



## Composição química volátil e não-volátil de *Eupatorium ballotifolium* Kunth, Asteraceae

Maria Rose Jane R. Albuquerque,<sup>\*1</sup> Hélcio S. dos Santos,<sup>1</sup> Elnatan B. de Souza,<sup>1</sup>  
Rochanne M. da Silva,<sup>1</sup> Jane Eire Silva A. de Menezes,<sup>2</sup> Otilia Deusdênia L. Pessoa,<sup>3</sup>  
Raimundo Braz-Filho,<sup>4</sup> Sônia Maria O. Costa<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Curso de Licenciatura em Química, Coordenação de Química, Universidade Estadual Vale do Acaraú,  
Caixa Postal D-3, Campus da Betânia, 62040-370 Sobral-CE, Brasil,

<sup>2</sup>Curso de Licenciatura em Química, Faculdade de Educação de Itapipoca, Av. Monsenhor Tabosa s/n, 62500-000  
Itapipoca-CE, Brasil,

<sup>3</sup>Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, Universidade Federal do Ceará, Caixa Postal 12200,  
Campus do Pici, 60020-181 Fortaleza-CE, Brasil,

<sup>4</sup>Setor de Química de Produtos Naturais, Universidade Estadual do Norte Fluminense, 28013-602 Campos dos  
Goytacazes-RJ, Brasil,

<sup>5</sup>Curso de Licenciatura em Química, Coordenação de Química, Universidade Estadual do Ceará, Campus do Itaperi,  
60740-903 Fortaleza-CE, Brasil.

**RESUMO:** Este trabalho descreve a composição química dos óleos essenciais e o isolamento de onze substâncias de *Eupatorium ballotifolium* Kunth, Asteraceae. Os óleos essenciais foram obtidos por hidrodestilação, analisados por CG-EM e avaliados quanto às suas atividades frente à enzima acetilcolinesterase. O rendimento dos óleos foi de 0,11% para as folhas e 0,03% para os talos. Os principais constituintes dos óleos foram os sesquiterpenos  $\beta$ -cariofileno (24,9 e 22,2%), espatulenol (17,7 e 12,4%) e epóxi-*allo*-aromadendreno (23,0 e 23,6%). Do extrato hexânico da parte aérea foi isolada a mistura de  $\beta$ -sitosterol e estigmasterol, incluindo suas formas glicosiladas, e os triterpenos acetato de taraxasterila e taraxasterol, enquanto, do extrato etanólico foram isolados os flavonóides nepetina and 3-*O*-glicosil-quercetina. Do extrato hexânico das raízes foram isolados os triterpenos *epi*-friedelanol e damara-20,24-dien-3 $\beta$ -ol e do extrato etanólico a cumarina 11-hidroxi-11,12-di-hidroobliquina. As estruturas de todos os compostos foram determinadas usando técnicas espectroscópicas tais como IV, EM e RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C.

**Unitermos:** *Eupatorium ballotifolium*, Asteraceae, óleo essencial, atividade acetilcolinesterásica.

**ABSTRACT:** This work describes the chemical composition of the essential oils and the isolation of eleven substances from *Eupatorium ballotifolium* Kunth, Asteraceae. The essential oils were obtained by hydrodistillation, analyzed by GC/MS and evaluated towards the acetylcholinesterase enzyme. The oils yield was of 0.11% for the leaves and 0.03% for the stems. The main constituents of the oils were the sesquiterpenes  $\beta$ -caryophyllene (24.9 and 22.2%), spathulenol (17.7 and 12.4%) and epoxy-*allo*-aromadendrene (23.0 and 23.6%). From the hexane extract of the aerial part were isolated a mixture of sitosterol and stigmasterol, its glucosides, and the triterpenes taraxasteryl acetate and taraxasterol, while from the ethanol extract were obtained the flavonoids nepetin and 3-*O*-glucoside-quercetin. The triterpenes *epi*-friedelanol and dammara-20,24-dien-3 $\beta$ -ol were obtained from the hexane extract of roots, while the coumarin 11-hydroxy-11,12-di-hydroobliquine was obtained from the ethanol extract. The structures of all compounds were determinate based on spectroscopic methods such as IR, MS and <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR

