



COMPOSIÇÃO QUÍMICA E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE E CITOTÓXICO DAS FOLHAS DE *Eremanthus erythropappus* (DC) MCLEISH (CANDEIA)

*CHEMICAL COMPOSITION AND EVALUATION OF ANTIOXIDANT AND CYTOTOXIC POTENTIAL OF *Eremanthus erythropappus* (DC) MCLEISH (CANDEIA).*

Thais Vieira Soares¹, Rodrigo Luiz Fabri²

¹ Aluna do curso de Farmácia da Universidade Presidente Antônio Carlos/UNIPAC-JF

² Professor Adjunto I; Faculdade de Ciências da Saúde; Universidade Presidente Antônio Carlos/Juiz de Fora/ Minas Gerais

* Autor para correspondência: rodrigolfabri@yahoo.com.br

Recebido em 08/02/2011, Aceito em 28/08/2011

RESUMO: Este estudo teve como objetivo avaliar o potencial antioxidante e citotóxico das folhas de *Eremanthus erythropappus* e identificar os principais constituintes por CG/EM e pelo método de bioautografia antioxidante. Os extratos das folhas de *E. erythropappus* foram testados frente ao radical DPPH, sendo que o extrato em diclorometano apresentou resultado mais significativo com IC₅₀ 28,6 µg/mL, seguido do hidroetanólico com IC₅₀ 34,3 µg/mL. Somente o extrato em diclorometano apresentou citotoxicidade frente à *Artemia salina* com CL₅₀ 64,7 µg/mL. Por meio do teste de bioautografia foi possível identificar cumarinas e, principalmente, flavonoides como as principais classes antioxidantes de *E. erythropappus*. A análise por CG/EM identificou no extrato em hexano as seguintes substâncias majoritárias β-amirenoil, acetato de α-amirenil, friedelina, β-cariofileno, aristoleno e óxido de cariofileno.

PALAVRAS-CHAVE: *Eremanthus erythropappus*, antioxidante, flavonóides, bioautografia, Asteraceae.

ABSTRACT: This study aimed to evaluate the potential antioxidant and cytotoxic of *Eremanthus erythropappus* leaves and identify the principal components by GC / MS and the antioxidant bioautography method. The extracts from the *E. erythropappus* leaves were tested against the DPPH radical, of which the dichloromethane extract showed most significant result with IC₅₀ 28.6 µg/mL, followed by hydroethanolic extract with IC₅₀ 34.3 µg/mL. Only the dichloromethane extract showed cytotoxicity against the *Artemia salina* with LC₅₀ 64.7 µg/mL. Through the bioautography test were identified coumarins and mainly flavonoids as antioxidants major classes of *E. erythropappus*. The analysis by GC/MS identified in the hexane extract the following majority compounds β -amyrenol, α -amyrenyl acetate, friedelin, β -caryophyllene, aristolene and caryophyllene oxide.

KEYWORDS: *Eremanthus erythropappus*, antioxidant, flavonoids, bioautography, Asteraceae.

INTRODUÇÃO

A utilização de plantas medicinais no tratamento de enfermidades ocorre desde o início da humanidade⁽¹⁾. Atualmente esta prática vem aumentando a cada dia, mesmo com o avanço da medicina. A maior parte da população dos países em desenvolvimento utiliza as plantas medicinais e medicamentos fitoterápicos na atenção primária à saúde⁽²⁾.

Com a crescente utilização das plantas medicinais aumenta também o interesse científico a fim de se avaliar o valor terapêutico, o risco e a toxicidade⁽²⁾. Devido os avanços tecnológicos da última década, a maneira de se pesquisar compostos ativos sofreu grandes mudanças, podendo propiciar de forma mais

rápida o surgimento de novos medicamentos no mercado⁽³⁾.

Para a descoberta de um novo fármaco a diversidade química dos compostos a serem selecionados é de muita importância, sendo a triagem de extratos naturais uma das grandes estratégias. A maioria das substâncias bioativas encontradas em produtos naturais são de baixo peso molecular e grande complexidade estrutural, facilitando a absorção e metabolização, o que é importante para uma nova droga, além de possuírem mecanismos de ação diferentes das drogas sintéticas⁽³⁻⁴⁾.

