

## ESTUDO QUÍMICO E ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DO CAULE DE *Aristolochia esperanzae* Kuntze (ARISTOLOCHIACEAE)

Alison G. Pacheco, Thiago M. Silva, Rozângela M. Manfrini, William S. T. Sallum, Lucienir Pains Duarte, Dorila Piló-Veloso e Antônio F. de C. Alcântara\*

Departamento de Química, Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Presidente Antônio Carlos, 6627, 31260-901 Belo Horizonte – MG, Brasil

Vagner F. Knupp

Fundação Centro Tecnológico de Minas Gerais, Av. José Cândido da Silveira, 2000, 31170-000 Belo Horizonte - MG, Brasil

Recebido em 8/10/09; aceito em 13/5/10; publicado na web em 17/9/10

CHEMICAL STUDY AND ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF STEM OF *Aristolochia esperanzae* Kuntze (ARISTOLOCHIACEAE). From the ethanolic extract of the stem of *A. esperanzae* ethyl and methyl fatty acid esters, fatty acids, aristolochic I and II acids, and  $\beta$ -cubebin were isolated. In addition asarinin, populifolic and 2-oxo-populifolic acids, aristolactams A Ia and A II, and sitosterol 3-O- $\beta$ -D-glucopyranoside were also isolated and firstly described in the species. Asarinin and  $\beta$ -cubebin showed antibacterial activity against *Bacillus cereus* and aristolochic acid I against *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*.

Keywords: *Aristolochia esperanzae*; aristolochic acids; antibacterial activity.

### INTRODUÇÃO

*Aristolochia esperanzae* Kuntze (Aristolochiaceae) tem como sinônimo *A. boliviensis* O. Kuntze,<sup>1</sup> sendo encontrada na América do Sul e conhecida popularmente no Brasil como cipó-mil-homens.<sup>2</sup> Levantamentos etnofarmacológicos indicam o uso de extratos desta espécie no tratamento de artrite reumatoide e de diversas outras doenças.<sup>3</sup> Por outro lado, a comercialização de ervas medicinais contendo extratos de espécies do gênero *Aristolochia* é proibida em muitos países, devido as suas propriedades nefrotóxicas, carcinogênicas e mutagênicas,<sup>4</sup> que podem levar tanto à nefropatia progressiva quanto ao câncer urotelial em humanos.<sup>5</sup>

O gênero *Aristolochia* tem sido documentado quimicamente desde 1951,<sup>6</sup> revelando principalmente a presença de terpenoides, lignoides, flavonoides, ácidos graxos e constituintes nitrogenados (alcaloides e nitrofenantrenos).<sup>7</sup> A literatura registra estudos fitoquímicos das folhas e raízes de *A. esperanzae*,<sup>8</sup> das quais foram isolados diterpenos dos tipos clerodano e labdano, triterpenos, lignanas dos tipos dibenzilbutirolactona, furofurano tetra-hidrofurano e 4-aril-tetralona, ácidos aristolóquicos e aristolactamas. O presente trabalho descreve o estudo fitoquímico do caule (cerne e cascas) de *A. esperanzae*, resultando no isolamento de asarinina (**1**), ácido populifólico (**2**), ácido 2-oxo-pupulifólico (**3**), ácido aristolóquico II (**4**), aristolactama AII (**5**), aristolactama A Ia (**6**), (8*R*,8'*R*,9*S*)-cubebina ou  $\beta$ -cubebina (**7**), ácido aristolóquico I (**8**), sitosterol-3-O- $\beta$ -D-glicopiranosídeo (**9**) e estigmastan-3,5,22-trieno (**10**), conforme Figura 1. Os compostos **4**, **7** e **8** haviam sido anteriormente isolados nas folhas e raízes da planta e os demais estão sendo descritos pela primeira vez na espécie. Além disto, este estudo foi acompanhado por testes de atividade antibacteriana de seus extratos, frações e fitoconstituintes isolados.

