

CONSTITUINTES QUÍMICOS DE *Alchornea glandulosa* (EUPHORBIACEAE)

Leila de Souza Conegero, Regina Massae Ide, Anelise Samara Nazari e Maria Helena Sarragiotto*

Departamento de Química, Universidade Estadual de Maringá, Av. Colombo, 5790, 87020-900 Maringá - PR

Benedito Prado Dias Filho e Celso Vataru Nakamura

Departamento de Análises Clínicas, Universidade Estadual de Maringá, Av. Colombo, 5790, 87020-900 Maringá - PR

João Ernesto de Carvalho e Mary Ann Foglio

Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas, CP 6171, 13083-970 Campinas - SP

Recebido em 12/11/02; aceito em 19/5/03

CHEMICAL CONSTITUENTS OF *Alchornea glandulosa* (EUPHORBIACEAE). Chemical investigation of the leaves of *Alchornea glandulosa* (Euphorbiaceae) afforded a mixture of β -sitosterol and stigmasterol, the terpenoid loliolide, the guanidine alkaloid *N*-1,*N*-2,*N*-3-triisopentenylguanidine and the phenolic compound corilagin. The structures of these compounds were elucidated by spectroscopic analysis. The antimicrobial and antiproliferative properties of the crude methanolic extract of the leaves and of fractions from its fractionation, were investigated against a series of bacteria and fungi, as well as against four human cancer cell lines.

Keywords: *Alchornea glandulosa*; chemical constituents; antimicrobial and antiproliferative assays.

INTRODUÇÃO

A família Euphorbiaceae compreende aproximadamente 290 gêneros e 7.500 espécies distribuídas em todas regiões tropicais e subtropicais do globo, principalmente na América e na África. No Brasil, ocorrem 72 gêneros e cerca de 1.100 espécies difundidas em todos os tipos de vegetação¹. Espécies do gênero *Alchornea* têm sido usadas popularmente como agente antidiarréico, antiinflamatório, anti-reumático e no tratamento de lepra e de doenças cutâneas^{2,4}. Estudos farmacológicos realizados com extratos brutos e compostos isolados revelaram atividades antibacteriana, antiinflamatória, antiespasmódica, antitripanossômica e antidiarréica^{2,3}, bem como citotóxica contra células cancerosas Hep-G2 (carcinoma hepatocelular), MDA-MB-231 (adenocarcinoma mamário) e A-431 (carcinoma epidermóide)⁴.

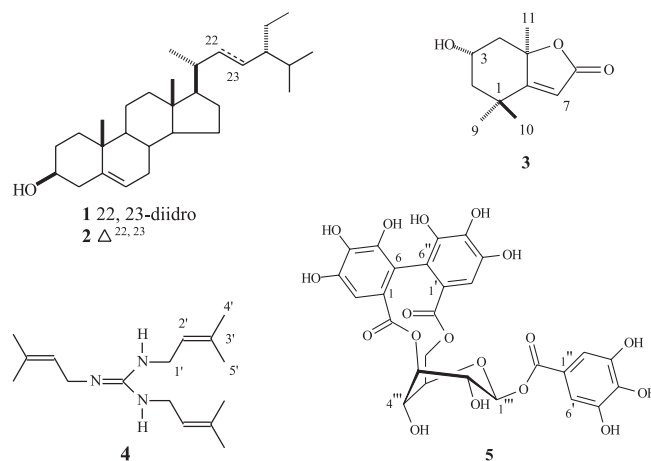
Os estudos químicos efetuados com espécies do gênero *Alchornea* descrevem o isolamento e a identificação de alcalóides hexaidroimidazo-pirimidínicos e guanidínicos, como principais constituintes, além de triterpenos, flavonóides e outros compostos fenólicos⁵.

Alchornea glandulosa Poepp. & Endl. (sinonímia: *Alchornea irucurama* Casar), conhecida pelo nome popular de “amor seco”, é uma árvore, de caule tortuoso, que ocorre em florestas ciliares do Brasil⁶. A partir de levantamento bibliográfico, constatamos a ausência de estudos químicos ou farmacológicos sobre esta espécie. O presente trabalho descreve o estudo químico de *A. glandulosa*, bem como a avaliação preliminar da atividade antibacteriana, antifúngica e antiproliferativa do extrato bruto e de frações obtidas a partir do fracionamento deste por partição com solventes e por extração ácido-base.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O fracionamento do extrato metanólico das folhas de *A. glandulosa* resultou no isolamento de uma mistura dos esteróides β -sitosterol (**1**) e estigmasterol (**2**), da loliolida (**3**), do alcalóide

guanidínico *N*-1,*N*-2,*N*-3-triisopentenilguanidina (**4**) e da corilagina (**5**). As estruturas das substâncias isoladas foram elucidadas com base na análise de dados espectroscópicos de RMN¹H e ¹³C e de experimentos de DEPT 90⁰ e 135⁰, COSY ¹H - ¹H e HETCOR.



