



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA**



ANTIDIO DOS REIS E SILVA FILHO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Alcalóides e atividade antimicrobiana de *Ertela trifolia* (L.) Kuntze.

SALVADOR - BAHIA

2011

ANTIDIO DOS REIS E SILVA FILHO

Alcalóides e atividade antimicrobiana de *Ertela trifolia* (L.) Kuntze.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Farmácia, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia, como requisito obrigatório para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador(a): Profa. Dra. Tânia Fraga Barros
Co-orientador(a): Prof. Dr. Eudes da Silva Velozo

Financiamento: FAPESB N° BOL0171/2009

SALVADOR - BAHIA

2011

FICHA CATALOGRÁFICA

Sistema de Bibliotecas - UFBA

Silva Filho, Antidio dos Reis e.
Alcalóides e atividade antimicrobiana de *Ertela trifolia* (L.) Kuntze / Antidio dos Reis e Silva
Filho. - 2011.
74.f., il.

Orientadora: Profª. Drª. Tânia Fraga Barros.
Co-orientador: Prof. Dr. Eudes da Silva Velozo.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal da Bahia, Faculdade de Farmácia, Salvador,
2011.

1. *Ertela trifolia*. 2. Microbiologia farmacêutica. 3. Antibióticos. 4. Farmacologia.
I. Barros, Tânia Fraga. II. Velozo, Eudes da Silva. III. Universidade Federal da Bahia.
Faculdade de Farmácia. IV. Título.

CDD - 615.1
CDU - 615.1

AGRADECIMENTOS

À Deus, pelo seu infinito amor e misericórdia.

Aos colegas da Pós-Graduação em Farmácia, pelas trocas de informações científicas, auxílio nos experimentos e, sobretudo, pela amizade. Em especial a Corine Sampaio, Rodrigo Cezar, Cristiane de Oliveira, Manuela Lins, Milena Cabral, Daniel Cardoso e Humberto Fonseca.

Às técnicas do LAPEMM e LPMC, pelo carinho e auxílio constante, em especial a Railda, Débora e Mira.

Aos companheiros do LAPEMM, Edijane, Bárbara, Rafael, Lucas, Isley e Juliana pelo auxílio e momentos de descontração.

À amiga Ingrid Gutierrez, por ter me incentivado a cursar o mestrado.

À Professora Dra. Mara Zélia de Almeida, pela amizade e incentivo nos momentos difíceis.

Aos professores Dra. Tânia Fraga Barros e Dr. Eudes Velozo pela orientação e ensinamentos.

À FAPESB e CNPq pelo auxílio financeiro.

Aos meus pais e irmãs pelo apoio incondicional em cada passo da minha vida.

À Polly pelo amor, paciência, companheirismo e compreensão nos momentos mais difíceis desta jornada.

Muito obrigado!

Maricotinha

Se fizer bom tempo amanhã
Eu vou
Mas se por exemplo chover
Não vou
Diga a Maricotinha que eu
Mandei dizer que eu
Não tô
Não tô... não vou
Se fizer bom tempo amanhã
Eu vou
Mas se por exemplo chover
Não vou
Uma chuvinha, redinha, cotinha
Aí... piorou
Nem tô... nem vou
Se fizer bom tempo...

Dorival Caymmi

RESUMO

A resistência bacteriana aos antibióticos tem aumentado a cada ano em todo o mundo e se tornou um problema de saúde pública. Uma das principais fontes de novos fármacos são as espécies vegetais. O objetivo deste trabalho foi avaliar a ação antibacteriana dos extratos e frações das partes aéreas e subterrâneas da *Ertela (Monniera) trifolia* (L.) Kuntze (Rutaceae) e identificar quais são as possíveis moléculas responsáveis por esta atividade. Esta espécie foi selecionada a partir de um estudo etnobotânico realizado em um terreiro de candomblé de Salvador-BA, onde a mesma é utilizada tanto para fins medicinais como para fins ritualísticos. A extração da raiz e caule *in natura* foi realizada através da maceração a frio com diclorometano e por Soxhlet com metanol. O óleo essencial das folhas foi extraído por hidrodestilação em aparelho de Clevenger modificado e as folhas foram maceradas em metanol. Os testes de atividade antimicrobiana foram realizados através do método de difusão em disco, difusão em poço, concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM), segundo as recomendações do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), adaptados para produtos naturais. As cepas bacterianas utilizadas foram *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e 33591, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella enterica* ATCC 13076 e três isolados clínicos de *S. aureus* multirresistentes. O óleo essencial das folhas, os extratos da raiz e o aquoso das folhas não apresentaram atividade antibacteriana frente às bactérias testadas. O extrato diclorometânico do caule apresentou atividade frente *S. aureus* ATCC 25923, ATCC 33591 e dois isolados clínicos; o extrato acetato de etila e o extrato clorofórmico das folhas foram ativos frente *S. aureus* ATCC 25923 e dois isolados clínicos. Nenhum extrato apresentou atividade frente às bactérias Gram negativas. Os resultados obtidos demonstram a tendência dos extratos inibirem bactérias Gram positivas. Os dados espectroscópicos em conjunto com o conhecimento da ocorrência de alcalóides derivados do ácido antranílico em Rutaceae e a comparação com dados da literatura, sugeriram a presença dos alcalóides arborinina, evolitrina, esquimianina e dictamina nos extratos e frações bioativos. Estes alcalóides provavelmente são os responsáveis pela atividade antibacteriana da *E. trifolia*.

Palavras-chave: *Ertela trifolia*. Rutaceae. Arborinina. Atividade antimicrobiana.

ABSTRACT

Bacterial resistance to antibiotics has increased each year throughout the world and became a public health problem. Plant species are major source of new drugs. The objective of this study was to evaluate the antibacterial activity of extracts and fractions of overhead and underground parts of *Ertela (Monnieria) trifolia* (L.) Kuntze (Rutaceae) and identify what are the possible molecules responsible for this activity. This species was selected from an ethnobotanical study conducted in a Candomblé temple in Salvador, Bahia, where it's used both for medicinal and ritualistic purposes. The extraction from fresh root and stem was performed by cold maceration with dichloromethane and Soxhlet with methanol. The essential leaves oil was extracted by hydrodistillation in a modified Clevenger apparatus and the sheets were soaked in methanol. The antimicrobial activity tests were performed using the disk diffusion method, well diffusion, minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC), according to the recommendations of the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), adapted for natural products. The bacterial strains used were *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and 33591, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella enterica* ATCC 13076 and three clinical isolates of *S. aureus* multidrug-resistant. The essential leaves oil, the root and the leaves aqueous extracts showed no antibacterial activity against any bacteria tested. The dichloromethane extract of the stem show activity against *S. aureus* ATCC 25923, ATCC 33591 and two clinical isolates; the ethyl acetate and chloroform extracts of the leaves were active against *S. aureus* ATCC 25923 and two clinical isolates. No extract showed activity against Gram-negative bacteria.. The results shows the trend of the extracts inhibit Gram-positive bacteria. Spectroscopic data together with knowledge of the occurrence of alkaloids anthranilic acid derivatives in Rutaceae and comparison with literature data, suggested the presence of alkaloids arborinine, evolitrina, and esquimianina dictamnine in bioactive extracts and fractions. These alkaloids are probably responsible for the antibacterial activity of *E. trifolia*.

Keywords: *Ertela trifolia*. Rutaceae. Arborinine. Antimicrobial activity.

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Alcalóides já isolados e identificados da <i>E. trifolia</i> .	23
-----------------	----------------------------------------------------------------	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Manso Dandalungua Cocuazenza.	21
Figura 2	Exsicata da <i>E. trifolia</i> .	27
Figura 3	Extração do óleo essencial das folhas de <i>E.trifolia</i> .	31
Figura 4	Técnica de difusão em poço: formação dos poços após solidificação do meio de cultura e retirada das ponteiras.	36
Figura 5	Alcalóides encontrados na <i>E. trifolia</i> : arborinina (1), evolitrina (2), esquimianina (3), dictamina (4).	47
Figura 6	Teste de difusão em disco de frações do extrato diclorometânico do caule da <i>E. trifolia</i> frente ao <i>S.aureus</i> ATCC 33591.	57
Figura 7	Teste de microdiluição para determinação da CIM de extratos de <i>E. trifolia</i> .	59

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1	Métodos de obtenção dos extratos da raiz da <i>E.trifolia</i> .	29
Esquema 2	Métodos de obtenção dos extratos do caule da <i>E.trifolia</i> .	29
Esquema 3	Fracionamento do extrato diclorometânico do caule da <i>E.trifolia</i> .	30
Esquema 4	Métodos de obtenção dos extratos da folha da <i>E.trifolia</i> .	32
Esquema 5	Fracionamento do extrato clorofórmico da folha da <i>E.trifolia</i>	32
Esquema 6	Placa de 96 poços para o teste da microdiluição.	32
Esquema 7	Metodologia da bioautografia.	40

LISTA DE ESPECTROS DE RMN ^1H E ^{13}C

Espectro 1	RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) do extrato clorofórmico da folha da <i>E. trifólia</i> .	43
Espectro 2	RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) da substância 1 da fração ETFC 2.14 do extrato clorofórmico da folha da <i>E. trifólia</i>	44
Espectro 3	Expansão do espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) da substância 1 da fração ETFC 2.14 do extrato clorofórmico da folha da <i>E. trifólia</i> .	45
Espectro 4	RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) da substância 1 da fração ETFC 2.14 do extrato clorofórmico da folha da <i>E. trifolia</i> .	45
Espectro 5	RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) do extrato acetato de etila da folha de <i>E. trifolia</i> .	48
Espectro 6	RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) da fração ETFA8 extrato acetato de etila da folha de <i>E. trifolia</i> .	49
Espectro 7	RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) do extrato diclorometânico do caule da <i>E. trifolia</i> .	50
Espectro 8	RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) da fração ETCD 5 do extrato diclorometânico do caule da <i>E. trifólia</i> .	51
Espectro 9	RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) da fração ETCD 5.26 do extrato diclorometânico do caule da <i>E. trifólia</i> .	52
Espectro 10	Expansão do Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) da fração ETCD5.26 do extrato diclorometânico do caule da <i>E. trifólia</i> .	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Sistemas de solventes utilizados nas corridas cromatográficas e seus respectivos extratos.	39
Tabela 2	Dados espectroscópicos de RMN ¹ H da arborinina.	46
Tabela 3	Dados espectroscópicos de RMN ¹³ C da arborinina	47
Tabela 4	Atividade antibacteriana de extratos e frações do Caule da <i>E. trifolia</i> , expressa pela média dos halos em milímetros de diâmetro.	57
Tabela 5	Atividade antibacteriana de extratos e frações da folha da <i>E. trifolia</i> , expressa pela média dos halos em milímetros de diâmetro.	58
Tabela 6	Concentrações Inibitória Mínima (CIM) e Bactericida Mínima (CBM) (mg/mL) do extrato e frações do caule de <i>E. trifolia</i>	60
Tabela 7	Concentrações Inibitória Mínima (CIM) e Bactericida Mínima (CBM) (mg/mL) do extrato e frações da folha de <i>E. trifolia</i>	62
Tabela 8	Fatores de retenção (RFs) obtidos por bioautografia com os extratos de <i>E. trifolia</i> .	64

