

Estudo fitoquímico e avaliação *in vitro* da atividade anti-*Trypanosoma cruzi* cepa Y de *Pilocarpus spicatus* St. Hil. (Rutaceae)

SILVA, C.V.¹; BOMFIM, F.C.C.²; DOS SANTOS, M.A.V.²; VELOZO, E.S.¹

¹Departamento do Medicamento, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia, Rua Barão de Jeremoabo, s/n - Ondina, CEP: 40170-115, Salvador-Brasil *cinarasilva@ufba.br; ²Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Rua Waldemar Falcão, 121, Candeal, CEP: 40296-710, Salvador-Brasil.

RESUMO: A investigação química da espécie *Pilocarpus spicatus*, popularmente conhecida como jaborandi e usada na medicina tradicional para doenças como estomatite, febre, bronquite e psoríase, teve por objetivo o isolamento e/ou identificação de substâncias ativas e a avaliação da atividade antiparasitária dos extratos frente às formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*. O estudo resultou na identificação de nove substâncias, tais como: tridecanona, 2-heptadecanona, espatulenol, aromadendreno, β -cariofileno, ácido 3 α -hidroxitirucala-7,24-dien-21-óico, (+)-isoangenomalina, episesamina e sesamina. As estruturas dos compostos foram elucidadas por análises espectroscópicas e comparação com dados da literatura. Os extratos hexânico e metanólico de folhas e raízes foram testados *in vitro* contra o *Trypanosoma cruzi* cepa Y e apresentaram atividade tripanomicida.

Palavras-chave: Rutaceae, *Pilocarpus spicatus*, atividade tripanomicida

ABSTRACT: **Phytochemical study and *in vitro* evaluation of the anti-*Trypanosoma cruzi* Y strain activity of *Pilocarpus spicatus* A. St. Hil.** The chemical investigation of the species *Pilocarpus spicatus* – popularly known as jaborandi and used in traditional medicine for diseases, such as stomatitis, fever, bronchitis and psoriasis – aimed to isolate and / or identify the active substances and evaluate the antiparasitic activity of the extracts against the *Trypanosoma cruzi* epimastigote forms. The study resulted in the identification of nine substances, such as tridecanone, 2-heptadecanone, spathulenol, aromadendrene, β -caryophyllene, 3 α -hydroxytirucalla-7,24-dien-21-oic acid, (+)-isoangenomaline, episesamin and sesamin. The structures were elucidated by spectroscopic analysis and comparison with literature data. The hexane and methanol extracts from leaves and roots were tested *in vitro* against *Trypanosoma cruzi* Y strain and showed trypanocidal activity.

Keywords: Rutaceae; *Pilocarpus spicatus*; trypanocidal activity.

INTRODUÇÃO

Pilocarpus Vahl é um gênero neotropical de plantas arbustivas e arbóreas, com distribuição geográfica que se estende desde o sul do México e América Central - incluindo as Pequenas e Grandes Antilhas - até o sul da América do Sul. É composto por 17 espécies e 14 são encontradas exclusivamente no território brasileiro (Skorupa, 1996; Skorupa e Pirani, 2004; Sawaya et al., 2011).

Algumas espécies de *Pilocarpus* são chamadas popularmente como jaborandi, nome derivado da língua tupi-guarani, que significa planta que causa saliva. Este gênero é constantemente estudado devido às propriedades farmacológicas

como potente estimulante de secreção e diurético (Corrêa, 1969). As folhas de *Pilocarpus* são usadas em infusões para o tratamento de febre, estomatite, bronquite e psoríase (Holmsted et al., 1979).

O isolamento da pilocarpina, um alcaloide imidazólico, em 1875 e o uso na oftalmologia para glaucoma mostram a importância desta planta da flora brasileira (Pinheiro, 1997).

Além dos alcaloides, um grande número de metabólitos secundários é reportado no gênero *Pilocarpus*, tais como: as cumarinas (Amaro-Luis et al., 1990), os flavonoides (Bertrand et al., 2001), os hidrocarbonetos oxidados (Negri et al., 1998), os

terpenos (Andrade Neto et al., 1994), e as lignanas (Souza et al., 2003).