**Keywords:** *Eupatorium ballotifolium*, Asteraceae, essential oil, acetylcholinesterase activity.

### INTRODUÇÃO

O gênero *Eupatorium* (tribo Eupatorieae, subtribo Eupatoriinae), um dos maiores da família Asteraceae, é representado por aproximadamente 1200 espécies,

distribuídas principalmente na Europa, Ásia e América do Norte (Zhang et al., 2008). As espécies pertencentes a esse gênero são utilizadas na medicina popular, em diferentes

\*E-mail: maria.jane@uvanet.br, Tel. +55 85 3081 3559.

partes do mundo, no tratamento de úlceras estomacais e dores de cabeça (El-Seedi et al., 2002), malária (Lang et al., 2001), inflamação (Yang et al., 2004) e doenças do fígado (Carreras et al., 1998). Corroborando o uso popular, a literatura tem demonstrado que extratos e óleos essenciais, bem como substâncias com propriedades biológicas têm sido obtidos a partir de espécies de *Eupatorium* (Shen et al., 2005; De Las Herras et al., 1998; Habtemariam 1998). Muitos extratos de plantas pertencentes a esse gênero, especialmente aqueles ricos em lactonas sesquiterpênicas, podem ser fontes promissoras para o desenvolvimento de novas drogas (Zhang et al., 2008). Estudos fitoquímicos prévios envolvendo espécies de *Eupatorium* descrevem, entre muitos outros compostos, o isolamento de lactonas sesquiterpênicas (Boeker et al., 1986; Huo et al., 2004), flavonóides (Muschieta et al., 1994), diterpenos (González et al., 1990), compostos benzofurânicos (Habtemariam, 1998), alcalóides pirrolizidínicos (Lang et al., 2001) e cromenos (Gómez et al., 1982). Aspectos químicos e quimiotaxonômicos, sobre a subtribo Eupatoriinae, a qual inclui quatro gêneros, *Austroeupatorium*, *Stomatanthes*, *Hatschbiella* e *Eupatorium* têm sido revisados (Herz, 2001).

Como parte de um estudo multidisciplinar, cujo objetivo é investigar a composição química e atividade biológica de óleos essenciais de plantas da família Asteraceae, investigou-se a composição química de *E. pauciflorum* (sin. *Praxelis pauciflora*), *E. betonicaeforme* (sin. *Barrosoa betonicaeformis*) e *E. ballotifolium* (sin.: *Louthergia ballotaefolia*) (Albuquerque et al., 2006, 2005, 2004, 2001; Militão et al., 2004). Neste trabalho é descrita a composição química dos extratos de *E. ballotifolium*, incluindo seus óleos essenciais, desta vez envolvendo plantas coletadas em dois municípios do estado do Ceará, Meruoca e Acarape. Adicionalmente, foi avaliada qualitativamente, a atividade anticolinesterase dos óleos essenciais das folhas e talos da referida espécie.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Material vegetal

A planta, em estágio de floração, foi coletada na serra da Meruoca, Sobral-CE, em março de 2008. A autenticação botânica foi feita pelos professores Edson Paula Nunes (Departamento de Biologia, Universidade Federal do Ceará) e Elnatan Bezerra de Souza (Universidade Estadual Vale do Acaraú). A exsiccata de nº 27.646, encontra-se depositada no Herbário Prisco Bezerra da Universidade Federal do Ceará.

### Instrumentação e material cromatográfico

Os pontos de fusão foram obtidos em equipamento de Microdeterminação digital da Mettler Toledo com placa aquecedora FP82HT e central de processamento FP90.

