Neurol.* **1994**, *7*, S57; Bombardelli, E.; *Fitoterapia* **1995**, *66*, 43; Rodríguez-Landa, J. F.; Contreras, C. M.; *Phytomedicine* **2003**, *10*, 688.
6. Pilkington, K.; Boshnakova, A.; Richardson, J.; *Complement Ther. Med.* **2006**, *14*, 268.
7. Jayasuriya, H.; Clark, A. M.; Mcchfsney, J. D.; *J. Nat. Prod.* **1991**, *54*, 1314; Schempp, C. M.; Pelz, K.; Wittmer, A.; Schöpf, E.; Simon, J. C.; *The Lancet* **1999**, *353*, 2129.
8. Robson, N. K. B.; *Bulletin of the British Museum (Natural History)* **1990**, *20*, 1.
9. Corrêa, M. P.; *Dicionário de Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas*, Imprensa Nacional: Rio de Janeiro, 1984.
10. Rocha, L.; Marston, A.; Kaplan, M. A. C.; Stoeckli-Evans, H.; Thull, U.; Testa, B.; Hostettmann, K.; *Phytochemistry* **1994**, *36*, 1381; Rocha, L.; Marston, A.; Potterat, O.; Kaplan, A. C.; Stoeckli-Evans, H.; Hostettmann, K.; *Phytochemistry* **1995**, *40*, 1447; Rocha, L.; Marston, A.; Potterat, O.; Kaplan, M. A. C.; Stoeckli-Evans, H.; Hostettmann, K.; *Phytochemistry* **1996**, *42*, 185; Rocha, L. M.; Ruppelt, B.; Kaplan, M. A.; Pereira, N. A.; *Revista Brasileira de Farmácia* **1991**, *72*, 67; Perazzo, F. F.; Lima, L. M.; Rocha, L. M.; França, H. S.; Carvalho, J. C. T.; *Phcog. Mag.* **2008**, *4*, 155.
11. CLSI - **Clinical and Laboratory Standards Institute – (Formerly NC-CLS); Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard**, 7th ed., 2006.
12. Parker, W. L.; Johnson, F.; *J. Amer. Chem. Soc.* **1968**, *90*, 4716.
13. Li-Hong, H.; Ching-Wan, K.; Vittal, J. J.; Keng-Yeow, S.; *Phytochemistry* **2000**, *53*, 705; Winkelmann, K.; Heilmann, J.; Zerbe, O.; Rali, T.; Sticher, O.; *J. Nat. Prod.* **2001**, *64*, 701; Matsuhisa, M.; Shikishima, Y.; Takaishi, Y.; Honda, G.; Ito, M.; Takeda, Y.; Shibata, H.; Higuti, T.; Kodzhimatov, O. K.; Ashurmetov, O.; *J. Nat. Prod.* **2002**, *65*, 290.
14. Teixeira, L. A.; Resende, C. A.; Ormonde, L. R.; Rosenbaum, R.; Figueiredo, A. M.; de Lencastre, H.; Tomaz, A.; *J. Clin. Microbiol.* **1995**, *33*, 2400.
15. Silva Coimbra, M. V.; Silva-Carvalho, M. C.; Wisplinghoff, H.; *J. Hosp. Infect.* **2003**, *53*, 103.
16. Tenover, F. C.; Weigel, L. M.; Appelbaum, P. C.; McDougal, L. K.; Chaitram, J.; McAllister, S.; Clark, N.; Killgore, G.; O'Hara, C. M.; Jevitt, L.; Patel, J. B.; Bozdogan, B.; *Antimicrob. Agents Chemother.* **2004**, *48*, 275.
17. Rabanal, R. M.; Arias, A.; Prado, B.; Hernández-Pérez, M.; Sánchez-Mateo, C. C.; *J. Ethnopharmacol.* **2002**, *81*, 287.
18. van Klink, J. W.; Larsen, L.; Perry, N. P.; Weavers, R. T.; Cook, G. M.; Bremer, P. J.; Mackenzie, A. D.; Kirikae, T.; *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 6651.
19. Parker, W. L.; Johnson, F.; *Lloydia* **1969**, *32*, 217.