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AcOEt	acetato de etila
ATCC	American Type Culture Collection
CBM	Concentração Bactericida Mínima
CCA	Cromatografia em Coluna Aberta
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CCDA	Cromatografia em Camada Delgada Analítica
CCDP	Cromatografia em Camada Delgada Preparativa
CHCl ₃	clorofórmio
CH ₂ Cl ₂	diclorometano
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CMH	Caldo Mueller-Hinton
DMSO	dimetilsulfóxido
EPO	European Patent Office
ETCD	Extrato diclorometânico do caule da <i>E.trifolia</i>
ETCM	Extrato metanólico acidificado do caule da <i>E.trifolia</i>
ETFA	Extrato acetato de etila da folha da <i>E.trifolia</i>
ETFC	Extrato clorofórmico da folha da <i>E.trifolia</i>
ETFH	Extrato aquoso da folha da <i>E.trifolia</i>
ETRD	Extrato diclorometânico da raíz da <i>E.trifolia</i>
ETRM	Extrato metanólico da raíz da <i>E.trifolia</i>
ETRMH	Extrato metanólico acidificado da raíz da <i>E.trifolia</i>
HCl	ácido clorídrico

INPI	Instituto Nacional da Propriedade Industrial
IV	Infravermelho
KBr	brometo de potássio
KPC	<i>Klebsiella pneumoniae</i> produtora de carbapenemase
MeOH	metanol
MMA	Ministério do Meio Ambiente
MOBOT	Missouri Botanical Garden
OE	oleo essencial
P&D	Pesquisa e desenvolvimento
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
UV	Ultravioleta
USPTO	United States Patent and Trademark Office

SUMÁRIO

1.0 INTRODUÇÃO	17
2.0 OBJETIVOS	24
2.1 Objetivo geral	25
2.2 Objetivos específicos	25
3.0 MATERIAL E MÉTODOS	26
3.1 Material vegetal	27
3.2 Obtenção dos extratos e frações	28
3.2.1 Obtenção dos extratos da raiz e do caule	28
3.2.1.1 Fracionamento do extrato diclorometânico do caule	30
3.2.1.1.1 Purificação da fração ETCD5	30
3.2.2 Obtenção dos extratos da folha	30
3.2.2.1 Fracionamento do extrato clorofórmico da folha	32
3.2.2.1.1 Purificação da fração ETFC2	33
3.2.2.1.2 Purificação da fração ETFC2.14	33
3.2.2.2 Fracionamento do extrato acetato de etila da folha	33
3.2.2.3 Análise dos extratos e frações por UV-Vis	33
3.2.2.4 Análise dos extratos e frações por IV	34
3.2.2.5 Análise dos extratos e frações por RMN	34
3.3. Ensaio microbiológicos	34
3.3.1 Microorganismos	34
3.3.2. Testes de susceptibilidade	35
3.3.2.1. Difusão em disco	35
3.3.2.1.1. Suspensão bacteriana	35
3.3.2.1.2. Impregnação de discos	35
3.3.2.1.3 Técnica de difusão em disco	35
3.3.2.2 Teste de difusão em poço	36
3.3.2.3 Concentração inibitória mínima (CIM)	36
3.3.2.3.1 Preparo de soluções	37
3.3.2.3.2 Técnica da microdiluição	37
3.3.2.4 Concentração bactericida mínima (CBM)	38
3.3.2.5 Bioautografia	38
4. 0. RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
4.1 Fitoquímicos	42
4.1.1 Rendimentos dos fracionamentos e purificações	42

4.1.2 Identificação e determinação estrutural	43
4.2 Microbiológicos	54
4.2.1 Difusão em disco	54
4.2.2 Concentração inibitória mínima e bactericida mínima	57
4.2.3 Bioautografia	63
5.0. CONCLUSÃO	65
6.0 REFERENCIAS	67

O Brasil é o país com a maior diversidade genética vegetal do mundo, contando com mais de 55000 espécies catalogadas de um total estimado entre 350000 e 550000. Em contrapartida, pouco mais de 8% das espécies vegetais da flora brasileira foram estudadas em busca de compostos bioativos e cerca de 1100 espécies vegetais foram avaliadas em suas propriedades medicinais (SIMÕES et al, 2003).

Atualmente, as plantas são responsáveis por grande parte do faturamento das indústrias que exploram o potencial advindo dos recursos vegetais, principalmente no setor farmacêutico. Exemplos importantes de fármacos obtidos de espécies vegetais são os alcalóides bisindólicos - vinblastina e vincristina - isolados da *Catharantus roseus* (Apocynaceae) utilizados no tratamento da leucemia e o paclitaxel, isolado da *Taxus brevifolia* utilizado no tratamento do câncer de mama e de pulmão (BARREIRO & FRAGA, 2001, HOSTETTMANN et al, 2003).

Diversas etapas são necessárias para o desenvolvimento de medicamentos a partir de plantas medicinais. A etapa inicial deste processo é a seleção da planta. Nesta fase, a pesquisa etnobotânica é uma ferramenta importante que encurta o caminho entre a seleção das espécies e a descoberta de novos fitofármacos (BRUHN, 1989; BALICK, 1990; PRANCE, 1991; SOEJARTO, 1993; DEWITT, 1994; HOUGHTO, 1994; NIELSEN, 1994; KING, 1994; KING et al, 1994). A etnobotânica caracteriza-se pelo estudo e análise da interação homem-vegetal, considerando aspectos interdisciplinares e o uso local de espécies vegetais (MAIOLI-AZEVEDO, 2008). Para isso é necessária a coleta do material botânico para a elaboração de exsicatas e depósito das mesmas em herbário, para evitar enganos com a identificação da espécie que está sendo estudada (MACIEL et al, 2002). Na pesquisa etnobotânica, procura-se focar comunidades tradicionais, isto é, aquelas que vivem em estreita relação com o ambiente, dependendo de seus recursos naturais para a reprodução sócio-cultural, por meio de atividades de baixo impacto ambiental (DIEGUES, 1994).

As investigações etnobotânicas permitem planejar a pesquisa a partir de um conhecimento empírico já existente que deverá então ser testado em bases científicas. Esta estratégia tem sido utilizada como uma boa ferramenta para seleção de plantas medicinais (AMOROZO, 1996), permitindo a descoberta de fármacos extraídos da *Cordia verbenaceae* DC, como o antiinflamatório Acheflan[®] e de

metabólitos secundários com atividade antimicrobiana, como os extraídos da *Tulbaghia violacea* Harv. (NCUBE et al, 2011).

A resistência dos microorganismos patogênicos aos agentes antimicrobianos é um sério problema de saúde pública tanto em países desenvolvidos como em desenvolvimento (PENNA et al, 2001). Esta resistência tem crescido a cada ano, devido à superexposição das bactérias aos antibióticos (REUTERS, 2011). Dentre as bactérias superresistentes, a *Klebsiella pneumoniae* é a mais comumente encontrada no mundo, incluindo o Brasil. Os fatores de risco para as infecções por *K. pneumoniae* incluem internação prolongada, unidade de terapia intensiva (UTI), dispositivos invasivos, imunodepressão e o uso de vários antibióticos (NORDMANN, 2009). Os locais do mundo onde se verificam uma situação endêmica e epidêmica pela KPC e suas variantes incluem: Grécia, Israel, Colômbia, Porto Rico, locais específicos da China e Estados Unidos. No Brasil, recentemente, observou-se um aumento dos casos em hospitais, porém, ainda são casos isolados (REUTERS, 2011).

Staphylococcus aureus, bactéria Gram-positiva amplamente distribuída na natureza, faz parte da microbiota normal da pele e mucosas de mamíferos e aves, tem se tornado outra bactéria superresistente. É o agente mais comum de infecções piogênicas e em portadores do vírus HIV. Esta bactéria é conhecida pela sua elevada capacidade de desenvolver resistência a diversos antibióticos (MARTINS, 1999; PESAVENTO et al., 2005; SOUZA, 2007). A resistência de *S. aureus* à meticilina (MRSA) causa um grande impacto social e econômico nos grandes centros hospitalares, estima-se que somente MRSA seja responsável pela morte de cerca de 20 mil pessoas por ano nos EUA – mais do que a AIDS – e um número semelhante na Europa (DAVIES, 2011). Estes dados evidenciam a atual crise no tratamento de doenças infecciosas e aumentam a preocupação dos cientistas na busca de novos tratamentos que combatam a etiologia das mesmas (DAVIES, 2011).

Devido a fatores econômicos associados a avaliações mercadológicas, muitas das grandes companhias farmacêuticas tem focado suas pesquisas na descoberta de medicamentos mais rentáveis, como os antineoplásicos e antiretrovirais, refletindo na estagnação do lançamento de novos antibióticos. Spellberg e colaboradores (2008) observaram que entre os anos de 1983 e 2007houve uma diminuição de mais de 50% no lançamento de novos fármacos

desta classe. É notório que a pesquisa de novos agentes antimicrobianos se faz necessária, tanto pelos centros de pesquisas das universidades quanto pelo setor de pesquisa e desenvolvimento (P&D) das indústrias farmacêuticas. Neste contexto, a etnobotânica se torna uma ferramenta valiosa na descoberta de antibióticos capazes de combater as atuais cepas bacterianas superresistentes.

Durante a sua vida, as plantas reagem a várias injúrias advindas do ambiente e são capazes de produzir compostos antimicrobianos para se proteger contra infecções causadas por patógenos como bactérias, fungos e vírus (RODRIGUES, 1980; WOJTASZEK, 1997; YUNES e CALIXTO, 2001; ESQUENAZI et al., 2002). A presença de substâncias antimicrobianas nos vegetais superiores (RODRIGUES, 1980; BUHNER, 1999; COWAN, 1999; YUNES e CALIXTO, 2001) aumentam a importância de pesquisas com estes vegetais, pois os mesmos podem contribuir para a descoberta de medicamentos mais eficazes e menos tóxicos que impeçam os mecanismos de resistência dos microorganismos superresistentes (MENG et al, 2000; HO et al, 2001; MICHELIN et al, 2005; LEITÃO et al, 2006; LIMA et al, 2006; BARBOSA-FILHO et al, 2007; SAÚDE-GUIMARÃES & FARIAS, 2007; OSTROSKY et al, 2008).

Dentre as plantas superiores, os exemplares da família Rutaceae possuem grande importância no Reino Vegetal, por produzir uma quantidade importante de metabólitos secundários bioativos. A família Rutaceae A. Juss., ordem Rurales, possui cerca de 160 gêneros e 1.900 espécies, estando amplamente distribuída pelas regiões tropicais e temperadas do planeta Terra, sendo mais abundantes na América tropical, sul da África e Austrália (PIRANI, 1999). No Brasil, ocorrem 33 gêneros e cerca de 190 espécies nativas (PIRANI, 2010), a maioria na Mata Atlântica e na Amazônia (GIULIETTI, 2009). As plantas desta família são capazes de produzir uma variedade de metabólitos secundários, dentre eles fenilpropanóides como cumarinas, lignanas e flavonóides; além de terpenóides como limonóides, óleos essenciais e alcalóides. Os alcalóides produzidos por esta família, os derivados do ácido antranílico – dentre eles os acridônicos e furoquinolínicos - são considerados marcadores quimiotaxonômicos desta família. A ocorrência destes alcalóides é restrita a espécies vegetais Rutaceae (AMBROZIN, 2004).