As determinações foram realizadas a uma velocidade de aquecimento de 2 °C/min e não foram corrigidas. Os espectros de absorção na região do infravermelho foram registrados em espectrômetro Perkin-Elmer, modelo 1000-FT, utilizando-se pastilhas de brometo de potássio (KBr). Os espectros de RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C, uni- e bidimensionais foram obtidos em espectrômetro Bruker, modelo DRX-300 (300 MHz para <sup>1</sup>H e 75 MHz para <sup>13</sup>C) e Avance DRX-500 (500 MHz para <sup>1</sup>H e 125 MHz para <sup>13</sup>C). Os espectros de massas dos óleos essenciais foram obtidos em espectrômetro de massa Hewlett-Packard, modelo HP-5971 A, acoplado a cromatógrafo gás-líquido, modelo HP-5890 A, série II (CG/EM), provido de coluna capilar DB-5 com 25,0 m de comprimento, 0,20 mm de diâmetro interno, utilizando um gradiente de aumento de temperatura de 4 °C/min de 50 a 180 °C e 20 °C/min de 180 a 280 °C, sendo a temperatura do injetor de 250 °C. Os espectros de massa dos constituintes não-voláteis foram obtidos em espectrômetro de massa Shimadzu, modelo QP 5000, DI-50, por impacto eletrônico a 70 eV. Nas cromatografias de adsorção utilizou-se gel de sílica 60 da Vetec (Ø µm 70-230 mesh) e Merck (Ø µm 230-400), enquanto nos fracionamentos cromatográficos por exclusão molecular foi empregado Sephadex LH-20. As cromatografias em camada delgada analítica (CCDA) foram realizadas com gel de sílica 60, (Ø µm 5-40, Merck) com indicador de fluorescência na faixa de 254 nm (F<sub>254</sub>), sobre cromatofolha de poliéster. As substâncias foram reveladas com solução de vanilina/ácido perclórico/EtOH, seguida de aquecimento em estufa (≈100 °C), por aproximadamente 5 min. As rotações ópticas foram obtidas utilizando Polarímetro digital da Perkin-Elmer 341 à temperatura de 25 °C e concentração de 1 mg para 2 mL de solvente.

### Extração dos óleos essenciais

Porções de folhas (185,68 g) e talos (224,02 g) de *E. ballotifolium* foram acondicionadas, separadamente em balão de 5 L, juntamente com 1,5 L de água e submetidos ao processo de hidrodestilação em aparelho tipo-Clevenger por um período de 2 h. Os óleos obtidos foram secos com sulfato de sódio anidro (~1 g), filtrados e mantidos sob refrigeração antes da análise. Óleos amarelados e com odor agradável foram obtidos em teores de 0,11% (óleo I, folhas) e 0,03% (óleo II, talos), calculado com base no peso do material vegetal fresco.

### Extração e isolamento dos constituintes

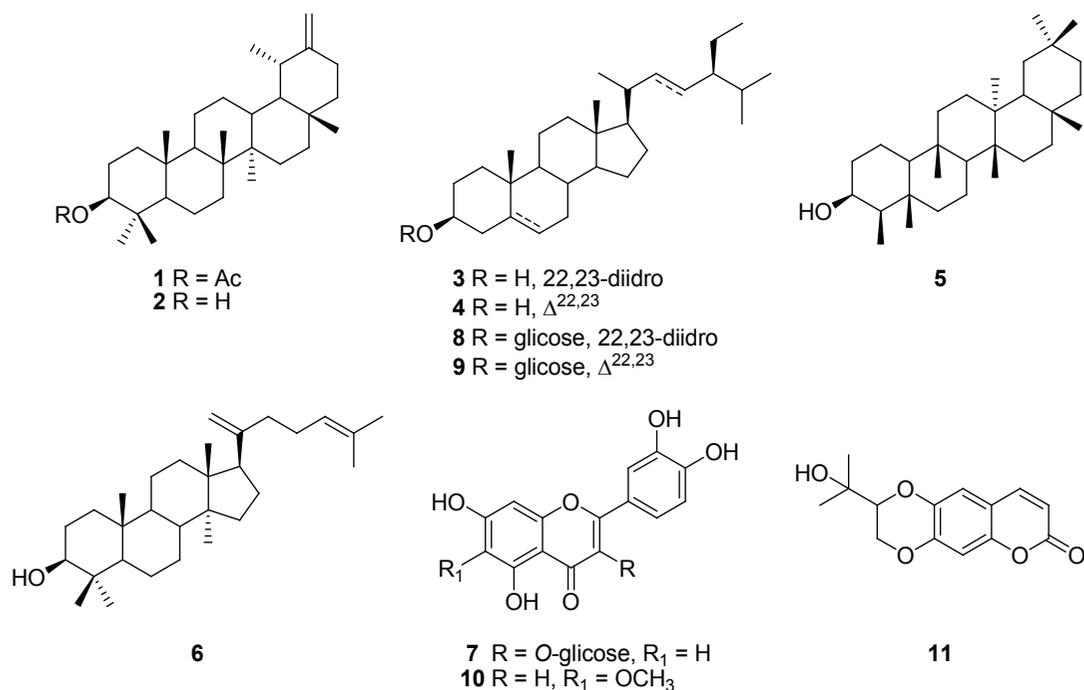
A parte aérea (1200 g) e raízes (600 g) de *E. ballotifolium* foram secas à temperatura ambiente, trituradas e submetidas à extração exaustiva com hexano a frio, seguido de etanol. As soluções obtidas de cada solvente foram destiladas sob pressão reduzida, resultando nos respectivos extratos: hexânicos (21,6 g, parte aérea, Ext. A; 4,3 g, raízes, Ext. B) e EtOH (50,3 g, parte aérea,