Neste gênero, destaca-se *Pilocarpus spicatus*, espécie encontrada apenas no Brasil, nos estados de São Paulo, Rio de Janeiro, Espírito Santo e Bahia. O estudo fitoquímico da espécie demonstrou a presença da cumarina chalepina, a qual apresentou atividade tripanomicida, além de vários terpenos, tais como: α e β -pineno, canfeno, Z,Z-farnesol, E-nerolidol e allo-aromadendreno (Andrade et al. 1994; 2002; Pavão et al., 2002; Santos e Moreno, 2004).

As atividades antibacterianas e imunomodulatórias do extrato de folhas desta espécie foram estudadas, bem como, a atividade dos extratos brutos de caule de *P. spicatus* e suas frações, frente à forma tripomastigota de *T. cruzi* com resultados superiores a 80% de inibição do parasita (Costa et al., 2009; Mafezoli et al., 2000).

Sabe-se que a composição química de espécimes de uma mesma espécie varia a depender das condições geográficas do local de coleta, bem como da parte estudada. Por este motivo, o presente trabalho teve por objetivo o isolamento, a identificação de substâncias ativas de um espécime de *Pilocarpus spicatus* coletado no semiárido baiano e a avaliação da atividade antiparasitária dos extratos frente à forma epimastigota do *Trypanossoma cruzi* cepa Y, agente etiológico da Doença de Chagas.

MATERIAL E MÉTODO

O espécime de *Pilocarpus spicatus* A. St. Hil. estudado foi coletado nas margens da estrada que liga o município de Piatã ao distrito Inúbia, Chapada Diamantina – BA, em 26 de Março de 2005. A identificação botânica foi realizada pela Prof^a Maria Lenise da Silva Guedes, curadora do Herbário Alexandre Leal Costa (ALCB), no Instituto de Biologia da Universidade Federal da Bahia e uma excisata encontra-se catalogada no ALCB, sob o número 69167.

As raízes (1,40 Kg), caule (1,20 Kg) e folhas (186,32 g) de *Pilocarpus spicatus* foram secos, triturados e submetidos às extrações sucessivas com *n*-hexano e metanol (3 X 3,0 L/ solvente) em temperatura ambiente. O caule seco foi moído e macerado à frio com *n*-hexano e metanol por três vezes.

As folhas foram secas ao ar livre, trituradas e extraídas por três vezes com *n*-hexano e metanol (MeOH). Todos os extratos foram concentrados sob pressão reduzida.

O extrato hexânico das raízes foi separado por coluna cromatográfica filtrante, empacotada a seco com gel de sílica 60, utilizando-se como fase móvel misturas de diclorometano (DCM), acetato de

etila (AcOEt) e MeOH em gradiente de polaridade crescente (*n*-hexano puro, *n*-hexano-AcOEt nas proporções: 99:1, 9:1, 8:2, 7:3 e 1:1, além de MeOH puro), obtendo-se 7 frações de aproximadamente 200 mL cada. Após a evaporação dos solventes, todas as frações desta coluna foram submetidas à cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC), analisadas e agrupadas em 06 frações.

A fração 01 da coluna filtrante (6,23 g) apresentou-se como um óleo de coloração amarela e, quando analisada em cromatografia em camada delgada (CCD) e revelada na luz ultravioleta (UV) e em vapores de iodo apresentou uma única mancha, a qual, em seguida, foi submetida à cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG/EM), sendo possível a identificação da mistura das substâncias **1, 2, 3, 4 e 5**.

A fração 02 (6,85 g) foi fracionada por coluna cromatográfica de sílica gel 60, utilizando como eluentes, misturas de *n*-hexano e acetato de etila em gradiente crescente de polaridade a começar com *n*-hexano puro e terminar com AcOEt puro. Foram obtidas 18 frações, que depois de analisadas por CCD, resultaram em 8 frações. Na fração 3 desta coluna foi determinada a substância **6**.

A fração 04 (5,65 g) foi purificada por cromatografia em coluna (CC), utilizando como fase móvel solventes em ordem crescente de polaridade: *n*-hexano, DCM e MeOH. Este procedimento levou à obtenção de 40 frações, que foram reunidas em 9 frações, após análise com CCD. Da fração 04 desta coluna foi identificada a substância **7**.

