



Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre cepas de *Cladosporium carrionii*

Antifungal activity of essential oils on strains of *Cladosporium carrionii*

Recebido em 17/07/2012

Aceito em 20/02/2013

 Camilla Pinheiro de Menezes^{1*} & Edeltrudes O. Lima²
¹ Mestranda do Programa de Pós-Graduação em produtos naturais e/ou sintéticos bioativos. Laboratório de Micologia, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, 58051-970, João Pessoa - PB, Brasil.

² Docente Orientadora. Laboratório de Micologia, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, 58051-970, João Pessoa - PB, Brasil

RESUMO

O gênero *Cladosporium* abrange muitas espécies de fungos contaminantes e oportunistas dematiáceos, estando relacionados com quadros de patologias em pacientes imunocomprometidos. Considerando a ampla atividade biológica apresentada pelos produtos naturais, óleos essenciais obtidos a partir de espécies vegetais têm sido investigados para determinação de suas atividades antimicrobianas. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antifúngica de óleos essenciais provenientes de espécies vegetais da família Lamiaceae sobre cepas de *Cladosporium carrionii*. A metodologia empregada foi a técnica de difusão em meio sólido. Os ensaios foram realizados em duplicata e os resultados considerados positivos quando as médias aritméticas dos halos de inibição apresentaram valores iguais ou superiores a 10 mm de diâmetro. Os resultados mostraram que os sete óleos essenciais testados apresentaram atividade antifúngica contra 100 % das cepas de *C. carrionii*. Os óleos essenciais de *Ocimum gratissimum*, *Pneumus boldus*, *Origanum vulgare* e *Melissa officinalis* apresentaram as melhores atividades antifúngicas, com halos de inibição de 49,25 mm, 42,25 mm, 40,25 mm, 29 mm respectivamente. Os dados obtidos mostram-se promissores e podem servir como guia na seleção de plantas com atividades antifúngicas de futuros trabalhos, na perspectiva de uma possível aplicação terapêutica desses produtos.

Palavras-chave: óleos essenciais, Lamiaceae, fungos filamentosos, *Cladosporium*

ABSTRACT

The genus *Cladosporium* includes many species of opportunistic dematiaceous and contaminants fungi, being related to frames of pathologies in immunocompromised patients. Given the broad biological activity displayed by the natural products, essential oils obtained from plant species have been investigated to determine their antimicrobial activities. In this context, the aim of this study was to evaluate the antifungal activity of essential oils from plant species of the Lamiaceae family against strains of *Cladosporium carrionii*. The methodology used was technique of solid medium diffusion. Assays were performed in duplicate and the results considered positive when the arithmetic means of the inhibition halos showed values equal or greater than 10 mm in diameter. The results showed that the seven essential oils tested showed antifungal activity against 100% of strains of *C. carrionii*. The essential oils of *Ocimum gratissimum*, *Pneumus boldus*, *Origanum vulgare* and *Melissa officinalis* showed the best antifungal activity with inhibition zones of 49.25 mm, 42.25 mm, 40.25 mm, 29 mm respectively. The results obtained appear promising and may serve as a guide in selecting plants with antifungal activity of future work, in view of a possible therapeutic application of these products.

Keywords: essential oils, Lamiaceae, fungi, *Cladosporium*

INTRODUÇÃO

Os fungos do gênero *Cladosporium* são considerados contaminantes ambientais, sendo encontrados em diversos ambientes. Sua relação com a saúde humana está prin-

cipalmente relacionada com quadros de patologias oportunistas quando do desenvolvimento de severa imunossupressão (Tasic & Tasic, 2007; Correia et al.,

* Contato: Camilla Pinheiro de Menezes, Universidade Federal da Paraíba, Cidade Universitária, CEP:58059-900, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Ciências Farmacêuticas, João Pessoa, Paraíba, Brasil, Telefone: (83) 3225.1396 / (83) 8815.5981, e-mail: camilla.farmaufpb@gmail.com

2010; Bakheshwain et al., 2011).

