

VARIAÇÃO QUÍMICA DOS CONSTITUINTES VOLÁTEIS DE
***Vitex agnus castus* L (VERBENACEAE) CULTIVADA NO PIAUÍ-BRASIL**

*Eilika Andréia Feitosa Vasconcelos*¹
*Alysson Kenned de Freitas Mesquita*²
*Antônia Maria das Graças Lopes Citó*³
*José Arimateia Dantas Lopes*⁴

RESUMO: *Vitex agnus castus* L é originária da costa do mediterrâneo e da região do centro asiático. É conhecida no Norte e Nordeste do Brasil como alecrim-do-norte, alecrim-d'angola e pau d'angola. O óleo essencial de *Vitex agnus castus* L obtido no Nordeste do Brasil apresenta quimiotipo diferente do óleo essencial obtido em países da Europa. Por essa razão este trabalho aponta para a necessidade de caracterizar o óleo essencial das folhas de *Vitex agnus castus* L de acordo com biomas e ecótonos, distinguindo as estações de seca e chuva. As amostras dos óleos essenciais das folhas foram obtidas por hidrodestilação e identificadas por CG-MS. As quatro amostras analisadas foram identificadas como sendo do quimiotipo 1,8-cineol, embora as amostras tenham apresentado variabilidade nos constituintes.

PALAVRAS-CHAVE: *Vitex agnus castus* L; Óleo essencial; 1,8-cineol.

VARIATION OF CHEMICAL CONSTITUENTS OF VOLATILE *VITEX AGNUS CASTUS* (VERBENACEAE) CULTIVATED IN PIAUÍ-BRAZIL.

ABSTRACT : *Vitex agnus castus* is an important species of Verbenaceae family with utilization in treatment of various obstetric and gynecological disorders. The essential oil of *Vitex agnus castus* obtained in northeastern Brazil has different chemotype of essential oil obtained in European countries. For this reason this work points to the need to characterize the essential oil leaves of *Vitex agnus castus* according to biomes and ecotones, distinguished seasons of drought and rain. Samples of essential oils from leaves were obtained by hydrodistillation and identified by GC-MS. The four samples were identified as the 1,8-cineole chemotype, although the samples have shown variability in the constituents.

KEY WORDS: *Vitex agnus castus* L; Essential oil; 1,8-cineole.

¹ Doutora Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia – RENORBIO, UFPI – Teresina, Brasil.
 E-mail: e-mail: eafvasconcelos@hotmail.com.

² Graduando em Farmácia pela UFPI– Campus Ministro Petrônio Portela.

³ Doutora do Departamento de Química – UFPI – Campus Ministro Petrônio Portela.

⁴ Doutor do Departamento de Química – UFPI – Campus Ministro Petrônio Portela.

INTRODUÇÃO

A espécie *Vitex agnus castus* L (VAC) da família (Verbenaceae), é um arbusto cujo habitat natural vai desde o Mediterrâneo até a Ásia Central (UPTON, 2001). Os frutos de VAC são usados na medicina popular para o tratamento de várias doenças obstétricas e ginecológicas. Os extratos dos frutos têm sido utilizados no tratamento de vários problemas femininos, incluindo amenorréia, dismenorréia, distúrbio pré-menstrual, insuficiência do corpo lúteo, hiperprolactinemia, infertilidade, acne e na menopausa (SCHELLENBERG, 2001; WUTTKE et al., 2003; LAURITZEN et al., 2004; PRILEPSKAYA et al., 2006; PERINI et al., 2007). No Brasil, essa planta está amplamente distribuída nas regiões Norte e Nordeste. No Piauí é conhecida popularmente como Pau d'Angola (CAMARGO, 1988).

Os óleos essenciais são compostos naturais, voláteis e complexos, formados a partir do metabolismo secundário de plantas que são amplamente utilizadas na medicina popular, na alimentação, na perfumaria e em farmácia. Normalmente, os componentes majoritários determinam as propriedades biológicas que têm sido atribuídas à presença de uma mistura de componentes característico em que os tipos mais abundantes de compostos químicos são terpenóides especificamente monoterpenos e sesquiterpenos (BURT, 2004; BAKKALI et al., 2008). Dessa forma, as composições de óleos essenciais obtidos a partir de diferentes espécies de plantas refletem a resposta do metabolismo secundário a condições ambientais específicas, como solo, clima, altitude e luminosidade (CARVALHO et al., 2006).

