

ESTUDO QUÍMICO DE *Sinningia allagophylla* GUIADO POR TESTES DE ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA

Dilamara Riva, Andersson Barison e Maria Élide Alves Stefanello*

Departamento de Química, Universidade Federal do Paraná, 81530-900 Curitiba – PR, Brasil

Clarisse Bolfe Poliquesi

Museu Botânico Municipal, Secretaria Municipal do Meio Ambiente, 80001-970 Curitiba – PR, Brasil

Ana Lúcia Tasca Goes Ruiz e João Ernesto de Carvalho

Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas, Universidade Estadual de Campinas, 13083-970 Campinas – SP, Brasil

Marcos José Salvador

Curso de Farmácia, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, 13083-970 Campinas – SP, Brasil

Recebido em 18/9/11; aceito em 5/12/11; publicado na web em 28/2/12

CHEMICAL STUDY OF *Sinningia allagophylla* GUIDED BY ANTIPROLIFERATIVE ACTIVITY ASSAYS. Activity guided fractionation of *Sinningia allagophylla* (Mart.) Wiehler ethanolic extract yielded a new benzochromene 8-methoxylapachenol, besides seven known compounds: lapachenol, sitosteryl oleate, sitosteryl linoleate, stigmasteryl oleate, stigmasteryl linoleate, dunniole and tectoquinone. Extract, fractions, and compounds lapachenol, 8-methoxylapachenol, and dunniole were tested *in vitro* against human cancer cell lines U251 (glioma, CNS), MCF-7 (breast), NCI-ADR/RES (drug-resistant ovarian), 786-0 (kidney), NCI-H460 (lung, no small cells), PC-3 (prostate), OVCAR-3 (ovarian), HT-29 (colon), K562 (leukemia) and against VERO, a normal cell line. The most active compound was dunniole, which inhibited the growth of U251, MCF-7, NCI-ADR/RES, OVCAR-3 and K562 cell lines.

Keywords: *Sinningia allagophylla*; Gesneriaceae; antiproliferative activity.

INTRODUÇÃO

Sinningia (Gesneriaceae) é um gênero de plantas ornamentais encontrado nas regiões tropicais do Novo Mundo. Atualmente são reconhecidas 68 espécies, a maioria ocorrendo em território brasileiro.¹ *Sinningia allagophylla* (Mart.) Wiehler é uma erva anual, de tubérculo perene, largamente espalhada no Brasil (regiões centro-oeste, sul e sudeste), Argentina, Paraguai e Uruguai.² É conhecida como batata-do-campo ou batata-de-perdiz, sendo empregada na medicina popular como febrífugo, diurético, depurativo, emoliente e tônico.³

A química do gênero *Sinningia* é ainda pouco conhecida, pois apenas quatro espécies foram investigadas: *S. aggregata* (Ker-Gawl.) Wiehler,⁴ *S. cardinalis* (Lehm.) H. E. Moore,⁵ *S. speciosa* (Lodd.) Hiern⁶ e *S. tubiflora* (Hook.) Fritsch.⁷ Estes estudos revelam a ocorrência de óleos essenciais, flavonoides, glicosídeos fenólicos, antraquinonas e lactonas aromáticas.

O câncer é uma doença com elevado índice de mortalidade, que atinge anualmente milhões de pessoas ao redor do mundo. Embora tenha havido muito progresso na quimioterapia do câncer, muitos tumores ainda são de difícil remissão, tornando necessária a procura de novos agentes antitumorais. As plantas superiores constituem uma rica fonte de novas substâncias, que podem ser úteis contra neoplasias.⁸ Como parte de um projeto que visa a procura de substâncias com atividade citotóxica de plantas brasileiras, foi realizado o estudo fitoquímico de *S. allagophylla* guiado por ensaios de atividade antiproliferativa contra linhagens de células tumorais humanas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O extrato etanólico dos tubérculos de *S. allagophylla* foi testado contra oito linhagens de células tumorais, apresentando um fraco efeito antiproliferativo *in vitro*, exceto para a linhagem de células K-562