Ext. C; 16,1 g, raízes, Ext. D). O extrato A (21,6 g), após fracionamento cromatográfico sobre gel de sílica (80,0 g), resultou nas seguintes frações: éter de petróleo (8,1 g), hexano (0,7 g),  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (6,6 g), AcOEt (5,7 g) e MeOH (0,3 g). Durante a evaporação da fração éter de petróleo formou-se um precipitado, o qual após filtração à vácuo e recristalização em acetona resultou no isolamento de **1** (1,5 g, p.f. 215-217 °C), identificado como o triterpeno acetato de taraxasterila (Ahmad & Rahman, 1994). A fração hexânica (0,7 g), após fracionamento cromatográfico sobre gel de sílica utilizando hexano, hexano- $\text{CHCl}_3$  (9:1, 1:1) e  $\text{CHCl}_3$ , forneceu a substância **2** (6,0 mg, p.f. 255-257 °C), identificada como o triterpeno taraxasterol (Mahato & Kundu, 1994), por eluição com hexano- $\text{CHCl}_3$  9:1. A fração  $\text{CHCl}_3$  (6,6 g), após fracionamento cromatográfico utilizando a mesma metodologia, resultou em 2,01 g da mistura dos esteróides  $\beta$ -sitosterol (**3**) e estigmasterol (**4**), por eluição com hexano- $\text{CHCl}_3$  1:1. O extrato B (4,3 g) foi submetido a cromatografia sobre gel de sílica (74,6 g), utilizando os solventes éter de petróleo, AcOEt e MeOH, puros ou em misturas binárias. Foram obtidas 74 frações de 30 mL, as quais foram concentradas sob pressão reduzida e analisadas por CCDA. A fração resultante da eluição com éter de petróleo/AcOEt 9:1, forneceu a substância **5** (40,1 mg; p.f. 276-278 °C; lit. 279-281 °C), identificada como o triterpeno epi-friedelanol (Kiem et al., 2004). As frações 14 a 22, resultantes da eluição com éter de petróleo/AcOEt nas concentrações de 9:1 e 8:2, foram reunidas, obtendo-se 1,3 g de material que foi sujeito a fracionamento cromatográfico sobre gel de sílica (30,2 g) utilizando os solventes hexano e AcOEt, puros ou em misturas binárias, seguido de MeOH. Deste fracionamento foram obtidas 68 frações de 10 mL. As frações 21-25 (70,1 mg), resultantes da eluição com hexano/AcOEt 1:1, após recristalização em acetona, resultou no composto **6** (19,2 mg; p.f. 118-120 °C; lit. 133,0-134,0 °C), identificado como o triterpeno damara-20,24-dien-3 $\beta$ -ol (Leong & Harrison, 1999). O extrato C (50,3 g) foi submetido a fracionamento cromatográfico sobre 75,2 g de gel de sílica, utilizando  $\text{CHCl}_3$ , AcOEt e MeOH, como eluentes. A evaporação dos solventes resultou nas frações  $\text{CHCl}_3$  (39,6 g), AcOEt (1,4 g) e MeOH (2,9 g). A fração  $\text{CHCl}_3$  (39,6 g) foi fracionada sobre 93,8 g de gel de sílica, utilizando os solventes hexano, AcOEt, acetona e MeOH, puros ou em misturas binárias. Este fracionamento resultou em 83 frações de 50 mL, que foram concentradas sob pressão reduzida e analisadas por CCDA. Entre as frações reunidas, na de número 57-78 houve a formação de um precipitado que após adição de hexano/AcOEt 5%, seguido de filtração, resultou no isolamento do composto **7** (500,0 mg; p.f. 259-260 °C; lit. 276-278 °C), identificado como o flavonóide nepetina (Agrawal, 1989). A fração 81 (11,3 g), foi acondicionada sobre 70,0 g de gel de sílica e sujeita a fracionamento cromatográfico empregando os solventes hexano, AcOEt, e MeOH, puros ou em misturas binárias, resultando em 106 frações de 30 mL. As frações 77-81, obtidas com