A Legislação Sanitária Brasileira (BRASIL, 2010) que dispõem sobre o registro de medicamentos fitoterápicos estabelece dentre outros quesitos o controle de qualidade da matéria-prima vegetal como pré-requisito para a obtenção de fitoterápicos com reprodutibilidade de ação. A qualidade total de um medicamento engloba a qualidade das matérias-primas, assim, como a dos demais insumos envolvidos na produção e no processo como um todo. Em se tratando de matéria-prima vegetal, os parâmetros de qualidade devem ser precisamente pré-definidos e os procedimentos de preparação dos produtos, padronizados considerando a complexidade da composição da matéria-prima vegetal, garantindo, assim, a uniformidade dos diferentes lotes e parâmetros relacionados com a eficácia, segurança e qualidade do produto (FARIAS, 1999).

Os óleos essenciais de espécies da família Verbenaceae têm apresentado atividade antibacteriana e antifúngica relacionadas com a presença de alguns constituintes químicos como o 1,8-cineol, alfa-terpineol, alfa-pineno, beta-pineno entre outros, e outros estudos têm reportado o uso de óleo essencial de VAC em terapias complementares no tratamento de sintomas da menopausa (GUIDO et al., 1996; LUCKS, 2003; SCHELLENBERG, 2001).

Em função da aclimação da VAC no Brasil, que apresenta clima tropical, diferente daqueles da região de origem da planta (Mediterrâneo e Ásia Central) e as estações do ano refletem principalmente nos ciclos anuais de temperatura e outros tipos de fatores abióticos, gerando assim uma sazonalidade que influencia na vida da planta.

A literatura relata a composição química dos óleos essenciais de VAC cultivada em regiões diferentes, especialmente na região originária, mas não relata a influências das variações climáticas na composição do óleo essencial, seja ele extraído das folhas, flores ou frutos (FELICE et al., 1996; GUIDO et al., 1996; ZOGHBI et al., 1999; JAMINA et al., 2000). Desta forma, este trabalho objetivou o estudo da sazonalidade no teor do óleo essencial dos constituintes majoritários de folhas de VAC, cultivadas na região nordeste do Brasil, no estado do Piauí, com a finalidade de caracterizar quimicamente o óleo essencial nas diferentes épocas de coletas e comparar com os quimiotipos já relatados na literatura.

MATERIAIS E MÉTODOS

- **Material Vegetal:** As amostras de folhas de VAC foram coletadas no horto de plantas medicinais da Universidade Federal do Piauí (UFPI), situada a uma altitude de 71 m, latitude: 5°04'37" e longitude: 42°78'25", em Teresina, Piauí, Brasil. As amostras foram coletadas em épocas diferentes durante um ano. A espécie foi identificada e a exsicata de nº 18885 encontra-se depositada no Herbário Graziela Veloso da Universidade Federal do Piauí. A região onde as amostras foram coletadas apresenta clima tropical, com duas estações: no inverno é frio e úmido (período de Janeiro a Maio), no verão é quente e abafado (período de Setembro a Dezembro). A temperatura média é de 28 °C (com mínima em torno de 22 °C e

máxima em torno de 42 °C). As precipitações no período chuvoso variam em torno de 109 a 250 mm e no período de seca variam em torno de 17 a 126 mm (INMET, 2009).