(leucemia), que teve o seu crescimento totalmente inibido com uma concentração (TGI) de 5,13 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Tabela 1). Por essa razão, esse extrato foi submetido à partição com hexano, diclorometano, acetato de etila e 1-butanol e as respectivas frações foram avaliadas frente a células tumorais e uma linhagem de células normais (VERO). A maior atividade foi observada na fração em hexano, a qual inibiu o crescimento de seis linhagens de células tumorais, com valores de TGI variando entre 15,5-32,7 $\mu\text{g mL}^{-1}$, mas foi inativa frente à linhagem VERO (células normais, TGI > 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Pôde ser notado que a linhagem K562 foi menos susceptível à fração em hexano (TGI 15,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$) do que ao extrato total (TGI 5,13 $\mu\text{g mL}^{-1}$), sugerindo a existência de um sinergismo entre os diversos componentes do extrato. Mas, comparativamente, as demais frações foram ativas contra um número menor de linhagens de células tumorais e em maiores concentrações. (Tabela 1).

Com base neste resultado, a fração em hexano foi selecionada para o isolamento dos seus constituintes químicos. O seu fracionamento cromatográfico rendeu um novo benzocromeno identificado como 8-metoxilapachenol (**1**), juntamente com sete substâncias conhecidas, que foram identificadas como lapachenol (**2**),⁹ uma mistura de ésteres esteroideais contendo oleato de sitosterila (**3**), linoleato de sitosterila (**4**), oleato de estigmasterila (**5**) e linoleato de estigmasterila (**6**),¹⁰ dunniole (**7**)¹¹ e tectoquinona (**8**)¹² (Figura 1). As substâncias foram identificadas através de análise dos seus dados espectrométricos, principalmente RMN 1D e 2D e comparação com dados publicados.

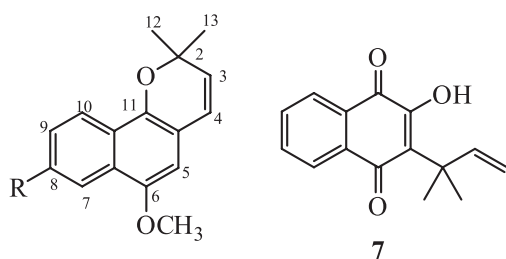
A substância **1** teve sua fórmula molecular deduzida como $\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{O}_3$ através da análise do seu espectro de massas de alta resolução (pico em m/z 271,13283, $[\text{M} + 1]^+$, requer 271,13342) e dos dados de RMN de ^1H e ^{13}C . No seu espectro no IV foram observadas bandas de absorção características de deformação axial das ligações C-H, C=C e C-O e ausência de bandas referentes aos grupos hidroxila e carbonila (ver Parte experimental). O seu espectro de RMN de ^1H apresentou quatro sinais característicos de hidrogênios ligados a anéis aromáticos distribuídos em dois sistemas de spins, sendo um deles

*e-mail: elida@ufpr.br

Tabela 1. Atividade antiproliferativa do extrato etanólico, frações e substâncias isoladas dos tubérculos de *S. allagophylla*

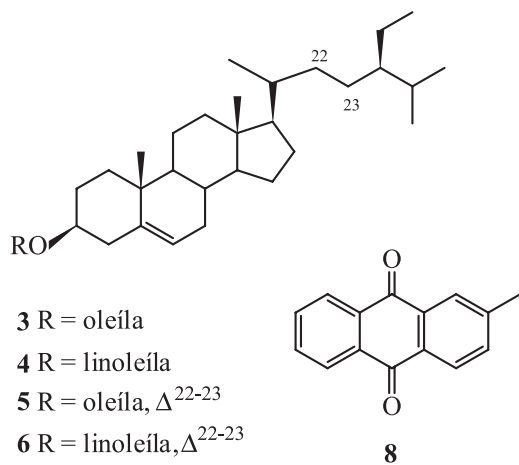
Linhagem de células	TGI ($\mu\text{g mL}^{-1}$)								
	EE	SA1	SA2	SA3	SA4	1	2	7	Doxorrubicina
U251	-	32,7	>250	118	>250	>50	42,1	4,84	0,03
MCF-7	99,1	30,4	76,6	69,8	150	-	>250	5,28	0,06
NCI-ADR/RES	127	>250	250	>250	121	>50	>250	2,95	0,92
786-0	>250	27,5	74,2	167	>250	>50	>250	>250	0,09
NCI-H460	230	26,3	>250	203	>250	>50	>250	>250	0,01
PC-3	181	142	111	41,2	>250	>50	>250	>250	0,13
OVCAR-3	>250	-	-	-	-	>50	>250	6,88	0,40
HT-29	>250	15,6	43,2	23,4	106	26,7	131	>250	0,30
K562	5,13	15,5	>250	>250	>250	>50	13,7	1,14	0,08
VERO	-	>250	42,4	124	>250	>50	>250	9,47	0,09

