



Estudo Fitoquímico e Avaliação da Atividade Antimicrobiana de *Talauma ovata* (Magnoliaceae)

Maria É.A. STEFANELLO ^{1*}, Marcos J. SALVADOR ², Izabel Y. ITO ³, Andréia MONTOIA ¹,
Camila J.F. SILVA ¹ & Letícia F.L. BARROS ¹

¹ Departamento de Química, Universidade Federal do Paraná,
81531-990, Curitiba, PR, Brasil.

² Instituto de Biologia, Departamento de Fisiologia Vegetal, Curso de Farmácia,
Universidade Estadual de Campinas, 13083-970, Campinas, SP, Brasil,

³ Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas,
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, USP, 14040-903, Ribeirão Preto, SP, Brasil.

RESUMO. O estudo fitoquímico de cascas do tronco e folhas de *Talauma ovata* St. Hil. (Magnoliaceae) levou ao isolamento das lactonas sesquiterpênicas costunolídeo e partenolídeo e dos alcalóides aporfinícos liriodenina, lanuginosina, dicentrinona, O-metilmoschatolina e N-acetilxilopina. Os extratos brutos, frações de extratos obtidas por partição com solventes e substâncias isoladas foram avaliadas pelo método de difusão em ágar, utilizando-se 15 bactérias Gram-positivas, 3 bactérias Gram-negativas e 3 fungos. A maior atividade foi detectada na fração em diclorometano do extrato em etanol das cascas, a qual foi ativa contra bactérias Gram-positivas. Nenhum extrato ou fração inibiu o crescimento de bactérias Gram-negativas ou fungos. Partenolídeo e O-metilmoschatolina apresentaram boa atividade contra várias cepas de *Staphylococcus aureus*, com concentração inibitória mínima (CIM) variando entre 100 e 25 µg/mL. O alcalóide N-acetilxilopina apresentou moderada atividade antifúngica (CIM = 250 µg/mL). Liriodenina, lanuginosina, dicentrinona e O-metilmoschatolina estão sendo descritos pela primeira vez nesta espécie.

SUMMARY. "Phytochemical Study and Antimicrobial Activity Evaluation of *Talauma ovata*". Petroleum ether and ethanol extracts of trunk bark and leaves from *Talauma ovata* St. Hil. (Magnoliaceae) were submitted to chromatographic separation. This procedure furnished the sesquiterpene lactones costunolide and parthenolide and the aporphine alkaloids liriodenine, lanuginosine, dicentrinone, O-methylmoschatoline and N-acetylxylopine. Crude extracts, fractions from sequential partition with solvents and isolated compounds were screened against 15 Gram-positive bacteria, 3 Gram-negative bacteria and 3 yeasts, using the agar well-diffusion technique. The most activity was detected in the fraction in dichloromethane from ethanol extract of trunk bark, which was active against Gram-positive bacteria, but not against Gram-negative bacteria or fungi. Parthenolide and O-methylmoschatoline showed good and specific activity against several strains of *Staphylococcus aureus*, with minimum inhibitory concentration (MIC) varying from 100 to 25 µg/mL. The alkaloid N-acetylxylopine exhibited moderate activity against *Candida albicans* (MIC = 250 µg/mL). This is the first report of liriodenine, lanuginosine, dicentrinone and O-methylmoschatoline in *T. ovata*.

INTRODUÇÃO

Talauma ovata St. Hil. (Magnoliaceae), conhecida como baguaçu ou pinha-do-brejo, é uma árvore aromática, nativa do Brasil, que atinge até 30 metros de altura. Apresenta uma grande dispersão no país, sendo encontrada desde Minas Gerais até o Rio Grande do Sul. É uma planta típica de solos úmidos, ocorrendo nas matas ciliares de quase todas as formações florestais. Por ser uma espécie pioneira, adaptada a terrenos brejosos, tem sido recomendada

para a recuperação de áreas ciliares degradadas ¹. Na medicina popular as cascas do tronco são empregadas contra febre e as folhas para o tratamento de diabetes ².