Os metabólitos secundários desta família são responsáveis por diversas atividades biológicas. Dentre os alcalóides já isolados tem-se os quinolínicos com ação moluscicida (*Galipea bracteata*), quinolinonas com ação inseticida (*Esenbeckia*

leiocarpa), acridônicos com ação antineoplásica (*Angostura paniculata*) (VIEIRA & KUBO, 1992) e furoquinolinas com atividade antiplasmodial (*Teclea afzelii*) (WANSI et al, 2010), antineoplásica (*Ertela trifolia*) (CAO et al, 2008) e antiinflamatória (*Evodia lunu-ankeda*) (LAL et al, 2005). É importante ressaltar que são poucos os estudos que abordam a atividade antimicrobiana dos alcalóides da família Rutaceae.

Os extratos da *Hortia oreadica* (Rutaceae) foram capazes de inibir o crescimento de cepas de *Streptococcus salivarius*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus mutan*, *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus sanguinis* (SEVERINO et al, 2009). O extrato etanólico da *Zanthoxylum zanthoxyloides* Lam. (Rutaceae) inibe o crescimento de *C. albicans* e *S. aureus* (ADEBIYI et al, 2009). Os extratos acetato de etila e clorofórmico das espécies *Esenbeckia grandiflora* Mart.e *Galipea simplicifolia* (Rutaceae) apresentaram atividade antibacteriana frente cepas de *E. coli* e *S. aureus* (COSTA et al, 2010).

A *Ertela* (*Monnieria*) *trifolia* (L.) Kuntze (Rutaceae) foi selecionada a partir de um levantamento etnobotânico realizado em 2008 no terreiro de candomblé Manso Dandalungua Cocuazenza (ALMEIDA et al, 2007). O mesmo está situado na Estrada Velha do Aeroporto, periferia de Salvador-BA, e possui uma área com 38.000 m² de remanescente de Mata Atlântica (Figura 1).

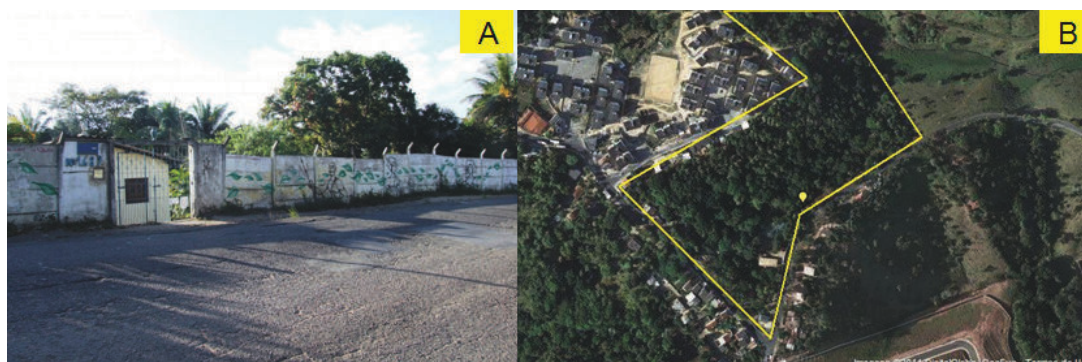


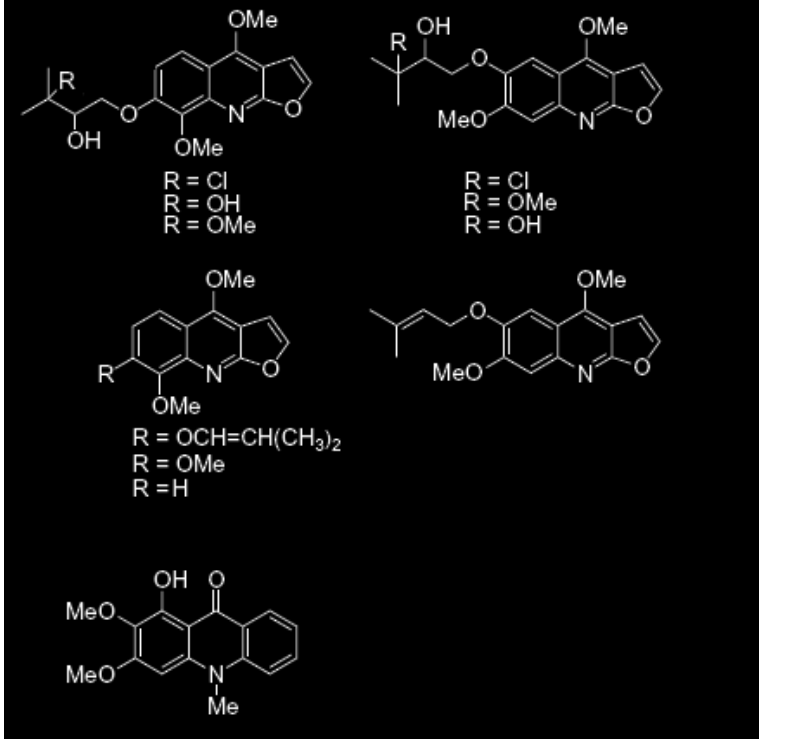
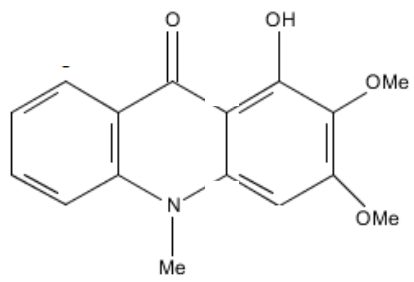
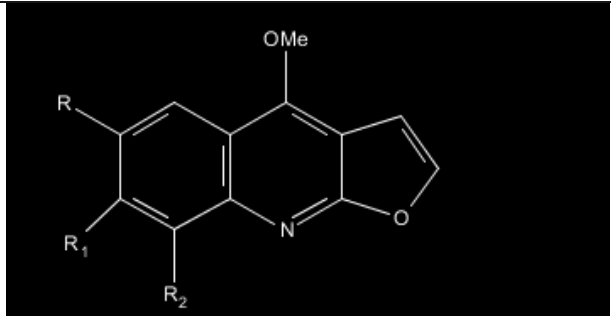
Figura 1: Manso Dandalungua Cocuazenza. (A) Fachada; (B) Imagem de satélite, destacando os 38.000m² de área verde no limite da linha amarela.

A *E. trifolia* apresenta as sinónimas botânicas *Ertela bahiensis* (Engl.) Kuntze, *Monnieria trifolia* L., *Monniera trifolia* Loefl., *Moniera trifolia* L. (PIRANI, 2010; *Missouri Botanical Garden*, 2011). Esta espécie é nativa, porém não é endêmica do Brasil, estando presente nos biomas Amazônia, Caatinga e Mata Atlântica, podendo ser encontrada no Norte (Roraima, Amapá, Pará, Amazonas, Tocantins, Acre, Rondônia), Nordeste (Maranhão, Piauí, Pernambuco, Bahia, Alagoas, Sergipe) e

Centro-Oeste (Mato Grosso, Goiás, Mato Grosso do Sul). O seu nome popular varia de acordo com a região onde se encontra, sendo conhecida como maricutinha e alfavaca-de-cupim na Bahia, alfavaca de cobra no Amazonas, alecrim-de-cobra em Alagoas e alfavaca brava e pimenta de lagarta no Pará. É usada popularmente como diurética, antidiabética, emenagoga, expectorante, antitérmica (ROSEGHINI, 2005), agente antiinflamatório (CORREA, 1926), para tratar doenças renais e hepáticas, além de ser usada em rituais de religiões afro-brasileiras (SILVA FILHO et al, 2008).

Estudos fitoquímicos anteriores isolaram os alcalóides esquimianina (FOURASTE et al, 1973; BHATTACHARYYA et al, 1984; CAO et al, 2008), arborinina (CAVE et al, 1971; BHATTACHARYYA et al, 1984; ROSEGHINI et al, 2006), montrifolina, delbina, kokusaguinina, fagarina, evoxina (BHATTACHARYYA et al, 1984) e outros alcalóides furoquinolônicos (CAO et al, 2008) das partes aéreas da *E. trifolia*– Quadro 1.

Em relação aos testes de atividade antimicrobiana, não existe nenhum dado anterior a este trabalho referente ao assunto. As atividades biológicas testadas referem-se a ação antiproliferativa dos extratos da *E.trifolia* frente a linhagens celulares humanas de câncer ovariano (CAO et al, 2008) e a ação da arborinina como estimuladora da produção de células do sistema imunológico de ratos. Não foi encontrado registro algum de produto e (ou) processo com a espécie nas bases de patentes do Instituto Nacional de Propriedade Intelectual (INPI), “European Patent Office” (EPO) e “United States Patent and Trademark Office” (USPTO). Em relação à conservação da espécie, não consta registro da mesma nas listas de espécies vulneráveis à extinção do “International Union for Conservation of Nature” (IUCN) e Ministério do Meio Ambiente (MMA).

Substâncias isoladas	Parte da planta	Referência
 <p>R = Cl R = OH R = OMe</p> <p>R = Cl R = OMe R = OH</p> <p>R = OCH=CH(CH₃)₂ R = OMe R = H</p>	Partes aéreas	CAO et al, 2008.
	Partes aéreas	CAVE et al, 1971. BHATTACHARYY A et al, 1984. ROSEGHINI et al, 2006.
 <p>1 R= OCH₂CH(OH)C(OH)(CH₃)₂, R₁= OCH₃, R₂= H</p> <p>2 R= OH, R₁= OCH₃, R₃=H</p> <p>3 R=R₁=OCH₃, R₂= H</p> <p>4 R=R₁=H, R₂=OCH₃</p> <p>5 R=H, R₁=R₂=OCH₃</p> <p>6 R=H, R₁=OCH₂CH(OH)C(OH)(CH₃)₂, R₂= OCH₃</p> <p>7 R= OCH₃, R₁=OH, R₂=H</p>	Partes aéreas	BHATTACHARYY A et al, 1984. FOURASTE et al, 1973. CAO et al, 2008.

Quadro 1: Alcalóides já isolados e identificados da *E. trifolia*.

2.0 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a ação antibacteriana dos extratos e frações das partes aéreas e subterrâneas da *Ertela (Monnieria) trifolia* (L.) Kuntze (Rutaceae) e identificar quais são as possíveis moléculas responsáveis por esta atividade.

2.2 Objetivos específicos

Quanto ao estudo fitoquímico:

1. Extrair os metabólitos secundários presentes na partes aéreas e subterrâneas.
2. Purificar as frações que apresentarem atividade antimicrobiana.

Quanto ao estudo microbiológico:

3. Determinar a atividade antibacteriana os extratos de *E. trifolia* e de suas frações, através da técnica da difusão de disco.
4. Determinar a concentração inibitória mínima (CIM) e bactericida mínima (CBM) dos extratos e frações positivos no teste de difusão em disco.
5. Avaliar a atividade antibacteriana dos extratos e frações, através da técnica da bioautografia.

3.0 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material vegetal

E. trifolia foi coletada durante a manhã, no dia 26 de abril de 2009, na Fazenda Riacho Claro, situada no município de São Sebastião do Passé-BA (12° 30'S; 38° 29'W) onde é conhecida popularmente como alfavaca-de-cupim. Um espécime foi identificado pela curadora Profa. Dra. Maria Lenise Silva Guedes e depositado no Herbário Alexandre Leal Costa (ALCB) do Instituto de Biologia da Universidade Federal da Bahia. A exsicata foi catalogada sob o número ALCB-88273 (Figura 2).



Figura 2: Exsicata da *E. trifolia*. Planta adulta medindo 30cm (Herbário ALCB-UFBA nº 88273).