-: não testado; TGI: concentração necessária para promover inibição total do crescimento celular; U251: glioma SNC; MCF-7: mama; NCI-ADR/RES: ovário resistente a múltiplos fármacos; 786-0: rim; NCI-H460: pulmão, tipo não pequenas células; PC-3: próstata; OVCAR-3: ovário; HT-29: cólon; K562: leucemia; VERO: rim (célula normal de macaco verde); SA1: fração em hexano; SA2: fração em diclorometano; SA3: fração em acetato de etila; SA4: fração em 1-butanol; 1: 8-metoxilapachenol; 2: lapachenol; 7: dunnioil.



1 R = OCH₃

2 R = H



3 R = oleíla

4 R = linoleíla

5 R = oleíla, Δ^{22-23}

6 R = linoleíla, Δ^{22-23}

8

Figura 1. Estruturas das substâncias isoladas de *S. allagophylla*

com apenas um hidrogênio em δ 6,50 e outro no qual as multiplicidades e constantes de acoplamento indicaram um anel aromático 1,2,4-trissubstituído. Também foram observados sinais referentes a dois grupos metoxila (δ 3,92 e 3,94) e a um grupo 2,2-dimetilpirano, caracterizado pela presença de um singlete em δ 1,47, integrando para seis hidrogênios, e de dois dupletos em δ 6,38 e 5,60, integrando para um hidrogênio cada (Tabela 2). A combinação dos espectros de RMN de ¹³C e DEPT135 mostrou a presença de três carbonos metílicos, seis metínicos, sete quaternários e nenhum carbono metilênico. Estes dados sugeriram o esqueleto de um benzocromeno.⁹ Através dos mapas de correlação ¹H-¹³C a uma ligação e a longa distância obtidos através dos experimentos de HSQC e HMBC, respectivamente, foi possível confirmar a estrutura **1**, bem como estabelecer a correta e inequívoca atribuição de deslocamentos químicos de RMN de ¹H e

¹³C. Em particular, a posição dos grupos metoxila foi determinada pela análise do experimento HMBC. Os grupos metoxila em δ 3,92 e 3,94 estão ligados, respectivamente, aos carbonos em δ 157,8 e 148,3. O hidrogênio em δ 6,50 (*s*, H-5) mostrou correlação com o carbono em δ 148,3, mas não com o carbono em δ 157,8. Por outro lado, o hidrogênio em δ 7,44 (*d*, 2,6 Hz, H-7) apresentou correlação com os carbonos em δ 148,3 e 157,8, localizando os grupos metoxila em C-6 e C-8 e não em C-6 e C-9 (Tabela 2). Esta substância é inédita na literatura, diferindo da substância **2** pela presença da metoxila em C-8 sendo, portanto, denominada 8-metoxilapachenol.