- **Obtenção e identificação dos compostos voláteis:** As folhas da planta fresca foram submetidas ao processo de hidrodestilação na proporção de 1:15 material vegetal:água (m/m), durante 3 horas. O rendimento do óleo essencial foi expresso em percentagem (%) volume/massa, ou seja, volume (mL) de óleo essencial por massa (g) de material vegetal. Foi utilizado um cromatógrafo gasoso marca Shimadzu modelo GC-17A, acoplado a um espectrômetro de massas GCMS QP5050A equipado com coluna capilar de sílica fundida J & W Scientific DB-5 (50 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de espessura do filme). As condições de operação foram às seguintes: injetor a 220 °C, interface a 240 °C e coluna programada para operar a 60 °C, com elevação de temperatura na taxa de 3 °C min⁻¹, até 240 °C. Utilizou-se hélio como gás de arraste, mantido ao fluxo constante de 1,0 mL min⁻¹. A aquisição dos espectros de massas foi feita na faixa de 40 a 350 daltons pelo método de ionização por impacto de elétrons, com energia de ionização de 70 eV e fonte de íons a 200 °C. Os constituintes voláteis foram, na sua maioria, tentativamente identificados por comparação dos espectros de massas obtidos com os registros da biblioteca computacional Wiley229 e pela determinação experimental dos índices de Kováts, aplicando-se uma série homóloga de n-alcenos nas mesmas condições usadas para a injeção dos óleos essenciais. Os valores assim obtidos foram, então, comparados com os índices de Kováts disponíveis na literatura (ADMS, 2007). A identificação definitiva de alguns constituintes voláteis foi realizada pela coinjeção de padrões químicos com os óleos essenciais. Somente as identificações baseadas nos dados de espectrometria de massas associada à coinjeção dos óleos com compostos padrões foram consideradas definitivas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O processo de hidrodestilação, utilizando aparelho tipo Clevenger modificado, forneceu um óleo essencial de coloração amarela e odor característico, com

rendimento médio de 0,7% (amostra 1: Janeiro/2008); 0,8% (amostra 2: Maio/2008); 0,7% (amostra 3: Setembro/2008); 0,7% (amostra 4: Dezembro/2008). Quanto ao rendimento não houve diferença significativa nas diferentes épocas de coleta, isto pode ser devido ao fato do solo não ter sofrido tratamento, como por exemplo, adubação orgânica ou suplementação de nitrogênio, durante o período de coleta. Estudo realizado por Carneiro e colaboradores (2010) demonstrou que o aumento do rendimento do óleo essencial pode estar relacionado com a adubação mineral do solo, especialmente com compostos nitrogenados.

Os componentes do óleo essencial de VAC variaram quantitativamente e qualitativamente de acordo com a época do ano em que se coletaram as folhas (Tabela 1). O composto majoritário encontrado nas folhas independente da época da coleta foi o 1,8-cineol destacando, que na amostra 3 o mesmo composto apresentou um maior teor e a mesma amostra foi a que teve o menor número de constituintes identificados. Ressaltando que as amostras 1 e 2 foram coletadas no período correspondente ao período chuvoso na região e a amostra 3 foi coletada no período mais quente e com menor índice pluviométrico e a amostra 4 foi coletada já no final do período quente e início do período chuvoso. Destaca-se ainda que as folhas coletadas no período correspondente ao inverno na região apresentaram uma maior quantidade em constituintes químicos. A figura 1 mostra os cromatogramas das amostras 1 a 4, respectivamente do óleo essencial de VAC, objeto deste estudo e a figura 2, o espectro de massas do componente majoritário, o 1,8-cineol.