Eremanthus erythropappus (DC) McLeisch, sinônimo *Vanillosmopsis erythropappa* Schultz-Bip pertence à família Asteraceae, é popularmente conhecida como "candeia-da-serra". Florestas nativas

do território brasileiro apresentam grande diversidade de espécies, dentre elas está *E. erythropappus* (DC) McLeish⁽⁵⁾. Em Minas Gerais, a espécie predomina no alto das Serras da Mantiqueira e do Espinhaço⁽⁶⁾. De acordo com Souza et al.⁽⁷⁾ sua madeira apresenta um grande potencial econômico, não somente pelo uso tradicional, mas também por possuir óleos essenciais, o qual o principal constituinte é o α -bisabolol, tendo já descritos as propriedades antiflogística, antibacteriana, antimicótica e dermatológica. Popularmente é utilizada como cicatrizante, no combate às infecções e no tratamento de úlceras pépticas⁽⁶⁾.

Nos últimos anos, uma quantidade substancial de evidências tem indicado o papel chave dos radicais livres e outros oxidantes como grandes responsáveis pelo envelhecimento e pelas doenças degenerativas associadas ao envelhecimento⁽⁵⁾. A pesquisa por agentes antioxidantes naturais presentes nos vegetais, tanto para fins terapêuticos, como para conservação de alimentos tem sido objeto de grande interesse. Há evidências consistentes da ação protetora dos antioxidantes naturais contra os efeitos deletérios do estresse oxidativo decorrente do ataque dos radicais livres aos sistemas celulares⁽⁸⁾.

A fim de se descobrir novas substâncias bioativas, alguns modelos simples de testes biológicos têm sido utilizados. Dentre eles, o bioensaio de toxicidade com *Artemia salina* ("Brine Shrimp Test" – BST) o qual vem sendo utilizado para seleção de extratos de plantas com substâncias de potencial farmacológico. Esse microcrustáceo marinho fornece um bom modelo para estudos de bioatividade de extratos vegetais e produtos naturais devido à rapidez do seu crescimento, ao baixo custo de criação e manutenção em condições de laboratório⁽⁹⁾.

Este estudo teve como objetivo identificar os principais constituintes e avaliar o potencial antioxidante e citotóxico de *Eremanthus erythropappus*.

MATERIAL E MÉTODOS

Material Vegetal

As folhas de *Eremanthus erythropappus* (DC) McLeish foram coletadas em Juiz de Fora, MG, Brasil. A espécie foi previamente identificada pela Dra. Fátima R. Gonçalves Salimena. A exsicata desta espécie está depositada, sob o nº 25363, no Herbário CESJ da UFJF.

Preparo dos extratos

O material coletado foi submetido à secagem a 50°C, sob ventilação, até perda de 90 a 95% de sua umidade. O material botânico (400 g) foi triturado em moedor elétrico BMC-0022 e pulverizado em tamis de malha 80. O extrato foi obtido por maceração estática com etanol durante um período de duas semanas com seis trocas de solvente. Após este tempo, o solvente foi removido por rotaevaporação.

O extrato etanólico (EEE) (1,20 g) foi ressuspendido em EtOH: Água (8:2 v/v) e, em seguida, particionado com solventes de polaridade crescente: hexano e CH₂Cl₂, obtendo os extratos hexânico (EEH), diclorometânico (EED) e hidroalcoólico (EEHi). Os solventes foram evaporados e as partições foram pesadas e mantidas sobre refrigeração até o momento da realização dos ensaios fitoquímicos e biológicos.

Fracionamento cromatográfico

O extrato EED (200 mg) foi fracionada usando coluna cromatográfica em sílica-gel (Merck, 70-230 mesh ASTM) de tamanho 48 X 1,5 cm, com gradiente crescente de eluição (CH₂Cl₂, CH₂Cl₂ - MeOH, e MeOH). As frações obtidas foram analisadas por cromatografia em

camada delgada (CCD) e agrupadas de acordo com o perfil cromatográfico em 6 frações. Estas frações foram concentradas à pressão reduzida, utilizando evaporador rotatório, pesadas e mantidas sobre refrigeração até a realização dos testes fitoquímicos e biológicos.

Cromatografia gasosa/ Espectrometria de massas, GC/MS

Visando identificar as substâncias de EEH, a mesma foi analisada por cromatografia Gasosa (CG) realizada num cromatógrafo Hewlett Packard 6890 Series, coluna capilar de sílica fundida HP-5 (5% difenil e 95% dimetilpolisiloxano, 60m x 0,25mm, 0,25 µm de espessura do filme); hélio como gás de arraste; temperatura programada de 70°C a 290°C (2°C/min); temperatura do injetor a 270°C e temperatura do detector de 300°C, acoplado a um espectrômetro de massas (Hewlett-Packard 5972) com 70 eV, fonte de íons a 250°C equipado com EI.

