



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
SISTEMA DE BIBLIOTECAS DA UNICAMP  
REPOSITÓRIO DA PRODUÇÃO CIENTÍFICA E INTELLECTUAL DA UNICAMP

**Versão do arquivo anexado / Version of attached file:**

Versão do Editor / Published Version

**Mais informações no site da editora / Further information on publisher's website:**

[https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-40422010001000006](https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422010001000006)

**DOI: 10.1590/S0100-40422010001000006**

**Direitos autorais / Publisher's copyright statement:**

©2010 by Sociedade Brasileira de Química. All rights reserved.

DIRETORIA DE TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO

Cidade Universitária Zeferino Vaz Barão Geraldo

CEP 13083-970 – Campinas SP

Fone: (19) 3521-6493

<http://www.repositorio.unicamp.br>

CITOCALASINAS PRODUZIDAS POR *Xylaria* sp., UM FUNGO ENDOFÍTICO DE *Piper aduncum* (PIPERACEAE)#

Geraldo H. Silva, Camila M. de Oliveira, Helder L. Teles, Vanderlan da S. Bolzani e Angela R. Araujo\*

Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, CP 355, 14801-970 Araraquara – SP, Brasil

Ludwig H. Pfenning

Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Lavras, 37200-000 Lavras – MG, Brasil

Maria Cláudia M. Young

Seção de Fisiologia e Bioquímica de Plantas, Instituto de Botânica, CP 4005, 01061-970 São Paulo – SP, Brasil

Claudio M. Costa-Neto

Departamento de Bioquímica e Imunologia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 14049-900 Ribeirão Preto – SP, Brasil

Renato Haddad e Marcos N. Eberlin

Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, CP 6154, 13083-970 Campinas – SP, Brasil

Recebido em 30/4/10; aceito em 6/10/10; publicado na web em 8/11/10

CYTOCHALASINS PRODUCED BY *Xylaria* sp., AN ENDOPHYTIC FUNGUS FROM *Piper aduncum*. A chemical study on the EtOAc extract produced by *Xylaria* sp., an endophytic fungus from *Piper aduncum*, resulted in the isolation of a new cytochalasin **1**, along with five known 19,20-epoxycytochalasin D (**2**), C (**3**), N (**4**), Q (**5**), and R (**6**). The **1-6** were evaluated against the fungi *C. cladosporioides* and *C. sphaerospermum* and only **5** showed weak activity. The cytotoxicity *in vitro* against HeLA and CHO cells lines were investigated and the cytochalasins **2-4**, and **6** showed a strong activity against HeLA. The DNAdamaging activity of **1-6** were also investigated against mutant strains of *S. cerevisiae*.

Keywords: *Xylaria* sp.; *Piper aduncum*; endophytic fungus.

## INTRODUÇÃO

Aproximadamente um quarto de todos os produtos naturais biologicamente ativos conhecidos têm sido produzidos por fungos.<sup>1</sup> Estes são estimados em 1,5 milhões de espécies<sup>2</sup> distribuídos principalmente entre fungos micoparasitas, coprófilos, de solo, de água doce, epifíticos e endofíticos. Fungos endofíticos são micro-organismos que habitam o interior de um vegetal,<sup>3</sup> em pelo menos por um período de seu ciclo de vida. Apesar de serem produtores de metabólitos secundários biologicamente ativos,<sup>4</sup> são pouco explorados.

Dando continuidade aos estudos de prospecção química e biológica em fungos endofíticos isolados de espécies vegetais do cerrado, a espécie vegetal *Piper aduncum* foi selecionada, pois a medicina popular relata propriedades diurética, cicatrizante e anti-hemorragica.<sup>5-7</sup> Dados fitoquímicos de *P. aduncum* relatam a ocorrência de amidas, fenilpropanoides, di-hidrochalconas e derivados prenilados com atividades moluscida, bactericida e citotóxica.<sup>8,9</sup> Estes fatos, associados às observações de que micro-organismos endofíticos podem mimetizar a química de seus respectivos hospedeiros e produzirem substâncias ou derivados com maior bioatividade,<sup>10</sup> direcionaram o estudo químico/biológico dos fungos endofíticos associados à *P. aduncum*.

