

TERPENOS ISOLADOS DE *Coussarea platyphylla* Müll. Arg. (RUBIACEAE)

**Francieli Casassa Vieira de Araujo, Fábio Gonçalves Marques, Cleuza Conceição da Silva e Silvana Maria de Oliveira Santin\***

Departamento de Química, Universidade Estadual de Maringá, 87020-900 Maringá – PR, Brasil

**Celso Vataru Nakamura**

Departamento de Microbiologia, Universidade Estadual de Maringá, 87020-900 Maringá – PR, Brasil

**Maria Lucília Motinha Zamuner**

Departamento de Farmácia e Farmacologia, Universidade Estadual de Maringá, 87020-900 Maringá – PR, Brasil

**Maria Conceição de Souza**

Departamento de Biologia, Universidade Estadual de Maringá, 87020-900 Maringá – PR, Brasil

Recebido em 7/8/08; aceito em 5/3/09; publicado na web em 10/8/09

TERPENES ISOLATED OF *Coussarea platyphylla* Müll. Arg. (RUBIACEAE). The phytochemical investigation of *Coussarea platyphylla* led to the isolation of triterpenes betulonic and betulinic acid, monoterpenes monotropein and monotropein salt, the diterpene *trans*-phytol and esters. The structures of the isolated compounds were assigned on the basis of spectroscopic data, including two-dimensional NMR methods. The antiproliferative properties against human cancer cell lines and molluscicidal activity against *Biomphalaria glabrata* of the crude methanolic extract and of its fractions were investigated.

Keywords: *Coussarea platyphylla*; terpenes; antitumor.

## INTRODUÇÃO

O gênero *Coussarea* (Rubiaceae) compreende 150 espécies distribuídas nos países da América do Sul e Central.<sup>1</sup> Apesar da ampla quantidade de espécies deste gênero, estudos químicos e farmacológicos se delimitam em apenas quatro espécies: *C. macrophylla*, *C. paniculata*, *C. brevicaulis* e *C. hydrangeifolia*. Estes estudos constataram a presença de antracenos,<sup>1</sup> antraquinonas,<sup>1</sup> triterpenos das classes dos lupanos,<sup>2</sup> oleananos<sup>2,3</sup> e ursanos,<sup>1,3</sup> fenilpropanoides<sup>4</sup> e o iridoide éster metílico diacetilcandósideo.<sup>5</sup> Alguns dos triterpenos isolados mostraram-se bioativos para células tumorais.

O estudo de *Coussarea platyphylla*, popularmente conhecida como jasmim-da-mata, teve como objetivo dar continuidade à investigação do potencial químico e farmacológico das espécies pertencentes à família Rubiaceae, em área de preservação ambiental da região de Porto Rico, na planície de inundação do alto do Rio Paraná, que abrange áreas dos estados do Paraná e Mato Grosso do Sul. Em estudo anterior da espécie *Galianthe brasiliensis*,<sup>6</sup> encontrada na mesma região e da mesma subfamília de *C. platyphylla* (Rubiaceae), foi constatada a presença de esteroides, de ácido ursólico e de alguns iridoides como asperulosídeo e ondelandosídeo, os quais possuem potenciais antitumorais<sup>7</sup> e são importantes marcadores quimiotaxonômicos na subfamília.<sup>6,8</sup> Análises preliminares de atividade antiproliferativa em células tumorais do extrato bruto das partes aéreas apresentaram resultados promissores.<sup>6</sup>

O presente trabalho, primeiro estudo químico da espécie *Coussarea platyphylla*, descreve o isolamento e a identificação de dois triterpenos, um diterpeno e de dois iridoides e os resultados dos ensaios antitumorais e moluscicida dos extratos brutos e frações das folhas e galhos.