Avaliação da atividade antioxidante (DPPH)

O método de Brand-Williams⁽⁴⁾ tem por base a redução do radical 2,2'-difetil-1-picrihidrazilo (DPPH·), que apresenta um máximo de absorção a 517-520 nm. Ao fixar um H⁺, abstraído do antioxidante em

estudo, observa-se uma diminuição da absorvância, o que permite calcular, após o estabelecimento do equilíbrio da reação, a quantidade de antioxidante gasta para reduzir 50% do DPPH. Para realização desse teste, as amostras foram solubilizados em MeOH (1,0 mg/mL) e diluídas em solução metanólica do radical DPPH (50 $\mu\text{mol/L}$) (Sigma) nas concentrações de 250,0 a 0,12 $\mu\text{g/mL}$. Após um período de 30 minutos, foram realizadas as leituras das absorvâncias das amostras e do branco (MeOH + DPPH) em espectrofotômetro a 515nm. A CI_{50} , que é a concentração da amostra necessária para reduzir em 50% a concentração inicial do DPPH foi calculado utilizando o programa estatístico Probit. Desta forma, quanto menor o valor de CI_{50} , maior a atividade antioxidante do composto. Rutina (Sigma) foi utilizada como controle positivo.

Teste de Bioautografia

O método da bioautografia realizado neste estudo seguiu o protocolo descrito por Gu et al.⁽¹⁰⁾. Vinte microlitros das amostras na concentração de 4 mg/mL foram aplicados em cromatoplas de sílica gel 60 F 254 (Merck) (7 x 5 cm) e eluídas com CH_2Cl_2 e $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{CH}_3\text{OH}$ (9,5:0,5 v/v), respectivamente para EED_1 e EED_2 ; EED_3 - EED_6 .

Para verificar a atividade antioxidante utilizou 2,54mM DPPH em CH_3OH , sendo borrifados nas placas após a eluição. Os resultados foram observados sob luz visível e luz UV (366nm). O fator de retenção (Rf) foi calculado para cada banda que apresentou zona de inibição do radical DPPH. Cromatoplas de referência foram desenvolvidas em sílica gel 60 F 254, a fim de se identificar qual (is) a(s) classe(s) de fitoconstituintes bioativos estavam presentes nas amostras. Foram utilizados os seguintes reveladores: ácido sulfúrico:vanilina, como revelador universal; KOH 10% (reativo de Borntrager), para identificação de antraquinonas e cumarinas; Dragendorff, para alcaloides; NP/PEG, para flavonoides e Liebermann-Burchard, para identificação de esteroides e triterpenos (Fabri et al., 2011). Todos os testes foram realizados em duplicatas e comparados com uma amostra padrão (EED).

Avaliação da atividade citotóxica

A presença de constituintes citotóxicos foi avaliada utilizando-se a metodologia proposta por Meyer et al.⁽¹¹⁾. Larvas de *Artemia salina* (náuplios), obtidas a partir de ovos utilizados como ração para peixes ornamentais (TROPFISH®), foram colocadas para eclodir em aquário

com água do mar artificial arejada durante 48h. As amostras foram solubilizadas em água do mar artificial, com a ajuda de um diluente (DMSO 1%). Os testes foram realizados em tubos de ensaio com 10 náuplios, preenchidos com 4,5 mL de água do mar artificial e 0,5 mL do material a ser avaliado. As amostras foram testadas nas concentrações de 1000, 500, 100, 50 e 10 µg/mL. Após 24 horas foram contados os indivíduos vivos nas diferentes concentrações. Timol (Vetec) e a água do mar artificial + DMSO 1% foram usados com controles positivo e negativo, respectivamente. Os testes foram realizados em triplicata. Os resultados foram expressos em CL₅₀ (concentração necessária para matar 50% dos náuplios) que foi calculado pelo programa estatístico Probit.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Apesar de não representar as condições semelhantes aos processos que ocorrem *in vivo*, o método colorimétrico para avaliar a atividade antioxidante contra o radical DDPH representa um método simples e rápido para detectar a presença de substâncias com tais propriedades em extratos vegetais.