Tabela 2. Dados de RMN de **1** (CDCl₃, 400 MHz)

Posição	δ_{H} (mult., <i>J</i>)	δ_{C}	¹ DJ _(H,C)
1	-	-	-
2	-	76,2	-
3	5,60 (<i>d</i> , 9,7)	128,8	2, 4a, 12, 13
4	6,38 (<i>d</i> , 9,7)	123,0	2, 4a, 5, 11
4a	-	112,8	-
5	6,50 (<i>s</i>)	103,3	4, 6, 6a, 11
6	-	148,3	-
6a	-	127,2	-
7	7,44 (<i>d</i> , 2,6)	100,4	6, 8, 9, 10a
8	-	157,8	-
9	7,11 (<i>dd</i> , 9,1; 2,6)	118,3	7, 8, 10a
10	8,06 (<i>d</i> , 9,1)	123,5	6a, 8, 11
10a	-	121,0	-
11	-	142,3	-
12	1,48 (<i>s</i>)	27,5	2, 3, 13
13	1,48 (<i>s</i>)	27,5	2, 3, 12
CH ₃ O-6	3,94 (<i>s</i>)	55,7	6
CH ₃ O-8	3,92 (<i>s</i>)	55,3	8

As demais substâncias mostraram dados espectrométricos idênticos àqueles publicados.⁹⁻¹² Em particular, a mistura de ésteres esteroidais foi confirmada através do espectro de massas, obtido pela técnica de eletrospray (ESI) no modo positivo, que apresentou picos em *m/z* 675,60 (**6**), 677,47 (**4** e **5**) e 679,49 (**3**).

Dentre as substâncias isoladas, apenas **1**, **2** e **7** foram obtidas em quantidade suficiente para os ensaios de atividade antiproliferativa

in vitro. A substância **1**, majoritária na fração em hexano, apresentou atividade antiproliferativa apenas contra a linhagem de células tumorais de cólon (HT29, TGI 26,74 $\mu\text{g mL}^{-1}$), mas sendo menos ativa do que a fração em hexano frente a esta mesma linhagem (TGI 15,60 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Do mesmo modo, seu análogo estrutural **2** foi ativo apenas contra as linhagens de leucemia (K562, TGI 13,66 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e glioma (U251, TGI 42,09 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Este resultado está de acordo com estudos anteriores, que reportam a ausência de atividade citotóxica de lapachenol (**2**) frente às linhagens de células HL60 (leucemia) e SW1573 (carcinoma pulmonar, células pequenas),¹³ bem como uma insignificante capacidade na prevenção de tumores.¹⁴

A substância **7** (dunniol) apresentou promissora atividade antiproliferativa, inibindo o crescimento de cinco linhagens de células tumorais, com valores de TGI entre 1,14 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (para a linhagem K562) e 6,88 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (linhagem OVCAR-3) e também da linhagem VERO (célula normal) com TGI 9,47 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Tabela 1). Pode-se concluir que dunniol é, ao menos em parte, responsável pela atividade observada no extrato etanólico e na fração em hexano. Em estudos anteriores esta substância mostrou moderada atividade contra as formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* e contra a linhagem TA3 de célula tumoral.¹⁵ Também apresentou forte atividade inseticida e baixa toxicidade para mamíferos.¹¹ Estas informações, juntamente com os resultados descritos neste trabalho tornam dunniol uma substância promissora para ensaios de atividade antitumoral *in vivo*.

PARTE EXPERIMENTAL

Procedimentos gerais

Os experimentos de RMN 1D (^1H e $^{13}\text{C}\{1\text{H}\}$) e 2D (HSQC e HMBC) foram adquiridos em CDCl_3 , a temperatura ambiente, em um espectrômetro de RMN Bruker Avance 400, operando a 9,4 Tesla, observando-se os núcleos de hidrogênio e carbono a 400,13 e 100,61 MHz, respectivamente. Os experimentos de correlação direta ^1H - ^{13}C (HSQC) e a longa distância (HMBC) foram otimizados para constantes de acoplamento $^1J_{(\text{H,C})}$ e $^{1\text{D}}J_{(\text{H,C})}$ de 140 e 8 Hz, respectivamente. Os deslocamentos químicos de RMN de ^1H e ^{13}C são expressos em ppm (δ) em relação ao sinal do TMS em 0,00 ppm, como referência interna, e as constantes de acoplamento (J) em Hz. Os espectros de massas de baixa resolução foram obtidos em espectrômetro de massas LC-MS/MS UPLC Acquity - TQD-MS da Waters. Os espectros de alta resolução foram obtidos no equipamento 7,2 Tesla, FT-LQT-MS da Thermo Fisher Scientific. Os espectros de infravermelho foram registrados usando-se pastilhas de KBr, em um espectrofotômetro Biorad FTIR. Os espectros de UV foram obtidos em MeOH, em um espectrofotômetro Shimadzu UV-2401PC. Nas separações cromatográficas em coluna aberta à pressão ambiente (CC) ou sob vácuo (CLV) foi utilizado gel de sílica 60 (0,063-0,200 mm, Merck). Nas análises e separações por cromatografia em camada delgada analítica (CCDA) e preparativa (CCDP) foi utilizado gel de sílica 60 GF₂₅₄ (Merck ou Vetec), com espessura de 0,25 e 1,00 mm, respectivamente. As placas foram reveladas com luz UV (254 e 366 nm), além de solução etanólica de ácido sulfúrico (5%, v/v) seguida de aquecimento. Os solventes utilizados nas separações cromatográficas foram de grau analítico (Synth ou Vetec).