## PARTE EXPERIMENTAL

## Procedimentos experimentais gerais

Os espectros de RMN (uni e bidimensionais) foram obtidos em espectrômetro Varian, modelo Mercury plus BB, operando a 300 MHz para <sup>1</sup>H e 75,5 MHz para <sup>13</sup>C. Os deslocamentos químicos foram dados em ppm, tendo como referência interna o tetrametilsilano TMS ( $\delta = 0,0$  ppm) ou o próprio solvente. Os solventes utilizados foram D<sub>2</sub>O, CD<sub>3</sub>OD e CDCl<sub>3</sub>. Para as cromatografias em coluna (CC) utilizou-se gel de sílica 60 (0,063-0,200 mm, Merck) ou Sephadex LH-20 como fase estacionária. Para as cromatografias em camada delgada (CCD) e em camada delgada preparativa (CCDP) empregou-se gel de sílica 60 G e 60 GF254 (Merck). A visualização dos compostos em CCD foi realizada por irradiação com luz ultravioleta em 254 e 366 nm e/ou por pulverização com solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/MeOH (1:1), H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/anisaldeído/ácido acético (1:0,5:50 mL) seguido de aquecimento. A caracterização do cátion do sal orgânico foi realizada por meio de espectrômetro de absorção atômica Varian modelo AA 175 (comprimento de onda de 330,2 nm) usando chama de ar/acetileno como fonte de energia e lâmpada de cátodo oco.

## Material vegetal

A planta foi coletada em abril de 2004 na bacia de inundação do Rio Paraná, no município de Bataiporã – MS. A exsiccata do material vegetal encontra-se depositada no Herbário da Universidade Estadual de Maringá sob o registro nº HUNP 3175.

## Isolamento dos terpenos presentes nas folhas e galhos

As folhas e galhos de *Coussarea platyphylla* (600 e 400 g, respectivamente) foram secos ao ar, triturados e extraídos exaustivamente com metanol, à temperatura ambiente, fornecendo 59,0 e 18,0 g de extrato bruto. Parte dos extratos brutos das folhas e galhos (39,0 e 13,0 g) foram solubilizados em MeOH/H<sub>2</sub>O 1:1 e submetidos à partição em solven-

\*e-mail: smoliveira@uem.br

tes de diferentes polaridades, resultando nas frações hexânica (FHF, 13,13 g), clorofórmica (FCF, 3,26 g), acetato de etila (FAEF, 0,75 g) e hidrometanólica (FHMF, 20,10 g) das folhas e hexânica (FHG, 1,16 g), clorofórmica (FCG, 1,53 g), acetato de etila (FAEG, 0,42 g) e hidrometanólica (FHMG, 7,78 g) dos galhos. Parte da fração FHF (11,98 g) foi fracionada em CC em gel de sílica com misturas de hexano, acetato de etila e metanol em ordem crescente de polaridade. Tratamento da subfração hexano:AcOEt 2% por CC em gel de sílica (hexano, hexano/AcOEt 2-20%) resultou no isolamento da substância **5** (19,9 mg) e de uma mistura de esteroides (estigmasterol, sitosterol e campesterol, 26,9 mg). A subfração hexano:AcOEt 10%, após tratamento em CCDP com hexano:AcOEt 15% resultou no isolamento das substâncias **1** (15,8 mg) e **2** (5,5 mg). A fração FCF (3,00 g) foi tratada em CC em gel de sílica (hexano, hexano/AcOEt 5-60%) e purificações das subfrações hexano:AcOEt 10% (77,3 mg) e 20% (105,6 mg) através de CCDP resultaram novamente nas substâncias **5** e **1**. A filtração da fração FHMF (0,50 g) em Sephadex LH-20, utilizando água e metanol resultou no isolamento das substâncias **3** (22,7 mg) e **4** (4,6 mg). As frações FHG e FCG foram submetidas ao mesmo tratamento empregado para as frações FHF e FCF, resultando no isolamento da substância **2** para ambas frações. Parte da fração FHMG (0,68 g) foi submetida à filtração em Sephadex LH-20 com água/metanol resultando no isolamento de **3** (7,2 mg).