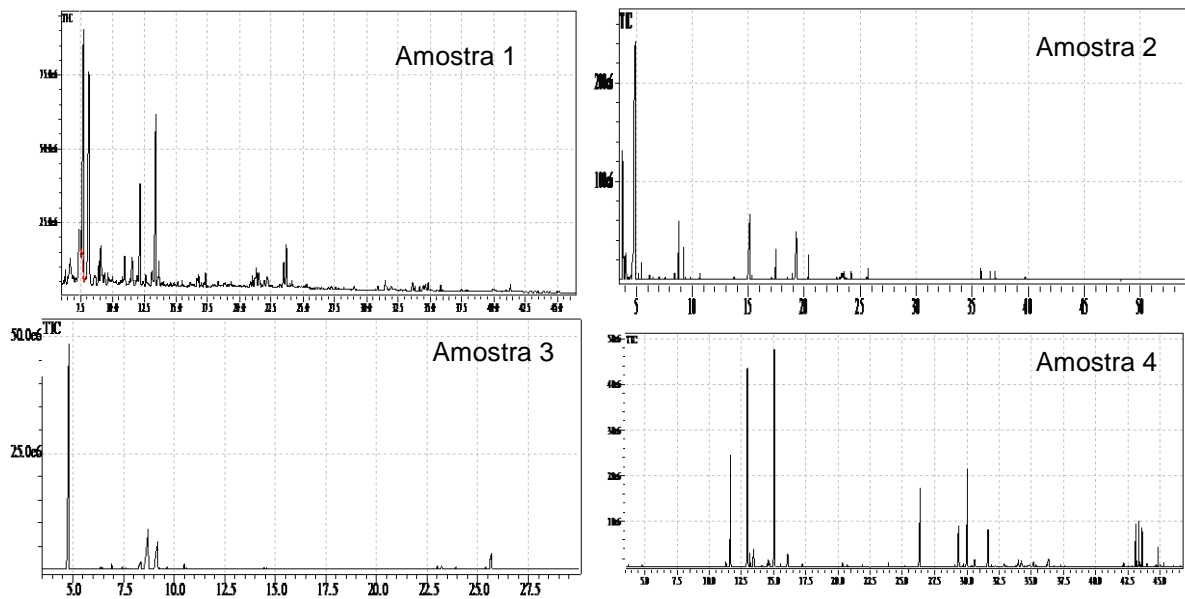
Tabela 1: Principais constituintes químicos (% relativa) voláteis encontrados no óleo essencial de *Vitex agnus castus* L cultivada no estado do Piauí.

CONSTITUINTES	Amostra 1 (Jan/08)	Amostra 2 (Mai/08)	Amostra 3 (Set/08)	Amostra 4 (Dez/08)
Trans-2,7-dimetil-oct-5-in-3-eno	13.18	-	-	-
Cis-2,7-dimetil-oct-5-in-3-eno	9.28	-	-	-
Felandreno	-	0.53	-	-
<i>cis</i> -Ocimeno	-	10.15	-	-
Beta-Felandreno	-	20.57	-	-
Beta-Pineno	-	1.28	-	-
Miceno	3.43	1.62	-	-
Alfa-Terpineno	0.75	0.67	-	22.45
Para-Cimeno	1.97	0.58	-	-
1,8-Cineol	34.32	22.29	61.47	24.80
(E)-beta-Ocimeno	-	0.24	-	-
Linalol	-	-	0.43	3.23
Gama-Terpineno	1.68	1.26	-	-
Alfa-Terpinoleno	-	0.28	0.89	-
Propionato de linalila	0.87	-	-	7.34
Terpineol	-	-	14.01	2.32
3-ciclohexen-1-ol	6.54	-	-	-
<i>trans</i> - Sabineno	-	0.51	-	1.05
Alfa-Terpineol	2.85	0.49	8.99	-
Timol	-	0.37	-	-
Acetato de para-menten-8-ila	-	-	-	7.40
Citronelole	-	-	0.90	0.82
Alfa-Terpinyl acetate	-	8.26	0.22	14.21
Beta-Terpinyla acetate	10.02	-	0.25	-
<i>trans</i> - Caryophyllene	2.83	4.10	-	-
Beta -Farnesene	5.57	10.02	-	-
Bicyclogermacrene	-	3.86	-	-
Beta -germacrene	2.25	-	-	-
gama-Cadinol	-	1.01	0.49	2.53
spatuleno	-	-	-	0.75
gama -Cadinene	0.93	-	5.17	1.16
Beta-Cariofileno	-	0.31	-	0.60
Isometil-beta-Ionono	-	3.20	-	-
oxide Cariofileno	-	0.39	0.52	-
Alfa-Humuleno	-	2.58	-	-
Não Identificados	3.24	5.43	6.34	10.42