Material vegetal

Tubérculos de *Sinningia allagophylla* (Martius) Wiegler foram coletados no município de Palmeira, estado do Paraná, em março de 2008. A planta foi identificada pela bióloga C. B. Poliquesi, chefe de divisão do Museu Botânico Municipal de Curitiba, que depositou uma exsiccata no Herbário do referido Museu (MBM 31.3530).

Isolamento dos constituintes químicos

O material vegetal, seco e moído (166,2 g) foi extraído a temperatura ambiente por maceração em etanol. O solvente foi eliminado em evaporador rotativo, fornecendo o extrato etanólico (EE – 28,2 g). Parte deste extrato (27,2 g) foi dissolvida em etanol:H₂O 1:1 e submetida à partição com hexano, diclorometano, AcOEt e 1-butanol. Após a evaporação dos solventes foram obtidas as frações em hexano (SA1 – 1,27 g), diclorometano (SA2 – 5,45 g), AcOEt (SA3 – 2,89 g) e 1-butanol (SA4 – 7,20 g). A fração SA1 foi submetida à CLV, eluída com misturas de hexano:acetona (95:5; 8:2 e 1:1), acetona pura e metanol puro, rendendo cinco grupos (I-V).

O grupo I (849,4 mg, eluído com hexano:acetona 95:5) foi submetido à CC, eluída primeiramente com hexano:AcOEt 98:2, aumentando-se a polaridade gradativamente até hexano:AcOEt 8:2 e, finalmente, metanol puro. Foram obtidas 21 frações (I-1 a I-21), após comparação por CCDA. A fração I-6 (315,2 mg, eluída com hexano:AcOEt 98:2) foi submetida a nova CC eluída com hexano, hexano:CH₂Cl₂ 99:1 e 98:2. Foram obtidas 8 frações, após análise por CCDC. A fração I-6-1 (2,5 mg, eluída com hexano puro) rendeu a substância **2** pura. A fração I-6-2 (21,2 mg, eluída com hexano puro) foi purificada por CCDP, eluída com hexano:acetona 98:2, rendendo a substância **1** (9,0 mg). A fração I-6-4 (53,1 mg, eluída com hexano:CH₂Cl₂ 99:1) foi submetida à CCDP, eluída com hexano:CH₂Cl₂ 2:1, rendendo **1** (3,6 mg) e **3 + 4 + 5 + 6** (37,7 mg). A fração I-9 (26,5 mg, eluída da coluna principal com hexano:AcOEt 98:2) foi submetida a repetida CCDP, eluída com hexano:AcOEt 95:5, rendendo **7** (5,3 mg) e **8** (3,4 mg). As demais frações deste grupo continham substâncias alifáticas de cadeia longa e/ou as substâncias **1-8** em diferentes proporções. Os grupos II (147,0 mg) e III (84,0 mg) continham a substância **1** quase pura, enquanto que os grupos IV (31,0 mg) e V (168,0 mg) não permitiram o isolamento ou identificação de nenhuma substância.