*P. aduncum* foi submetida ao isolamento e à purificação dos endofitos e conduziu a seis linhagens puras. Após triagem química/biológica, a linhagem PA-01 foi classificada como *Xylaria* sp. e selecionada para estudo, mediante atividade seletiva do extrato bruto AcOEt contra a linhagem mutante de *Saccharomyces cerevisiae* RS 321 e contra os fungos fitopatogênicos *C. cladosporioides* e *C. sphaerospermum*.

O fungo *Xylaria* sp. foi cultivado no meio de cultura PDB, em escala ampliada, para obtenção do extrato bruto que, após fracionamento cromatográfico por CLAE, levou ao isolamento de uma citocalasina inédita (**1**) e das 19,20-epoxicitocalasina conhecidas D (**2**), C (**3**), N (**4**), Q (**5**) e (**6**). A estrutura das substâncias isoladas foi determinada com base nas análises dos dados espectrométricos de IV, EM-ES, RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C (1D e 2D).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A fórmula molecular da citocalasina **1** foi estabelecida como C<sub>30</sub>H<sub>37</sub>NO<sub>7</sub> por ESI-EMAR (*m/z* 524,2729 [M + H]<sup>+</sup>) e com auxílio dos espectros de RMN de <sup>13</sup>C e DEPT. O espectro no IV mostrou as absorções de hidroxila (3440 cm<sup>-1</sup>) e uma absorção larga (1710 cm<sup>-1</sup>) atribuída a estiramentos C=O. A análise dos dados de RMN de <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C e DEPT indicou a presença de quatro átomos de carbono carbonílico (sendo dois de grupos cetona), um anel benzênico monossustituído, cinco metilas, onze átomos de carbono de grupos metínicos (dois olefínicos e três carbinólicos), dois metilênicos e dois átomos de carbono quaternário, sendo um carbinólico. O índice de deficiência de hidrogênio calculado foi igual a 13. Estes dados são característicos de substâncias da classe das citocalasinas. A atribuição de todos os átomos de hidrogênio aos respectivos átomos de carbonos foi realizada com auxílio dos mapas de contorno do experimento gHMQC.

A análise dos espectros de gCOSY e TOCSY indicou os átomos de hidrogênios acoplados em série e permitiu identificar os quatro sistemas de spins da molécula H-2' a H-6'; H-10 a H-12; H-8 a H-22 e H-19 a H-21. A estereoquímica da ligação dupla entre C-13 e C-14, assim como o epóxido em C-19 e C-20 foi definida como *trans* pelas constantes de acoplamento (*J* = 15,5 e 2,0 Hz, respectivamente).<sup>11</sup> A correlação gHMBC de H-10a ( $\delta_H$  2,68) com C-1' ( $\delta_C$  137,5) confirmou a presença do grupo fenil em C-10. As correlações de H-12 ( $\delta_H$  1,01) e H-8 ( $\delta_H$  3,42)

\*e-mail: araujoar@iq.unesp.br

#Artigo em homenagem ao Prof. Hans Viertler

com C-7 ( $\delta_C$  212,6) e comparação com dados de citocalasa-13(E),19(E)-dieno-1,7,17-triona,<sup>12</sup> possibilitaram a elucidação do núcleo isoindolona. As correlações de H-22 ( $\delta_H$  1,12) e H-23 ( $\delta_H$  1,44) com C-17 ( $\delta_C$  214,9) e entre H-21 ( $\delta_H$  5,43) e C-8 ( $\delta_C$  51,2) e comparação com 19,20-epoxicitocalasina C (**3**)<sup>13</sup> permitiram elucidar o anel macrocíclico.

As configurações relativas do núcleo isoindolona e do anel macrocíclico de **1** foram estabelecidas pelo experimento NOESY, onde se observou correlação entre H-4 e H-21, valores dos deslocamentos químicos de RMN de  $^1H$  e  $^{13}C$ , constantes de acoplamento e comparação com 18,21-di-hidroxi-16,18-dimetil-10-fenil-citocalasa-13(E),19(E)-dieno-1,7,17-triona<sup>12</sup> e com 19,20-epoxicitocalasina C (**3**),<sup>13</sup> respectivamente, Figura 1. Estas informações permitiram estabelecer a configuração relativa da inédita citocalasina **1**.