Fonte: Autor do trabalho

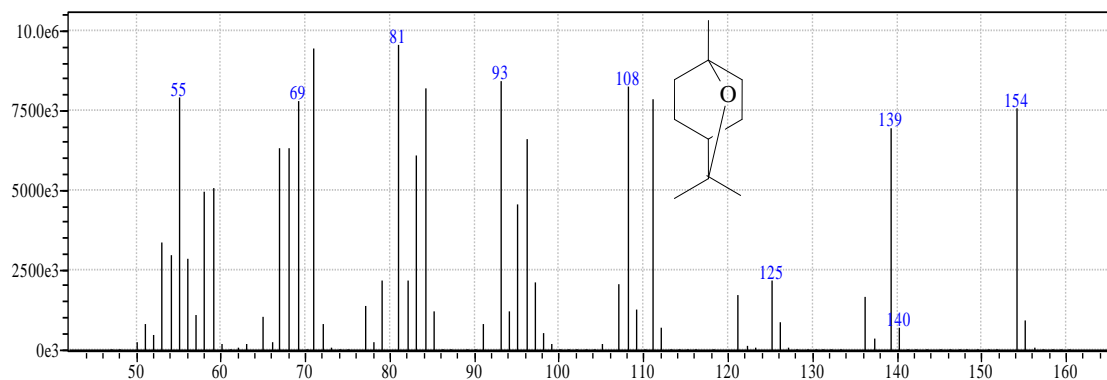
Figura 1: Cromatograma das amostras do óleo essencial de *Vitex agnus castus*

L.



Fonte: Autor do trabalho

Figura 2: Espectro de massa do 1,8-cineol.



Fonte: Autor do trabalho

De acordo com Evans (1996) a extensão com que ocorrem as variações anuais, mensais e diárias na temperatura é um dos fatores que exerce maior influência no desenvolvimento da planta, afetando, portanto, a produção de

metabólitos secundários. De maneira geral, a formação de óleos voláteis parece aumentar em temperaturas mais elevadas, apesar de dias muito quentes levar a uma perda excessiva destes metabólitos.

A quantidade total dos metabólitos secundários e as proporções relativas dos componentes da mistura podem estar sujeitos a variações quando relacionados ao estágio do desenvolvimento da planta, bem como dos diferentes órgãos vegetais, além das estações do ano (JENKS et al., 1996; HENDRIKS et al., 1997). Conforme os resultados obtidos neste estudo, as variações foram sujeitas somente as diferentes épocas de coleta, uma vez que as mesmas se deram no período do início da manhã e coletando-se apenas folhas adultas.

Estudos anteriores envolvendo a análise do óleo volátil de espécies de VAC coletadas em diferentes países são reportados. Dejan e colaboradores (2011) caracterizaram o óleo das folhas e frutos da VAC, onde o óleo dos frutos teve o sabineno (17,8%) e o 1,8-cineol (17,5%) como constituintes majoritários e nas folhas o 1,8-cineol (22%). Estudo realizado com o óleo obtido na região Amazônica mostrou como componentes o 1,8-cineol, (E)-beta-farneseno, sabineno, alfa-pineno, acetato de alfa-terpinila, beta-cariofileno e biciclogermanceno e quando comparado aos óleos obtidos na Europa e Nigéria observou-se que o constituinte presente em todas as amostras foi o 1,8-cineol (ZOGHBI et al., 1999). Estudo realizado por Jamina & Stavros (2000), avaliaram os parâmetros (maturação dos frutos, tempo de extração e método de extração) que influenciava no rendimento do óleo essencial de VAC coletada na ilha de Creta na Grécia e observaram que em função dos parâmetros avaliados o teor dos constituintes majoritários identificados variava (sabineno: 16,4 – 44,1%), 1,8-cineol (8,4 -15,2%), beta-cariofileno (2,1 – 5,0%) e trans-beta-farneseno (5,0 – 11,7%). Felice e colaboradores (1996) analisaram o óleo das inflorescências, folhas e frutos de VAC cultivada na Itália e identificaram como principais constituintes do óleo extraído das folhas o 1,8-cineol (15,6%), beta-cariofileno (9,7%), cis-beta-farneseno (9,1%), alfa-terpineol (8,5%) e sabineno (6,9%). O óleo das folhas de VAC coletadas na Calabria (Itália) foi caracterizado pela presença 1,8-cineol (35,2%), sabineno (23,6%), acetato de alfa-terpinila (12,5%) e alfa-pineno (7,6%) (GUIDO et al., 1996). A caracterização do óleo essencial de folhas de VAC cultivada na região centro-norte da Nigéria, diferentemente dos outros estudos, apresentou como componente majoritário o