### Ensaio de atividade moluscicida

A atividade moluscicida dos extratos e frações sobre caramujos adultos de *Biomphalaria glabrata* foi determinada segundo a metodologia descrita por Hostettmann.<sup>9</sup> Os bioensaios foram realizados em duplicata usando a niclosamida como controle positivo.

### Ensaio de atividade antitumoral

Os extratos brutos das folhas (EBF) e dos galhos (EBG) e as frações hexânica (FHF e FHG), clorofórmica (FCF e FCG), acetato de etila (FAEF e FAEG) e hidrometanólica (FHMF e FHMG) provenientes da partição destes extratos foram avaliados frente a culturas de células tumorais humanas do intestino (Caco-2) e do colo do útero (HeLa) cultivadas durante 48 h a 37 °C pelo método da sulforodamida B descrito por Skehan.<sup>10</sup>

### Dados espectroscópicos das substâncias isoladas

#### Monotropeína (**3**)

Aspecto físico: sólido castanho claro. RMN de <sup>1</sup>H (D<sub>2</sub>O, 300,06 MHz), δ (H, mult., J em Hz, int.): 5,58 (d, 1,8, H-1); 7,40 (d, 1,5, H-3); 3,57 (m, H-5); 6,23 (dd, 2,7; 5,7, H-6); 5,70 (dd, 1,8; 5,7, H-7); 2,68 (dd, 1,8; 8,7, H-9); 3,68 (m, H-10); 4,81 (d, 8,1, H-1'); 3,20 (m, H-2'); 3,34 (m, H-3'); 3,28 (m, H-4'); 3,26 (m, H-5') e 3,64 (m, H-6'). RMN de <sup>13</sup>C (D<sub>2</sub>O - 75,5 MHz): 95,0 (C-1); 152,3 (C-3); 106,5 (C-4); 41,3 (C-5); 140,7 (C-6); 134,1 (C-7); 87,8 (C-8); 47,8 (C-9); 69,4 (C-10); 174,0 (C-11); 98,9 (C-1'); 73,8 (C-2'); 76,8 (C-3'); 72,1 (C-4'); 78,4 (C-5') e 64,0 (C-6').

#### Sal de monotropeína (**4**)

Aspecto físico: sólido castanho claro RMN de <sup>1</sup>H (D<sub>2</sub>O, 300,06 MHz), δ (mult., J em Hz): 5,59 (d, 1,5, H-1); 7,10 (sl, H-3); 3,60 (m, H-5); 6,23 (dd, 2,4; 5,7, H-6); 5,70 (d, 1,8; 5,7, H-7); 2,69 (dd, 1,8; 8,7, H-9); 3,74 (m, H-10); 4,65 (d, 8,1, H-1'); 3,30 (m, H-2'); 3,33 (m, H-3'); 3,44 (m, H-4'); 3,52 (m, H-5') e 3,96 (sl, H-6'). RMN de <sup>13</sup>C (D<sub>2</sub>O - 75,5 MHz): 96,7 (C-1); 149,4 (C-3); 118,1 (C-4); 41,2 (C-5); 140,8 (C-6); 134,2 (C-7); 87,8 (C-8); 47,0 (C-9); 69,4 (C-10); 179,8 (C-11); 100,9 (C-1'); 75,5 (C-2'); 78,4 (C-3'); 72,4 (C-4'); 79,1 (C-5') e 63,5 (C-6').

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

O estudo fitoquímico de *Coussarea platyphylla* resultou no isolamento dos triterpenos ácidos betulônico<sup>11</sup> (**1**) e betulínico<sup>12</sup> (**2**), do iridoide monotropeína<sup>13</sup> (**3**) e seu derivado salino<sup>13</sup> (**4**), do diterpeno *trans*-fitol<sup>14</sup> (**5**) e da mistura de esteroides<sup>15</sup> (24α -metil-colesta-5-enol, 24α -etil-colesta-5,22-dienol e 24ξ-etil-colesta-5-enol). As estruturas das substâncias isoladas foram elucidadas com base nas análises dos dados espectroscópicos (RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C, DEPT 90 ° e 135°, COSY <sup>1</sup>H - <sup>1</sup>H, HMQC, HMBC e NOESY) e por comparação com os dados disponíveis na literatura.