Estudos fitoquímicos anteriores descreveram a presença da lactona sesquiterpênica costunolídeo nas raízes ³ e alcalóides, neolignanas e sesquiterpenos nas cascas do tronco ^{4,5}. O aroma dos frutos é caracterizado por um elevado teor de naftaleno, juntamente com monoterpenos e sesquiterpenos ⁶. Os óleos essenciais das cascas

PALAVRAS CHAVE: Alcalóides aporfinícos, Atividade antimicrobiana, Lactonas sesquiterpênicas, Magnoliaceae, *Talauma ovata*.

KEY WORDS: Antimicrobial activity, Aporphine alkaloids, Magnoliaceae, Sesquiterpene lactone, *Talauma ovata*.

* Autor a quem correspondência deve ser enviada: E-mail: elida@ufpr.br

e folhas são ricos em sesquiterpenos e apresentam atividade antimicrobiana, sendo que a composição e a atividade são variáveis ao longo do ano ^{7,8}. O extrato em hexano da madeira mostrou uma fraca atividade inseticida ⁹. Por outro lado, o extrato das folhas não apresentou atividade hipoglicêmica ¹⁰.

Embora já tenha sido bastante investigada, a maioria dos estudos envolvendo *T. ovata* não relaciona atividade farmacológica e composição química. Também não há estudos sobre a atividade antimicrobiana dos constituintes não voláteis. Por esses motivos, o presente trabalho teve como objetivos avaliar a atividade antimicrobiana de extratos e isolar e identificar os constituintes das frações mais ativas.

MATERIAL E MÉTODOS

Procedimentos gerais

Os espectros de ressonância magnética nuclear foram registrados em um espectrômetro Varian, modelo Gemini 2000 BB 300 MHz (¹H, 300 MHz e ¹³C, 75 MHz) usando-se clorofórmio deuterado como solvente e TMS como referência interna. Nas separações cromatográficas em coluna aberta foi utilizado gel de sílica (Merck, referência 7734). Nas análises e separações por cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC) e preparativa (CCDP) foi utilizado gel de sílica 60PF254 (Merck), com espessura de 0,25 mm e 1,0 mm, respectivamente. As placas foram reveladas com luz UV (254 e 366 nm), solução etanólica de ácido sulfúrico (5% v/v) e reagente de Dragendorff ¹¹.

Material vegetal

Folhas e cascas do tronco de *Talauma ovata* foram coletadas em Santos Dumont, MG, em outubro de 2003. Uma exsicata está depositada no herbário do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (R.Mello-Silva 2168).

Preparação dos extratos

O material vegetal, seco e moído (cascas 420,0 g; folhas 121,0 g) foi extraído a frio, sucessivamente com éter de petróleo e etanol. Os extratos em éter de petróleo (cascas 1,5 g; folhas 1,0 g) foram dissolvidos em hexano e submetidos à partição com metanol:água 9:1, sendo obtidas as frações em hexano (cascas 1,14 g; folhas 0,81 g) e em metanol (cascas 0,34 g; folhas 0,18 g). Os extratos etanólicos foram dissolvidos em etanol:água 1:1 e extraídos, sucessivamente, com diclorometano, acetato de etila e 1-butanol, rendendo as frações em diclorometano (cascas 3,15 g; folhas, 3,60 g), acetato de etila (cascas

2,2 g; folhas 1,8 g), 1-butanol (cascas 2,1 g; folhas 1,5 g) e as remanescentes frações hidroalcoólicas (cascas 14,8 g; folhas 4,1 g).

Isolamento dos constituintes

As frações em metanol de cascas e folhas foram reunidas (0,52g) e submetidas a cromatografia em coluna com gel de sílica, eluída com gradiente de acetato de etila em hexano. Foram recolhidas 50 frações de 10 mL. Após análise por CCDC foram formados 9 grupos de frações. O grupo V (35 mg) foi submetido a CCDP, eluída com hexano:acetato de etila 8:2, rendendo a substância **1**. O grupo VI (20 mg) forneceu a substância **2** (6 mg) após recristalização em metanol.