beta-pineno (20,0%), seguido do viridiflorol (9,8%), alfa-pineno (9,1%), cis-ocimeno (8,4%), 1,8-cineol (6,7%), beta-farneseno (5,4%), terpineol (4,2%), alfa-terpineol (4,1%) e beta-felandreno (4,1%), (HAMID et al., 2010) o mesmo, foi caracterizado como sendo do quimiotipo beta-pineno e os óleos obtidos na Itália e Região Amazônica do Brasil foram caracterizados como sendo do quimiotipo 1,8-cineol. O 1,8-cineol é um monoterpeneo oxigenado encontrado também em outras espécies que tem apresentado atividades antibacterianas e antifúngicas significantes (SANTOS et al., 2004; BAKKALI et al., 2008; DEJAN et al., 2011).

Além de todos estes parâmetros deve-se levar em conta a variabilidade genética das plantas, que está intimamente relacionada com a qualidade dos óleos voláteis, e é expressa através dos chamados quimiotipos. A variação química ocorre com predomínio de diferentes compostos no óleo volátil obtido a partir de uma mesma espécie coletada em locais diferentes, o que é freqüente devido à alta complexidade na composição química dos óleos voláteis (TAVERES, et al., 2005).

CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos neste trabalho verifica-se que o ambiente pode ter grande influência na sazonalidade do óleo essencial, visto que esses parâmetros são fundamentais para o entendimento dos aspectos biológicos, agrônômicos e químicos de espécies com interesse industrial e medicinal. Este trabalho aponta ainda para a necessidade de caracterização da *Vitex agnus castus* L por biomas e ecótonos, distinguindo-se, em cada caso, as estações da seca e das chuvas, embora as quatro amostras analisadas caracterizem o quimiotipo 1,8-cineol, há variabilidade no teor o que leva a necessidade de padronização da matéria-prima vegetal considerando os fatores edafoclimáticos.

AGRADECIMENTOS

Ao LAPETRO/UFPI pelas análises de cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas. Ao CNPq e a CAPES pelo suporte financeiro.

REFERÊNCIAS

ADAMS, R.P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy**. 14th ed. Illinois: Allured Publishing corporation: Carol Stream. 2007.

BAKKALI F, AVERBECK S, AVERBECK D, WAOMAR, M. Biological effects of essential oils – A review. **Food and Chem Toxicol**. v..46, p 446 - 475, 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Resolução de Diretoria Colegiada RDC nº 14, de 31 de março de 2010.

BURT S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. **Int J Food Microbiol**. v.94, p. 223 - 253, 2004.

CAMARGO MTLA. **Plantas Medicinais e de Rituais Afro-Brasileiros**. São Paulo, ALMED, 1988.

CARNEIRO FB, JUNIOR ID, LOPES PQ, MACEDO RO. Variação da quantidade de β -cariofileno em óleo essencial de *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng., Lamiaceae, sob diferentes condições de cultivo. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v.4, p 600 - 606, 2010.

CARVALHO JLS, BLANK AF, ALVES PB, EHLERT PAD, MELO AS, CAVALCANTI SCH, ARRIGONI-BLANK MF, SILVA- MANN RS. Influence of the harvesting time, temperature and drying period on basil (*Ocimum basilicum* L.) essential oil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. V.16, n.1, p. 24 - 30, 2006.

DEJAN S, MARINA S, JASMINA G, ANA D, ANA C, MIHAILO R, DRAGOLJUB G. Chemical composition and antimicrobial activity of *Vitex agnus castus* L. fruits and leaves essential oils. **Food Chemistry**. v.128, n.4, p. 823 – 1164, 2011.

Evans WC. **Trease and Evans' Pharmacognosy**. 14. ed. London: WB Saunders Company. 1996.

FARIAS MRA. Avaliação da Qualidade das Matérias-primas Vegetais. In: SIMÕES, M. O. *et al*. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre: UFRGS, Florianópolis: UFSC, 1999. cap. 12: 197 – 220.