A mistura de β -sitosterol (**1**) e estigmasterol (**2**) foi identificada pela comparação de seus dados espectroscópicos de RMN ¹H e ¹³C com os registrados na literatura⁷.

O espectro de IV de **3** apresentou bandas de absorção típicas de lactona α,β -insaturada em 1731 e 1625 cm⁻¹. O espectro de RMN ¹H mostrou sinais para três grupos metílicos (δ_{H} 1,78, 1,47 e 1,27), um hidrogênio olefínico (δ_{H} 5,70, s), um hidrogênio hidroximetínico (δ_{H} 4,33, *quinteto*, *J*=3,5 Hz) e para dois grupos de hidrogênios metilênicos em δ_{H} 1,53 (1H, *dd*, *J*=14,4 e 3,5 Hz), 1,79 (1H, *dd*, *J*=14,0 e 3,5 Hz), 1,98 (1H, *dt*, *J*=14,4 e 2,7 Hz) e 2,46 (1H, *dt*, *J*=14,0 e 2,7 Hz). A unidade lactônica α,β -insaturada foi evidenciada pelos sinais em δ_{C} 182,6 (C-6), 171,0 (C-8) e 113,0 (C-7), no espectro de RMN ¹³C. Os dados espectroscópicos da substância isolada foram comparados aos da literatura para a loliolida (**3**), e aos de seu epímero, a 3-epiloliolida⁸. Com base nesta comparação, a substância isolada foi

*e-mail: mhsarragiotto@uem.br

caracterizada como loliolida (**3**). Embora a loliolida (**3**) já tenha sido isolada de outras plantas e de organismos marinhos, este representa o primeiro relato da ocorrência desta substância no gênero *Alchornea* e na família Euphorbiaceae. Algumas das propriedades biológicas reportadas⁸ para **3** incluem atividades como repelente, inibidora de germinação, imunossupressiva e citotóxica contra carcinoma humano de nasofaringe (KB) e leucemia linfóide (P388).

O alcalóide guanidínico **4** apresentou pico referente ao íon molecular em m/z 263 no espectro de massas. As bandas de absorção em 3177 e 1626 cm^{-1} , no espectro de IV, foram atribuídas às vibrações de estiramento dos grupos N-H e C=N, respectivamente. O espectro de RMN ^1H de **4** corresponde basicamente ao da unidade isopentenila, mostrando sinais para um hidrogênio olefínico em δ_{H} 5,25 (H-2), hidrogênios metilênicos em δ_{H} 3,95 (H-1) e, para dois grupos metílicos sobre ligação dupla em δ_{H} 1,72 (H-4) e δ_{H} 1,69 (H-5). O sinal adicional em δ_{H} 7,00 foi atribuído aos hidrogênios dos grupos N-H. O sinal característico para carbono de um grupo C=N em δ_{C} 155,9, no espectro de RMN ^{13}C , evidenciou a presença da unidade guanidínica. Os dados espectroscópicos da substância isolada foram condizentes com os da literatura para o alcalóide *N*-1,*N*-2,*N*-3-triisopentenilguanidina (**4**), isolado previamente da espécie *Alchornea javanensis*⁵. Estudos com cepas modificadas de *Saccharomyces cerevisiae* mostraram que alcalóides guanidínicos monoterpênicos ou contendo unidades isopentenílicas, como no caso de **4**, são potenciais agentes anticâncer⁹.