Parte da fração em diclorometano do extrato etanólico das cascas (1,2 g) foi dissolvida em clorofórmio e extraída com HCl 5%. A solução ácida foi separada, basificada com hidróxido de amônio e extraída novamente com diclorometano. A evaporação do solvente forneceu uma fração rica em alcalóides (0,25 g). Esta fração foi cromatografada em uma coluna com gel de sílica, eluída com gradiente de acetona em clorofórmio. Foram recolhidas 46 frações, reunidas em 9 grupos. O grupo II (10 mg) foi submetido a CCDP eluída com diclorometano-metanol 99:1, rendendo a substância **3** (2 mg). O grupo III (13 mg) foi submetido a CCDP eluída com diclorometano:metanol 98:2, rendendo a substância **6** (3 mg). O grupo IV (19 mg) foi submetido a CCDP, eluída com éter de petróleo:diclorometano:acetona 5:3:2, dando as substâncias **4** (8 mg) e **6** (2 mg). O grupo V (26 mg) foi submetido a CCDP eluída com clorofórmio-metanol 3:03, dando as substâncias **4** (6 mg) e **5** (4 mg). O grupo VIII (46 mg) continha uma mistura de alcalóides que sofreram decomposição durante o isolamento.

Uma outra parte da fração em diclorometano das cascas (1,2 g) foi submetida a acetilação com anidrido acético em piridina, seguindo o procedimento usual. A mistura acetilada (1,29 g) foi submetida à cromatografia em coluna com gel de sílica, eluída com gradiente de acetato de etila em diclorometano. Foram obtidos 11 grupos de frações. O grupo VIII (54 mg) foi submetido a CCDP eluída com hexano:diclorometano:acetona 3:5:2, resultando no isolamento da substância **7** (7,2 mg). Os grupos IX (277 mg) e X (102 mg) continham, respectivamente, as substâncias **4** e **6** já isoladas.

Avaliação da atividade antimicrobiana

A avaliação da atividade antimicrobiana foi

realizada *in vitro* sendo utilizadas como indicadoras 21 cepas de microrganismos, cepas padrão e cepas de campo, sendo dezoito cepas de bactérias (15 Gram-positivas e 3 Gram-negativas) e 3 de leveduras (Tabela 1). Estes microrganismos são mantidos como culturas puras no Laboratório de Microbiologia do Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FCFRP/USP), Ribeirão Preto-SP, Brasil.

A ação antimicrobiana frente a bactérias e fungos foi determinada pelo método de difusão em ágar empregando-se a técnica do poço em camada dupla ¹². A camada base foi obtida pela adição de 20,0 mL de Müller Hinton Medium (Difco)-MH e Brain Heart Infusion agar (Difco)-BHIIa, em placas de 20 x 150 mm. Após a solidificação foram adicionados 5,0 mL de MH inoculado com as cepas padrão e BHIIa com cepas de campo (5.10⁶ufc/mL) obtendo-se, assim, a camada *seed*. A seguir confeccionaram-se poços com 5,0 mm de diâmetro e em cada poço foram aplicados 20 µL das drogas-testes. Os extratos e frações de extratos foram avaliados na concentração de 5,0 mg/mL e as substâncias puras na concentração de 0,5 mg/mL. Para as substâncias ativas, a concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada. Nos testes foi utilizado como solvente dimetilsulfóxido (DMSO)/água destilada esterilizada (1:19). Como controles positivos foram utilizados bacitracina (0,20 UI/mL) e cetoconazol (100,0 µg/mL) e como controle negativo o solvente. Estas placas foram mantidas à temperatura ambiente, por cerca de 2 horas, e depois incubadas a 37 °C por 24, 48 h, para as bactérias e leveduras, respectivamente. As cepas de *Enterococcus* e *Streptococcus* foram incubadas sob condições de microaerofilia. Decorrido o período de incubação, as zonas de inibição do desenvolvimento microbiano foram mensuradas em termos de diâmetro (halo) e aro da borda do poço a início do desenvolvimento, em milímetros. Os experimentos foram realizados em triplicata, para cada cepa indicadora utilizada, e o resultado final apresentado como média aritmética.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os ensaios preliminares de atividade antimicrobiana (Tabela 1) mostraram que o extrato bruto mais ativo foi o extrato em éter de petróleo das cascas do tronco, o qual inibiu o crescimento de 12 bactérias Gram-positivas, com halos de inibição de 6-10 mm. A atividade dos extratos etanólicos foi consideravelmente menor e