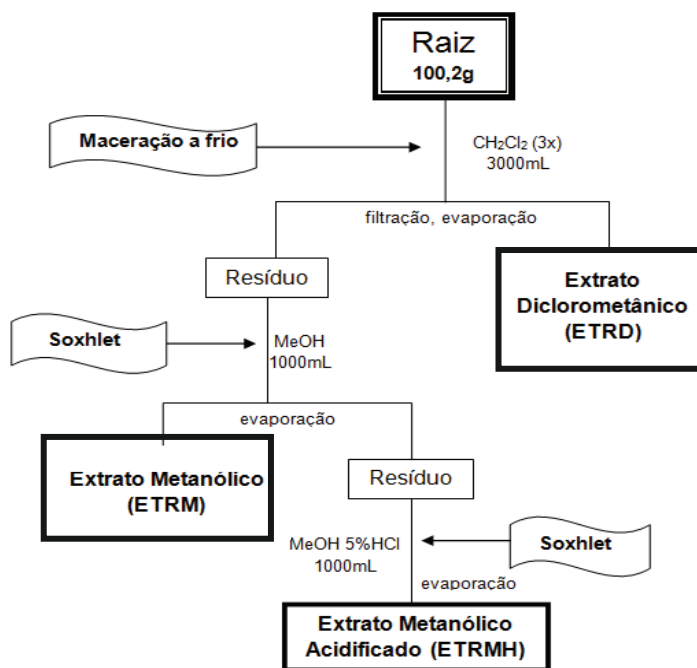
3.2 Obtenção dos extratos e frações

Após a coleta, todos os exemplares da planta adulta *in natura*, com tamanhos variando entre 30 e 70 cm, foram separados em folhas (406,9g), caules (457,9g) e raízes (100,2g), apresentando massa total de aproximadamente 965,0g. Em seguida, estes órgãos vegetais foram extraídos sucessivamente com diclorometano, acetato de etila, clorofórmio, metanol e metanol com ácido clorídrico. Os sistemas de eluentes utilizados na cromatografia em coluna aberta (CCA) foram definidos por cromatografia em camada delgada analítica (CCDA).

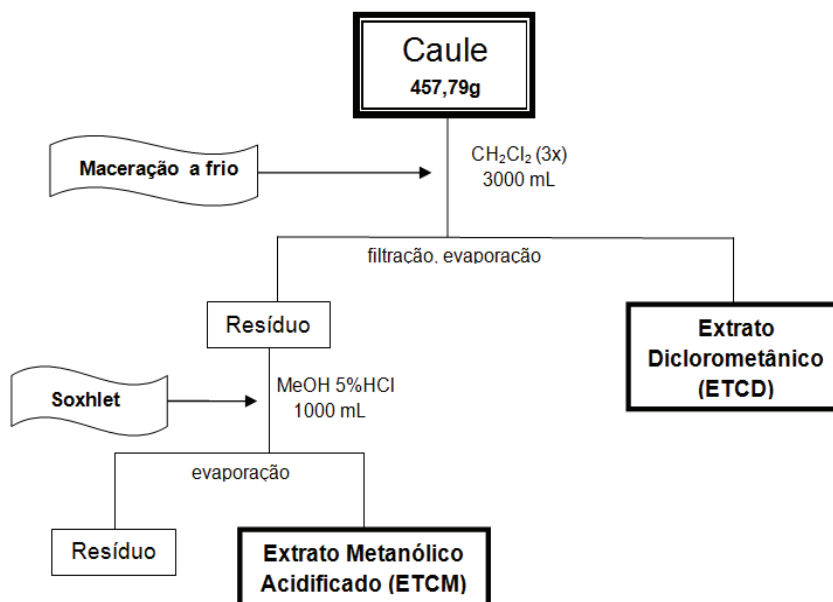
Os extratos que apresentaram atividade antibacteriana e uma quantidade de massa suficiente para dar continuidade a realização dos testes foram fracionados.

3.2.1 Obtenção dos extratos da raiz e do caule

Foram realizadas três extrações da raiz e caule, fragmentados, por maceração a frio em balão de vidro, protegido da luz ambiente, com diclorometano (CH_2Cl_2) PA (QUEMIS), em intervalos de sete dias. Os macerados foram filtrados, concentrados em evaporador rotatório (FISATOM 802), secos em dessecador e armazenados sob refrigeração em frasco de vidro âmbar. Ao final das três extrações os extratos foram agrupados. Em seguida, nova extração foi procedida com as mesmas raízes e caules através de técnica de extração à quente utilizando Soxhlet. A extração da raiz foi feita em dois ciclos de 12 horas. No primeiro ciclo foi utilizado metanol (MeOH) PA (QUEMIS) e no segundo metanol PA (QUEMIS) com 5% de ácido clorídrico (HCl) PA (QUIMEX). Já a extração do caule foi feita em um ciclo de 12 horas com metanol acrescido de 5% de HCl. Os macerados foram concentrados, secos e armazenados sob refrigeração. Os esquemas 1 e 2 apresentam os esquemas de extração e fracionamento descritos.



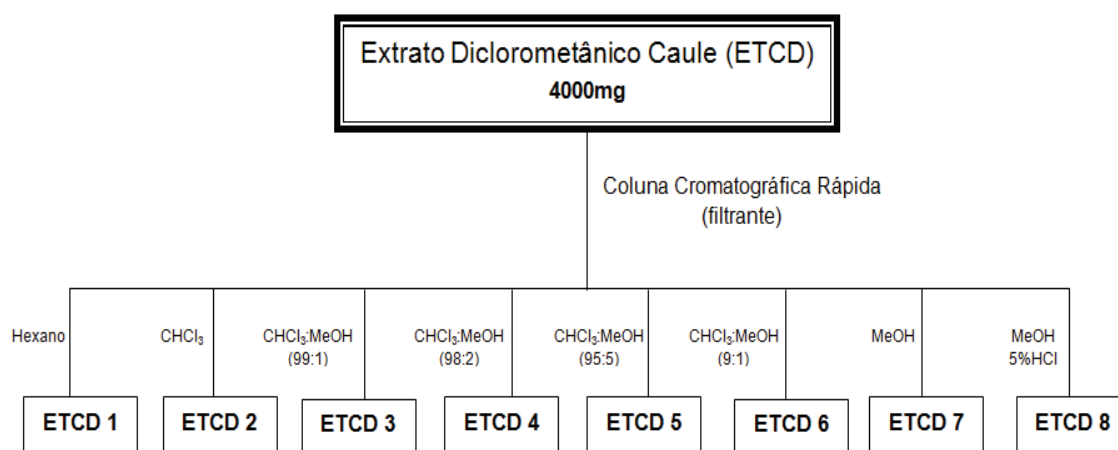
Esquema 1: Métodos de obtenção dos extratos da raiz da *E.trifolia*.



Esquema 2: Métodos de obtenção dos extratos do caule da *E.trifolia*.

3.2.1.1 Fracionamento do extrato diclorometânico do caule (ETCD)

Aproximadamente 4000mg de ETCD foram submetidos à cromatografia rápida (filtrante) por adsorção em gel de sílica 60 (MERCK, 63 - 200 μ m), com uma relação entre sílica e extrato 1:20. Os eluentes foram utilizados na seguinte ordem: hexano (FMAIA), clorofórmio PA (QUEMIS), clorofórmio:metanol (99:1; 98:2; 95:5; 9:1), metanol puro e metanol com 5% de HCl. Este fracionamento rendeu oito frações (Esquema 3).



Esquema 3: Fracionamento do extrato diclorometânico do caule da *E.trifolia*.

3.2.1.1.1 Purificação da fração ETCD5

Cerca de 1060mg de ETCD5 foram submetidos à cromatografia em coluna aberta (CCA) com gel de sílica 60, com uma relação entre sílica e extrato de 1:40. Os eluentes utilizados foram clorofórmio:metanol em gradiente, sendo a polaridade aumentada no decorrer da separação. Durante a eluição coletou-se alíquotas de 5mL. Desta coluna foram recolhidas 130 frações, as quais depois de serem analisadas por cromatografia em camada delgada analítica (CCDA), foram agrupadas dando origem a 34 frações.

3.2.2 Obtenção dos extratos da folha

A extração do óleo essencial da folha (406,89g) foi realizada por hidrodestilação em aparelho de Clevenger (Figura 3A), conforme preconizado pela Farmacopéia Brasileira 4^a edição (1988). O óleo essencial extraído foi armazenado sob refrigeração em frasco de vidro hermeticamente fechado e protegido da luz. A

água do decocto das folhas (Figura 3B) foi extraída com acetato de etila PA (QUEMIS).

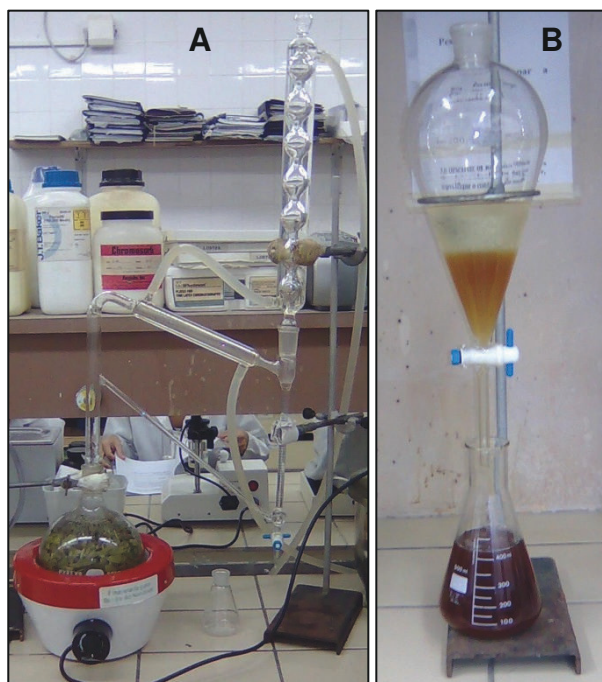
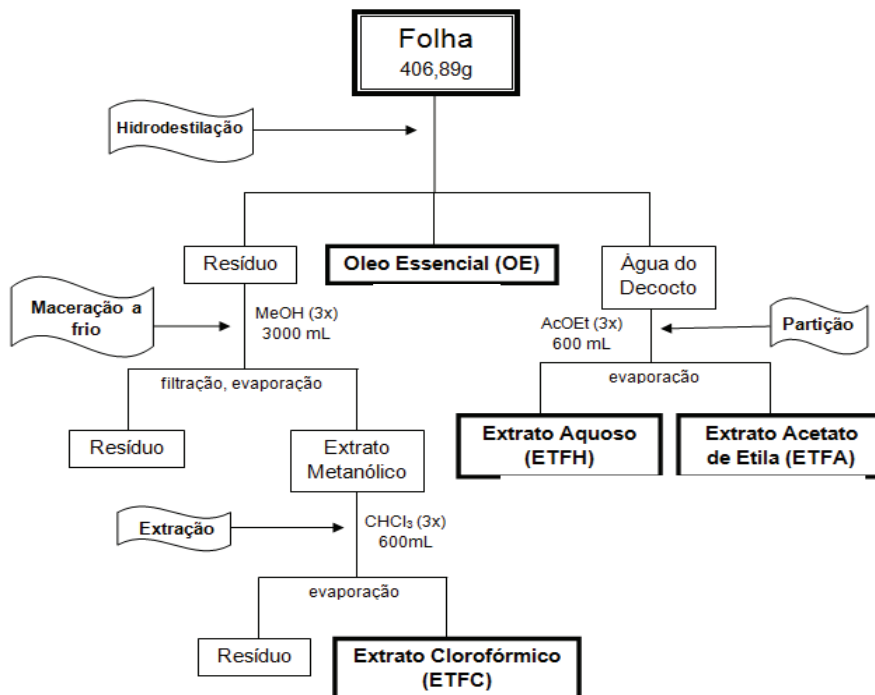


Figura 3: Extração das folhas de *E. trifolia*. (A) Aparelho de Clevenger modificado (LAPEMM-UFBA); (B) Partição da água do decocto das folhas com acetato de etila.