As substâncias **2-6** foram identificadas pela análise por EM, RMN de  $^1H$  e  $^{13}C$ , gHMQC, gHMBC, gCOSY e NOESY e por comparação com dados descritos na literatura.<sup>13</sup>

As citocalasinas **1-6** (Figura 1) foram avaliadas quanto à atividade antifúngica, frente aos fungos fitopatogênicos *Cladosporium cladosporioides* e *C. sphaerospermum*, usando-se o método da autobiografia direta.<sup>14</sup> A substância **5** mostrou uma fraca atividade na concentração de 100  $\mu g mL^{-1}$ , quando comparada com o padrão nistatina (1  $\mu g mL^{-1}$ ). As outras citocalasinas apresentaram-se inativas.

As substâncias **1-6** foram ensaiadas frente à linhagem mutante de *Saccharomyces cerevisiae* RS 321 mostrando-se inativas, o que indica não serem as responsáveis pela bioatividade inicialmente observada no extrato bruto.<sup>15</sup>

A avaliação da atividade citotóxica de **1-6** foi realizada em células de mamíferos das linhagens HeLa (tumor de cérvix humano) e CHO (ovário de hamster chinês).<sup>16</sup> Para a linhagem não cancerígena CHO, as substâncias **2, 3, 5 e 6** apresentaram  $IC_{50}$  de 90,0; 120,0; 125,0 e 4,00  $\mu mol L^{-1}$ , respectivamente. As citocalasinas **1 e 4** não apresentaram  $IC_{50}$  nas concentrações testadas, sendo que **1** foi totalmente inativa. A cisplatina foi usada como padrão com  $IC_{50} = 20 \mu mol L^{-1}$ .

Na linhagem cancerígena HeLa as substâncias **1-6** apresentaram  $IC_{50}$  de 43,0; 1,0; 2,0; 1,0; 3,0; e 3,0  $\mu mol L^{-1}$ , respectivamente. A cisplatina foi usada como padrão com  $IC_{50} = 5,0 \mu mol L^{-1}$ .

A forte atividade apresentada pelas citocalasinas **2-5** contra a linhagem cancerígena HeLa e a fraca contra a linhagem não cancerígena CHO evidenciam uma seletividade destas substâncias para as linhagens tumorais HeLa.

Para o nosso conhecimento, este é o primeiro relato de citocalasinas sendo produzidas por fungos endofíticos associados à *Piper aduncum*.

## PARTE EXPERIMENTAL

### Instrumentação

Os espectros de absorção na região do IV foram obtidos em um espectrômetro Perkin Elmer- FT-IR, utilizando-se pastilhas de KBr. Os espectros de massas foram registrados em espectrômetro de massas de baixa resolução da marca Fisons, modelo VG Platfform II, no modo de ionização *electrospray* (ESI). Os espectros