o extrato das folhas em éter de petróleo foi completamente inativo nas condições testadas. Após o fracionamento por partição com solventes, a atividade antimicrobiana permaneceu em 4 frações: as duas frações em metanol dos extratos em éter de petróleo e as duas frações em diclorometano dos extratos etanólicos. Entre as frações ativas, a maior atividade foi encontrada na fração em diclorometano das cascas do tronco, que inibiu o crescimento de 15 microrganismos, com halos de inibição de 7-12 mm. Entre as frações metanólicas não houve diferença significativa entre folhas e cascas. As várias cepas de *Staphylococcus aureus* foram os microrganismos mais susceptíveis. Nenhuma amostra foi ativa contra bactérias Gram-negativas ou fungos. A maior atividade de extratos vegetais contra bactérias Gram-positivas já foi verificada em estudos anteriores ^{13,14}.

Os constituintes das frações mais ativas foram isolados por técnicas cromatográficas e identificados por comparação dos seus dados espectrométricos com dados da literatura. Foram obtidas sete substâncias conhecidas, identificadas como: costunolídeo (**1**) ¹⁵, partenolídeo (**2**) ¹⁶, liriodenina (**3**) ^{17,18}, lanuginosina (**4**) ¹⁸, dicentrinona (**5**) ¹⁹, O-metilmoschatolina (**6**) ¹⁷ e N-acetilxilopina (**7**) ¹⁸. Os compostos **1**, **2** e **7** já haviam sido reportados em *T. ovata* ⁴, enquanto que os demais estão sendo descritos pela primeira vez na espécie (Fig. 1).

Com exceção de **3**, as demais substâncias foram avaliadas contra os mesmos microrganismos utilizados nos ensaios preliminares. Destas, apenas **2** e **6** apresentaram atividade antibacteriana (Tabela 2). A lactona partenolídeo (**2**) exibiu atividade moderada contra *S. aureus* ATCC 25923 e *S. aureus* penicillinase +7. O alcalóide O-metilmoschatolina (**6**) inibiu o crescimento de um número maior de microrganismos, mas apenas do gênero *Staphylococcus*. Os microrganismos mais susceptíveis foram *S. aureus* ATCC 6538, *S. aureus* penicillinase +7 e *S. aureus* penicillinase -8 (CIM = 25 µg/mL). O alcalóide **7** apresentou moderada atividade antifúngica contra *Candida albicans*. Este composto não é um produto natural, mas um derivado acetilado do alcalóide xilopina (**8**), originalmente presente no extrato e que não pode ser obtido puro devido a sua rápida degradação. O alcalóide xilopina é conhecido por apresentar atividade antibacteriana ²⁰. O alcalóide **3** não foi avaliado neste trabalho devido a pequena quantidade obtida, mas é conhecido por possuir, entre outras, atividade antibacteriana ²¹.