O extrato hexânico de caule, com massa de 31,20 g, foi separado em coluna de sílica gel 60, eluído com misturas de clorofórmio (CHCl₃) e MeOH nas concentrações: CHCl₃ puro, CHCl₃-MeOH – 99:1, 98:2, 97:3, 95:5, 9:1; 85:15, 7:3, 6:4, 1:1, 4:6, 3:7, 2:8, 15:85, 1:9, MeOH puro; resultando em um total de 16 frações. Destas, a fração 3 (1,13 g) foi usada para separação cromatográfica, utilizando misturas de *n*-hexano e DCM em gradiente crescente de polaridade, desta coluna foram obtidas 32 frações separadas a partir do acompanhamento da coluna com luz ultravioleta. Da fração 07 desta coluna (56,12 mg) foi isolada a substância **8**.

Com o objetivo de isolar alcaloides, o extrato hexânico de folhas (15 g) foi tratado com uma solução de KOH 5% (p/v) e extraído com diclorometano. Esta fração resultou em resíduo de 4,50g, que foi submetido a coluna isocrática com clorofórmio/metanol (99:1) fornecendo 19 frações. A fração 01 obtida nesta coluna foi separada por uma CC em sílica gel 60, eluída com misturas de clorofórmio e acetato de etila em gradiente crescente de polaridade (*n*-hexano; 99:1, 98:2, 95:5, 9:1, 8:2, 7:3; 6:4, 1:1 e AcOEt), onde foram obtidas 10 frações. A fração 6 desta coluna foi identificada como

o composto **9**.

Os ensaios Anti-*Trypanosoma cruzi* foram realizados no Laboratório de Biomorfologia Parasitária (LBP) do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz (Fiocruz). A cultura de formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* cepa Y foi mantida em meio LIT (Liver Infusion Tryptose) suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF), numa temperatura de 28°C. Uma concentração inicial de 5×10^6 de parasitas/mL foi utilizada e incubada em placas de 24 poços, utilizando-se 40 μ L de uma solução dos extratos com dimetilsulfóxido (DMSO) na concentração de 10 mg mL⁻¹ e completando com 2 mL de meio/poço.

Os experimentos foram realizados em triplicata e para o controle do experimento foi utilizado DMSO e meio de cultura. O número de parasitas foi apurado após 96 horas de tratamento, por contagem em hemocitômetro de Neubauer.

Os espectros de ressonância magnética nuclear (RMN) de ¹H (300 MHz), ¹³C (75 MHz) e de *melhoramento sem distorção* por transferência de *polarização a 135°* (DEPT 135°) foram obtidos nos espectrômetros Varian Gemini 300 e Mercuri 300. Os cromatogramas foram revelados através de irradiação de lâmpada U.V. nos comprimentos de onda de 254 nm e 366 nm, vapores de iodo e reveladores químicos como Dragendorff, Lieberman-Burchard e solução de FeCl₃. Nas separações cromatográficas em coluna, foram usadas sílica gel 60 (70-230 mesh/ 0,063-0,200 mm/ 40-63 mm) das marcas Merck e Vetec. Os espectros de massas foram registrados por impacto eletrônico (70 eV) em CG-EM de marca Shimadzu, modelo GC-17A equipado com injetor e divisor de fluxo e partição da amostra de 1:50 e coluna capilar (30 m x 0,25 mm x 0,1 mm) e *Tinj* 60°C com elevação de 3°C min⁻¹ até 200°C e depois 10°C/min até 280°C com tempo total de análise de 100 min. A quantificação dos constituintes foi obtida por integração eletrônica pela técnica de normalização. Na análise qualitativa, se utilizou as mesmas condições e, como detector, o espectrômetro de massas GC/MS - QP5000 (Shimadzu).

RESULTADO E DISCUSSÃO

Uma alíquota da fração 01, originada da coluna filtrante do extrato hexânico de raiz, foi injetada em cromatógrafo à gás acoplado à espectrometria de massa (CG/EM) nas condições de Adams. Após a determinação dos índices de retenção (IK) e comparação dos espectros de massa com dados da literatura foi possível a identificação dos sesquiterpenos β -cariofileno (**1**) – IK1409, aromadendreno (**2**) - IK1441, espatulenol (**3**) – IK1484 e dos hidrocarbonetos oxidados

2-tridecanona (**4**) – IK1578 e 2-heptadecanona (**5**) – IK1700 (Adams, 1995).