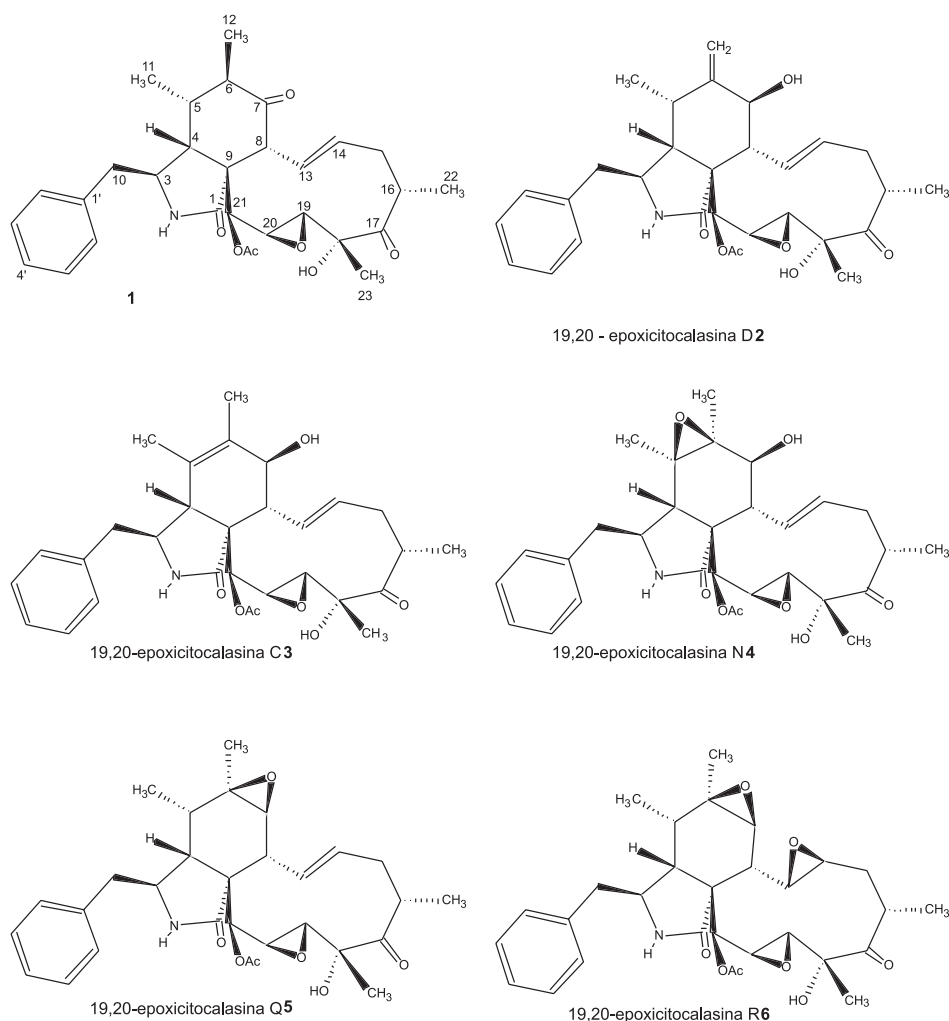


Figura 1. Estruturas das substâncias isoladas de *Xylaria* sp.

de massas de alta resolução foram obtidos em espectrômetro QTOF (Micromass), utilizando-se como método de ionização *electrospray* no modo positivo.

Os espectros de RMN foram registrados em CDCl<sub>3</sub> e DMSO-*d*<sub>6</sub> no espectrômetro Varian Inova 500, usando TMS como padrão de referência.

O aparelho de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foi um Varian Pro Star, com detectores UV-Vis. As colunas analíticas e preparativas utilizadas foram Phenomenex tipo Luna - C18 (250 x 4,60 mm, 5 μm) e (250 x 21,20 mm, 10 μm), respectivamente.

Os meios de cultura líquido e sólido foram submetidos à esterilização em autoclave a 121 °C e 1 atm de pressão por 20 min.

### Material vegetal

Folhas saudáveis de *Piper aduncum* foram coletadas na Casa de Vegetação do Instituto de Química - UNESP- Araraquara em maio de 2001.

### Isolamento dos fungos endofíticos

As folhas coletadas foram lavadas com água e sabão, a seguir esterilizadas por imersão em NaClO (1%) por 5 min, seguido de etanol 70% por 1 min e lavadas com água esterilizada 2 vezes por 10 min.<sup>17-22</sup> As folhas esterilizadas foram assepticamente seccionadas em segmentos de 1 cm<sup>2</sup> aproximadamente e colocados em placa de Petri, contendo o meio de cultura batata dextrose ágar (PDA), marca Difco, preparado na concentração de 39 g/L, acrescido do antibiótico sulfato de gentamicina e incubado a 25 °C. O crescimento dos fungos foi monitorado diariamente e, após cada cultura atingir de 1-2 cm em diâmetro, foram submetidos a sucessivas repicagens até obtenção das linhagens puras. Foram obtidas seis linhagens puras, codificadas como PA-01, PA-02, PA-03, PA-04, PA-05 e PA-06 e depositadas na micoteca do Departamento de Química Orgânica, IQ-UNESP. O isolado PA-01 foi identificado como *Xylaria* sp. pelo Prof. Dr. L. H. Pfenning e depositado na Coleção Micológica de Lavras, Universidade Federal de Lavras sob registro CML 292.