Cladosporium carrionii é considerada a espécie patogênica mais importante desse gênero, devido aos inúmeros casos de doenças causadas por este fungo em todo o mundo, sendo um agente reconhecido de cromoblastomicose, feo-hifomicoses e quadros alérgicos. As infecções causadas por *C. carrionii* são crônicas e aparecem como micoses na pele, tecidos subcutâneos e unhas (Abliz et al., 2004). São infecções difíceis de tratar, devido ao longo período de tratamento, às limitadas opções terapêuticas, às condições da imunidade do doente e à relativa resistência do fungo aos antifúngicos habitualmente utilizados, podendo, portanto, ocorrer recidivas (Sidrim, Rocha, 2004; Lacaz et al., 2002).

Tendo em vista a crescente importância clínica e epidemiológica dispensada às essas infecções micóticas e a necessidade de tratamentos mais eficazes e menos tóxicos para os indivíduos acometidos, numerosas pesquisas vêm sendo desenvolvidas na expectativa de se obter novos produtos antifúngicos. Essa situação tem encorajado a adoção de novas terapêuticas, dentre elas o uso mais extenso dos produtos naturais, em especial das plantas medicinais (Odds, Brown, Gow, 2003; Bansod, Rai, 2008). A Família Lamiaceae inclui cerca de 252 gêneros, nos quais se distribuem 6700 espécies que são nativas principalmente na área do Mediterrâneo, embora algumas tenham origem na Austrália, no Sudoeste da Ásia e na América do Sul, compreendendo ervas ou arbustos que secretam óleos essenciais e compostos fenólicos, responsáveis pelo aroma característico das espécies (Evans, 2002; Judd et al., 1999).

Além da importância do ponto de vista medicinal, esta família também é fonte de espécies com grande valor como condimentos, alimentos e na indústria de perfumes e cosméticos (Cuppert, Hall, 1998; Di Stasi, Hiruma-Lima, 2002).

São exemplos as espécies de alecrim (*Rosmarinus* sp.), sálvia (*Salvia* sp.), orégano (*Origanum* sp.), tomilho (*Thymus* sp.), manjerição (*Ocimum* sp.), manjerona (*Marjorana* sp.), menta (*Mentha* spp.), segurelha (*Satureja* sp.), erva-cidreira (*Melissa* sp.) dentre outras, as quais são estudadas devido às suas propriedades antioxidantes, antibacterianas, antifúngicas, dentre outras (Mariutti, Braganolo, 2007).

Neste contexto, o objetivo desse estudo foi avaliar a atividade antifúngica de óleos essenciais obtidos de espécies vegetais pertencentes à família Lamiaceae sobre cepas fúngicas de *Cladosporium carrionii* e desta maneira contribuir para a pesquisa científica quanto à investigação farmacológica de um promissor antifúngico de origem natural.

MATERIAL E MÉTODOS

Óleos Essenciais

Foram utilizados neste estudo óleos essenciais obtidos de espécies vegetais pertencentes à família Lamiaceae, adquiridos na Quinari Fragrâncias e Cosméticos Ltda./Ponta Grossa, Paraná, Brasil (Quadro 1).

Espécies Fúngicas

Para realização dos ensaios de atividade antifúngica foram selecionadas 8 cepas de *Cladosporium carrionii*,

sendo 2 cepas (URM 5109, URM 2871) pertencentes à coleção de culturas da Micoteca URM 604, Departamento de Micologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, e as demais (CL-03, LM-0212, LM-227, CQ-02, LM-01, CQ-03) pertencentes à coleção de culturas do Laboratório de Micologia, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba. Todas as cepas foram mantidas em ágar Sabouraud dextrose – ASD inclinado (DIFCO Laboratories Ltda, USA) a temperatura ambiente (28° a 30°C) e a 4°C.

Quadro 1. Espécies vegetais das quais foram obtidos os óleos essenciais.