A segunda fração da coluna filtrante do extrato hexânico de raiz forneceu 56,12 mg de um sólido branco amorfo. O espectro de RMN ¹H desta substância apresentou sete simpletos em δ 1,67; δ 1,58; δ 0,95; δ 0,93; δ 0,91; δ 0,88 e δ 0,72, indicando a presença de sete grupos metílicos na molécula e sugerindo tratar-se de triterpeno. O espectro de RMN ¹H apresentou ainda um simpleto largo em δ 3,50 atribuído ao H-3, em axial. O duplete largo em δ 5,23 ($J = 3,3$ Hz) e o tripleto em δ 5,08 indicam a presença de próton vinílico em ligação dupla endo-cíclica Δ^7 , além de uma ligação dupla na cadeia lateral Δ^{24} , apontando para esqueleto do tipo tirucalano.

O espectro de RMN de ¹³C desta substância apresentou 30 sinais de carbonos, confirmando a estrutura triterpênica. Além do sinal em δ 181,65, referente ao carbono carboxílico, foram encontrados: sinais em δ 118,13 e δ 145,62 relativos aos carbonos olefínicos da insaturação entre carbonos C-7 e C-8, sinais em δ 132,09 e δ 123,65 dos carbonos olefínicos C-25 e C-24 da cadeia lateral e o sinal em δ 76,47, atribuído ao carbono carbinólico, com deslocamento característico de OH na posição equatorial. Através do experimento DEPT-135 foi possível confirmar a presença de 8 carbonos metínicos, 9 carbonos metilênicos e 7 metílicos. Estes dados comparados com aqueles fornecidos pela literatura identificam esta substância como ácido 3 α -hidroxi-tirucala-7,24-dien-21-óico (Mora et al., 2001).

A fração 04 foi submetida à purificação por cromatografia em coluna clássica (C.C) com sílica gel, utilizando como fase móvel misturas de hexano, diclorometano e metanol, em ordem crescente de polaridade. Este procedimento forneceu 9,0 mg de um sólido branco. Os dados dos espectros de RMN de ¹H, ¹³C apresentados na Tabela 1 e o espectro de correlação homonuclear de H¹-H¹ (COSY), que confirmou as multiplicidades observadas no espectro de RMN de H¹ (Figura 1), foram comparados com a literatura (Yamaguchi et al., 1989) e possibilitaram

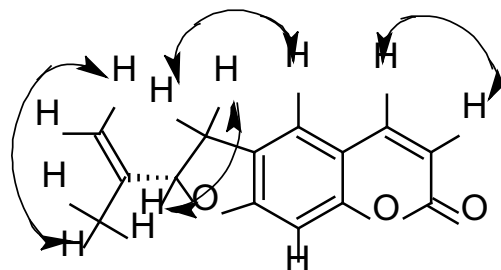


FIGURA 1. Correlações H¹-H¹ da cumarina isoangomalina (**7**).

TABELA 1. Dados espectroscópicos de RMN ^1H e ^{13}C da cumarina (+)-isoangenomalina

Posição	^{13}C	d ^1H (8)
2	161,2	-
3	112,6	6,19;1 H;d; J= 9,3 Hz
4	144,1	7,57;1 H;d; J= 9,3 Hz
5	124,9	7,21;1 H;s
6	123,7	-
7	163,2	-
8	98,3	6,76;1 H;s
9	157,1	-
10	143,1	-
2'	87,9	5,27; 1H; dd; J= 8,7 Hz e 8,4Hz, Heq.3,35 ; 1H; dd; J= 9 Hz e 15,3 Hz Hax. 3,03; 1H; dd; J= 9 Hz e 15,3 Hz
3'	33,8	-
1''	-	-
2''	113,3	5,10 e 4,96; 1 H;s
3''	17,4	1,77 H;s
2	161,2	-
3	112,6	6,19;1 H;d; J= 9,3 Hz
4	144,1	7,57;1 H;d; J= 9,3 Hz
5	124,9	7,21;1 H;s
6	123,7	-
7	163,2	-

a identificação da cumarina(+)-isoangenomalina.

Após o fracionamento por cromatografia em coluna, o extrato hexânico de caule forneceu 15,20 mg de uma substância **8** e foi identificada por RMN ^1H , ^{13}C e DEPT-135 e dados da literatura (Hsieh et al., 2005) como a lignana sesamina, já isolada de outras espécies de Rutaceae (Tabela 2).