### PARTE EXPERIMENTAL

#### Procedimentos gerais

Os pontos de fusão não corrigidos foram determinados em aparelho Mettler FP80 SNR H22439. As análises por espectroscopia

de absorção na região do infravermelho (IV) foram realizadas em espectrômetro Perkin Elmer Spectrum One (ATR). As análises por cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas (CG/EM) foram realizadas em um cromatógrafo CG Varian 3800, acoplado a um espectrômetro de massas Varian Saturno 4000. As condições de análises foram: coluna 5% fenil 95% polidimetilsiloxano (30 m x 0,25 mm x 0,25  $\mu$ m de filme); hélio como gás de arraste com fluxo de 1 mL/min; injetor com programação de temperatura a 250 °C com rampa de 200 °C/min até 300 °C; injeções em modo *split* de 1:15; interface operante a 300 °C com energia de ionização de 70 eV. Para análise de **9** a programação de temperatura foi isotérmica a 300 °C, por 40 min; para **10**, foi a 50 °C por 5 min, 10 °C/min até 300 °C, por 30 min; para as demais amostras, foi a 80 °C, 7 min, 10 °C/min até 300 °C, por 40 min. A identificação dos componentes por CG/EM baseou-se na comparação eletrônica do padrão de fragmentação dos componentes nos respectivos espectros de massas com aqueles da biblioteca do banco de dados NIST (2005).

As análises por espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) foram realizadas em espectrômetros Bruker DPX-200 e DRX-400 linha Avance. Os deslocamentos químicos foram registrados em unidade  $\delta$  (em ppm) e as constantes de acoplamento (*J*) em Hz. Tetrametilsilano (TMS) foi empregado como padrão de referência interna, tendo CDCl<sub>3</sub> ou DMSO-*d*<sub>6</sub> como solvente.

Nas cromatografias em camada delgada (CCD) foram empregadas placas de vidro recobertas por sílica gel 60 G Merck com 0,25 mm de espessura e ativadas a 100 °C. Nas cromatografias em coluna (CC) foram empregadas colunas de vidro de diversos diâmetros e eluição na maioria das vezes sob pressão atmosférica. As fases estacionárias utilizadas foram sílica gel 60 Merck (70-230 mesh), sílica gel 60 Merck impregnada com 5% de AgNO<sub>3</sub> e Sephadex LH-20. As frações contendo clorofila foram tratadas com carvão ativo.<sup>9</sup> Luz ultravioleta ( $\lambda = 254$  e 366 nm), vapores de iodo e solução vanilina/ácido perclórico foram empregados como reveladores na CCD.

Os bioensaios foram realizados empregando-se bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Bacillus cereus* ATCC 11779 e *Listeria monocytogenes* ATCC 15313) e Gram-negativas (*Escherichia coli* ATCC 25723, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 e *Citrobacter freundii* ATCC 8090).