A atividade antibacteriana de extratos e fra-

Microrganismos	Diâmetro do halo de inibição (mm)																P
	EP		HEX		MeOH		EtOH		DCM		AcOEt		BuOH		Et:H ₂ O		
	F	C	F	C	F	C	F	C	F	C	F	C	F	C	F	C	
<i>Kocuria rhizophila</i> ATCC 9341 ^a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	12	-	-	-	-	-	-	25
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538 ^a	-	7	-	-	10	11	-	6	6	12	-	7	-	-	-	-	23
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 ^a	-	6	-	-	7	7	6	6	6	12	-	7	-	-	-	-	29
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25213 ^a	-	10	6	-	10	10	6	7	6	10	-	9	-	-	-	-	29
<i>S. aureus penicillinase</i> +7+ ^b	-	6	-	-	7	7	-	6	6	10	-	6	-	-	-	-	25
<i>S. aureus penicillinase</i> -8- ^b	-	10	10	-	9	12	6	7	7	10	-	7	-	-	-	-	25
<i>Staphylococcus epidermis</i> 6ep ^b	-	7	-	-	6	8	6	6	-	10	-	6	-	-	-	-	31
<i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175 ^a	-	7	-	-	7	8	-	-	6	8	-	-	-	-	-	-	24
<i>Streptococcus mutans</i> Fab 3 ^b	-	6	-	-	7	7	-	-	6	7	-	-	-	-	-	-	22
<i>Streptococcus mutans</i> 11.1 ^b	-	6	6	-	10	7	-	-	-	12	-	-	-	-	-	-	22
<i>Streptococcus mutans</i> 9.1 ^b	-	6	7	-	8	6	-	-	-	8	-	-	-	-	-	-	22
<i>Streptococcus mutans</i> 9.31 ^b	-	6	-	-	8	6	-	-	6	8	-	-	-	-	-	-	22
<i>Streptococcus mutans</i> 11.22.1 ^b	-	6	6	-	8	8	-	-	-	8	-	-	-	-	-	-	24
<i>Streptococcus sobrinus</i> 180.3 ^b	-	-	-	-	6	-	-	-	-	10	-	-	-	-	-	-	23
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 10541 ^a	-	-	-	-	6	-	-	-	-	7	-	-	-	-	-	-	28
<i>Escherichia coli</i> ATCC 10538 ^a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	32
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 290D ^b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	32
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853 ^a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	22
<i>Candida albicans</i> ATCC 1023 ^a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	22
<i>Candida albicans</i> cas ^b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	40
<i>Candida tropicalis</i> ct ^b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	20

Tabela 1. Atividade antimicrobiana, em milímetros, dos extratos brutos e frações de extratos de folhas (F) e cascas do tronco (C) de *T. ovata*. - não ativo; ^a cepa-padrão; ^b cepa de campo; **EP:** extrato bruto em éter de petróleo; **HEX:** fração em hexano do extrato EP; **MeOH:** fração em metanol:água 9:1 do extrato EP; **EtOH:** extrato bruto em etanol; **DCM:** fração em diclorometano do extrato EtOH; **ACOEt:** fração em acetato de etila do extrato EtOH; **BuOH:** fração em 1-butanol do extrato EtOH; **Et:H₂O:** fração remanescente em etanol:água 1:1; **P:** controle positivo: bacitracina para bactérias e cetoconazol para fungos.

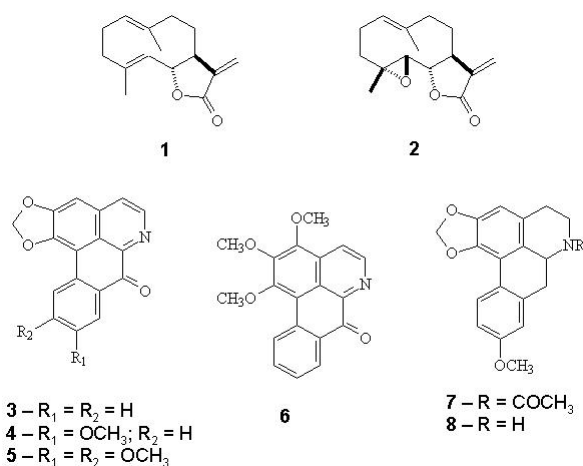


Figura 1. Estruturas das substâncias isoladas de *T. ovata*: costunolídeo (1), partenolídeo (2), liriodenina (3), lanuginosina (4), dicentrinona (5), O-metilmoschatolina (6), N-acetilxilopina (7) e xilopina (8).

ções de *T. ovata* é, ao menos em parte, devida a presença dos compostos partenolídeo (extratos em éter de petróleo, fração metanol) e O-metilmoschatolina (extrato em etanol, fração em diclorometano) que inibiram seletivamente várias cepas de *Staphylococcus aureus*. Os alcalóides xilopina e liriodenina, conhecidos por sua atividade antibacteriana, também devem ter contribuído para a atividade inibitória observada. Os extratos oriundos das cascas do tronco foram mais ativos que os respectivos extratos obtidos de folhas, embora as mesmas substâncias tenham sido detectadas em ambas as partes da plantas. Essa observação pode estar associada a uma maior concentração dos princípios ativos nas cascas do tronco.