Espécie	Família	Nome popular
<i>Mentha piperita</i> L.	Lamiaceae	Hortelã pimenta
<i>Melissa officinalis</i> L.	Lamiaceae	Erva-cidreira
<i>Mentha arvensis</i> L.	Lamiaceae	Hortelã comum
<i>Ocimum basilicum</i> L.	Lamiaceae	Manjerição
<i>Ocimum gratissimum</i> Blume	Lamiaceae	Alfavaca
<i>Origanum vulgare</i> L.	Lamiaceae	Orégano
<i>Peumus boldus</i> Benth	Lamiaceae	Boldo

Preparação do Inóculo

Para preparação do inóculo, as cepas fúngicas selecionadas foram mantidas no meio de cultura sólido, ágar Sabouraud destrose (ASD), por 10-14 dias, a temperatura de 28 °C para atingirem um crescimento satisfatório. As recentes colônias fúngicas foram devidamente cobertas com 5 mL de solução salina estéril (NaCl 0,85 % p/v), e as suspensões feitas por suaves agitações e raspagens com auxílio de uma alça de platina em “L”. A mistura resultante de conídios e fragmentos de hifas foi retirada e transferida para tubos de ensaio esterilizados. Em seguida, essas suspensões foram agitadas por 2 minutos com auxílio do aparelho Vortex (FANEM). Após agitação, cada suspensão teve sua turbidez comparada e ajustada àquela apresentada pela suspensão de sulfato de bário do tubo 0,5 da escala McFarland, a qual corresponde a um inóculo de aproximadamente 10⁶ unidades formadoras de colônias/mL (UFC/mL). Por fim, foi realizado contagem celular em câmara de Neubauer e as suspensões ajustadas no espectrofotômetro (Leitz-Photometer 340-800), para conter aproximadamente 1x10⁶ UFC/mL. (Ostrosky et al., 2008; Koneman et al., 2008, Hadacek & Greger, 2000; Cleeland & Squires, 1991).

Ensaio de atividade antifúngica

O *screening* microbiológico para avaliação do poder antifúngico dos óleos essenciais em estudo foi realizado com base na técnica de difusão em meio sólido com discos de papel de filtro (Sensibiodisc do Centro de Controle e Produtos para Diagnósticos Ltda – CECON/SP). Em placas de Petri (150x15 mm) descartáveis e estéreis (INLAB), foram depositados 2 mL da suspensão fúngica na concentração de 10⁶ UFC/mL de cada cepa, previamente preparada. Em seguida, foi adicionado cerca de 40 mL do meio ASD fundido à 50 °C, com homogeneização constante. Após a solidificação do meio foram depositados na superfície do meio, discos de papel de filtro impregnados com 20 µL de cada óleo essencial *in*

natura. O sistema foi então incubado a 28-30 °C por 7-14 dias (Bawer et al., 1966; Cleeland & Squires, 1991; Koneman et al., 2008; Hadacek & Greger, 2000).

O Fluconazol, 25 µg (Centro de Controle e Produtos para Diagnósticos Ltda – CECON/SP) foi selecionado como antifúngico padrão.

Os ensaios foram realizados em duplicata e os resultados expressos pela média aritmética dos halos de inibição obtidos nos dois ensaios. A presença da atividade antifúngica foi evidenciada pela formação de halos de inibição de crescimento em volta dos discos de papel. A atividade antifúngica dos óleos essenciais testados foi considerada positiva quando a média dos halos de inibição apresentou valores iguais ou superiores a 10 mm de diâmetro (Wong Leung, 1988; Cole, 1994; Alves et al., 2000; Nunes et al., 2006).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O presente trabalho permitiu identificar a atividade antifúngica de óleos essenciais obtidos de espécies vegetais pertencentes à família Lamiaceae sobre *Cladosporium carrionii* utilizando o método microbiológico de difusão em ágar.

Conforme apresentado na tabela 1, os sete óleos essenciais testados apresentaram atividade antifúngica contra as oito cepas de *C. carrionii*, caracterizado pela formação de halos de inibição do crescimento microbiano com diâmetro igual ou superior a 10 mm.

Tabela 1. Média dos halos de inibição do crescimento fúngico (em milímetros) produzidos pelos óleos essenciais, in natura, sobre cepas de *Cladosporium carrionii*.