Uma massa de 36,0 mg da substância **9** foi obtida do extrato hexânico de folhas, após fracionamento. A análise dos dados de RMN ^{13}C e ^1H e comparação destes com a literatura (Brown et al., 2001) permitiu a identificação da episesamina (Tabela 2).

Os testes de atividade anti- *T. cruzi* foram realizados com extrato hexânico e metanólico das folhas, e com o extrato metanólico das raízes. As

amostras apresentaram atividade tripanomicida (Figura 2). Todos os extratos apresentaram inibição maior que 50%, sendo que o extrato hexânico das folhas inibiu 79%, o extrato metanólico das folhas inibiu 56% e o extrato metanólico das raízes inibiu 62% do crescimento de parasitas.

Em trabalho anterior, os extratos brutos de *P. spicatus* apresentaram inibição dos parasitas maior que suas frações, sugerindo o efeito sinérgico entre os componentes do extrato (Mafezoli et al, 2000). Apesar dos estudos, até o momento, não detectarem a presença da chalepina, piranocumarina que apresenta atividade inibitória da enzima GAPDH fundamental para o *Trypanosoma cruzi* (Pavão et al., 2002); a presença de outros componentes com possível ação anti- *T. cruzi* a exemplo de terpenos,

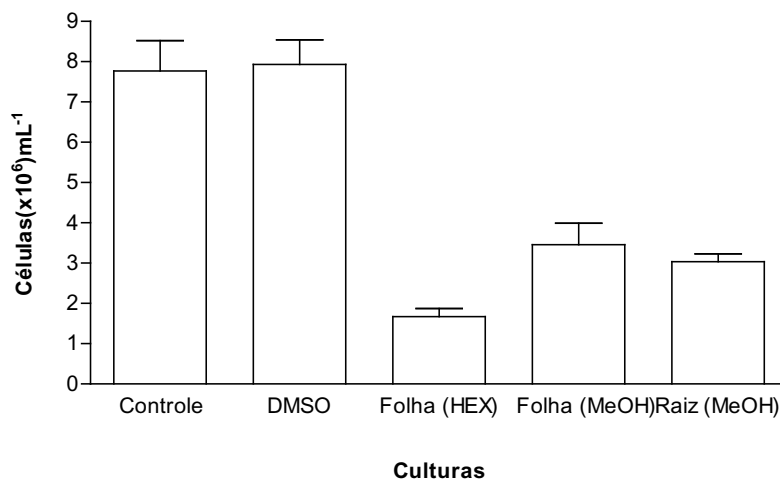


FIGURA 2. Screening dos extratos de *P. spicatus* frente a *T. cruzi* - 200µg/mL

TABELA 2 – Dados espectroscópicos de RMN ¹H e ¹³C das lignanas sesamina (8) e episamina (9).

Posição	d ¹ H (8)	d ¹³ C (8)	d ¹ H (9)	d ¹³ C (9)
1	3,05m	54,5	3,30m	54,8
5	3,05m	54,5	3,30m	50,3
2	H _{eq} : 4,23dd (J= 9,2 e 6,9) H _{ax} : 3,86dd (J= 9,2 e 3,6)	71,9	H _{eq} : 3,83dd (J= 9,3 e 6) H _{ax} : 2,85q (J= 7,3 e 0,9)	71,0
6	H _{eq} : 4,23dd (J= 9,2 e 6,9) H _{ax} : 3,86dd (J= 9,2 e 3,6)	71,9	H _{eq} : 4,09d (J= 9,6) H _{ax} : 3,86m	69,8
4	4,71d (J= 4,2)	86,0	4,83d (J= 5,7)	82,1
8	4,71d (J= 4,2)	86,0	4,39d (J= 7,2)	87,8
1'	-	135,2	-	135,1
1''	-	135,2	-	132,3
2'	6,85d (J=1,2)	106,7	6,77m	106,7
2''	6,85d (J=1,2)	106,7	6,77m	106,5
3'	-	147,9	-	147,3
3''	-	147,9	-	146,7
4'	-	148,2	-	148,1
4''	-	148,2	-	147,8
5'	6,77d (J= 8,4)	108,4	6,77m	108,2
5''	6,77d (J= 8,4)	108,4	6,77m	108,2
6'	6,79dd (J= 8,4 e 1,2)	119,5	6,77m	119,8
6''	6,79dd (J= 8,4 e 1,2)	119,5	6,77m	118,8
1'''	5,96s	101,3	5,95s	101,2
1''''	5,96s	101,3	5,97s	101,3