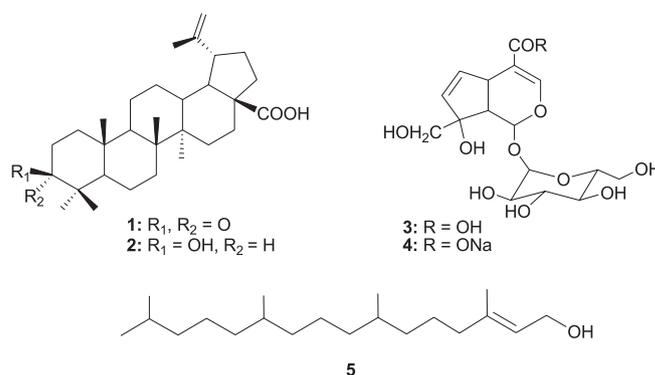


Figura 1. Terpenos isolados de *Coussarea platyphylla*

A substância **1** foi isolada da fração hexânica como sólido branco solúvel em clorofórmio e apresentou fluorescência quando visualizado sob luz ultravioleta no comprimento de onda de 366 nm. Pelo espectro de RMN de <sup>1</sup>H da substância foram observados sinais em δ<sub>H</sub> 4,74 (d, J = 1,8 Hz, H-29), 4,62 (sl, H-29), 3,01 (ddd, J = 10,7, 10,7 e 4,5 Hz, H-18) e seis sinais de hidrogênios metílicos em δ<sub>H</sub> 1,07 (s, H-23), 1,02 (s, H-24), 0,94 (s, H-25), 0,97 (s, H-26), 0,99 (s, H-27) e 1,69 (s, H-30). O espectro de RMN de <sup>13</sup>C apresentou sinais referentes a carbonos carbonílicos de cetona em δ<sub>C</sub> 218,5 (C-3) e de ácido carboxílico em δ<sub>C</sub> 181,5 (C-28), sinal de carbono metilênico em δ<sub>C</sub> 109,9 (C-29) e de carbono vinílico em δ<sub>C</sub> 150,6 (C-20). Os carbonos metílicos apresentam deslocamentos químicos entre δ<sub>C</sub> 14,8 (C-27) e δ<sub>C</sub> 26,8 (C-23). Através do experimento COSY, pode-se observar as correlações entre os hidrogênios vinílicos em δ<sub>H</sub> 4,74 e 4,62 e entre os hidrogênios δ<sub>H</sub> 3,01 e 1,69, dentre outras. As análises dos dados de RMN de <sup>1</sup>H e de <sup>13</sup>C e comparação com os descritos na literatura permitiram identificar **1** como o ácido betulônico.<sup>12</sup>

A substância **2** foi obtida da fração hexânica como sólido branco. Na comparação dos dados de RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C desta com os da substância **1** foram observadas várias semelhanças, destacando-se a principal diferença para o sinal de C-3 que em **1** correspondia a carbono não ligado a hidrogênio em δ<sub>C</sub> 218,5 e em **2** corresponde a carbono carbinólico em δ<sub>C</sub> 78,1/ δ<sub>H</sub> 3,40 (tl, J = 5,4 Hz, H-3). De acordo com os dados apresentados e comparação com os dados da substância **1** e da literatura para o ácido betulínico<sup>13</sup> pode-se constatar que **2** se trata desta substância.