### Cultivo em meio líquido e obtenção dos extratos brutos

O fungo endofítico *Xylaria* sp. foi repicado para placas de Petri, contendo PDA e incubado por 8 dias. A seguir foi inoculado em 20 frascos de Erlenmeyers (500 mL) contendo 200 mL de meio de cultivo PDB (DIFCO), preparado na concentração de 24 g/L, os quais foram mantidos em mesa agitadora a 120 rpm e 25 °C por 28 dias. Após este período o caldo foi separado do micélio por filtração, extraído com AcOEt (3 X 2 L) e concentrado, fornecendo 1,7 g de extrato bruto. O extrato AcOEt foi extraído com CHCl<sub>3</sub> obtendo-se assim a fração CHCl<sub>3</sub> (0,7 g).

### Isolamento das citocalasinas

A fração CHCl<sub>3</sub> (0,7 g) foi fracionada em CC de sílica gel em fase reversa C-18, usando H<sub>2</sub>O:MeOH em gradiente, fornecendo cinco frações: PA-01-1 (28,0 mg, H<sub>2</sub>O:MeOH, 9:1), PA-01-2 (90 mg, H<sub>2</sub>O:MeOH, 7:3), PA-01-3 (320 mg, H<sub>2</sub>O:MeOH, 5:5), PA-01-4 (42 mg, H<sub>2</sub>O:MeOH 3:7) e PA-01-5 (8 mg, H<sub>2</sub>O:MeOH, 0:1). Estas foram analisadas por CLAE-DAD (Si C-18, gradiente H<sub>2</sub>O:CH<sub>3</sub>CN 5 a 100% de CH<sub>3</sub>CN, 40 min, fluxo de 1 mL/min), sendo detectada uma alta concentração de citocalasinas na fração PA-01-3.

A fração PA-01-3 foi submetida à CLAE-prep em fase reversa [λ = 220 nm, 10 mL/min CH<sub>3</sub>CN:H<sub>2</sub>O (68:32)], resultando nas citocalasinas **1** (5,5 mg, t<sub>R</sub> = 71 min), **2** (17,5 mg, t<sub>R</sub> = 32 min), **3** (30,0

**Tabela 1.** Dados de RMN de <sup>1</sup>H (500 MHz) e <sup>13</sup>C (125 MHz) de **1**

Posição	<b>1</b>		<b>1</b>	
	<sup>13</sup> C DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub>	<sup>13</sup> C CDCl <sub>3</sub>	<sup>1</sup> H DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub>	<sup>1</sup> H CDCl <sub>3</sub>
1	174	173,7		
2			8,28 NH	5,67 NH
3	53,2	52,5	3,55 m	3,48 m
4	49,5	50,8	2,2 t (4,0)	2,39 t (4,0)
5	34,3	35,5	1,88 m	2,01 m
6	44,9*	45,5	1,78 dq (7,0; 12,0)	1,89 m
7	214,0	212,6		
8	51,0	51,2	3,56 d (10,5)	3,42 d (9,5)
9	53,1	54,2		
10	44,9*	45,5	2,67 dd (4,0; 13,5) 2,84 dd (8,0; 13,5)	2,68 dd (8,5; 13,5) 2,90 dd (4,5; 13,5)
11	15,1*	15,5	0,37 d (7,0)	0,85 d (6,5)
12	15,2*	15,6	0,87 d (7,0)	1,01 d (6,5)
13	126,0	127,3	5,64 dd (16,0; 10,5)	5,85 dd (10,0; 15,5)
14	132,4	132,2	5,43 ddd (10,0; 16,0; 5,5)	5,38 ddd (10,0; 15,5; 5,5)
15	37,6	37,9	2,00 m 2,29 m	2,09 (m) 2,60 (m)
16	41,3	41,8	3,30*	3,10 (m)
17	215,8	214,9		
18	76,9	76,3		
19	60,2	59,6	3,23 d (2,0)	3,05 d (2,0)
20	54,2	53,6	3,3 *	3,51 dd (2,0; 1,5)
21	73,0	74,4	5,02 s	5,43 s
22	19,45	19,0	1,05 d (7,0)	1,12 d (7,0)
23	23,1	21,8	1,34 s	1,44 s
24	170,1	169,6		
25	21,0	20,7	2,20 s	2,12 s
1'	137,05	137,5		
2' e 6'	130,7	129,2	7,30 m	7,30 m
3' e 5'	129,0	129,0	7,30 m	7,30 m
4'	127,3	127,7	7,22 m	7,22 m