Óleos Essenciais	CL-03	URM 5109	LM-0212	LM-227	CQ-02	LM-01	CQ-03	URM 2871
<i>O. gratissimum</i>	50	48	50	50	40	50	54	52
<i>P. boldus</i>	40	32	50	40	48	54	44	30
<i>M. officinalis</i>	30	30	34	32	30	26	24	26
<i>M. arvensis</i>	10	14	14	16	10	11	11	14
<i>M. piperita</i>	12	15	10	15	11	11	15	16
<i>O. basilicum</i>	12	12	11	10	11	10	12	10
<i>O. vulgare</i>	50	48	40	34	44	36	46	24
Fluconazol (25 mcg)	0	5	6	0	0	4	0	0

Os óleos essenciais de *O. gratissimum*, *P. boldus*, *O. vulgare* e *M. officinalis* apresentaram as melhores atividades antifúngicas, com halos médios de inibição de 49,25 mm, 42,25 mm, 40,25 mm e 29 mm, respectivamente.

A droga padrão utilizada foi o fluconazol, visto que é um dos antifúngicos utilizados na terapêutica das micoses causadas por *C. carrionii*. Entretanto, pode-se observar que o fluconazol (25 µg), nesta concentração, não apresentou atividade antifúngica contra nenhuma das cepas testadas, sendo provavelmente essas cepas resistentes a esse antifúngico. Portanto, são necessários experimentos adicionais para avaliar uma possível resistência dessas

cepas ao fluconazol.

A necessidade atual de descoberta de novos antimicrobianos tem estimulado o uso de compostos de plantas como os óleos essenciais, esses têm sido bem estudados em relação ao seu poder antimicrobiano, no entanto, são mais explorados em relação as suas características flavorizantes e antioxidantes (Burt, 2004).

Poucos relatos na literatura são disponíveis a cerca da ação de óleos essenciais na concentração absoluta sobre o crescimento de microrganismos, de modo que esta escassez de informações torna-se mais acentuada quando se busca relatos da atividade de óleos essenciais sobre fungos dematiáceos, como é o caso do *C. carrionii* (MOREIRA, 2006).

O possível papel dos óleos essenciais de algumas plantas, dentre elas a *M. officinalis* L., assim como o modo de ação destes produtos naturais é discutido no que diz respeito à prevenção e tratamento do câncer, doenças cardiovasculares, incluindo aterosclerose e trombose, bem como a sua bioatividade como antibacteriana, antiviral, antioxidantes, e agentes antidiabéticos (Edris, 2007).

Os resultados obtidos no presente trabalho, considerando o óleo essencial de *M. officinalis*, encontram-se compatíveis com os achados de outros autores que têm mostrado que esse óleo essencial apresenta marcante atividade antibacteriana e antifúngica (Mimica-Dukic et al., 2004).

Em se tratando do óleo essencial de *O. vulgare*, o forte poder antifúngico contra *C. carrionii* observado neste estudo, está de acordo com os apresentados na literatura. Muitos estudos já foram realizados sobre o *O. vulgare* L. devido ao seu grande poder antioxidante, fungistático, fungicida e antimicrobiano (Bozin et al., 2006; Sartorato et al., 2004).

Em estudos realizados por Saeed e Tariq (2009), excelente atividade antibacteriana foi obtida ao testar o *O. vulgare* contra bactérias Gram-positivas. Saglam et al. (2009), ao analisar a atividade antifúngica do óleo essencial de *O. vulgare* dentre outros óleos essenciais, contra o crescimento micelial de *Alternaria alternata*, *Aspergillus niger* e *Aspergillus parasiticus* observou que o óleo de *O. vulgare* foi o mais ativo contra todos os fungos testados em comparação aos demais óleos. Assim sendo, considerando o óleo essencial de *O. gratissimum*, os resultados encontrados neste estudo também encontram-se compatíveis com os achados de outros autores, Koba e colaboradores (2009) avaliando a atividade antifúngica do óleo essencial do *O. gratissimum* comprovaram atividades fungistática e fungicida desse óleo contra dezessete linhagens fúngicas.