\*e-mail: aalcantara@zeus.qui.ufmg.br

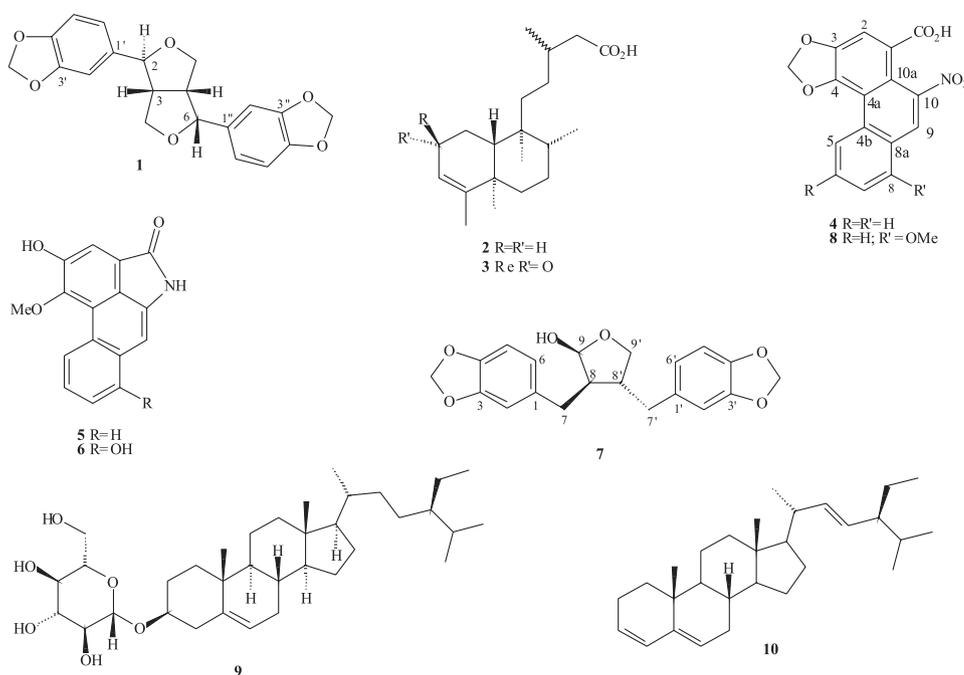


Figura 1. Estrutura química dos constituintes isolados do caule de *Aristolochia esperanzae*

## Material vegetal

O material vegetal de *A. esperanzae* foi coletado no Município de Esmeraldas (MG). Uma exsiccata da espécie encontra-se depositada no Herbário do Departamento de Botânica do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais sob o número BHCB 61743. Fotos ilustrativas de *A. esperanzae* Kuntze podem ser visualizadas em [http://farm4.static.flickr.com/3476/3729632198\\_94598d6320.jpg](http://farm4.static.flickr.com/3476/3729632198_94598d6320.jpg).

## Extração e isolamento dos compostos

O caule de *A. esperanzae* foi separado manualmente em cascas e cerne. Após secagem em estufa a 50 °C e pulverização, cascas (1,21 kg) e cerne (7,00 kg) do caule foram submetidos separadamente à extração a temperatura ambiente com EtOH por 7 dias, obtendo-se os extratos concentrados das cascas (ECA; 189,76 g) e do cerne (ECE; 328,48 g).

ECA foi submetido à CC de sílica gel, sendo coletadas frações eluídas em hexano, diclorometano (DCM), acetato de etila (AcOEt), EtOH e MeOH, em gradiente crescente de polaridade. As frações foram reunidas em grupos após análises por CCD. As frações eluídas em hexano:DCM 9:1 apresentaram-se como um óleo amarelado (0,02 g), identificado como uma mistura dos seguintes compostos: hexadecanoato de etila (CG/EM  $t_R$  = 21,522 min,  $m/z$  284,3 [M]<sup>+</sup>, 239,3, 157,2, 101,1, 88,1, 73,1, 55,1 e 43,1), oleato de etila ( $t_R$  = 23,154 min,  $m/z$  310,4 [M]<sup>+</sup>, 264,4, 211,3, 110,2, 96,2, 83,1, 69,1 e 55,1), 15-metil-heptadecanoato de etila ( $t_R$  = 23,383 min,  $m/z$  312,3 [M]<sup>+</sup>, 269,4, 157,2, 101,1, 88,1, 57,1 e 55,1), ácido docosanoico ( $t_R$  = 25,034 min,  $m/z$  340,4 [M]<sup>+</sup>, 295,4, 157,2, 88,1, 71,1 e 43,1), ácido tricosanoico ( $t_R$  = 25,875 min,  $m/z$  354,4 [M]<sup>+</sup>, 309,3, 157,2, 88,1, 69,2, 55,1 e 43,1), (2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)octadecanoato de metila ( $t_R$  = 27,376 min,  $m/z$  382,5 [M]<sup>+</sup>, 157,2, 101,1, 57,1, 55,1 e 41,1) e 2-metil-hexacosanoato de metila ( $t_R$  = 29,452 min,  $m/z$  424,5 [M]<sup>+</sup>, 157,2, 101,1, 87,1, 69,2, 57,1, 47,1 e 43,1).