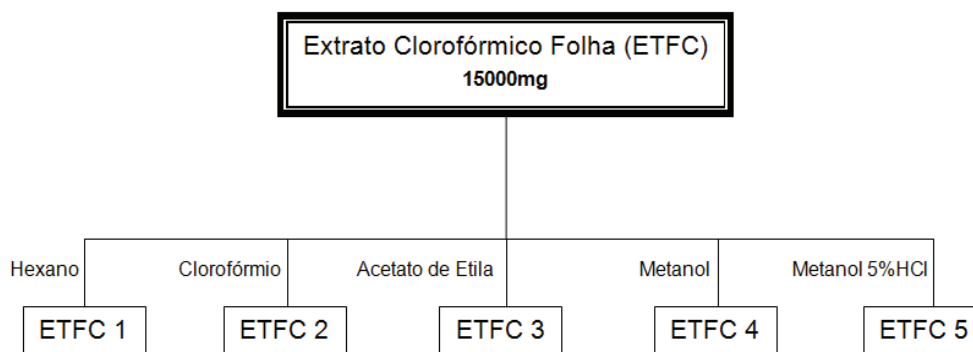
O mesmo material vegetal utilizado na hidrodestilação foi extraído posteriormente com metanol por maceração a frio. Foram realizadas três extrações com metanol, em intervalos de sete dias. Durante os intervalos, o macerado foi filtrado, concentrado em rota evaporador e extraído com clorofórmio PA (QUEMIS). A fase clorofórmica foi concentrada, seca e armazenada em frasco de vidro âmbar sob refrigeração (Esquema 4).



Esquema 4: Métodos de obtenção dos extratos da folha da *E.trifolia*.

3.2.2.1 Fracionamento do extrato clorofórmico da folha (ETFC)

Aproximadamente 15g de ETFC foram submetidos à cromatografia rápida (filtrante) por adsorção em gel de sílica 60 com uma relação entre sílica e extrato de 1:40. Foram utilizados os eluentes na ordem: hexano, clorofórmio, acetato de etila, metanol puro e metanol 5% de HCl (Esquema 5).



Esquema 5: Fracionamento do extrato clorofórmico da folha da *E.trifolia*.

3.2.2.1.1 Purificação da fração ETFC2

Cerca de 4000mg de ETFC2 foram submetidos à cromatografia em coluna aberta (CCA) com gel de sílica 60 com uma relação entre sílica e extrato de 1:40. Os eluentes utilizados foram clorofórmio:metanol em gradiente de polaridade. Durante a eluição foram coletadas alíquotas de 5mL. Ao final da corrida cromatográfica, foram coletados 27 frações, depois de serem analisadas por CCDA, as mesmas foram agrupadas, originando 19 frações.

3.2.2.1.2 Purificação da fração ETFC2.14

Aproximadamente 900mg de ETFC2.14 foram submetidos à cromatografia em coluna aberta (CCA) com gel de sílica 60 com uma relação entre sílica e extrato de 1:40. Foram utilizados os eluentes: clorofórmio, clorofórmio:acetona (98:2), clorofórmio:acetona (8:2), acetona, clorofórmio:metanol (1:1) e metanol puro. Foram coletadas alíquotas de 5mL no decorrer da separação. Desta coluna foram coletadas 33 frações, depois de serem analisadas por CCDA, as mesmas foram agrupadas, originando 26 frações.

3.2.2.2 Fracionamento do extrato acetato de etila da folha (ETFA)

Cerca de 2000mg de ETFA foram submetidos à cromatografia rápida (filtrante) por adsorção em gel de sílica 60 com uma relação entre sílica e extrato de 1:30. Foram utilizados como eluentes clorofórmio:metanol em gradiente de polaridade, na ordem: clorofórmio puro, clorofórmio:metanol (99:1), clorofórmio:metanol (98:2), clorofórmio:metanol (97:3), clorofórmio:metanol (96:4), clorofórmio:metanol (95:5), clorofórmio:metanol (9:1), clorofórmio:metanol (8:2), clorofórmio:metanol (1:1) e metanol. Desta coluna foram coletadas 33 frações, depois de serem analisadas por CCDA, as mesmas foram agrupadas, originando 16 frações.

3.2.2.3 Análise dos extratos e frações por UV-Vis

Os espectros de ultravioleta foram obtidos em espectrofotômetro FEMTO – 800XI, utilizando cubeta de quartzo, caminho óptico de 1cm, no intervalo de 200 a 650nm.

3.2.2.4 Análise dos extratos e frações por IV

As análises espectrofotométricas na região do infravermelho foram realizadas no Instituto de Química da UFBA, em espectrofotômetro (região do infravermelho) com transformada de Fourier IR-MB 100 – ABB Bomen, Arid Zone™, utilizando pastilhas de KBr.

3.2.2.5 Análise dos extratos e frações por RMN

Os espectros de RMN de ^1H (300 MHz) e ^{13}C (75 MHz) foram obtidos dos extratos e frações que apresentaram resultados positivos nos testes microbiológicos. As análises foram realizadas no espectrômetro da marca Varian modelo Gemini 2000, localizado no Instituto de Química da UFBA e no Departamento de Química (DQ) - UFMT.

3.3 Ensaios microbiológicos

3.3.1 Microorganismos

Foram utilizados nos testes de susceptibilidade, cinco bactérias cepas-padrão do “American Type Culture Collection” (ATCC): *Staphylococcus aureus* 25923, *Staphylococcus aureus* 33591, *Escherichia coli* 25922, *Pseudomonas aeruginosa* 27853 e *Salmonella entérica* 13076; e três *Staphylococcus aureus* hospitalares: isolado 01 (resistente a Amoxicilina + Acido Clavulônico, Ampicilina, Cefoxitina, Ciprofloxacina, Clindamicina, Eritromicina e Ofloxacina), isolado 02 (resistente a Ampicilina, Cefoxitina e Ciprofloxacina) e isolado 03 (sensível a Cefoxitina 30µg, Ciprofloxacina 5µg, Ampicilina 10µg, Tetraciclina 30µg, Vancomicina 30µg, Levofloxacina 5µg, Ofloxacina 5µg, Amoxicilina associada ao ácido clavulônico 30µg, Clindamicina 2µg, e Eritromicina 15µg).

Todas as cepas fazem parte da Coleção de Cultura do Laboratório de Pesquisa em Microbiologia Clínica (LPMC) da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal da Bahia (UFBA). São mantidas à temperatura de -20°C e, no momento do uso, foram repicadas em ágar de soja e tripiticaséina (TSA – ACUMEDIA) e incubadas a temperatura de 35°C por 18-24h.

Todos os extratos e frações ativos frente as cepas bacterianas padrões ATCC também foram testadas frente a isolados clínicos hospitalares Gram positivas.

3.3.2 Testes de susceptibilidade

3.3.2.1 Difusão em disco

O teste de difusão em disco foi realizado baseado na Norma M02-A10 do “Clinical and Laboratory Standards Institute” (CLSI) (CLSI-A, 2009), adaptada para testes com produtos naturais.

3.3.2.1.1 Suspensão bacteriana

De um crescimento de 24 horas em TSA, foi feita uma suspensão bacteriana em solução salina (0,85%) esterilizada cuja turvação foi ajustada à escala de turbidez 0,5 de McFarland, correspondente a aproximadamente de $1,0 \times 10^8$ UFC/mL.

3.3.2.1.2 Impregnação de discos

Foram aplicados 10µL de solução do extrato ou da fração dissolvidos em Dimetilsulfóxido (DMSO - FMAIA) na concentração de 300 µg/µL em discos de papel de filtro de seis milímetros (mm) de diâmetro previamente esterilizados. Após aplicação, os discos foram secos em estufa a 35°C.

3.3.2.1.3 Técnica de difusão em disco

Um “swab” esterilizado foi umedecido na suspensão bacteriana (item 3.3.2.1.1) recém preparada e o excesso de líquido foi retirado comprimindo-o na parede interna do tubo. O inóculo foi então semeado na superfície de uma placa de Petri contendo ágar Mueller-Hinton (AMH - ACUMEDIA) com quatro mm de espessura, estriando o “swab” em três direções diferentes e com um giro final de cerca de 60 graus, para assegurar uma distribuição bacteriana uniforme.

Com auxílio de uma pinça estéril, os discos impregnados e secos foram aplicados na superfície seca da placa inoculada, respeitando a distância de 20 mm entre os mesmos e entre a borda da placa. As placas foram incubadas a 35°C por 24h, e após o período de incubação o diâmetro do halo de inibição de crescimento bacteriano ao redor do disco foi medido em mm. Foi considerado ativo o extrato ou a fração que apresentou halo de inibição de crescimento bacteriano igual ou superior a dez mm de diâmetro (SOUZA, et al 2005).

Os testes foram feitos em triplicata e o resultado final foi determinado pela média aritmética dos halos obtidos. O controle positivo do experimento foi realizado

com o disco de gentamicina (10µg – LABORCLIN) frente ao *S. aureus* ATCC 25923, enquanto o controle negativo com disco impregnado com 10µL de DMSO.

3.3.2.2 Teste de difusão em poço

Na determinação da atividade antibacteriana do óleo essencial foi utilizado o método de difusão em ágar de Kirby e Bauer modificado (LIMA et al, 2006), método mais apropriado para a análise de substâncias voláteis.

Nesse método, 1,0 mL da suspensão bacteriana recém preparada (item 3.3.2.1.1), foi homogeneizado com 14 mL de CMH, fundido a 45°C, e vertido em placas de Petri contendo uma base fina de ágar bacteriológico a 1% com ponteiras estéreis na posição vertical, para formação dos poços (Figura 09).

Após solidificação do meio, as ponteiras foram retiradas com cuidado e 30µL do óleo foram aplicados em cada poço. Após incubação a 35°C por 18-24h, o diâmetro do halo de inibição de crescimento bacteriano ao redor do poço foi medido em mm. Os testes foram feitos em triplicata e o resultado final foi determinado pela média aritmética dos halos obtidos. Como controle de sensibilidade, 30 µL de solução etanólica de cloranfenicol (SIGMA - ALDRICH) (1µg/µL) foram aplicados em um dos poços e, em outro poço, 30µL de etanol como controle negativo.

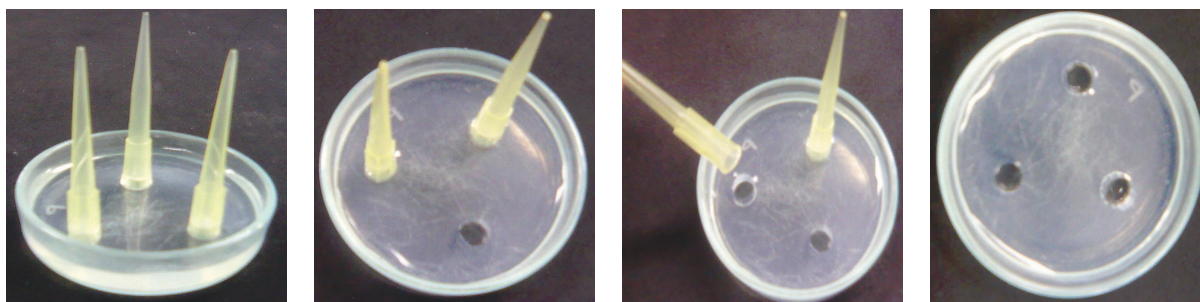


Figura 4: Técnica de difusão em poço. Formação dos poços após solidificação do meio de cultura e retirada das ponteiras.