O DPPH é um cromóforo extremamente estável e conforme vai sendo reduzido por um antioxidante, seu elétron se torna emparelhado e a absorvidade desaparece⁽³⁾. Os

antioxidantes são capazes de interceptar os radicais livres gerados pelo metabolismo celular ou por fontes exógenas, impedindo o ataque sobre lipídeos, os aminoácidos das proteínas, a ligação dupla dos ácidos graxos poliinsaturados e as bases de DNA, evitando a formação de lesões e perda da integridade celular, protegendo as células dos efeitos prejudiciais causados pelas espécies reativas⁽²⁾.

O potencial antioxidante e citotóxico dos extratos das folhas de *Eremanthus erythropappus* foi avaliado, a fim de selecionar a amostra mais ativa para fracionamento cromatográfico (Tabela 1). O extrato EED foi o que apresentou melhor resultado com IC₅₀ 28,6 µg/mL, seguido de EEHi com IC₅₀ 34,3 µg/mL. Os extratos EED e EEHi apresentam de média a alta polaridade, respectivamente, o qual favorece a presença de compostos fenólicos como flavonoides, que possuem atividade antioxidante investigada a vários anos⁽¹²⁻¹⁴⁾.

No teste de citotoxicidade o extrato EED de *E. erythropappus* apresentou atividade frente à *Artemia salina* com CL₅₀ 64,7 µg/mL (Tabela 1). Souza et al.⁽⁷⁾ em seu estudo também verificou a atividade citotóxica do extrato em diclorometano. Entretanto em nosso trabalho não houve toxicidade do extrato em hexano, diferente do

observado por esses autores. Os resultados desse bioensaio têm demonstrado uma boa correlação com a atividade antitumoral, sendo, portanto indicado para a triagem

preliminar de plantas com tal atividade⁽⁹⁾. Há relatos de correlação com outros testes farmacológicos, dentre eles atividade pesticida⁽⁹⁾, tripanomicida⁽¹⁵⁾ e antimaláricos⁽¹⁶⁾.

Tabela 1: Rendimento (% *p/p*), atividade antioxidante e citotóxica do extrato etanólico e partições de *E. erythropappus*.

Amostra	Rendimento (% <i>p/p</i>)^a	Ensaio DPPH IC₅₀ (µg/mL)^b	Atividade Citotóxica CL₅₀ (µg/mL)^b
EEE		101,4 (86-119,7)	>1000
EEH	52,8	158,3 (112,2 - 223,2)	>1000
EED	19,74	28,6 (22,7 - 36,2)	64,7 (43,2 - 97,0)
EEHi	7,44	34,3 (28,7 - 40,0)	>1000
Rutina^c		0,09 (0,07-0,12)	
Timol^c			1,4 (0,7-3,0)

^a Em relação ao extrato etanólico

^bIntervalo de confiança de 95% entre parêntesis

^cControles positivos

De acordo com os testes realizados, o extrato EED foi o que demonstrou melhores resultados para a atividade antioxidante, sendo o escolhida para fracionamento e identificação das classes de substâncias bioativas.

Através de coluna cromatográfica, foram obtidas seis frações do extrato EED. Estas foram pesadas e seus potenciais antioxidantes avaliados (Tabela 2). A

fração EED₃ foi a que apresentou maior poder de estabilização do DPPH (IC₅₀ 1,2 µg/mL), seguido por EED₄ (IC₅₀ 6,72 µg/mL). O teste de bioautografia demonstrou a presença de flavonoides (Rf 0,86; 0,50; 0,24 e 0,10) e cumarinas (Rf 0,96) como responsáveis pela atividade antioxidante de *E. erythropappus*, após análise por reveladores específicos para estas classes (Figura 1).

Tabela 2 - Rendimento (% *p/p*), fases móveis e ensaio com DPPH das frações obtidas da partição CH₂Cl₂ de *E. erythropappus*.

Fração	Rendimento (% <i>p/p</i>)	Fase Móvel	Ensaio DPPH IC ₅₀ (µg/mL) ^a
EED₁	3,0	CH ₂ Cl ₂	>250
EED₂	5,0	CH ₂ Cl ₂ :CH ₃ OH (9:1)	>250
EED₃	30,0	CH ₂ Cl ₂ :CH ₃ OH (9:1)	1,2 (0,93 - 1,54)
EED₄	3,0	CH ₂ Cl ₂ :CH ₃ OH (9:2)	6,72 (4,76 - 9,49)
EED₅	9,0	CH ₂ Cl ₂ :CH ₃ OH (9:2)	>250
EED₆	40,0	CH ₃ OH	>250

^a Intervalo de confiança de 95% entre parêntesis.