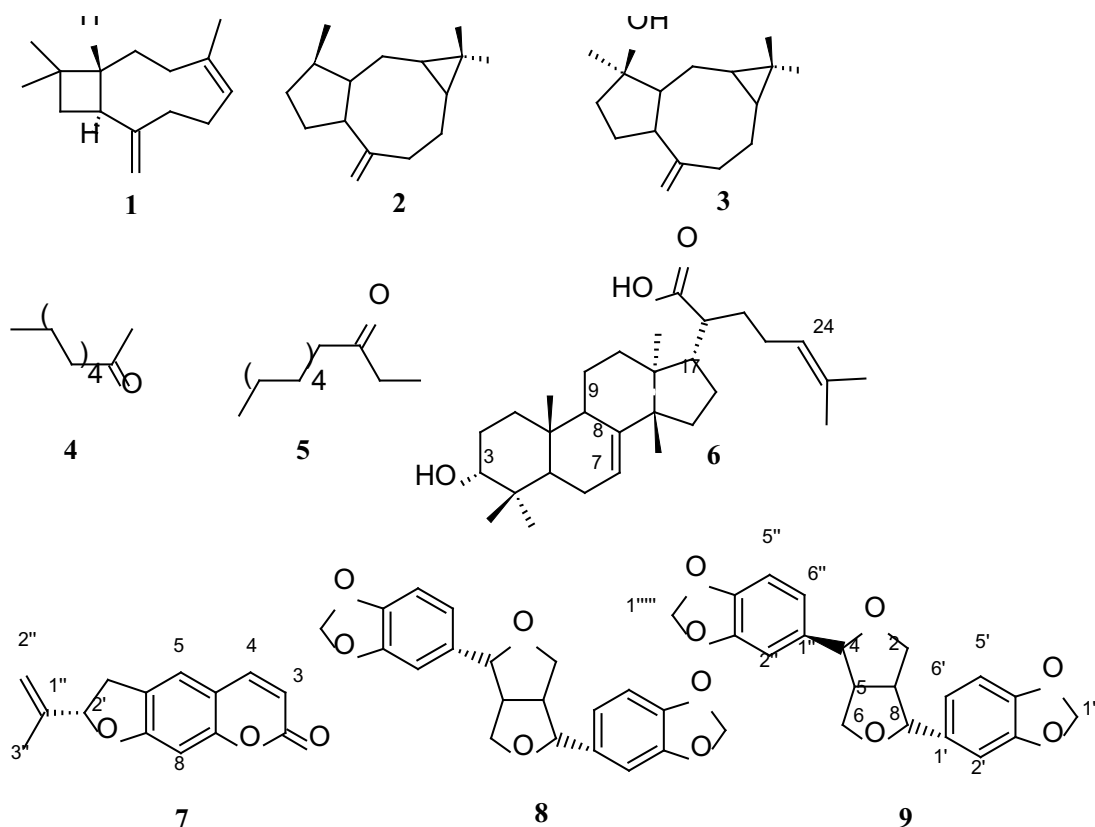


FIGURA 3. Substâncias identificadas nos extratos de caule, folhas e raiz de *Pilocarpus spicatus*.

cumarinas e lignanas pode explicar os resultados obtidos. Porém, estes resultados serão investigados para elucidar qual ou quais metabólitos presentes são responsáveis por tal atividade.

O presente trabalho com a espécie *P. spicatus* permitiu identificar 09 compostos: 2-tridecanona (1), 2-heptadecanona (2), espatulenol (3), aromadendreno (4), beta-cariofileno (5), o ácido 3 α -hidroxi-tírucala-7,24-dien-21-óico (6) isoangenomalina (7), episesamina (8) e sesamina (9). As substâncias 6, 7, 8 e 9 ainda não haviam sido isoladas do gênero *Pilocarpus*, contribuindo, portanto, para a quimiotaxonomia deste gênero.