No espectro de IV da substância **5** foram observadas, além de outras, bandas em 3376 e 1720 cm^{-1} , referentes à absorção de grupos OH e de C=O (éster), respectivamente. O espectro de RMN ^1H mostrou sinais na região de hidrogênios aromáticos em δ_{H} 7,03 (2H), 6,58 (1H) e 6,51 (1H) e sinais característicos da unidade glucose na região de δ_{H} 3,91 a 4,61 e em δ_{H} 6,22 (H-anomérico). A presença dos grupos galoil e hexaidroxidifenólico foi evidenciada, principalmente, pelos sinais característicos de carbonilas de ésteres em δ_{C} 165,3, 167,5 e 167,2 e de carbonos fenólicos na região de δ_{C} 144,3 a 145,9, no espectro de RMN ^{13}C . A comparação dos dados de RMN ^1H e ^{13}C com os descritos na literatura¹⁰ para o 1-*O*-galoil-3,6-(*R*)-hexaidroxidifenol β -glucopirranose, a corilagina (**5**), permitiu a confirmação da estrutura da substância isolada. Em analogia aos estudos descritos para a corilagina, a conformação da unidade de glucose de **5** foi estabelecida como sendo barco 1,4 ($B_{1,4}$), com base na constante de acoplamento ($J_{1,2} = 7,0$ Hz) observada para o hidrogênio anomérico, empregando-se as mesmas condições da literatura para a obtenção do espectro de RMN ^1H (DMSO- d_6 , temperatura ambiente).

Ensaio biológicos para avaliação da atividade antimicrobiana de *A. glandulosa* mostraram atividade moderada para o extrato bruto metanólico frente aos microrganismos *Staphylococcus aureus* (CMI = 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e *Candida albicans* (CMI = 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$), significativa para a fração alcaloidal (A), resultante do fracionamento do extrato bruto por extração ácido-base, frente a *Bacillus subtilis* (CMI = 62,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e *Candida tropicalis* (CMI = 31,2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e moderada (CMI de 125 a 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$) frente aos demais microrganismos testados. A análise desta fração por CG/EM mostrou que a mesma contém o alcalóide guanidínico **4** e outros componentes que não puderam ser identificados. Atividade antifúngica moderada foi também observada para a fração clorofórmio (C) obtida da partição do extrato bruto em solventes. As demais frações mostraram-se inativas (CMI > 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

A atividade antiproliferativa do extrato bruto e frações em culturas de células tumorais humanas de pulmão (NCI460), melanoma (UACC62), mama (MCF7) e mama resistente (NCIADR) foi avaliada. O extrato bruto produziu efeito citostático e citocida, concentração dependente, para as linhagens de melanoma, mama e pulmão, com maior potência para a de melanoma. Já para a linhagem NCIADR (mama), que expressa o fenótipo de resistência a múltiplos fármacos,

este extrato produziu inibição de crescimento (efeito citostático). Os resultados dos ensaios para as frações obtidas mostraram que o fracionamento do extrato bruto não produziu aumento da atividade.

PARTE EXPERIMENTAL

Procedimentos experimentais gerais

Os espectros de absorção na região do IV foram registrados em um espectrômetro FTIR-BOMEM MB-100, na região de 400 a 4000 cm^{-1} . Os espectros de massas (EM) de baixa resolução foram obtidos em espectrômetro SHIMADZU-GC/MS modelo QP 2000A a 70 eV, equipado com sonda para sólidos. As análises por CG/EM foram realizadas no mesmo equipamento utilizando coluna capilar SE-30 (50 m) com programação de temperatura (100 a 300 $^{\circ}\text{C}$, taxa de aquecimento 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$) e temperatura do injetor de 180 $^{\circ}\text{C}$. Os espectros de RMN ^1H e ^{13}C foram obtidos em espectrômetro VARIAN, modelo Gemini 2000 BB, 300 MHz, (300 MHz para ^1H e 75,5 MHz para ^{13}C). Para as cromatografias em coluna (CC) utilizou-se sílica gel (0,063-0,200 mm; 70-230 mesh ASTM), alumina ativa 90 neutra ou Sephadex Lipofílico LH-20. As análises por cromatografia em camada delgada analítica (CCDA) e cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP) foram realizadas em placas de sílica gel GF₂₅₄. Para a visualização dos compostos em placa utilizou-se radiação UV 254-366 nm, iodo ressublimado, solução de Dragendorff (para os alcalóides) e/ou solução de $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{MeOH}$ (1:1) seguido de aquecimento.

Material vegetal

As folhas de *Alchornea glandulosa* foram coletadas na mata ciliar do córrego Mandacarú, Maringá-PR, em maio de 2000. A espécie foi identificada pela Profa. Dr^a M. C. de Souza, Departamento de Biologia da Universidade Estadual de Maringá. Uma exsicata encontra-se depositada no Herbário dessa universidade sob registro n^o HU 7569.