As frações de ECA eluídas em hexano:DCM 1:1 (5,43 g) foram submetidas a refração por CC de sílica gel, sendo coletadas

frações eluídas em hexano, DCM e AcOEt, em gradiente crescente de polaridade. As frações eluídas em hexano:DCM 3:1 foram submetidas à recristalização em EtOH, fornecendo um sólido cristalino branco (0,11 g) identificado como **1**, conforme dados de RMN, IV e CG/EM apresentados no material suplementar.<sup>11</sup> As frações eluídas em hexano:DCM 1:3 (3,86 g) foram submetidas a refração por CC de sílica gel, sendo coletadas frações em hexano, DCM e AcOEt, em gradiente crescente de polaridade. As frações em hexano (1,23 g) e hexano:DCM 1:1 (0,85 g) foram reunidas e submetidas a refração por CC de sílica impregnada com AgNO<sub>3</sub> (5%) e eluição em ciclohexano:AcOEt 1:1, obtendo-se um sólido branco (0,01 g) identificado como uma mistura de **2** e **3**, conforme dados de RMN de <sup>13</sup>C descritos na literatura.<sup>7</sup>

As frações de ECA eluídas em DCM (2,58 g) forneceram um sólido branco que foi submetido a refração por CC de sílica gel e eluição em DCM e AcOEt, em gradiente crescente de polaridade. As frações em DCM forneceram um sólido (0,01 g) identificado como **4**, conforme dados de RMN, IV e CG/EM apresentados no material suplementar.<sup>11</sup> As frações de ECA eluídas em DCM:AcOEt 1:1 (0,12 g) forneceram um sólido branco que foi submetido a refração por CC de Sephadex e eluição em MeOH, obtendo-se sucessivamente sólidos amarelados identificados como **5** (0,05 g) e **6** (0,01 g), conforme dados de RMN, IV e CG/EM apresentados no material suplementar.<sup>12</sup>

ECE foi submetido à CC de sílica gel, sendo coletadas frações eluídas em hexano, DCM, AcOEt, EtOH e MeOH, em gradiente crescente de polaridade. As frações de ECE eluídas em DCM (6,24 g) foram submetidas a refração por CC de sílica e eluição em hexano, DCM e AcOEt em gradiente crescente de polaridade. Das frações eluídas em hexano:DCM 1:3 foi obtido um sólido cristalino branco (0,01 g) identificado como **7**, conforme dados de RMN e IV apresentados no material suplementar.<sup>13</sup> As frações de ECE eluídas em DCM:AcOEt 9:1 (4,88 g) foram submetidas a refração por CC de sílica e eluição em DCM e AcOEt, em gradiente crescente de polaridade. As frações obtidas em DCM:AcOEt 1:1 forneceram, após recristalização em MeOH, um sólido amarelado (0,06 g) identificado como **8**, conforme dados de RMN, IV e CG/EM apresentados no material suplementar.<sup>12</sup> As frações de ECE eluídas em DCM:AcOEt

1:4 (0,76 g) foram submetidas a fracionamento cromatográfico por Sephadex com eluição em MeOH, fornecendo um sólido branco (0,08 g) identificado como **9**, conforme dados de análise elementar (C: 70,55%; H: 10,36%; O: 19,09%), no IV e de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  descritos na literatura.<sup>10</sup>

As frações de ECE eluídas em AcOEt (2,59 g) foram recristalizadas em MeOH, fornecendo um sólido branco (0,03 g) identificado como **10**, conforme dados de CG/EM:  $t_r = 50,936$  min,  $m/z$  394,4  $[\text{M}]^+$ , 351,4, 255,2, 189,2, 145,2, 133,2, 107,2, 96,2, 93,2, 81,1 (pico base) e 55.

### Metodologia biológica

No teste de difusão em ágar,<sup>14</sup> os micro-organismos foram inoculados individualmente em tubos de ensaio contendo 2 mL do meio infuso de cérebro e coração (BHI; 37,0 g/L) e, posteriormente, incubados em estufa a 37 °C por 18 h. Uma alíquota de 0,5 mL deste material foi transferida para um tubo contendo 4,5 mL de solução salina estéril constituída por soluções aquosas de NaCl (9,0 g/L) e  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,5 g/L). Foram preparadas placas de Petri contendo o meio de cultura antibiótico nº 1 (27,0 g/L) e 0,4 mL do inóculo. Discos contendo 100 µg da amostra foram colocados nas placas com o auxílio de uma pinça estéril. Um disco contendo o controle positivo (disco impregnado com o antibiótico cloranfenicol) ou o controle negativo (disco impregnado com o solvente utilizado para solubilizar a amostra) foi colocado no centro de cada placa. As leituras dos halos de inibição foram feitas após 24 h de incubação.