3.3.2.3 Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A CIM foi determinada pela técnica da microdiluição, segundo a Norma M07-A8 do CLSI (CLSI-B, 2009) adaptada para testes com produtos naturais, somente para os extratos e frações que apresentaram atividade antibacteriana através da técnica de difusão em disco e em poço.

3.3.2.3.1 Preparo de soluções

De cada extrato e fração, foram feitas soluções na concentração de 1000 mg/mL em DMSO, as quais foram diluídas 1:10 em CMH contendo 10% de DMSO, e em seguida, foi realizada mais uma diluição 1:5 em CMH, obtendo essa solução a concentração de 20 mg/mL (soluções testes).

Solução etanólica de cloranfenicol a 5120 µg/mL foi diluída duas vezes consecutivas em CMH (1:10 e 1:14) para obtenção de concentração de 128 µg/mL.

3.3.2.3.2 Técnica da microdiluição

50 µL de CMH foram colocados a partir do segundo poço de cada fileira de uma microplaca de 96 poços com fundo em “U”. Em seguida, 50 µL da solução teste de cada extrato e fração foram dispensados no primeiro e segundo poços de cada fileira” (Esquema 01). Após homogeneização, foram realizadas diluições seriadas 1:2, transferindo 50 µL a partir do segundo poço até o 12º poço, sendo descartados os últimos 50 µL. Finalmente, foram adicionados 50 µL de suspensão bacteriana na concentração de $1,0 \times 10^6$ UFC/mL ($1,0 \times 10^8$ UFC/mL (item 2.2.1.1.) diluída 1:100 em CMH) em todos os poços de cada fileira, para atingir a concentração final de 5×10^5 UFC/mL em cada poço. As concentrações finais dos extratos e frações alcançadas nas placas são da faixa de 10 a 0,005 mg/mL (Esquema 6).

Fileiras 01 a 12

Extrato A	A	10	5	2,5	1,25	0,62	0,31	0,15	0,07	0,03	0,01	0,009	0,005	mg/mL
Extrato B	B													
Extrato C	C													
Controle	D	64	32	8	4	2	1	0,5						µg/mL

Esquema 6: Placa de 96 poços para o teste da microdiluição, mostrando as concentrações finais dos extratos e frações nos quadros de cor azul e as concentrações finais do controle nos quadros de cor amarela.

Os testes foram realizados em duplicata e foram feitos controles de crescimento bacteriano (50µL de meio de cultura + 50µL do inóculo), de esterilidade dos extratos (50µL de meio de cultura + 50µL do extrato), de esterilidade do meio de cultura (100µL de meio de cultura) e de sensibilidade (50µL da solução de cloranfenicol + 50µL do inóculo – *S. aureus* ATCC 25923).

As placas foram incubadas por 24 h a 35°C e, em seguida, 15 µL de solução aquosa a 0,5% do corante vital 2,3,5-trifenil tetrazólio (TTC – Mallinckrodt) foram adicionados e mais uma hora de incubação a 35°C foi procedida. A CIM foi determinada como a menor concentração que inibiu totalmente o crescimento bacteriano, revelada pela ausência de cor vermelha.

3.3.2.4 Concentração Bactericida Mínima (CBM)

Anterior a adição do TTC, com auxílio de alça bacteriológica, foi feita subcultura de cada poço onde não houve crescimento bacteriano visível, em placa de Petri contendo TSA. As placas foram incubadas por 24 h a 35°C e a CBM foi determinada pela observação de ausência do crescimento bacteriano correspondente ao poço de onde foi semeado. As concentrações que inibiram o crescimento bacteriano no poço e o crescimento bacteriano na placa foram consideradas as concentrações bactericidas mínima.

3.3.2.5 Bioautografia

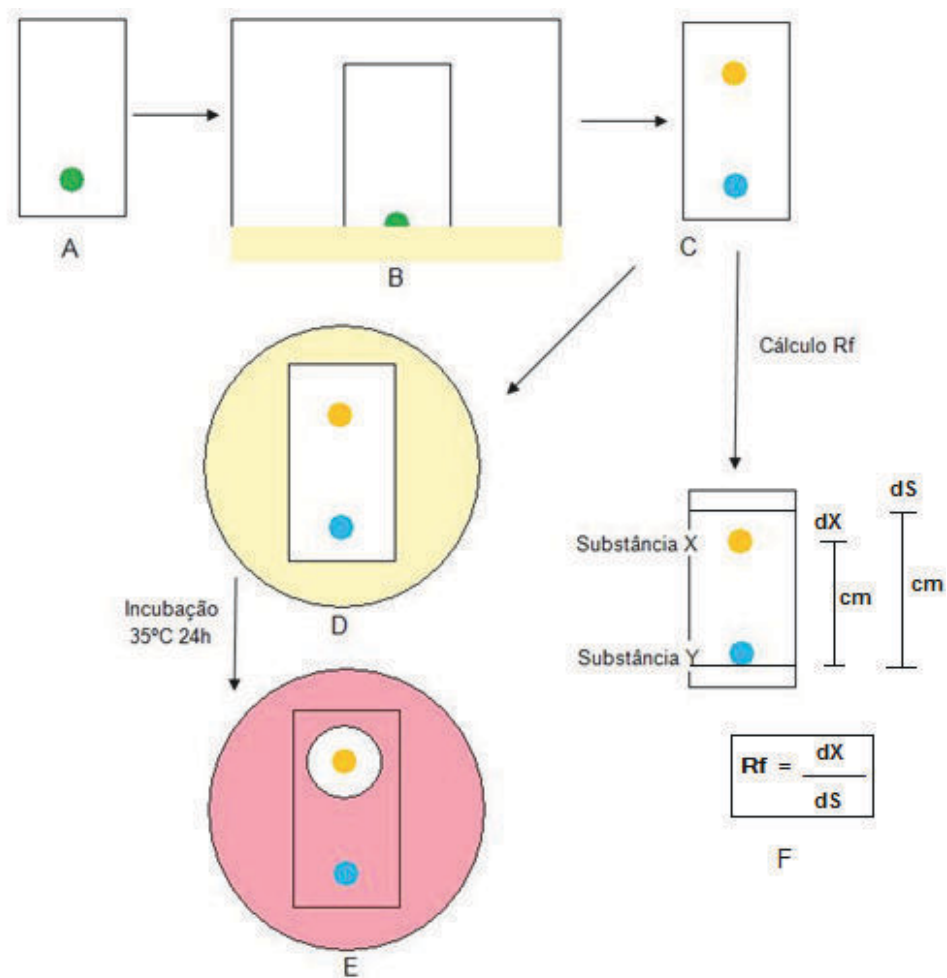
O teste de bioautografia foi realizado segundo Runyoro (2006), utilizando placas de alumínio gel de sílica 60 F₂₅₄ (MERCK) 20x20 cm, as quais foram fragmentadas em placas com as dimensões 2,5 x 7,5 cm. Foram aplicados 5µL do extrato (600µg/µL) dissolvido no solvente orgânico que lhe deu origem, na linha de partida de cromatoplaça. Os sistemas de solventes utilizados nas corridas cromatográficas são apresentados na Tabela 01. Cada experimento foi realizado em duplicata e o cloranfenicol (SIGMA-ALDRICH) foi utilizado como controle de sensibilidade e a uma corrida em placa sem nada aplicado como controle negativo. Após eluição e volatilização dos solventes, foi feita revelação cromatográfica com luz ultravioleta e em seguida foram calculados os índices de retenção (Rf) das substâncias através da divisão entre a distância percorrida pelas substâncias e a distância percorrida pelo solvente. Em continuidade ao processo, a cromatoplaça foi colocada dentro de uma placa de Petri vazia e esterilizada e, em seguida, foram

vertidos 15 mL do AMH fundido a 45°C acrescido de 1 mL da suspensão bacteriana (item 2.2.1.1.) recém preparada. Após solidificação do meio, as placas foram incubadas a 35°C por 24 h e o corante vital TTC foi borrifado sob a placa. As áreas de inibição de crescimento bacteriano foram reveladas pelo aparecimento de zonas claras não coradas pelo TTC e os respectivos Rfs foram calculados de maneira idêntica ao anteriormente descrito. O esquema 7 ilustra as etapas do teste de bioautografia realizado. A bioautografia foi realizada com os extratos e frações que apresentaram atividade antibacteriana positiva através da técnica de difusão em disco e que possuíam massa suficiente para dar continuidade aos fracionamentos cromatográficos.

Tabela 1: Sistemas de solventes utilizados nas corridas cromatográficas e seus respectivos extratos.

Amostra	Sistema de solventes
ETCD – Caule	CHCl ₃ :MeOH (89:11)
ETCD5 –Caule	CHCl ₃ :MeOH (97:3)
ETFA– Folha	CHCl ₃ :MeOH (9:1)
ETFC – Folha	CHCl ₃ :MeOH (87:13)
ETFC2 – Folha	CHCl ₃ :MeOH (95:5)

CH₂Cl₂: diclorometano; F4: fração de CH₂Cl₂; AcOEt: acetato de etila; CHCl₃: clorofórmio; F2: fração de CHCl₃; MeOH: metanol



Esquema 7: Metodologia da bioautografia. (A) aplicação da amostra em placa cromatográfica (CCD); (B) eluição da CCD; (C) CCD eluída; (D) CCD incubada em meio sólido inoculado; (E) revelação com solução de TTC; (F) cálculo dos fatores de retenção das áreas claras da cromatoplaça. Fonte: SOUZA,2007.

4.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Fitoquímicos

4.1.1 Rendimentos dos fracionamentos e purificações

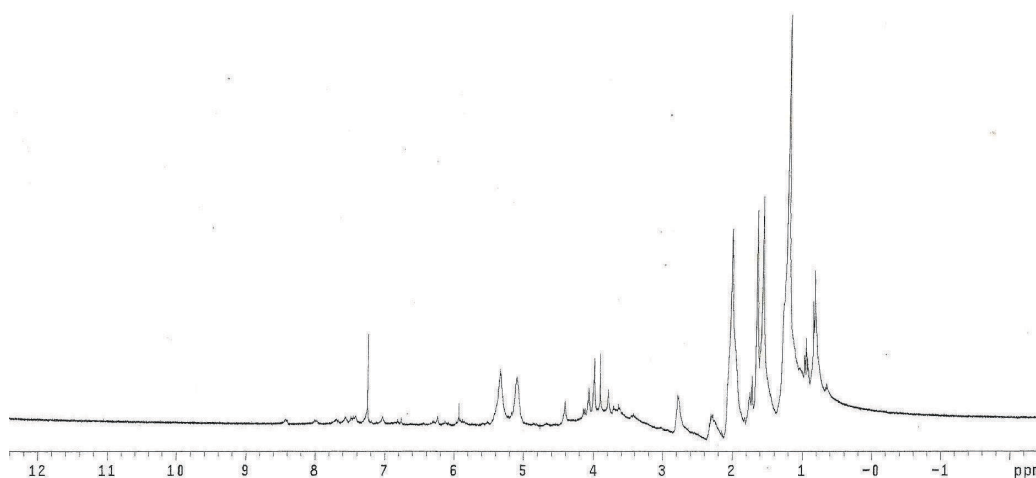
Os extratos que apresentaram atividade contra cepas padrão e isolados clínicos multirresistentes foram fracionados e analisados quanto a sua composição química. Os extratos que apresentaram resultados negativos – extratos da raiz, metanólico acidificado do caule, óleo essencial e aquoso da folha - não passaram por fracionamento e posterior análise química.