A substância **4** foi isolada da fração hidrometanólica das folhas como sólido castanho claro solúvel em água. O espectro de RMN de <sup>1</sup>H da substância apresenta um singlete em δ<sub>H</sub> 7,10 relativo ao hidrogênio do éter enólico (sl, H-3), dois duplo dupletos em δ<sub>H</sub> 6,23 (dd, J = 2,4 e 5,7 Hz, H-6) e 5,70 (dd, J = 1,8 e 5,7 Hz, H-7), um duplete em δ<sub>H</sub> 5,59 (d, J = 1,8 Hz, H-1) e um duplo duplete em δ<sub>H</sub> 2,69 (dd, J = 1,8 e 8,7 Hz, H-9). Os sinais na região de δ<sub>H</sub> 3,15-3,94 em conjunto com o sinal δ<sub>H</sub> 4,68 (d, J = 8,1 Hz, H-1') determinaram a presença de uma unidade β-D-glicose. No espectro de RMN de <sup>13</sup>C observa-se sinal em δ<sub>C</sub> 179,8 (C-11) evidenciando a presença de um

carbono carboxílico e sinais referentes a carbonos olefínicos em  $\delta_c$  149,4 (C-3),  $\delta_c$  118,1 (C-4),  $\delta_c$  140,8 (C-6) e  $\delta_c$  134,2 (C-7). O sinal presente em  $\delta_c$  69,4 (C-10) é característico de carbono carbinólico, em  $\delta_c$  100,9 (C-1') de carbono anomérico da unidade glicosídica e em  $\delta_c$  96,7 (C-1) de carbono anomérico da aglicona. Os sinais em  $\delta_c$  41,2 (C-5) e 47,0 (C-9) foram atribuídos aos carbonos da junção dos anéis e em  $\delta_c$  87,8 ao C-8. Os demais sinais na região de  $\delta_c$  79,1 a 63,5 correspondem aos carbonos da unidade glicosídica. No mapa de contornos HMBC pode-se observar correlações dos hidrogênios  $\delta_H$  7,10 (H-3) e 2,69 (H-9) com o carbono C-1 ( $\delta_c$  96,7) e do hidrogênio em  $\delta_H$  5,59 (H-1) com C-3 ( $\delta_c$  149,4). Os hidrogênios em  $\delta_H$  5,59 (H-1), 5,70 (H-7), 6,23 (H-6), 7,10 (H-3) e 2,69 (H-9) correlacionam-se com o carbono C-5 ( $\delta_c$  41,2) e os hidrogênios em  $\delta_H$  5,70 (H-7) e  $\delta_H$  3,74 (H-10) com os carbonos C-6 ( $\delta_c$  140,8) e C-7 ( $\delta_c$  134,2). Também foram observadas correlações dos hidrogênios em  $\delta_H$  5,70 (H-7) e 3,74 (H-10) com C-8 ( $\delta_c$  87,8) e dos hidrogênios com deslocamentos químicos  $\delta_H$  5,70 (H-7), 6,23 (H-6) e 3,74 (H-10) com C-9 ( $\delta_c$  47,0). Pelo experimento COSY destaca-se, além das correlações dos hidrogênios glicosídicos, a correlação entre os hidrogênios vinílicos  $\delta_H$  6,23 (H-6) e 5,70 (H-7), e entre o hidrogênio em  $\delta_H$  2,69 (H-9) com os hidrogênios  $\delta_H$  5,59 (H-1) e 3,60 (H-5). As correlações observadas pelo experimento NOESY entre o sinal em  $\delta_H$  2,69 (H-9) com os sinais em 5,59 (H-1), 3,60 (H-5) e 3,74 (H-10) indicam que estes hidrogênios estão na mesma face, e evidenciam a estereoquímica relativa de C-1, C-5, C-8, C-9 e C-10. O cátion inorgânico foi determinado por espectrometria de absorção atômica como sendo o íon sódio. Dados de RMN de  $^1H$  e de  $^{13}C$  de **4** comparados com os dados da literatura<sup>13</sup> permitiram concluir que a substância isolada se trata do sal sódico da monotropeína.