Extração e isolamento dos constituintes químicos

As folhas secas e moídas (620 g) foram submetidas à maceração em metanol, a temperatura ambiente. A evaporação do solvente sob vácuo em evaporador rotativo, resultou no extrato bruto metanólico (38 g). Parte deste extrato (13,74 g) foi dissolvido em uma mistura de MeOH/ H_2O 1:1 (200 mL) e extraída sucessivamente com hexano (3x50 mL), CHCl_3 (3x50 mL) e AcOEt (3x50 mL), fornecendo, após evaporação dos solventes em evaporador rotativo, as frações hexânica (H: 4,07 g), clorofórmica (C: 3,54 g), acetato de etila (AE: 4,89 g) e hidroalcoólica (MA: 1,24 g). A fração H foi submetida a cromatografia em coluna de sílica gel, utilizando misturas de hexano/AcOEt em ordem crescente de polaridade, obtendo-se 21 frações. A purificação da fr-8, forneceu o β -sitosterol (**1**) e uma mistura de β -sitosterol (**1**) e estigmasterol (**2**). Parte do resíduo obtido da extração com clorofórmio (fração C: 1,79 g) foi purificado por cromatografia em coluna de sílica gel, utilizando como eluente misturas de $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ em polaridade crescentes. Foram coletadas 85 frações de 20 mL cada, reunidas em 10 subfrações. A purificação da subfração 6 (225,2 mg) por CCDP (sílica gel; $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 5%), forneceu o composto **3** (9,4 mg). Das subfrações 8 e 9, eluídas com $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 20% e $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 30%, respectivamente, foi isolada a *N*-1,*N*-2,*N*-3-triisopentenilguanidina (**4**; 285,1 mg). A fração resultante da partição em acetato de etila (fração AE) foi submetida a sucessivas colunas cromatográficas em sílica gel (AcOEt e AcOEt/MeOH em polaridade crescente) e em Sephadex (H_2O , $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$ 1:1 e MeOH). Os espectros de RMN ^1H das subfrações obtidas em maior quantidade mostraram a presença de

misturas de flavonóides. Parte da fração MeOH/H₂O (MA; 500 mg) foi filtrada em Sephadex LH-20, usando como eluentes H₂O, H₂O/MeOH 1:1 e MeOH, em gradiente decrescente de polaridade. Foram recolhidas 26 frações de 20 mL cada. A fração 19-20, eluída com MeOH, forneceu a corilagina (**5**; 46,6 mg). Num segundo procedimento, o extrato bruto metanólico (21 g) foi fracionado por extração ácido-base, pelo tratamento com solução de HCl 5% (150 mL), filtração do resíduo sólido formado, adição de NH₄OH à fase ácida até pH 10, seguido de repetidas extrações com CHCl₃. A evaporação do solvente, a pressão reduzida, forneceu um sólido escuro que foi submetido a uma filtração em alumina neutra utilizando CHCl₃/MeOH 15% como solvente. A fração obtida (400 mg) desta filtração foi denominada fração alcaloidal (A). Análise por CG/EM da fração A mostrou a presença de (**4**) como componente majoritário.

Loliolida (**3**): IV (filme), ν_{\max} cm⁻¹: 3437, 1731, 1625. EM (70 eV), *m/z* (int. rel.): 196 (8, M⁺), 178 (25), 140 (20), 111 (60), 95 (20), 67 (21), 57 (25), 43 (100). RMN ¹H δ_{H} (300 MHz, CDCl₃): 5,70 (1H, s, H-7), 4,33 (1H, *quint.*, J=3,5 Hz, H-3), 2,46 (1H, *dt*, J=14,0 e 2,7 Hz), 1,98 (1H, *dt*, J=14,4 e 2,7 Hz), 1,79 (1H, *dd*, J=14,0 e 3,5 Hz), 1,78 (3H, *sl*, H-11), 1,53 (1H, *dd*, J=14,4 e 3,5 Hz), 1,47 (3H, s, H-10), 1,27 (3H, s, H-9). RMN ¹³C δ_{C} (75,5 MHz, CDCl₃): 182,6 (C-6), 171,0 (C-8), 113,0 (C-7), 86,9 (C-5), 66,8 (C-3), 47,2 (C-2), 45,5 (C-4), 36,0 (C-1), 30,6 (C-9), 27,0 (C-11), 26,4 (C-10).