O extrato diclorometânico do caule (ETCD) apresentou atividade antimicrobiana e por isso foi dado seguimento ao seu fracionamento. O primeiro fracionamento rendeu oito frações, ETCD1 (1mg), ETCD2 (530mg), ETCD3 (450mg), ETCD4 (60mg), ETCD5 (1430mg), ETCD6 (10mg), ETCD7 (440mg), ETCD8 (880mg), havendo perda de 200mg de extrato. Destas frações, a fração ETCD5 apresentou-se bioativa e foi purificada, gerando 34 frações, sendo a maior massa a da fração ETCD5.26, 661mg.

O extrato clorofórmico da folha (ETFC), também foi fracionado, gerando cinco frações: ETFC1 (1350mg), ETFC2(4420mg), ETFC3(6810mg), ETFC4(970mg) e ETFC5(860mg), ocorrendo a perda de aproximadamente 590mg de extrato. Posteriormente a fração ETFC2 foi purificada, pois apresentou atividade antimicrobiana, rendendo 19 frações, sendo a maior massa a fração ETFC2.14, 900mg. Seguindo o mesmo critério de fracionamento dos outros extratos, o acetato de etila (ETFA) também foi fracionado, gerando 16 frações, apresentando as maiores massas as frações ETFA8, 170mg e ETFA11, 350mg.

4.1.2 Identificação e determinação estrutural

O extrato clorofórmico das folhas apresentou atividade antimicrobiana, conforme descrito na Tabela 5, p55. O espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) do mesmo (Espectro 1), apresentou diversos sinais na região alifática e deslocamentos químicos em 4,00 δ indicativos da presença de metoxilas. Além disso, se observa a presença de sinais pouco intensos na região aromática.

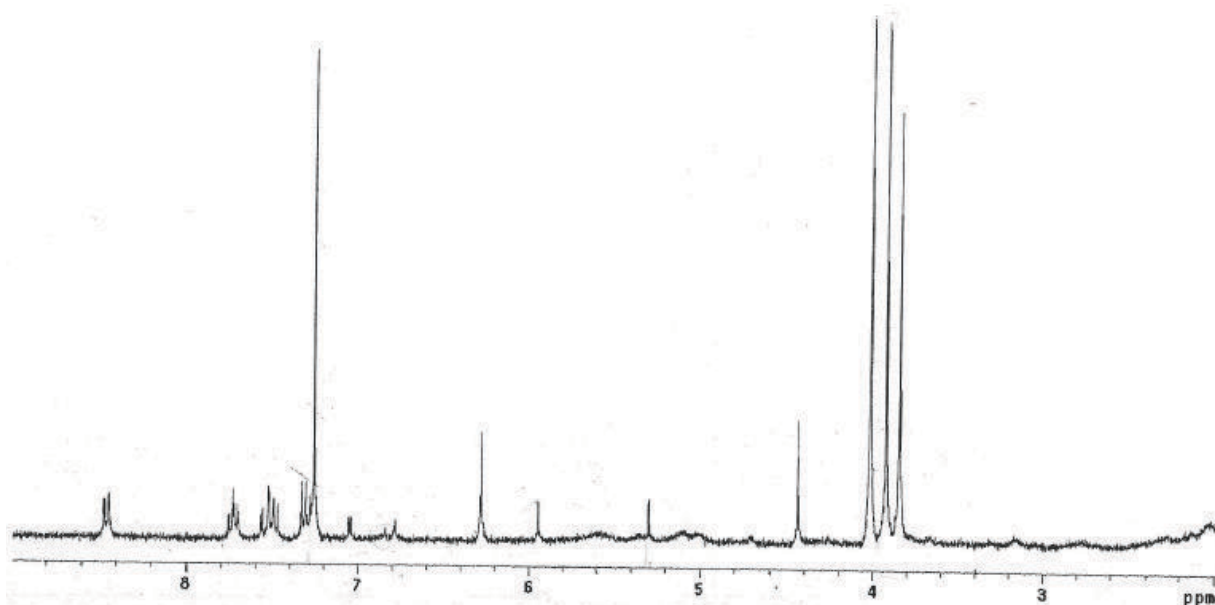


Espectro 1: RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) do extrato clorofórmico da folha da *E. trifolia*.

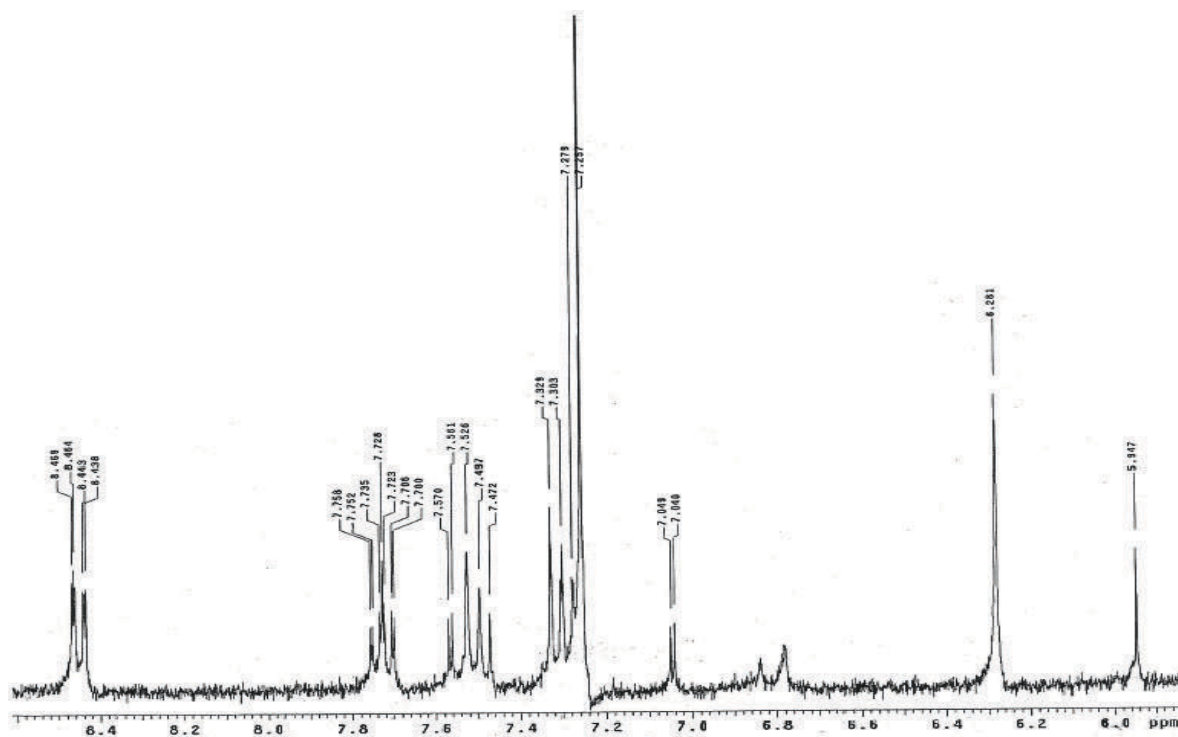
O fracionamento deste extrato – Esquema 5, p32 - gerou a fração ETFC2, também ativa contra cepas padrão e isolados clínicos. Posteriormente esta fração gerou a fração ETFC2.14. O espectro no UV/Vis (MeOH) desta fração mostrou bandas de absorção na região entre 200 – 250 nm, referentes as transições $\pi - \pi^*$ dos elétrons das ligações sp^2 dos anéis aromáticos e bandas benzenóides em 390nm referente a transição $n-\pi$ do par de elétrons não ligantes, semelhantes as absorções foram encontradas por Wu et al (2003) durante análise do espectro da arborinina. O espectro no IV ($V_{\text{máx}}/\text{cm}$, KBr) apresentou bandas características de estiramento da ligação O-H em 3475 cm^{-1} , um estiramento da ligação C=O de aril cetona em 1639 cm^{-1} , uma deformação assimétrica da ligação CH_3 em 1471 cm^{-1} e um estiramento da ligação C-N de aril amina em 1280 cm^{-1} , dados de acordo com os encontrados por Wu et al (2003).

O espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 300MHz) de **1** (Figura 5, p47) apresentou sinais em 8,45(*dd*, $J=7,8$ e $1,5\text{Hz}$), 7,73 (*ddd*, $J=8,7$, $6,9$ e $1,8\text{Hz}$), 7,51 (*d*, $J=8,7\text{Hz}$) e 7,30 (*t*, $J=7,8\text{Hz}$) relativos a hidrogênios aromáticos (Espectros 2 e 3), cujas mutiplicidades caracterizaram a presença de um anel *orto* dissubstituído na substância **1**. Foram observados também três singletos relativos à metoxila, em 4,04, 3,95 e 3,88 δ e um singlete de hidrogênio aromático em 6,28 (*s*). O espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75MHz) (Espectro 4) apresentou 16 sinais referentes aos respectivos carbonos: 156,1 (C-1), 130,1 (C-2), 159,4 (C-3), 86,8 (C-4), 114,8 (C-5), 134,1 (C-6), 121,6 (C-7), 126,6 (C-8), 180,8 (C-9), 140,5 (C-11), 105,8 (C-12), 120,7 (C-13), 141,6 (C-14), 61,1 (2-O $\underline{\text{C}}\text{H}_3$), 56,2 (3-O $\underline{\text{C}}\text{H}_3$) e 34,4 (N $\underline{\text{C}}\text{H}_3$).