O resultado anti-*Cladosporium* observado com o óleo essencial de *P. boldus* no presente trabalho, corrobora com estudos anteriores de outros autores, no qual o óleo essencial, obtido por hidrodestilação das folhas de *P. boldus*, apresentou atividade antibacteriana contra *Streptococcus pyogenes*, *Micrococcus* sp., *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* (Vila et al., 1999) e antifúngica contra diversas espécies de *Candida* (Lima et al., 2006).

Considerando a crescente resistência dos fungos oportunistas, dentre eles os pertencentes ao gênero *Cladosporium*, frente aos antifúngicos atualmente

disponíveis no mercado, pode-se inferir que a pesquisa de novos compostos antifúngicos de origem vegetal mostra-se de relevante significância, principalmente no que diz respeito ao tratamento de micoses causadas por fungos escuros como o *C. carrionii*, uma vez que há poucos estudos sobre a atividade antifúngica desses óleos sobre fungos dematiáceos.

CONCLUSÃO

Mediante os resultados obtidos, é possível observar o potencial antifúngico que os óleos essenciais de *Ocimum gratissimum*, *Pneumus boldus*, *Origanum vulgare* e *Melissa officinalis* possuem, e por consequência, a real possibilidade de aplicação destes produtos na prevenção e tratamento de doenças infecciosas de origem fúngica. Entretanto, são necessários estudos posteriores mais aprofundados acerca da toxicidade, mecanismos de ação, testes pré-clínicos, *in vivo* e *in vitro* com animais, e clínicos como suporte de segurança na perspectiva de uma possível aplicação terapêutica desses produtos.

REFERÊNCIAS

Abliz P, Fukushima K, Takizawa K, Nishimura K. Identification of pathogenic dematiaceous fungi and related taxa based on large subunit ribosomal DNA D₁/D₂ domain sequence analysis. *Immunol. Med. Mic.* 40: 41-49, 2004.

Alves TMA, Silva AF, Brandão M, Grandi TSM, Smânia EFA, Junior AS, Zani CL. Biological screening of brazilian medicinal plants. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 95(3): 367-373, 2000.

Bakheshwain S, Khizzi El, Rasheed AMAI, Ajlan AAI, Parvez S. Isolation of Opportunistic Fungi from Dermatophytic Samples. *Asian J. Dermatol.* 3(1): 13-19, 2011.

Bansod S, Rai M. Antifungal activity of essential oils from indian medicinal plants against human pathogenic *Aspergillus fumigatus* e *A. niger*. *World J. Med. Sci.* 3(2): 81-88, 2008.

Bawer AWMM, Kirby JC, Turck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am. J. Clin. Pathol.* 45(3): 493-496, 1966.

Bozin B, Mimica DN, Simin N, Anackov G. Characterization of the volatile composition of essential oils of some lamiaceae species and the antimicrobial and antioxidant activities of the entire oils. *J. Agric. Food Chem.* 54(5): 1822-1828, 2006.

Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods: a review. *Int. J. Microbiol.* 94(3): 223-253, 2004.

Case CL, Funke BR, Tortora GJ. *Microbiologia*. 10. ed. Porto Alegre: Artmed Editora, 2010.

Cleeland R & Squires E. Evaluation of new antimicrobials in vitro and experimental animal infection In: LORIAN, V. *Antibiotics in laboratory medicine*. 3. ed. Baltimore: Williams and Wilkiam, p. 739-787, 1991.

Cole MD. Key antifungal, antibacterial and anty-insect assays – A critical Review. *Biochem. Syst. Ecol.* 22: 837-856, 1994.

Correia RTM, Valente NYS, Criado PR, Martins JEC. Cromoblastomicose: relato de 27 casos e revisão da literatura. *An. Bras. Dermatol.* 85(4):448-54, 2010.

Cuppett SL, Hall III CA. Antioxidant activity of the Labiatae. *Adv. Food Nutr. Res.* 42: 245-271, 1998.

Di Stasi LC, Hiruma-Lima CA. *Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica*. 2 ed. São Paulo: Editora Unesp, 2002. 605p.

Edris AE. Pharmaceutical and therapeutic potentials os essential oils and their individual volatile constituents: a review. *Phytother. Res.* 21: 308-323, 2007.