N-1,N-2,N-3-triisopentenilguanidina (**4**): sólido amorfo marrom. IV (filme), ν_{\max} cm⁻¹: 3177, 1626, 1448. EM (70 eV), *m/z* (int. rel. %): 263 (10, M⁺), 84 (100), 69 (80). RMN ¹H δ_{H} (300 MHz, CDCl₃): 7,00 (*t*, N-H), 5,25 (*tg*, J=6,9 e 1,5 Hz, H-2', H-2'' e H-2'''), 3,95 (*t*, J=6,9 Hz, H-1', H-1'' e H-1'''), 1,72 (*s*, H-4', H-4'' e H-4'''), 1,69 (*s*, H-5', H-5'' e H-5'''). RMN ¹³C δ_{C} (75,5 MHz, CDCl₃): 155,9 (C-2), 138,4 (C-3', C-3'' e C-3'''), 119,0 (C-2', C-2'' e C-2'''), 40,4 (C-1', C-1'' e C-1'''), 25,5 (C-5', C-5'' e C-5'''), 17,9 (C-4', C-4'' e C-4''').

Corilagina (**5**): sólido marrom escuro. IV ν_{\max} (KBr) cm⁻¹: 3376, 1720, 1615, 1515, 1447. RMN ¹H δ_{H} (300 MHz, DMSO-d₆): 9,02 (*sl*, hidrogênios fenólicos); Galoil: 7,03 (*s*, H-2'' e H-6''); Hexaidroxidifenol: 6,58 (*s*, H-2'), 6,51 (*s*, H-2); Glucose: 6,22 (*d*, J=6,9 Hz, H-1'''), 4,61 (*sl*, H-3'''), 4,37 (*t*; J=7,8 Hz, H-5'''), 4,26 – 4,22 (*m*, H-6''', H-4'''), 3,96 (*dd*, J=10,5 e 9,0 Hz, H-6'''), 3,91 (*d*, J=7,0 Hz, H-2'''). RMN ¹³C δ_{C} (75,5 MHz, DMSO-d₆): Galoil: 165,3 (C=O), 145,9 (C-3'' e C-5'''), 139,4 (C-4''), 119,1 (C-1''), 109,3 (C-2'' e C-6''); Hexaidroxidifenol: 167,5 e 167,2 (C=O), 145,3 (C-5'), 145,2 (C-5), 144,7 (C-3'), 144,3 (C-3), 135,9 (C-4'), 135,7 (C-4), 124,2 (C-1'), 123,4 (C-1), 116,2 (C-6'), 115,9 (C-6), 107,3 (C-2'), 106,4 (C-2); Glucose: 92,5 (C-1'''), 77,8 (C-3'''), 76,6 (C-5'''), 71,9 (C-2'''), 62,4 (C-4''), 64,2 (C-6''').

Ensaios biológicos

O extrato bruto metanólico (EM) e as frações hexano (H), clorofórmio (C), MeOH/H₂O (MA) obtidas da partição em solventes, e a fração alcaloidal (A) proveniente do fracionamento por extração ácido-base foram ensaiadas quanto à atividade antibacteriana, antifúngica e antiproliferativa. A atividade antimicrobiana das amostras e dos antibióticos de referência foi estabelecida² de acordo com a concentração mínima inibitória (CMI): CMI > 500 µg/mL (inativa), CMI = 250 e 125 µg/mL (moderadamente ativa), CMI = 62,5 e 31,2 µg/mL (ativa), CMI = 15,6 µg/mL (mais ativa), CMI = 7,8 µg/mL (fortemente ativa).

Avaliação da atividade antibacteriana

As concentrações mínimas inibitórias (CMIs) das amostras e dos antibióticos de referência foram determinadas *in vitro* pelo método da microdiluição, usando meio Mueller-Hinton¹¹. Bactérias utiliza-

das/antibióticos de referência (CMI): *Staphylococcus aureus* ATCC 25923/ penicilina (0,00975 µg/mL), *Bacillus subtilis* ATCC 6623/ tetraciclina (0,78 µg/mL), *Escherichia coli* ATCC 25922/ vancomicina (0,09 µg/mL). Fração ativa (CMI, bactéria testada): EM (250 µg/mL, *S. aureus*); A (250 µg/mL, *S. aureus* e *E. coli*; 62,5 µg/mL, *B. subtilis*).