Multiplicidades e constante de acoplamento (*J*) em Hz, (δ) ppm, \* sinais encobertos pelo sinal da água do solvente

mg, t<sub>R</sub> = 54 min), **4** (15,0 mg, t<sub>R</sub> = 26 min), **5** (15,5 mg, t<sub>R</sub> = 74 min), e **6** (12,5 mg, t<sub>R</sub> = 43 min).

### Bioensaios

#### Teste de bioautografia com fungos

Para avaliação da atividade antifúngica do extrato bruto AcOEt e das substâncias **1-6** frente aos fungos fitopatogênicos *C. cladosporioides* e *C. sphaerospermum*, utilizou-se a metodologia descrita anteriormente na literatura.<sup>14</sup> Os ensaios foram realizados nas concentrações de 5, 10, 20, 50 e 100 μg mL<sup>-1</sup>, usando nistatina como controle positivo.

#### Teste para avaliação preliminar da atividade citotóxica

Para a avaliação da atividade citotóxica do extrato bruto AcOEt e das substâncias **1-6**, foram utilizadas três linhagens mutantes de *Saccharomyces cerevisiae* (rad+, 52Y e RS 321), segundo metodologia descrita na literatura.<sup>15</sup> Os extratos foram testados na concentração de 2 mg mL<sup>-1</sup> e as substâncias puras com 0,5 mg mL<sup>-1</sup>, como padrões foram utilizados: camptotecina: rad+ 200 μg mL<sup>-1</sup> (16,0 mm; 16,0 mm) e 52Y (5 μg mL<sup>-1</sup>; 21,0 mm) e estreptonigrina: RS-321 (4 μg mL<sup>-1</sup> 20,0 mm).

### Determinação da viabilidade celular

Para a determinação da citotoxicidade das citocalasinas **1-6**, foram utilizadas as linhagens de células de mamíferos HeLa (tumor de cérvix humano) e CHO (ovário de hamster chinês) na densidade de  $2 \times 10^4$  células poços<sup>77</sup>. As substâncias foram solubilizadas em dimetilsulfóxido em concentrações finais de 0,2; 2,0; 20,0 e 200,0  $\mu$ M. A viabilidade celular foi determinada pelo método MTT de acordo com a literatura<sup>16</sup> e cisplatina usada como padrão positivo.

*19,20-Epoxicitocalasina (I)* (5,5 mg), sólido branco amorfo,  $[\alpha]_D^{25}$  -17,1 (c 0,19, CHCl<sub>3</sub>), IV (KBr,  $v_{\max}$  cm<sup>-1</sup>): 3440, 2923, 2856, 1710, 1220, 1033. ESI-EMAR:  $m/z$  524,2729 [M+H]<sup>+</sup> Calcd para C<sub>30</sub>H<sub>37</sub>NO<sub>7</sub>, (523,2570), RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C, Tabela 1.

### AGRADECIMENTOS

À FAPESP, programa Biota-FAPESP (Instituto Virtual da Biodiversidade, www.biota.org) pelo auxílio financeiro, à CAPES e ao CNPq pelas bolsas concedidas (G. H. Silva, H. L. Teles, V. da S. Bolzani e M. C. M. Young) e à Profa. Dra. M. Furlan por gentilmente ter cedido folhas de *Piper aduncum*.