No teste de concentração inibitória mínima,<sup>15</sup> os micro-organismos foram inoculados em tubos de ensaio contendo o meio BHI (2,0 mL) e incubados em estufa a 37 °C por 18 h. Em seguida, 0,5 mL desta suspensão foi transferida para um tubo contendo 4,5 mL de solução salina estéril, obtendo-se uma suspensão compatível com a escala 5 de McFarland (inóculo). Para cada amostra a ser testada, foram usados 10 tubos de ensaio contendo 1,8 mL do meio de cultura BHI no tubo 1 e 1,0 mL nos demais tubos (tubos 2-10). Um volume de 200 µL da solução teste (1,025 mg de cada amostra dissolvidos em 200 µL de DMSO) foi colocado no tubo 1. Sequencialmente, transferiu-se 1 mL do tubo 1 para o tubo 2, depois 1 mL do tubo 2 para o tubo 3 e, assim sucessivamente. Desprezou-se 1 mL do tubo 10. Adicionaram-se 100 µL do inóculo em cada tubo de ensaio. Os tubos foram incubados em estufa a 35 °C por 18 h. A leitura foi realizada após 18 h de incubação. Observou-se a partir de qual tubo a mistura se tornara turva. A concentração inibitória mínima (CIM) foi atribuída àquela do tubo que não apresentou turbidez com a menor diluição, sendo, portanto, a menor concentração que inibe o crescimento do micro-organismo teste.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Análise estrutural dos fitoconstituintes isolados

Os compostos isolados **1**, **4**, **5**, **8** e **9** foram identificados como sendo, respectivamente, asarinina,<sup>11</sup> ácido aristolóquico II,<sup>11</sup> aristolactama AII,<sup>12</sup> ácido aristolóquico I<sup>12</sup> e sitosterol-3-*O*- $\beta$ -D-glicopiranosídeo,<sup>10</sup> com base na análise dos dados obtidos dos respectivos espectros de IV, EM e RMN uni- e bidimensionais (HMBC, COSY, HMBC e NOESY), bem como pela comparação com dados da literatura.

Os compostos isolados **2**, **3**, **6** e **7** foram identificados como sendo, respectivamente, ácidos populifólico<sup>8</sup> e 2-oxo-populifólico,<sup>8</sup> aristolactama AIa<sup>12</sup> e (8*R*,8'*R*,9*S*)-cubebina,<sup>13</sup> com base na análise dos dados obtidos dos respectivos espectros de IV e RMN uni- e bidimensionais (HMBC, COSY, HMBC e NOESY), bem como pela comparação com dados da literatura. O composto isolado **10** foi identificado como sendo

estigmastan-3,5,22-trieno, pela comparação eletrônica do padrão de fragmentação dos componentes nos respectivos espectros de massas com aqueles da biblioteca do banco de dados NIST (2005). Ésteres etílicos não são comuns quando originários de fontes vegetais, portanto, os fitoconstituintes isolados desse tipo podem ser derivados formados durante a maceração, já que a extração utilizou EtOH como solvente.

### Atividade antibacteriana

Testes de difusão em ágar e de concentração inibitória mínima (CIM) de ECA e ECE foram realizados frente a diferentes espécies de bactérias. Esses extratos foram ativos somente frente a *B. cereus* (CIM 256 µg/mL). *B. cereus* é uma bactéria termo-resistente encontrada principalmente em cereais e carnes, sendo responsável por doenças de origem alimentar, causando vômito e diarreia.<sup>16</sup>

O fracionamento cromatográfico dos extratos foi biomonitorado por testes de atividade antibacteriana contra *B. cereus*, empregando os sistemas eluentes: hexano, hexano:DCM 9:1, hexano:DCM 3:1, hexano:DCM 1:1, DCM, DCM:AcOEt 1:1, DCM:AcOEt 1:3, AcOEt, AcOEt:EtOH 1:1, EtOH e MeOH. Os testes de halo de inibição apresentaram-se positivos apenas para as respectivas frações dos dois extratos eluídos em hexano:DCM 1:1 e DCM, ambas com CIM de 512 µg/mL. Nessas frações do estudo fitoquímico de ECA e ECE foram isolados, respectivamente, **1** e **7**.