AGRADECIMENTO

Os autores agradecem a CAPES, FAPESB e CNPq pelas bolsas e apoios financeiros concedidos.

REFERÊNCIA

ADAMS, R.P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry**. Illinois: Allured Publishing: Carol Stream. 1995. 469p.
 AMARO-LUIS, M. et al. New coumarins from *Pilocarpus goudotianus*. **Planta Medica**, v.56, p.304-6, 1990.
 ANDRADE NETO, J.M. et al. 24-methyl-25-

ethyl-dammarane derivatives from *Pilocarpus spicatus*.

Phytochemistry, v.35, n.3, p.739-43, 1994.

ANDRADE NETO, J.M. et al. Volatile constituents of different populations of *Pilocarpus spicatus* Saint Hill. (Rutaceae) from the Northeast of Brazil. **The Journal of Essential Oil Research**, v.14, p.319-24, 2002.

BERTRAND, C. et al. Constituents of *Pilocarpus trachylophus*. **Fitoterapia**, v.72, p.844-7, 2001.

BROWN, R.C.D. et al. C-H Insertion Approach to the Synthesis of *endo,exo*-Furofuranones: Synthesis of (+)-Asarinin, (+)-Epimagnolin A, and (+)-Fargesin. **The Journal of Organic Chemistry**, n.66, p.6719-28, 2001.

CORRÊA, M.P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, 1969, v.4, 374p.

COSTA, J.F.O. et al. Immunomodulatory and antibacterial activities of extracts from *Rutaceae* species. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.20, n.4, p.502-505, 2010.

HOLMSTED, B. et al. Jaborandi: An interdisciplinary appraisal. **Journal of Ethnopharmacology**, v.1, p.3-21, 1979.

HSIEH, T.J. et al. NMR spectroscopic, mass spectroscopic, X-ray crystallographic, and theoretical studies of molecular mechanics of natural products: farformolide B and sesamin. **Biophysical Chemistry**, v.114, n.1, p.13-20, 2005.

MAFEZOLI, J. et al. *In vitro* activity of *Rutaceae* species against the trypomastigote form of *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.73, p. 335-340, 2000.

- MORA, A.J. et al. 3 α -hydroxy tirucalla-7,24-diene- 21-oic acid: A Triterpene from *Protium Crenatum* Sandwith. **Acta Crystallographica**, C57, p.638-40, 2001.
- NEGRI, G. et al. An aromatic hydrocarbon from the foliar epicuticular wax of *Pilocarpus jaborandi*. **Phytochemistry**, v.49, n.1, p.127-9,1998.
- PAVÃO F. et al. Structure of *Trypanosoma cruzi* glycosomal glyceraldehyde-3- phosphate dehydrogenase complexed with chalepin, a natural product inhibitor, at 1.95 Angstrom resolution. **Febs Letters**, v.520, p.13-7, 2002.
- PINHEIRO, C.U.B. Jaborandi (*Pilocarpus* sp., Rutaceae): a wild species and its rapid transformation into a crop. **Economic Botany**, v.51, n.1, p.49-58, 1997.
- SANTOS, A.P.; MORENO, P.R.H. *Pilocarpus* spp.: A survey of its chemical constituents and biological activities. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 40, n. 2, 2004.
- SAWAYA, A.C.H.F. et al. Screening species of *Pilocarpus* (Rutaceae) as sources of pilocarpine and other imidazole alkaloids. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 58, p.471–480, 2011.
- SKORUPA, L.A. **Revisão taxonômica de *Pilocarpus Vahl* (Rutaceae)**. 1996. 426p. Tese (Doutorado – Área de concentração – Botânica) - Instituto de Biologia, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- SKORUPA, L.A.; PIRANI, J.R. A new species of *Pilocarpus* (Rutaceae) from northern Brazil. **Brittonia**, v.56, p. 147–150, 2004.
- SOUZA, R.C. et al. Constituintes químicos de *Pilocarpus grandiflorus* (Rutaceae). In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 26. Poços de Caldas, 2003. **Resumos**. São Paulo: SBQ, 2003, PN-203.
- YAMAGUCHI, S. et al. The synthesis of some dimethylpyranocoumarins and isopropenyldihydrofuranocoumarins. **Bulletin of the Chemical Society of Japan**, v.62, p.3593-7, 1989.