8-metoxilapachenol (**1**)

Óleo amarelo. UV λ_{max} (MeOH) (log ϵ): 221 (4,61), 268 (4,59) 349 (4,04), 368 (3,99) nm. IV v_{max} (KBr): 3020 (v C-H, CH₃), 2976 e 2948 (v C-H, CH₃), 1623, 1596 e 1474 (v C=C, anel aromático), 1279 e 1204 (v C-O) cm^{-1} . ESI-AR em m/z 271,13283 [M + H] (calc. para C₁₇H₁₉O₃ 271,13287). ESI/EM/EM 10 eV em m/z (int. rel.) 271 (100%, [M + H]⁺); 30 eV em m/z (int. rel.) 271 (5,5%, [M + H]⁺), 256 (66%, [M + H]⁺ - CH₃), 241 (55%, [M + H]⁺ - (CH₃)₂), 213 (94%, [M + H]⁺ - (CH₃)₂ - CO), 188 (100%, C₁₀H₆(OCH₃)₂⁺), 173 (61%, C₁₀H₆(OCH₃)₂⁺ - CH₃). RMN ^1H e ^{13}C : Tabela 2.

Avaliação da atividade antiproliferativa

Para a realização da triagem *in vitro* foram utilizadas as linhagens tumorais humanas U251 (glioma, SNC), MCF-7 (mama), NCI-ADR/RES (ovário com fenótipo de resistência a múltiplas drogas), 786-0 (rim), NCI-H460 (pulmão), PC-3 (próstata), OVCAR-03 (ovário), HT29 (cólon) e K562 (leucemia), além da linhagem VERO (célula epitelial, rim de macaco verde). Essas linhagens, cedidas pelo Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos (NCI/EUA), foram cultivadas em meio RPMI 1640 com 5% de soro fetal bovino inativado (SFB), em atmosfera de 5% de CO₂, a 37 °C e ambiente úmido.

Uma mistura de penicilina e estreptomicina (1 $\mu\text{g mL}^{-1}$:1 UI mL^{-1}) foi adicionada às culturas experimentais. As células (100 μL de suspensão celular por compartimento, densidade de inoculação entre 3 x 10⁴ e 6,5 x 10⁴ cel mL^{-1}) foram expostas a diferentes concentrações das amostras (extrato etanólico, as frações obtidas por partição e as substâncias **1**, **2** e **7**) dissolvidas em DMSO/RPMI/SFB 5% (0,25; 2,5; 25 e 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e incubadas a 37 °C, 5% de CO₂,

em ambiente úmido, por 48 h. A concentração final de DMSO não afetou a viabilidade celular. Utilizou-se doxorubicina como controle positivo nas concentrações de 0,025; 0,25; 2,5 e 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Todas as amostras foram testadas em triplicata.

Após o período de incubação de 48 h, as células foram fixadas com ácido tricloroacético 50% e a proliferação celular foi determinada através da quantificação espectrofotométrica (540 nm) do conteúdo proteico celular, usando-se o teste de sulforrodamina B.¹⁶ A partir da curva de proliferação celular em função da concentração de amostra, calculou-se a concentração efetiva TGI (*Total Growth Inhibition*, concentração que produz inibição total do crescimento) através de regressão não linear usando o software ORIGIN 7.5 (OriginLab Corporation).¹⁷

MATERIAL SUPLEMENTAR

Os espectros de RMN da substância **1** estão disponíveis gratuitamente em <http://quimicanova.sbq.org.br>, na forma de arquivo PDF.

AGRADECIMENTOS

À CAPES, CNPq, FAPESP, FINEP e UFPR pelo suporte financeiro e à equipe do Laboratório Thomson (UNICAMP) pelo espectro de massas de alta resolução.