AcOEt, foram reunidas após análise em CCDA. Durante a evaporação do solvente ocorreu a formação de um precipitado que foi filtrado, resultando na mistura (8,9 mg) dos glicosídeos sitosterol (**8**) e estigmasterol (**9**). A fração AcOEt (1,4 g) foi disposta sobre 21,0 g de gel de sílica e submetida a eluições com os solventes hexano,  $\text{CHCl}_3$ , AcOEt, acetona e MeOH, puros ou em misturas binárias. Após análise em CCDA, obteve-se as frações:  $\text{CHCl}_3$  I (410,9 mg),  $\text{CHCl}_3$  II (258,0 mg)  $\text{CHCl}_3$ /AcOEt 1:1 (84,8 mg), AcOEt/acetona 1:1 (473,1 mg) e MeOH I (172,2 mg). A fração  $\text{CHCl}_3$  II, após cromatografias em Sephadex LH-20 ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ /MeOH 1:1) forneceu a substância **10** (17,6 mg; p.f. 233-234 °C; lit. 225,0-227,0 °C), identificada como o flavonóide isoquercitrina (Markham et al., 1978). O extrato D (16,1 g) foi submetido a cromatografia sobre gel de sílica (34,0 g) utilizando os solventes  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , AcOEt, acetona e MeOH. A evaporação do solvente resultou nas frações  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (1,7 g), AcOEt (3,4 g), acetona (3,1 g) e MeOH (0,9 g). A fração  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (1,7 g) foi acondicionada sobre 36,5 g de gel de sílica e eluída com os solventes hexano, AcOEt, acetona e MeOH, puros ou em misturas de escala crescente de polaridade. Foram coletadas 85 frações de 10 mL, que após análise em CCDA foram reunidas com base em seus Rf's. As frações 42-46, obtidas da eluição com hexano-AcOEt 6:4, foram reunidas (58,6 mg) e submetidas a várias colunas em Sephadex LH-20, utilizando uma mistura binária dos solventes acetona/MeOH 1:1, resultando no isolamento do composto **11** (11,0 mg; p.f. 150-151 °C; lit. 167 °C), identificado como a cumarina 11-hidroxi-11,12-di-hidroobliquina (Bohlmann et al., 1980; Herz et al., 1981).