A classe de metabólitos com atividade antioxidante presente em *E. erythropappus*, foi na sua maioria, flavonoides (Figura 1), que possuem número variável de hidroxilas fenólicas e excelentes propriedades de quelar ferro e outros metais de

transição⁽¹⁷⁾. A partir da estrutura básica de um flavonoide pode-se ter grande variedade de estruturas, que formam uma série de compostos com diferente grau de oxidação e substituição⁽¹⁸⁾.

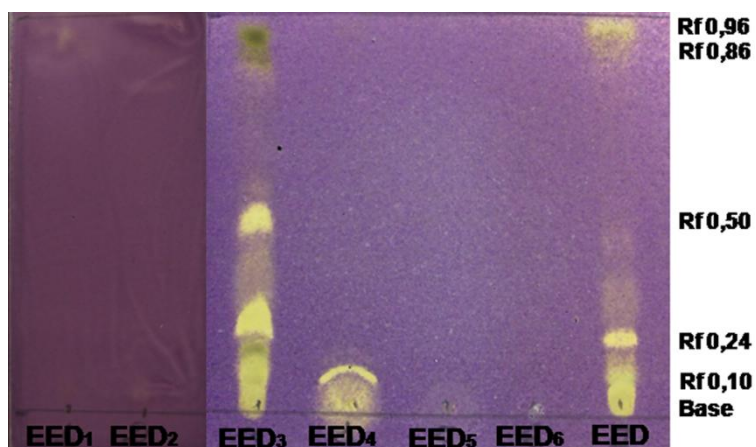


Figura 1 - Placa cromatográfica borrifada com solução metanólica de DPPH 2,54mM e observada em luz visível. Vinte microlitros das frações de *E. erythropappus* (4 mg/mL) foram aplicadas na placa. As bandas com valores de Rf indicam substâncias com atividade inibitória ao radical DPPH.

As propriedades benéficas dos flavonoides podem ser atribuídas a sua capacidade de seqüestrar os radicais livres⁽¹⁹⁾. Esses compostos são encontrados em frutas e vegetais e têm considerável importância na dieta, pois podem inibir o processo de peroxidação lipídica, agindo na proteção celular das macromoléculas celulares, incluindo o DNA⁽²⁰⁾.

Para possuírem tal atividade, os flavonoides devem apresentar estrutura *o*-dihidroxi no anel B, o que confere a estrutura maior estabilidade à forma radical e participa da deslocalização de elétrons; ligação dupla na posição 2-3 em conjunto com a função 4-*oxo* do anel C; presença de hidroxila na posição 3 e 5 com função 4-*oxo* nos anéis. O potencial antioxidante máximo é

observado quando apresenta a estrutura *o*-dihidroxi no anel B e hidroxila na posição 3 e 5⁽¹⁷⁾.

O extrato EEH teve seus constituintes identificados por CG/EM, mesmo não tendo atividades antioxidante e citotóxica expressivas (Figura 2). As substâncias majoritárias foram o β -amirenil (31,9%), acetato de α -amirenil (24,1%), friedelina (8,2%), β -cariofileno (3,8%), aristoleno (3,6%) e o óxido de cariofileno (1,3%). Relatos na literatura mostram que essas substâncias possuem importantes propriedades biológicas, destacando β -cariofileno como bactericida⁽²¹⁾, antitumoral⁽²²⁾ e antiinflamatória⁽²³⁾; friedelina como antifúngica⁽²⁴⁾; β -amirenil como bactericida⁽²⁵⁾ e antiinflamatória⁽²⁶⁾.