A substância **3** foi isolada da fração hidrometanólica dos galhos e os dados de RMN de  $^1H$  e de  $^{13}C$  foram comparados com os dados da substância **4**. Foram observadas similaridades, com exceção dos sinais do hidrogênio do éter enólico que de  $\delta_H$  7,10 (*sl*, H-3) deslocou para  $\delta_H$  7,40 (*d*,  $J = 1,5$  Hz, H-3), e dos carbonos C-3 de  $\delta_c$  147,3 para  $\delta_c$  152,3; C-4 de  $\delta_c$  118,1 para  $\delta_c$  106,5 e do C-11 de  $\delta_c$  179,8 para  $\delta_c$  174,0. Estas diferenças nos deslocamentos de  $^1H$  e  $^{13}C$  podem ser atribuídas à mudança do sal para ácido. Comparando os dados da substância **3** com os da substância **4** e da literatura,<sup>13</sup> podemos constatar que esta substância se trata da monotropeína.

A substância **5** foi isolada das frações hexânica e clorofórmica das folhas como um óleo incolor solúvel em clorofórmio, que apresentou fluorescência quando visualizado sob luz ultravioleta no comprimento de onda de 366 nm. Análises dos dados de RMN de  $^1H$  e de  $^{13}C$  e comparação com os da literatura permitiram concluir que a substância isolada é o *trans*-fitol.<sup>14</sup>

Os extratos brutos e frações das folhas e galhos foram submetidos à avaliação da atividade moluscicida com caramujos *Biomphalaria glabrata*, hospedeiro intermediário do *Shistosoma mansoni*, causador da esquistossomose. Os extratos brutos e frações não se mostraram ativos, com exceção da fração hexânica dos galhos que apresentou resultado moderado com  $DL_{50} = 139$  ppm. Foram realizados ainda ensaios de atividade antiproliferativa em células HeLa (célula tumoral do colo do útero) e células Caco-2 (célula tumoral do intestino). Para as células HeLa os melhores resultados foram observados para as frações hexânica e clorofórmica dos galhos e das folhas, e fração acetato de etila dos galhos com  $CC_{50} < 100$   $\mu g/mL$ . Para células Caco-2, foram encontrados  $CC_{50} < 100$   $\mu g/mL$  para as frações hexânica e clorofórmica dos galhos e das folhas, e fração acetato de etila dos galhos. A efetiva atividade antiproliferativa observada para as frações apolares pode ser relacionada, em parte, às substâncias ácido betulínico<sup>16</sup> e *trans*-fitol<sup>17</sup> presentes, as quais possuem comprovada atividade antitumor.

**Tabela 1.** Valores de  $CC_{50}$  ( $\mu g/mL$ ) para os extratos brutos das folhas e galhos e frações obtidas de *Coussarea platyphylla*

Amostra <sup>b</sup>	HeLa <sup>a</sup>	CaCo-2 <sup>a</sup>
	$CC_{50}$	$CC_{50}$
EBF	100	<100
FHF	<100	<100
FCF	<100	<100
FAEF	2400	2280
FHMF	2300	2430
EBG	200	<100
FHG	<100	<100
FCG	<100	<100
FAEG	<100	<100
FHMG	2300	2430
Padrão <sup>c</sup>	3,8	3,8

<sup>a</sup>HeLa: célula tumoral do colo do útero, Caco-2: célula tumoral do intestino. <sup>b</sup>EBF e EBG extratos brutos das folhas e dos galhos; FHF, FCF, FAEF e FHMF: frações hexânica, clorofórmica, acetato de etila e hidrometanólica das folhas; FHG, FCG, FAEG e FHMG: frações hexânica, clorofórmica, acetato de etila e hidrometanólica dos galhos. <sup>c</sup>Padrão: Paclitaxel (taxol) da Sigma Chemical Co, MO. USA.

## CONCLUSÃO

O estudo químico de *Coussarea platyphylla* resultou no isolamento de terpenos e esteroides. O ácido betulínico, o *trans*-fitol, a monotropeína e sua forma salina foram isolados pela primeira vez no gênero. Os iridoides são considerados marcadores quimiotaxômicos da subfamília Rubioideae.<sup>6,18</sup>

## AGRADECIMENTOS

À Fundação Araucária (Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado do Paraná).