#### Teste da atividade inibitória da enzima acetilcolinesterase

A atividade inibitória da enzima acetilcolinesterase (AChE), foi realizada através do método de Ellman (1961), modificado por Rhee e colaboradores (2001). Este bioensaio consiste na aplicação das amostras em CCDA, seguida da pulverização da placa com o reagente de Ellman (DTNB) e uma solução de ATCI em tampão apropriado. Em seguida, pulveriza-se a placa com a enzima AChE (3 U/mL). Decorridos aproximadamente 5 min, a inibição enzimática pode ser constatada pela ausência da cor amarela, e concomitante, o surgimento de uma mancha branca. O método de Ellman é um procedimento fidedigno para atividade da acetilcolinesterase e pode ser rotineiramente empregado para avaliar a atividade inibitória de constituintes químicos. Para a realização deste ensaio foram preparadas as seguintes soluções: (A) 50 mM Tris/HCl pH 8 (solução tampão); (B) 50 mM Tris/HCl pH 8, contendo 0,1% de albumina sérica bovina (BSA) (solução tampão); (C) 1 mM de ácido 5,5'-ditiobis-[2-nitrobenzóico] (DTNB ou reagente de Ellman) e (D) 1 mM de iodeto de acetiltiocolina (ATCI). A enzima AChE



(C-3389 sigma) previamente liofilizada foi dissolvida na solução tampão (A) para fazer uma solução estoque de 1000 U/mL. Para se fazer a diluição da enzima utilizou-se a solução tampão (B). Aliquotas de 5  $\mu$ L dos óleos essenciais I e II dissolvidos em clorofórmio, na concentração de 2 mg/mL, foram aplicados em CCDA (DC-Alufolien, Silicagel 60 F254, 0,2 mm de espessura da Merck). Em seguida pulverizou-se a placa com as soluções (C) e (D). Após completa secagem das soluções, pulverizou-se a placa com a enzima AChE (3 U/mL). Decorridos aproximadamente 5 min, observou-se o desaparecimento da cor amarela e o aparecimento de manchas brancas. Como controle positivo foi usado a fisostigmina.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A composição química dos extratos hexânico e etanólico de *E. ballotifolium*, originário do norte do Brasil e Venezuela foi previamente investigada, tendo sido isolados lactonas, sesquiterpenos, derivados do timol, uma cumarina e um triterpeno, o qual na época, não foi caracterizado (Bohlmann et al., 1980; Triana, 1984). Apesar disto resolveu-se investigar os extratos de *E. ballotifolium* do Nordeste do Brasil, região cujo principal bioma é a caatinga. Conforme os resultados, nenhuma lactona foi isolada, entretanto, triterpenos e flavonóides foram os constituintes predominantes nos extratos de *E. ballotifolium*, de origem do nordeste do Brasil. Do extrato hexânico das raízes foram isolados os triterpenos friedelanol e damara-20,24-dien-3 $\beta$ -ol, do extrato etanólico foi obtido a cumarina 11-hidroxi-11,12-di-hidroobliquina. Os compostos **2**, **5**, **6** e **7** estão sendo relacionados pela primeira vez a partir de *E. ballotifolium*.

Os óleos essenciais das partes aéreas obtidos das folhas e talos de *E. ballotifolium*, coletados em abril de 2003, apresentaram rendimentos de 0,11 e 0,03%. A análise por CG-EM permitiu a identificação e a quantificação de onze compostos (Adams, 2007), organizados por ordem de eluição em coluna DB-5, correspondendo a 83,2 e 96,4% da composição química dos óleos (Tabela 1). Foi observado que os óleos essenciais das partes aéreas e talos não apresentaram diferenças na composição química tendo como principais constituintes  $\beta$ -cariofileno (24,9 e 22,2%), espatulenol (17,7 e 12,4%) e epóxi-*allo*-aromadendreno (23,0 e 23,6%). Os óleos

**Tabela 1.** Componentes químicos identificados nos óleos essenciais das folhas (óleo I) e talos (óleo II) de *Eupatorium ballotifolium*.

Constituintes	IK	Óleo I (%)	Óleo II (%)
metil timol	1234	-	7,8
$\delta$ -elemeno	1336	3,0	-
$\beta$ -elemeno	1399	-	3,9
$\beta$ -cariofileno	1422	24,9	22,2
$\alpha$ -humuleno	1454	1,9	-
<i>allo</i> -aromadendreno	1462	3,9	5,1
germacreno D	1484	6,1	5,2
$\delta$ -cadineno	1520	2,7	7,9
espatulenol	1577	17,7	12,4
<i>epi</i> - $\alpha$ -muurolol	1627	-	8,3
epoxi- <i>allo</i> -aromadendreno	1641	23,0	23,6
Total identificado		83,2	96,4

IK = Índice de Kovats

foram predominantemente constituídos de sesquiterpenos, demonstrando a ausência de derivados de outras rotas metabólicas como fenilpropanóides e compostos alifáticos, além de cromenos e sesquiterpenos furânicos, encontrados em óleos essenciais de outras espécies de *Eupatorium* (Albuquerque et al, 2004; Zhang et al, 2008).