Agradecimentos. Os autores agradecem ao Prof. Dr. Renato de Mello-Silva, do Instituto de Biociências da USP, pela coleta e identificação da planta, ao Departamento de Química da Universidade Estadual de Maringá pela obtenção dos espectros de RMN e à Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e à Fundação Universidade do Paraná (FUNPAR) pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

- Lorenzi, H. (2000) “*Árvores Brasileiras: Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil*”, Instituto Plantarum, Nova Odessa.
- Mors, W.B., C.T. Rizzini & N.A. Pereira (2000) “*Medicinal Plants of Brazil*”, Reference Publications Inc., Michigan.
- Hoffmann, J.J., S.J. Torrance, R.M. Wiedhopf & J.R. Cole (1977) *J. Pharm. Sci.* **66**: 883-4.

Microrganismos	CIM (µg/mL)		
	2	6	7
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538 ^a	-	25	-
<i>S. aureus</i> ATCC 25923 ^a	100	500	-
<i>S. aureus</i> ATCC 25213 ^a	-	50	-
<i>S. aureus penicillinase</i> + (7+) ^b	100	25	-
<i>S. aureus penicillinase</i> - (8-) ^b	-	25	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (6ep) ^b	-	100	-
<i>Candida albicans</i> ATCC 1023 ^a	-	-	250

Tabela 2. Concentração inibitória mínima (CIM) das substâncias 2, 6 e 7. (-) não ativo.

- Stefanello, M.E.A. & M.A. Alvarenga (1997) *Fitoterapia* **68**: 475-6.
- Stefanello, M.E.A, M.A. Alvarenga & I.N. Toma (2002) *Fitoterapia* **73**: 135-9.
- Stefanello, M.E.A & R. Mello-Silva (2005) *J. Essent. Oil Res.* **17**: 455-6.
- Apel, M.A., M.E.L.Lima, A. Souza, I. Cordeiro, M.C.M. Young, M.E.G. Sobral, I.B. Suffredini & P.R.H. Moreno (2006) *Pharmacologyonline* **3**: 376-83.
- Stefanello, M.E.A., M.J. Salvador, I.Y. Ito, A. Wisniewski Jr, E.L. Simionatto & R. Mello-Silva (2008) *J. Essent. Oil. Res.* **20**: 565-9.
- Coelho, A.A.M., J.E.Paula & L.S. Espíndola (2006) *Neotropical Entomology* **35**: 133-8.
- Morato, G.S., J.B. Calixto, L. Cordeiro, T.C.M. Lima, E.F. Morato, M. Nicolau, G.A. Rae, R. N. Takahashi, R.M.R. Valle & R.A. Yunes (1989) *J. Ethnopharmacol.* **26**: 277-86.
- Harbone, J.B. (1998) “*Phytochemical Methods. A guide to modern techniques of plant analysis*”, Chapman & Hall, London.
- Salvador, M.J., P.S. Pereira, S.C. França, R.C. Candido, I.Y. Ito & D.A. Dias (2003) *Brazilian J. Microbiol.* **34**: 131-6.
- Holtez, F.B., G.L. Pessini, N.R. Sanches, D.A.G. Cortez, C. V. Nakamura & B.P. Dias Filho (2002) *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **97**: 1027-31.
- Rios, J.L. & M.C. Recio (2005) *J. Ethnopharmacol.* **100**: 80-4.
- Li, A., A. Sun & R. Liu (2005) *J. Chromatogr. A* **1076**: 193-7.
- Castañeda-Acosta, J., N.H. Fischer & D. Vargas (1993) *J. Nat. Prod.* **56**: 90-8.
- Guinadeau, H., M. Leboeuf & A. Cavé (1983) *J. Nat. Prod.* **46**: 761-835.
- Guinadeau, H., M. Leboeuf & A. Cavé (1994) *J. Nat. Prod.* **51**: 389-474.
- Zhou, B., R.K. Johnson, M.R. Mattern, X. Wang, S.M. Hecht, H.T. Beck, A. Ortiz & D.G.I. Kingston (2000) *J. Nat. Prod.* **63**: 217-21.
- Hossain, M.S., A.J. Ferdous & C.M. Hasan (1993) *Bangladesh J. Bot.* **22**: 37-40.
- Khan, M.R., M. Kihara & A. D. Omoloso (2002) *Fitoterapia* **73**: 744-8.