REFERÊNCIAS

1. Chautems, A.; Lopes, T. C. C.; Peixoto, M.; Rossini, J.; *Candollea* **2010**, *65*, 241.
2. Araujo, A. O.; Souza, V. C.; Chautems, A.; *Rev. Bras. Bot.* **2005**, *28*, 109.
3. Gomes, M. A. N.; Shepherd, S. L. K.; *Rev. Bras. Bot.* **2000**, *23*, 153; Mors, W. B.; Rizzini, C. T.; Pereira, N. A.; *Medicinal Plants of Brazil*, Reference Publications Inc.: Algonac, 2000.
4. Stefanello, M. E. A.; Cervi, A. C.; Wisniewski Jr, A.; *Rev. Bras. Farmacogn.* **2005**, *15*, 331; Verdán, M. H.; Barison, A.; Sá, E. L.; Salvador, M. J.; Poliquesi, C. B.; Eberlin, M. N.; Stefanello, M. E. A.; *J. Nat. Prod.* **2010**, *73*, 1434.
5. Jensen, S. R.; *Phytochemistry* **1996**, *43*, 777; Swinny, E. E.; Bloor, S. J.; Wong, H.; *Magn. Reson. Chem.* **2000**, *38*, 1031; Winefield, C. S.; Lewis, D. H.; Swinny, E. E.; Zhang, H.; Arathoon, H. S.; Fischer, T. C.; Halbwirth, H.; Stich, K.; Gosch, C.; Forkmann, G.; Davies, K. M.; *Physiol. Plant.* **2005**, *124*, 419.
6. Verdán, M. H.; Cervi, A. C.; Campos, F. R.; Barison, A.; Stefanello, M. E. A.; *Biochem. Syst. Ecol.* **2009**, *37*, 40.
7. Perret, M.; Chautems, A.; Spichiger, R.; Kite, G.; Savolainen, V.; *Am. J. Bot.* **2003**, *90*, 445.
8. Pan, L.; Chai, H.; Kinghorn, A. D.; *Phytochem. Lett.* **2010**, *3*, 1.
9. Reibenspies, J. H.; Williams, H. J.; Ortiz, C.; Scott, A. I.; Suarez, M.; Domingues, X. A.; *J. Crystallogr. Spectrosc. Res.* **1989**, *19*, 597.
10. Chaves, M. H.; Citó, A. M. G. L.; Lopes, J. A. D.; Costa, D. A.; Oliveira, C. A.; Costa, A. F.; Brito-Júnior, F. E. M.; *Rev. Bras. Farmacogn.* **2010**, *20*, 106; Shimada, Y.; Hirota, Y.; Baba, T.; Sugihara, A.; Moriyama, S.; Tominaga, Y.; Terai, T.; *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1999**, *76*, 713.
11. Khambay, B. P. S.; Batty, D.; Cahill, M.; Denholm, I.; Mead-Briggs, M.; Vinall, S.; Niemeier, H. M.; Simmonds, M. S. J.; *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 770.
12. Moreira, R. Y. O.; Arruda, M. S. P.; Arruda, A. C.; Santos, L. S.; Muller, A. H.; Guilhon, G. M. S. P.; Santos, A. S.; Terezo, E.; *Rev. Bras. Farmacogn.* **2006**, *15*, 392.
13. Costa, S. M. O.; Lemos, T. L. G.; Pessoa, O. D. L.; Pessoa, C.; Montenegro, R. C.; Braz-Filho, R.; *J. Nat. Prod.* **2001**, *64*, 792.
14. Itoigawa, M.; Ito, C.; Tan, H. T.-W.; Okuda, M.; Tokuda, H.; Nishino, H.; Furukawa, H.; *Cancer Lett.* **2001**, *174*, 135.
15. Morello, A.; Pavani, M.; Garbarino, J. A.; Chamy, M. C.; Frey, C.; Mancilla, J.; Guerrero, A.; Repetto, Y.; Ferreira, J.; *Comp. Biochem. Physiol., Part C: Toxicol. Pharmacol.* **1995**, *112*, 119.
16. Monks, A.; Scudiero, D.; Skehan, P.; Shoemaker, R.; Paull, K.; Vistica, D.; Hose, C.; Langley, J.; Cronise, P.; Vaigro-Wolff, A.; Gray-Goodrich, M.; Campbell, H.; Mayo, J.; Boyd, M.; *J. Natl. Cancer Inst.* **1991**, *83*, 757.
17. Shoemaker, R. H.; *Nat. Rev. Cancer* **2006**, *6*, 813.