A atividade anticolinesterase apresentada pelos óleos essenciais das folhas e talos de *E. ballotifolium* foram avaliadas em CCDA, frente à enzima acetilcolinesterase. O resultado deste bioensaio mostrou que tanto o óleo essencial das folhas como dos talos foram ativos. Neste ensaio utilizou-se como controle positivo a fisostigmina. Os resultados demonstram o potencial anticolinesterásico dos óleos essenciais de *E. ballotifolium* como forte candidatos naturais que possam vir a auxiliar no tratamento do mal de Alzheimer.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem as Instituições de fomento CNPq, FUNCAP e PRONEX pelo apoio financeiro para a realização deste trabalho e ao CENAUREMN na pessoa do Prof. Edilberto Rocha Silveira pela obtenção dos espectros e pelas sugestões na elaboração do manuscrito.

## REFERÊNCIAS

- Adams, RP 2007, *Identification of essential oil components by gás chromatography/mass spectrometry*. 4<sup>th</sup> ed. Carol Stream, Illinois.
- Albuquerque MRJR, Pires AML, Pessoa ODL, Silveira ER 2006. Terpenoids, flavonoids and other constituents of *Eupatorium betonicaeforme* (Asteraceae). *J Braz Chem Soc* 17: 68-72.
- Albuquerque MRJR, Silveira ER, Uchôa DEA, Lemos TLG, Souza EB, Santiago GMP, Pessoa ODL 2004. Chemical composition and larvicidal activity of the essential oils from *Eupatorium betonicaeforme* (D.C.) Baker (Asteraceae). *J Agric Food Chem* 52: 6708-6711.
- Albuquerque MRJR, Silveira ER, Lemos TLG, Souza EB, Nascimento RF, Pessoa ODL 2005. Volatile composition of *Eupatorium pauciflorum* H.B.K. (Asteraceae). *Flavour Frag J* 21: 92-94.
- Albuquerque, MRJR, Souza EB; Mesquita EF, Nunes EP, Cunha NA, Silveira ER 2001. Volatile constituents from leaves of *Vernonia chalybaea* Mart. and *Eupatorium ballotaefolium* H.B.K. *J Essent Oil Res* 13: 376-377.
- Agrawal PK 1989. *Carbon-13 NMR of flavonoids*. Amsterdam: Elsevier.
- Ahmad VU, Atta-ur-Rahman 1994. *Handbook of natural products data – Pentacyclic triterpenoids*. Amsterdam: Elsevier.
- Boeker R, Jakupovic J, Bohlmann F, King RM, Robinson H 1986. Further heliangolides and guaianolides from *Eupatorium altissimum*. *Phytochemistry* 25: 1669-1672.
- Bohlmann F, Zdero C, King RM, Robinson H 1980. New heliangolides from *Conocliniopsis prasiifolia*. *Phytochemistry* 19: 1547-1549.
- Carreras CR, Rossomando PC, Giordano OS 1998. ent-Labdanes in *Eupatorium buniifolium*. *Phytochemistry* 48: 1031-1034.
- De Las Heras B, Slowing K, Benedi J, Carretero E, Ortega T, Toledo C, Bermejo P, Iglesias I, Abad MJ, Gómez-Serranillos P, Liso PA, Villar A, Chiriboga X 1998. Antiinflammatory and antioxidant activity of plants used in traditional medicine in Ecuador. *J Ethnopharmacol* 61: 161-166.
- Ellman GL 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol* 7: 88-95.
- El-Seedi HR, Ohara T, Sata N, Nishiyama S 2002. Antimicrobial diterpenoids from *Eupatorium glutinosum* (Asteraceae). *J Ethnopharmacol* 81: 293-296.
- Gómez F, Quijano J, Calderó JS, Perales A, Ríos T 1982. 2,2-Dimethylchromenes from *Eupatorium aschembornianum*. *Phytochemistry* 21: 2095-2097.
- González AG, Barrera JB, Díaz JG, Pérez EMR, Yanes AC, Rauter P, Pozo J 1990. Diterpenes and other constituents of *Eupatorium salvia*. *Phytochemistry* 29: 321-323.
- Habtemariam S 1998. Cistifolin, an integrin-dependent cell adhesion blocker from the anti-rheumatic herbal drug, gravel root (rhizome of *Eupatorium purpureum*). *Planta Med* 64: 683-685.
- Herz W 2001. Chemistry of the Eupatoriinae. *Biochem Syst Ecol* 29: 1115-1137.
- Herz W, Govindan SV, Kumar N 1981. Sesquiterpene lactones and other constituents of *Eupatorium lancifolium* and *E. semiserratum*. *Phytochemistry* 20: 1343-1347.
- Herz W, Kulanthaivel P 1982. Flavones from *Eupatorium leucolepis*. *Phytochemistry* 21: 2363-2366.
- Huo J, Sheng-Ping Y, Ding J, Yue JM 2004. Cytotoxic sesquiterpene lactones from *Eupatorium lindleyanum* *J Nat Prod* 67: 1470-1475.
- Kiem PV, Minh CV, Huong HT, Nam NH, Lee JJ, Kim YH 2004. Pentacyclic triterpenoids from *Mallotus apelta*. *Arch Pharm Res* 27: 1109-1113.
- Lang G, Passreiter CM, Medinilla B, Castillo JJ, Witte L 2001. Non-toxic pyrrolizidine alkaloids from *Eupatorium semialatum*. *Biochem Syst Ecol* 29: 143-147.
- Leong YW, Harrison LJ 1999. (20R,23E)-Eupha-8,23-diene-3 $\beta$ ,25-diol from *Tripetalum cymosum*. *Phytochemistry* 50: 849-857.
- Mahato SB, Kundu AP 1994. 13C NMR spectra of pentacyclic triterpenoids - A compilation and some salient features. *Phytochemistry* 37: 1517-1575.
- Markham KR, Ternai B, Stanley R, Geiger H, Mabry TJ 1978. Carbon-13 NMR studies of flavonoids-III. Naturally occurring flavonoid glycosides and their acylated derivatives. *Tetrahedron* 34: 1389-1397.
- Militão GCG, Albuquerque MRJR, Pessoa ODL, Pessoa C, Moraes MEA, Moraes MO, Costa-Lotufu LV 2004. Cytotoxic activity of nepetin, a flavonoid from *Eupatorium ballotaefolium* HBK *Pharmazie* 59: 965-966.