Os testes microbiológicos de halo de inibição de **1** e **7** foram negativos contra *S. aureus*, *E. coli* e *S. typhimurium*. De forma semelhante aos extratos, os compostos **1** e **7** apresentaram atividades expressivas e seletivas frente a *B. cereus* (CIM 256 e 512 µg/mL, respectivamente). Estes resultados sugeriram que o mecanismo de ação não é por toxicidade, mas envolve fatores que afetam somente o *B. cereus*, apresentando-se muito importante para o desenvolvimento de antibióticos seletivos e de curto espectro de ação.

Para avaliar a possibilidade de sinergismo entre os compostos **1** e **7**, foram realizados testes de CIM de misturas destes compostos frente a *B. cereus*. As misturas de **1:7** nas proporções 0,4; 1,1 e 1,9 resultaram em CIM de 256, 512 e 512 µg/mL, respectivamente. Esses resultados indicam ausência de sinergismo e maior atividade de **1** frente a *B. cereus*.

Com exceção de **8**, os demais compostos isolados foram inativos frente a *S. aureus*, *E. coli*, *S. typhimurium*, *B. cereus*, *C. freundii* e *L. monocytogenes*. O ácido aristolóquico I (**8**) apresentou resultados positivos contra *S. aureus* e *L. monocytogenes* (CIM de 256 e 128 µg/mL, respectivamente). Este resultado é muito promissor, pois *S. aureus* é uma bactéria contaminante comum do solo, água e alimentos, sendo sua toxina a causadora de infecção gastrointestinal e desidratação.<sup>17</sup> Além disso, várias outras infecções, como as hospitalares, podem ser causadas também por *S. aureus*, sabendo-se que a sua resistência às drogas utilizadas aumenta sua virulência, causando complicações graves, como a pneumonia necrosal e toxicidade neonatal, nos casos de resistência a oxacilina.<sup>18</sup> Por sua vez, *L. monocytogenes*, um micro-organismo patogênico, também classificado como um problema de saúde pública pelo difícil diagnóstico, pode conduzir à pneumonia, encefalite e meningite adulta e neonatal, sendo de grande risco aos grupos de imunocomprometidos como aids, diabéticos e transplantados.<sup>19</sup>

Os resultados dos ensaios antibacterianos com os extratos, frações e compostos isolados de *A. esperanzae* dão um suporte científico ao uso da espécie pela população nos casos de infecções/inflamações causadas por artrite reumatoide.

### MATERIAL SUPLEMENTAR

Está disponível em <http://quimicanova.s bq.org.br>, na forma de arquivo .PDF, com acesso livre.

## AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo suporte financeiro; além da Profa. Dra. J. Takahashi, Departamento de Química, UFMG, pelas sugestões e comentários.