## REFERÊNCIAS

- Chiriboga, X.; Gilardoni, G.; Magnaghi, P. V.; Zanoni, G.; Vidari, G.; *J. Nat. Prod.* **2003**, *66*, 905.
- Chaturvedula, V. S. P.; Schilling, J. K.; Johnson, R. K.; Kingston, D. G. I.; *J. Nat. Prod.* **2003**, *66*, 419.
- Su, B. N.; Kang, Y. H.; Pinos, R. E.; Santarsiero, B. D.; Mesecar, A. D.; Soejarto, D. D.; Fong, H. H. S.; Pezzuto, J. M.; Kinghorn, A. D.; *Phytochemistry* **2003**, *64*, 293.
- Hamerski, L.; Bomm, M. D.; Silva, D. H. S.; Yung, M. C. M.; Furlan, M.; Eberlin, M. N.; Gamboa, I. C.; Cavalheiro, A. J.; Bolzani, V. S.; *Phytochemistry* **2005**, *66*, 1927.
- Hamerski, L.; Bomm, M. D.; Silva, D. H.; Yung, M. C. M.; Bolzani, V. S.; *22nd IUPAC International Symposium on the Chemistry of Natural Products*, São Carlos, Brasil, 2000.
- Moura, V. M.; Santos, D. P.; Carvalho, J. E.; Foglio, M. A.; Santin, S. M. O.; *Quim. Nova* **2006**, *29*, 452.
- Frew, T.; Powis, G.; Berggren, M.; Abraham, R. T.; Ashendel, C. L.; Zalkow L.H.; Hudson, C.; Qazia, S.; Gruszeckakowalik, E.; Merriman, R.; Bonjouklian, R.; *Anticancer Res.* **1994**, *14*, 2425.
- Moura, V. M.; Santos, A. R.; Nurnberg, V.; Souza, M. C.; Santin, S. M. O.; *Biochem. Syst. Ecol.* **2005**, *33*, 451; Inouye, H.; Takeda, Y.; Nishimura, H.; Kanomi, A.; Okuda, T.; Puff, C.; *Phytochemistry* **1988**, *27*, 2591.

9. Hostettmann, K.; Kizu, H.; Tominou, T.; *Planta Medica* **1982**, *44*, 33.
10. Skehan, P.; Storeng, R.; Scudeiro, D.; Monks, A.; McMahon, J.; Vistica, D.; Warren, J. T.; Bokesch, H.; Kenney, S.; Boyd, M.R.; *J. Natl. Cancer Inst.* **1990**, *82*, 1107; Skehan, P. Em *Cell Growth and Apoptosis. A Practical Approach*; Studzinski, G. P., ed.; IRL Press: Oxford, 1995.
11. González, A. G.; Amaro, J.; Fraga, B. M.; Luis, J. G.; *Phytochemistry* **1983**, *22*, 1830.
12. Rao, M. S.; Kumar, J. K.; Rao, P. S.; Toth, G.; Simon, A.; Balázs, B.; Duddek, H.; *Fitoterapia* **1999**, *70*, 200.
13. Bergeron, C.; Marston, A.; Antus, S.; Gauthier, R.; Hostettmann, K.; *Phytochemistry* **1998**, *49*, 233.
14. Sims, J. J.; Pettus, J. A. Jr.; *Phytochemistry* **1976**, *15*, 1076; Umlauf, D.; Zapp, J.; Becker, H.; Adam, K. P.; *Phytochemistry* **2004**, *65*, 2463.
15. Goulart, M. O. F.; Sant'Ana, A. E. G.; Lima, R. A. de; Cavalcante, S. H.; *Quim. Nova* **1993**, *16*, 95.
16. Fulda, S.; *Int. J. Mol. Sci.* **2008**, *9*, 1096.
17. Yu J.; Liu, H.; Lei, J.; Tan, W.; Hu, X.; Zou, G.; *Phytother. Res.* **2007**, *21*, 817.
18. Inouye, H.; Takeda, Y.; Nishimura, H.; Kanomi, A.; Okuda, T.; Puff, C.; *Phytochemistry* **1988**, *27*, 2591.