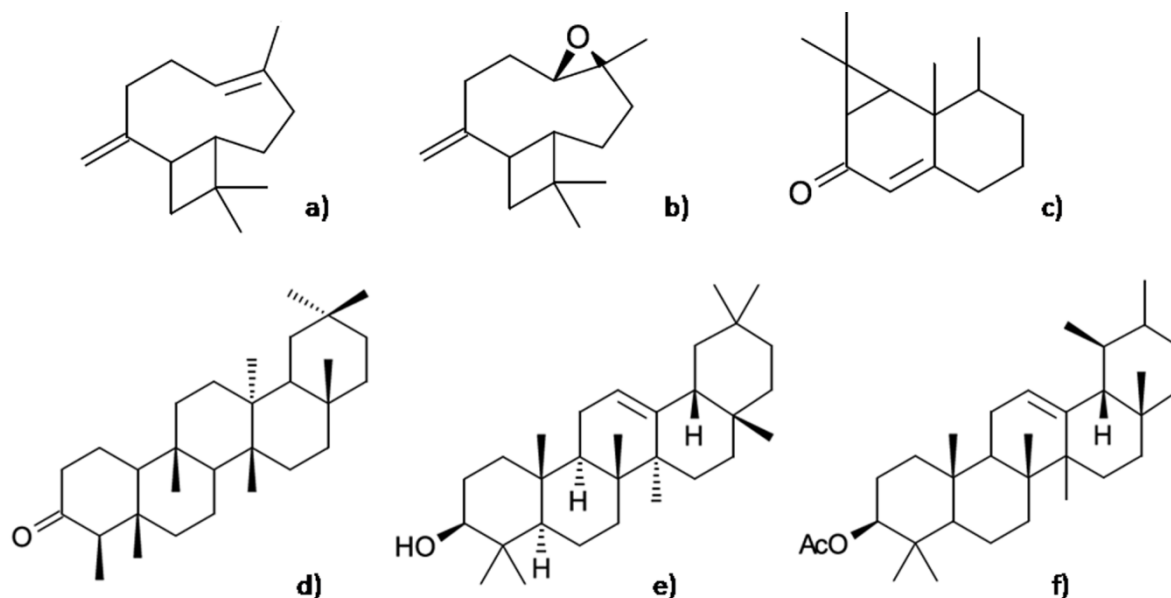


Figura 2 – Estruturas de (a) β -cariofileno, (b) óxido de cariofileno, (c) aristoleno, (d) friedelina, (e) β -amirenil e (f) acetato de α -amirenil.

CONCLUSÃO

Os resultados encontrados permitiram identificar as principais classes de metabólitos bioativos de *E. erythropappus* para atividade antioxidante e também alguns compostos com potencial biológico já relatados na literatura. Outros estudos devem ser realizados a fim de

isolar e elucidar os compostos bioativos.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Doutora Fátima Regina Salimena pela identificação botânica da espécie vegetal e aos Doutores Orlando Vieira de Sousa e Priscila de Faria e Pinto pelo material botânico utilizado.

REFERÊNCIAS

1. Oliveira RB, Costa EA, Valadares MC, Cunha LC. Avaliação das atividades antiinflamatórias e analgésica de extrato de *Synadenium umbellatum*. Rev. Eletr. Farm. 2005;2:137-139.
2. Güntzel ARC. Avaliação das Atividades Farmacológicas de Extratos de *Casearia sylvestris* Sw. [dissertation]. Rio Grande do Sul: Centro Universitário/UNIVATES; 2008. 67 p.
3. Fabri, R.L. Estudo Fitoquímico de *Mitracarpus frigidus* (Willd) K. Schum biomonitorado pela atividade antimicrobiana e a avaliação das atividades citotóxica, antioxidante e leishmanicida. [dissertation]. Juiz de Fora: Faculdade de Ciências Biológicas/UFJF. 2008. 142 p.
4. Fabri RL, Nogueira MS, Moreira JD, Bouzada ML, Scio E. Identification of antioxidant and antimicrobial compounds of *Lippia* species by bioautography J. Med. Food 2011;14:1-7.
5. Souza AL, Oliveira MLR, Silva EF, Coelho DJS. Caracterização fitossociológica em áreas de ocorrência natural de candeia (*Eremanthus Erythropappus* (DC) McLeish). Sociedade de Investigações Florestais 2007;31:667-677.
6. Silvério MS, Sousa OV, Vieira GDV, Miranda MA, Matheus FC, Kaplan MAC. Propriedades farmacológicas do extrato etanólico de *Eremanthus erythropappus* (DC) McLeish (Asteraceae). Rev. Bras. Farmacogn. 2008;18:430-435.