### REFERÊNCIAS

1. Kongsaree, P.; Prabpai, S.; Sriubolmas, N.; Chanika, V.; *J. Nat. Prod.* **2003**, *66*, 709.
2. Hawksworth, D. L.; *Mycol. Res.* **2001**, *105*, 1422.
3. Melo, I. S.; Azevedo, J. L.; *Ecologia microbiana*, Embrapa-CNPMA: Jaguariúna, 1998, p. 448.
4. Tan, R. X.; Zou, W. X.; *Nat. Prod. Rep.* **2001**, *18*, 448.
5. Diaz, P. P. D.; Maldonado, E.; Ospina, E.; *Rev. Latinoamer. Quím.* **1985**, *15*, 136.
6. Macedo, J. C. B.; Olviedo, S. G.; *Rev. Soc. Quím. Perú* **1987**, *53*, 228.
7. Orjala, J.; Erdelmeier, C. A. J.; Wright, A. D.; Rali, T.; Stüher, O.; *Planta Medica* **1993**, *59*, 546.
8. Baldoqui, D. C.; *Tese de Doutorado*, Universidade Estadual Paulista, Brasil, 2004.
9. Parmar, V. S.; Jain, S. C.; Bisht, K. S.; Jain, R.; Tneja, P.; Jha, A.; Tyagi, O. D.; Prasad, A. K.; Wengel, J.; Olsen, C. E.; Boll, P. M.; *Phytochemistry* **1997**, *47*, 597.
10. Strobel, G.; Daisy, B.; Castillo, U.; Harper, J.; *J. Nat. Prod.* **2004**, *67*, 257.
11. Crews, P.; Rodrigues, J.; Jaspars, M.; *Organic Structure Analysis*, Oxford University Press: New York, 1998, p. 332.
12. Fujii, Y.; Tani, H.; Ichinoe, M.; Nakajima, H.; *J. Nat. Prod.* **2000**, *63*, 132.
13. Espada, A.; Rivera-Sagredo, A.; de la Fuente, J. M.; Hueso-Rodriguez, J. A.; Elson S. W.; *Tetrahedron* **1997**, *53*, 6485.
14. Rahalison, I. L.; Hamburger, M.; Hostettmann, K.; Monod, M.; Frenk, E.; *Phytochem. Anal.* **1991**, *2*, 199.
15. Gunatilaka, A. A. L.; Samaranayake, G.; Kingston, D. G. I.; Hofmann, G.; Johnson, R. K. J.; *J. Nat. Prod.* **1992**, *55*, 1648.
16. Mosmann, T.; *J. Immunol. Methods* **1983**, *65*, 55.
17. Maier, W.; Hammer, U.; Dammann, U.; Schulz, B.; Strack, D.; *Planta* **1997**, *202*, 36.
18. Cafêu, M. C.; Silva, G. H.; Teles, H. L.; Bolzani, V. S.; Araújo, A. R.; Young, M. C. M.; Pfenning, L. H.; *Quím. Nova* **2005**, *28*, 991.
19. Silva, G. H.; Teles, H. L.; Trevisan, H. C.; Young, M. C. M.; Pfenning, L. H.; Eberlin, M. N.; Haddad, R.; Costa-Neto, C.; Bolzani, V. S.; Araujo, A. R.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2005**, *16*, 1463.
20. Silva, G. H.; Teles, H. L.; Zanardi, L. M.; Young, M. C. M.; Eberlin, M. N.; Hadad, R.; Pfenning, L. H.; Costa-Neto, C. M.; Castro-Gamboa, I.; Bolzani, V. S.; Araújo, A. R.; *Phytochemistry* **2006**, *67*, 1964.
21. Teles, H. L.; Silva, G. H.; Castro Gamboa, I.; Bolzani, V. S.; Pereira, J. O.; Costa-Neto, C. M.; Haddad, R.; Eberlin, M. N.; Young, M. C. M.; Araújo, A. R.; *Phytochemistry* **2005**, *66*, 2363.
22. Teles, H. L.; Sordi, R.; Silva, G. H.; Castro-Gamboa, I.; Bolzani, V. S.; Pfenning, L. H.; Costa-Neto, C. M.; Young, M. C. M.; Araújo, A. R.; *Phytochemistry* **2006**, *67*, 2686.