## REFERÊNCIAS

1. Hoene, F. C.; *Flora Brasílica: Aristolochiaceas* **1942**, *15*, 6.
2. Corrêa, M. P.; *Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas*, Imprensa Nacional: Rio de Janeiro, 1978.
3. Stasi, D. C. L.; *Plantas Medicinais na Amazônia I*, Ed. da UNESP: São Paulo, 1989; Marc, E. B.; Nelly, A.; Annick, D. D.; Frederich, D.; *J. Ethnopharmacol.* **2008**, *120*, 315; Adams, M.; Berset, C.; Kessler, M.; Hamburger, M.; *J. Ethnopharmacol.* **2009**, *121*, 343; Contrera, A.; Bernardi, A. C.; Pozetti, G. L.; Lopes, R. A.; Contrera, M. G. D.; *Rev. Esc. Farm. Odont.* **1985**, *11*, 157.
4. Poon, W. T.; Lai, C. K.; Chan, A. Y. W.; *Hong Kong J. Nephrol.* **2007**, *9*, 7.
5. Meinel, W.; Pabel, U.; Osterloh-Quiroz, M.; Hengstler, J. G.; Glatt, H.; *Int. J. Cancer* **2006**, *118*, 1090; Martinez, M. C. M.; Nortier, J.; Vereerstraeten, P.; Vanherweghem, J. -L.; *Nephrol Dial. Transplant.* **2002**, *17*, 408; Cheng, C. L.; Chen, K. J.; Shih, P. H.; Lu, L. Y.; Hung, C. F.; Lin, W. C.; Gu, J. Y.; *Cancer Lett.* **2006**, *232*, 236.
6. Schindler, H.; *Arzneim. Forsch.* **1951**, *1*, 7.
7. Pacheco, A. G.; Oliveira, P. M.; Piló-Veloso, D.; Alcântara, A. F. C.; *Molecules* **2009**, *14*, 1245; Wu, K. M.; Farrelly, J. G.; Upton, R.; Chen, J.; *Phytomedicine* **2007**, *14*, 273; Palmeira Júnior, S. F.; Conserva, L. M.; Corrêa, M. S. S.; Guilhon, G. M. S. P.; *Biochem. Syst. Ecol.* **2002**, *30*, 701; Silva-Brandão, K. L.; Solferini, V. N.; Trigo, J. R.; *Biochem. Syst. Ecol.* **2006**, *34*, 291.
8. Lopes, L. M. X.; Bolzani, V. S.; Trevisan, L. M. V.; *Phytochemistry* **1987**, *26*, 2781; Francisco, C. S.; Messiano, G. B.; Lopes, L. M. X.; Aristeu, T. G.; Oliveira, J. E.; Capellari Jr., L.; *Phytochemistry* **2008**, *69*, 168; Wu, T. S.; Damu, A. G.; Su, C. R.; Kuo, P. C.; *Nat. Prod. Rep.* **2004**, *21*, 594; Newman, A. A. Em *Chemistry of Terpenes and Terpenoids*; Connolly, J. D., ed.; Academic Press: London, 1972; Mix, D. B.; Guinaudeau, H.; Shamma, M.; *J. Nat. Prod.* **1982**, *45*, 657; Lopes, L. M. X.; Bolzani, V. S.; *Phytochemistry* **1988**, *27*, 2265; Lopes, L. M. X.; Bolzani, V. S.; Trevisan, L. M. V.; *Rev. Latinoamer. Quim.* **1988**, *19*, 113; Munavalli, S.; Viel, C.; *Annales Pharm. Fr.* **1969**, *27*, 449.
9. Jones, W. P.; Kinghorn, A. D. Em *Natural Products Isolation*; Sarker, S. D.; Latif, Z.; Gray, A. I., eds.; Humana Press Inc.: Totowa, New Jersey, 2006, cap. 13.
10. Costa, H. N. R.; Santos, M. C.; Alcântara, A. F. C.; Silva, M. C.; França, R. C.; Piló-Veloso, D.; *Quim. Nova* **2008**, *31*, 744.
11. Agrawal, P. K.; Thakur, R. S.; *Magn. Reson. Chem.* **1985**, *23*, 389; Priestap, H. A.; *Phytochemistry* **1987**, *26*, 519.
12. Priestap, H. A.; *Magn. Reson. Chem.* **1989**, *27*, 460.
13. Pascoli, I. C.; Nascimento, I. R.; Lopes, L. M. X.; *Phytochemistry* **2006**, *67*, 735.
14. Takahashi, J. A.; Pereira, C. R.; Pimenta, L. P. S.; Boaventura, M. A. D.; Silva, L. G. F. E.; *Nat. Prod. Res.* **2006**, *20*, 21.
15. Lana, E. J. L.; Carazza, F.; Takahashi, J. A.; *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 2053.
16. Agata, N.; Ohta, M.; Yokoyama, K.; *Int. J. Food Microbiol.* **2002**, *73*, 23.
17. Kotiranta, A.; Lounatmaa, K. K.; Haapasalo, M. M.; *Microbes Infect.* **2000**, *2*, 189.
18. Deurenberg, R. H.; Stobberingh, E. E.; *Infect. Genetics Evol.* **2008**, *8*, 747; Mee-Marquet, N. V.; Blanchard, M.; Domelier, A. S.; Quentin, R.; *Pathol. Biologie* **2004**, *52*, 579.
19. McLauchlin, J.; Mitchell, R. T.; Smerdon, W. J.; Jewell, K.; *Int. J. Food Microbiol.* **2004**, *92*, 15.