Avaliação da atividade antifúngica

As CMIs das amostras e do antifúngico de referência foram determinadas contra leveduras usando a técnica de microdiluição em caldo descrita pelo "National Committee for Clinical Laboratory Standards"¹¹. Fungos utilizados: *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis* e *Candida tropicalis*. Fração ativa (CMI, fungo testado): EM (125 µg/mL, *C. albicans*); C (250 µg/mL, *C. albicans* e *C. tropicalis*); MA (250 µg/mL, *C. parapsilosis*); A (250 µg/mL, *C. krusei* e *C. parapsilosis*; 125 µg/mL, *C. albicans*; 31,2 µg/mL, *C. tropicalis*). Micostatina foi utilizado como antifúngico de referência (CMI=2,0 µg/mL).

Avaliação da atividade antiproliferativa

As amostras (extrato metanólico e frações H, C, MA e A) foram testadas frente a culturas de células tumorais humanas de pulmão (NCI460), melanoma (UACC62), mama (MCF7) e mama resistente (NCIADR), segundo metodologia descrita por Monks e colaboradores¹².

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Dr^a M. C. de Souza (Departamento de Biologia, Universidade Estadual de Maringá) pela coleta da planta, à Fundação Araucária (Fundação de Apoio a Pesquisa do Estado do Paraná) pelo auxílio financeiro e ao CNPq pelas bolsas concedidas.

REFERÊNCIAS

- Barroso, G. M.; *Sistemática de Angiospermas do Brasil*, UFV Imprensa Universitária: Viçosa, 1984, vol. 2.
- Tona, K.; Kambu, K.; Mesia, K.; Cimanga, K.; De Bruyne, T.; Pieters, L.; Totté, J.; Vlietinck, A. J.; *Phytomedicine* **1999**, *6*, 59.
- Khong-Huu, F.; Le Forestier, J. P.; Goutarel, R.; *Tetrahedron* **1972**, *28*, 520; Tona, L.; Kambu, K.; Ngimbi, N.; Cimanga, K.; Vlietinck, A. J.; *J. Ethnopharmacol.* **1998**, *61*, 57; Ajali, U.; *Fitoterapia* **2000**, *71*, 436; Agbe, S. A. O.; Ogutimein, B.; *Phytother. Res.* **1987**, *1*, 151.
- Setzer, W. N.; Shen, X. M.; Bates, R. B.; Burns, J. R.; McClure, K. J.; Zhang, P.; Moriarity, D. M.; Lawton, R. O.; *Fitoterapia* **2000**, *71*, 195.
- Hart, N. K.; Johns, S. R.; Lamberto, N. J. A.; Willing, R. J.; *Aust. J. Chem.* **1970**, *23*, 1679; Lamikanra, A.; Ogundaini, A. O.; Ogungbamila, F. O.; *Phytother. Res.* **1990**, *4*, 198.
- Corrêa, M. P.; *Dicionário das Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas*, Imprensa Nacional: Rio de Janeiro, 1984, vol. 1.
- Kojima, H.; Sato, N.; Hatano, A.; Ogura, H.; *Phytochemistry* **1990**, *29*, 2351; Goulart, M. O. F.; Sant' Ana, A. E. G.; Lima, R. A.; Cavalcante, S. H.; Carvalho, M. G.; Braz Filho, R.; *Quim. Nova* **1993**, *16*, 95.
- Borkoski, S.; Valdés, D. A.; Bardón, A.; Díaz, J. G.; Herz, W.; *Phytochemistry* **1996**, *42*, 1637; Okada, N.; Shirata, K.; Niwano, M.; Koshino, H.; Uramoto, M.; *Phytochemistry* **1994**, *37*, 281.
- Bolzani, V. S.; Gunatilaka, A. A. L.; Kingston, D. G. I.; *J. Nat. Prod.* **1995**, *58*, 1683.
- Nawwar, M. A. M.; Hussein, S. A. M.; Merfort, I.; *Phytochemistry* **1994**, *36*, 793.
- National Committee For Clinical Laboratory Standards; *Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard M27-A*, NCCLS: Wayne, PA, 1997.
- Monks, A.; Scudiero, D.; Skehan, P.; Shoemaker, R.; Paull, K.; Vistica, D.; Hose, C.; Langley, J.; Cronise, P.; Vaigrowolf, A.; Graygoodrich, M.; Campbell, H.; Mayo, J.; Boyd, M.; *J. Nat. Cancer Inst.* **1991**, *83*, 757.