FELICE S, GIOVANNA DP, ERNESTO R. Constituents of *Vitex agnus castus* L. essential oil. **Flavour and Fragrance Journal**. v.11, n.3, p. 179 - 182, 1996.

GUIDO CG & MARIA TR. Essential oil composition of leaves and berries of *Vitex agnus castus* L. from Calabria, Southern Italy. **Mass Spectrometry**. v.10, n.1, p. 1345 - 1350, 1996.

HAMID AA, USMAN LA, ADEBAYO SA, ZUBAIR MF, ELAIGWU SE. Chemical constituents of leaf essential oil of North-central Nigerian Grow *Vitex agnus castus*. **Advances in Environmental Biology**. v.4, n.2, p 250 - 253, 2010.

HENDRIKS H, ANDERSON-WILDEBOER Y, ENGELS G, BOS R, WOERDENBAG HJ. Malay ethno-medico botany in Machang. **Planta Medica**. v.63, p 356-369, 1997.

INMET: **Instituto Nacional de Meteorologia**. Banco de dados. Disponível em: <<http://w.inmet.gov.br/html/observacoes.php?Ink=Capitais>>. Acesso em: 2 de março. 2009.

JAMINA MS & STAVROS TK. Parameters influencing the yield and composition of the essential oil from Cretan *Vitex agnus castus* fruits. **Planta Medica**. v. 66, p 245 - 250, 2000.

JENKS MA, TUTTLE HA, FELDMANN KA. The vegetable material medica of western India. **Phytochemistry**. v.42, p 29 - 33, 1996.

LAURITZEN C, REUTER HD, REPGES R, BOHNERT KJ, SCHMIDT U. Treatment of premenstrual tension syndrome with *Vitex agnus-castus* - controlled for treatment of hyperprolactinemia and mastalgia. **Int J Obstet Gynecol**. v. 85,p. 292 - 293, 2004.

LUCKS BC. *Vitex agnus castus* essential oil and menopausal balance: a research update. **Complementary Therapies in Nursing & Midwifery**. v. 9, p. 157 - 160, 2003.

PERINI S & ISAIA CF. Estudo de revisão da eficácia clínica do *Vitex agnus castus* na saúde feminina. **Fitos**. v. 3,n.2, p. 43 - 50, 2007.

PRILEPSKAYA VN, LEDINA AV, TAGIYEVA AV, REVAZONA FS. *Vitex agnus castus*: Successful treatment of moderate to severe premenstrual syndrome. **Maturitas**. v. 55, p. 55 - 63, 2006.

SANTOS FJB, LOPES JAD, CITÓ AMGL. Composition and biological activity of essential oils from *Lippia organoides* H.B.K. **Journal Essential Oil Research**. v. 16, p. 504 - 506, 2004.

SCHELLENBERG, R. Treatment for the premenstrual syndrome with *agnus castus* fruit extract: prospective, randomized, placebo controlled study. **British Med J**. v. 322, n. 7279, p 134 - 137, 2001.

TAVARES ES, JULIÃO LS, LOPES D, BIZZO HR, LAGE CLS, LEITÃO SG. Análise do óleo essencial de folhas de três quimiotipos de *Lippia alba* (Mill.) N.E.Br. (Verbenaceae) cultivados em condições semelhantes. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v.15, n. 1, p 1 - 5, 2005.

UPTON, R. Chaste Tree Fruit, *Vitex agnus-castus*: Standards of Analysis, Quality Control, and Therapeutics. **American Herbal Pharmacopoeia**, Santa Cruz, CA. 2001.

ZOGHBI MDB, ANDRADE EHA, MAIA JGS. The essential oil of *Vitex agnus castus* L. growing in the Amazon region. **Flavour and Fragrance Journal**. v. 14, n.1, p. 211 - 213, 1999.

WUTTKE W, JARRY H, CHRISTOFFEL V, SPENGLER B, SEIDLOVÁ-WUTTKE D. Chaste tree (*Vitex agnus castus*) - pharmacology and clinical indications. **Phytomedicine**. v. 10, p. 348 - 357, 2003.