Evans WC. *Trease and Evans: Pharmacognosy*. 15. ed. London: WB Saunders, 2002. 585 p.

Hadacek F & Greger H. Testing of antifungal natural products: methodologies, comparability of results and assay choice. *Phytochem. Analysis.* 11: 137-147, 2000.

Judd WS. *Plant systematics: a phylogenetic approach*. 2. ed. Sunderland: Editora Sinauer Associates, 1999. 464 p.

Koba K, Poutouli PW, Raynaud C, Sanda K. Antifungal activity of the essential oils from *Ocimum gratissimum* L. grown in Togo. *J. Sci. Res.* 1(1): 164-171, 2009.

Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Jr. Winn WC. *Diagnóstico Microbiológico. Texto e Atlas Colorido*. 6. ed. São Paulo: Editora Médica e Científica Ltda, 2008. 1565p.

Lacaz CL, Porto E, Martins JEC, Heins-Vaccarl EM, Melo NT. *Tratado de Micologia Médica*. 9. ed. São Paulo: Sarvier, 2002. 1104 p.

Lima IO, Oliveira RAG, Lima EO, Farias NMP, Souza EL. Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de *Candida*. *Rev. Bras. Farmacogn.* 16: 197-201, 2006.

Mariutti LRB, Bragagnolo N. Revisão: Antioxidantes Naturais da Família Lamiaceae - Aplicação em Produtos Alimentícios. *Braz. J. Food Technol.* 10(2): 96-103, 2007.

Mimica-Dukic N, Bozin B, Sokovic M, Simin N. Antimicrobial and Antioxidant activities of *Melissa officinalis* L. (Lamiaceae) Essential Oil. *J. Agric. Food Chem.* 52(9): 2485-2489, 2004.

Nishi I, Sunada A, Toyokama M, Asari S, Iwatani Y. In vitro antifungal combination effects of micafungin with fluconazole, voriconazole, amphotericin B, and flucytosine against clinical isolates of *Candida* species. *J. Infect. Chemother.* 15: 1-5, 2009.

Nunes XP, Maia GLA, Almeida JRGS, Pereira FO, Lima EO. Antimicrobial activity of the essential oil of *Sida cordifolia* L. *Rev. Bras. Farmacogn.* 16: 642-644, 2006.

Odds FC, Brown AJP, Gow NAR. Antifungal agents: mechanisms of action. *Trends Microbiol.* 11(6): 272-279, 2003.

Ostrosky EA, Mizumot MK, Lima MEL, Kaneko TM, Nishikawa O, Freitas BR. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. *Rev. Bras. Farmacogn.* 18(2): 301-307, 2008.

Saeed S, Tariq P. Antibacterial activity of oregano (*Origanum vulgare* Linn.) against gram positive bacteria. *Pak. J. Pharm. Sci.* 22(4): 421-424, 2009.

Saglam C, Ozcan MM, Boyraz N. Fungal inhibition by some spice essential oils. *J. E. O. B. P.* 12: 742-750, 2009.

Sartoratto A, Machado AL, Delarmelina C, Figueira GM, Duarte MCT, Rehder VLG.

Composition and antimicrobial activity of essential oils aromatic plants used in Brazil. *Braz J Microbiol.* 35(4): 275-280, 2004.

Sidrim JJC, Rocha MFG. *Micologia médica à luz de autores contemporâneos.* Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 2004. 396p.

Silva CB, Guterres SS, Weisheimer V, Schapoval EES. Antifungal activity of the lemongrass oil and citral against *Candida spp.* *Braz. J. Infect. Dis.* 12(1): 63-66, 2008.

Tasic S, Tasic NM. *Cladosporium spp.*-Cause of Opportunistic Mycoses. *Acta Fac. Med. Naiss.* 24 (1): 15-19, 2007.

Vila R, Valenzuela L, Bello H, Cañigüeral S, Montes M, Adzet T. Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Peumus boldus* leaves. *Planta Med.* 65: 178-179, 1999.

Woung-Leung YL. Antimicrobial activities of some Hon-Kong plants used in chinese medicine. *Fitoterapia,* 69(1):11-16, 1988.