7. Souza OVS, Oliveira MS, Rabello SV, Cunha RO, Costa BLS, Leite MN. Estudo farmacognóstico de galhos de *Vanillosmopsis erythropappa* Schult. Bip. - Asteraceae. Rev. Bras. Farmacogn. 2003;13:50-53.
8. Ferreli C, Condiev S, Pandolfo VZ, Ruggiero AC, Dédalo MFN, Baptistella LH, et al. Avaliação da capacidade antioxidante do extrato acetato de etila das folhas de graviola (*Annona muricata*). In: Anais do 30ª Reunião da Sociedade Brasileira de Química; [CD-ROM]; 2007; Águas de Lindóia, Brasil.
9. Maclaughlin JL, Rogers LL. The use of biological assays to evaluate botanicals. Drug Inf. J. 2001;32:513-52.
10. Gu L, Wu T, Wang Z. TLC bioautography-guided isolation of antioxidants from fruit of *Perilla frutescens* var. *acuta*. Food Sci. Technol. 2009;42:131-136.
11. Meyer BN, Ferrigni NR, Putnam JE, Jacobsen LB, Nichols DE, Maclaughlin JL. Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. Planta Medica 1982;45:31-34.
12. Chen ZY, Chan PT, Ho KY, Fung KP, Wang J. Antioxidant activity of natural flavonoids is governed by number and location of their aromatic hydroxyl groups. Hem. Phys. Lipids 1996;79:157-163.
13. Heim KE, Tagliaferro AR, Bobilya DJ. Flavonoid antioxidants: Chemistry, metabolism and structure-activity relationships. J. Nutr. Biochem. 2002;13:572-584.
14. Seyoum A, Asres K, El-Fiky FK. Structure-radical scavenging activity relationships of flavonoids. Phytochemistry 2006;67:2058-2070.
15. Zani CL, Chaves PPG, Queiroz R, Oliveira AB de, Cardoso JE, Anjos AMG, et al. Brine shrimp lethality assay as a prescreening system for anti-*Trypanosoma cruzi* activity. Phytomedicine 1995;2:47-50.
16. Perez H, Días F, Medina JD. Chemical investigation and *in vivo* antimalarial activity of *Tabebuia achraceae* ssp. *neochrysantha*. Int. J. Pharmacogn. 1998;35:227-231.

17. Flórez SM, Gallego JG, Culebras JM, Tuñon MJ. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nut. Hosp.* 2002;17:271-276.
18. Yunes RA, Cechinel-Filho V. Química de produtos naturais, novos fármacos e a moderna farmacognosia. 2nd ed. Santa Catarina: UNIVALI; 2009. 320 p.
19. Decker EA. Phenolics: prooxidants or antioxidants? *Nut. Rev.* 1997;55(11):396-407.
20. Kunchandy E, Rao MNA. Oxygen radical scavenging activity of curcumin. *Int. Pharmacol.* 1990;58:237-240.
21. Kang R, Helms R, Stout MJ, Jaber H, Nakatsu T. Antimicrobial activity of the volatile constituents of *Perilla frutescens* and its synergistic effects with polygodial. *J. Agric. Food Chem.* 1992;40:2328-2330.
22. Zheng GQ, Kenney PM, Lam LKT. Sesquiterpenes from clove (*Eugenia caryophyllata*) as potential anticarcinogenic agents. *J. Nat. Prod.* 1992;55:999-1003.
23. Shimizu M, Shogawa H, Matsuzawa T, Yonezawas S, Hayashi T, Arisawa M, Suzuki, et al. Anti-inflammatory constituents of topically applied crude drugs. IV. (1) Constituents and anti-inflammatory effect of Paraguayan crude drug "Alhucema" (*Lavandula latifolia* Vill.) (2). *Chem. Pharm. Bull.* 1990;38:2283-2284.
24. Duraipandiyan V, Gnanasekar M, Ignacimuthu S. Antifungal activity of triterpenoid isolated from *Azima tetraantha* leaves. *Folia Histochem. Cytobiol.* 2010;48(2):311-313.
25. Melo CM, Morais TC, Tomé AR, Brito GA, Chaves MH, Rao VS, et al. Anti-inflammatory effect of α,β -amyrin, a triterpene from *Protium heptaphyllum*, on cerulein-induced acute pancreatitis in mice. *Inflamm. Res.* 2011;60(7):673-681.
26. Zheng Y, Huang W, Yoo JG, Ebersole JL, Huang CB. Antibacterial compounds from *Siraitia grosvenorii* leaves. *Nat. Prod. Res.* 2011;25(9):890-897.