- Muschietti L, Martino V, Ferraro G, Coussio J 1994. 5,7,5'-Trihydroxy-3,6,2',4'-tetramethoxyflavone from *Eupatorium buniifolium*. *Phytochemistry* 36: 1085-1086.
- Rhee IK, Meent MV, Ingkaninan K, Verpoorte R 2001. Screening for acetylcholinesterase inhibitors from Amaryllidaceae using silica gel thin-layer chromatography in combination with bioactivitystainin. *J Chromatogr A* 915: 217-223.
- Shen YC, Lo KL, Kuo YH, Khalil AT 2005. Cytotoxic sesquiterpene lactones from *Eupatorium kiirunense*, a coastal plant of Taiwan. *J Nat Prod* 68: 745-750.
- Triana J 1984. Furanoheliangolides and flavonoids from *Louthergia ballotaefolia*. *Phytochemistry* 23: 2072-2074.
- Yang SP, Huo J, Wang Y, Lou LG, Yue JM 2004. Cytotoxic sesquiterpenoids from *Eupatorium chinense*. *J Nat Prod* 67: 638-643.
- Zhang ML, Wu M, Zhang JJ, Irwin D, Gu YC, Shi QW 2008. Chemical constituents of plants from the genus *Eupatorium*. *Chem Biodivers* 5: 40-55