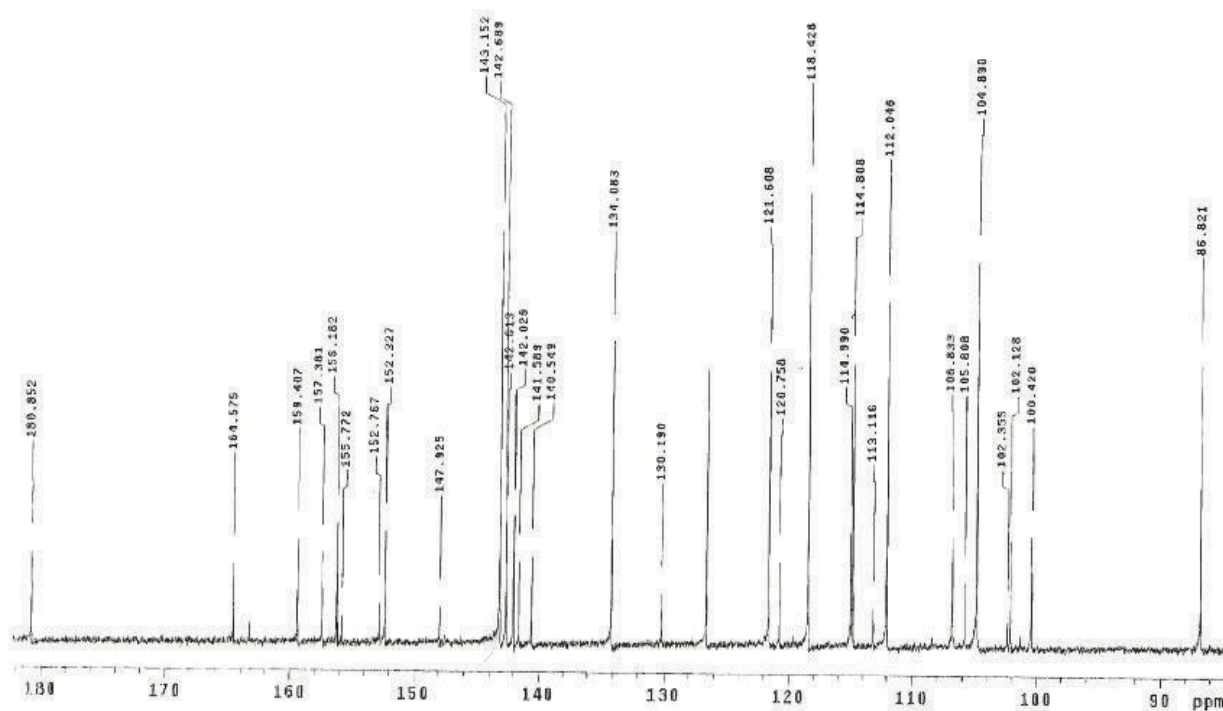
Estes dados espectroscópicos em conjunto com o conhecimento da ocorrência de alcalóides derivados do ácido antranílico em espécies vegetais da família Rutaceae (MESTER, 1983; WATERMAN, 1999) e a comparação com dados na literatura (JANUARIO, 1995; AMBROZIN, 2004) sugeriram que o alcalóide presente é do tipo acridônico, amplamente conhecido nesta família, arborinina (1). Os dados espectroscópicos de RMN ^1H são descritos na Tabela 02 e de ^{13}C na Tabela 03.



Espectro 2: RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) da substância 1 da fração ETFC 2.14 do extrato clorofórmico da folha da *E. trifolia*



Espectro 3: Expansão do espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) da substância 1 da fração ETFC 2.14 do extrato clorofórmico da folha da *E. trifólia*.



Espectro 4: RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) da substância 1 da fração ETFC 2.14 do extrato clorofórmico da folha da *E. trifólia*.

Tabela 2: Dados espectroscópicos de RMN ^1H da arborinina

H	δ_{H}	δ_{H}^*
4	6,28 s	6,32 s
5	7,51 d ($J=8,7\text{Hz}$)	7,54 d ($J=8,8\text{Hz}$)
6	7,73 ddd ($J=8,7, 6,9$ e $1,8\text{Hz}$)	7,75 ddd ($J=8,7, 6,8$ e $1,6\text{Hz}$)
7	7,30 t ($J=7,8\text{Hz}$)	7,33 t ($J=8,0\text{Hz}$)
8	8,45 dd ($J=7,8$ e $1,5\text{Hz}$)	8,50 dd ($J=8,0$ e $1,6\text{Hz}$)
2-OCH ₃	4,02 s	4,04 s
3-OCH ₃	3,93 s	3,95 s
NCH ₃	3,85 s	3,88 s
OH	-	-

* δ_{H} da arborinina (CDCl_3 , 400 MHz) (JANUARIO, 1995), (-) não detectado.

Tabela 3: Dados espectroscópicos de RMN ^{13}C da substância 1.

C	δ_{C}	δ_{C}^*
1	156,1	155,7
2	130,1	129,9
3	159,4	159,1
4	86,8	86,7
5	114,8	114,5
6	134,1	133,7
7	121,6	121,2
8	126,6	126,0
9	180,8	180,4
11	140,5	140,1
12	105,8	105,3
13	120,7	120,3
14	141,6	141,6
2-OCH ₃	61,1	60,6
3-OCH ₃	56,2	55,8
NCH ₃	34,4	33,8

* δ_{C} da arborinina (BERGENTHAL et al, 1979)

A Figura 5 mostra as estruturas dos possíveis alcalóides acridônicos e furoquinolínicos identificados nos extratos e frações bioativos da *E. trifolia*.

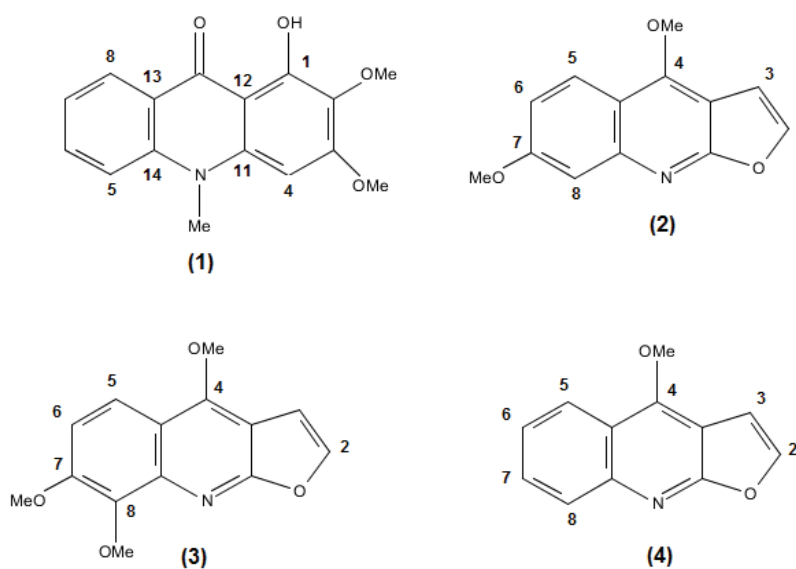
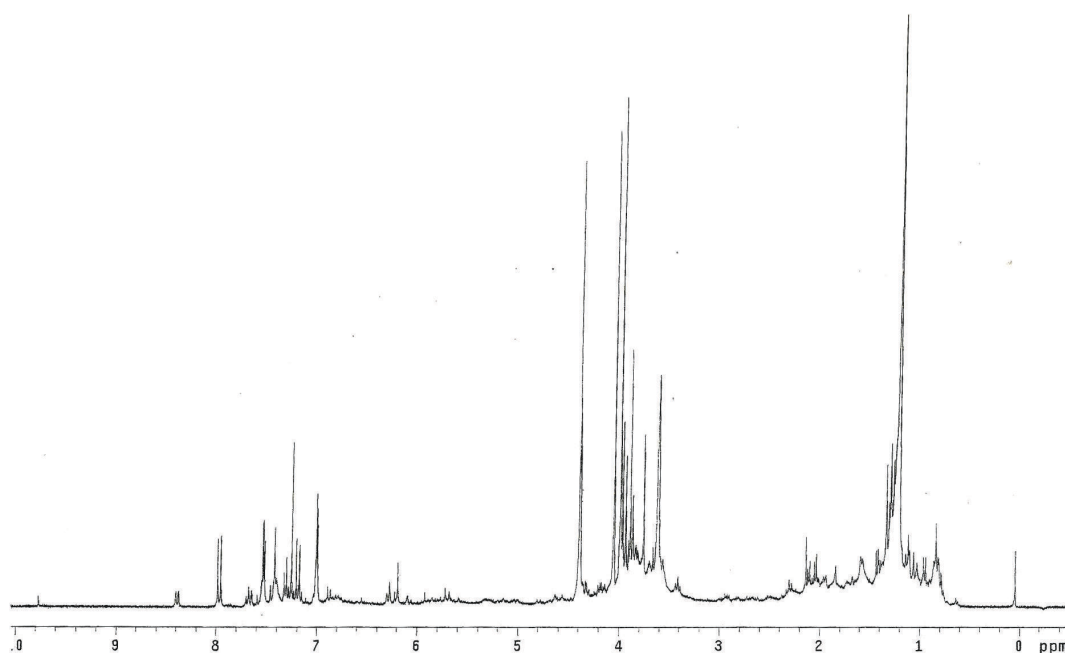


Figura 5: Alcalóides encontrados na *E. trifolia*: arborinina (1), evolitrina (2), esquimianina (3), dictamina (4).

O extrato acetato de etila das folhas (ETFA) também apresentou atividade antimicrobiana. O espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) deste extrato (Espectro 5) apresentou diversos sinais na região alifática, deslocamentos químicos na região de 4,00 δ indicativos da presença de hidrogênios das metoxilas e sinais intensos na região entre 7,00 e 8,00 δ referentes aos hidrogênios aromáticos.

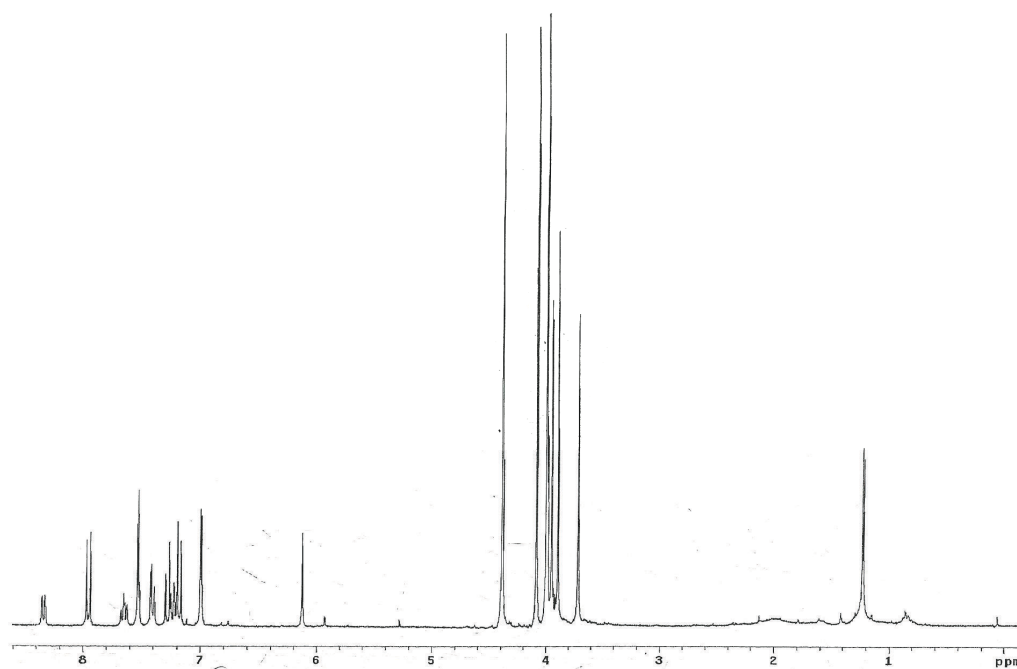
A fração 08, obtida do extrato acetato de etila das folhas, (ETFA 8) também foi capaz de inibir o crescimento de cepas bacterianas. O espectro no UV/Vis (MeOH) desta fração mostrou três bandas de absorção na região entre 200 e 280 nm, referentes as transições $\pi - \pi^*$ dos elétrons das ligações sp^2 dos anéis aromáticos e bandas benzenóides em 380nm referente a transição $n-\pi$ do par de elétrons não ligantes. O espectro no IV ($V_{\text{máx}}/\text{cm}$, KBr) apresentou bandas características de estiramento da ligação O-H em 3495 cm^{-1} , um estiramento da ligação C=O de aril cetona em 1699 cm^{-1} , uma deformação assimétrica da ligação CH_3 em 1450 cm^{-1} e um estiramento da ligação C-N de aril amina em 1246 cm^{-1} , dados de acordo com os encontrados por Wu et al (2003).



Espectro 5: RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) do extrato acetato de etila da folha de *E. trifolia*.

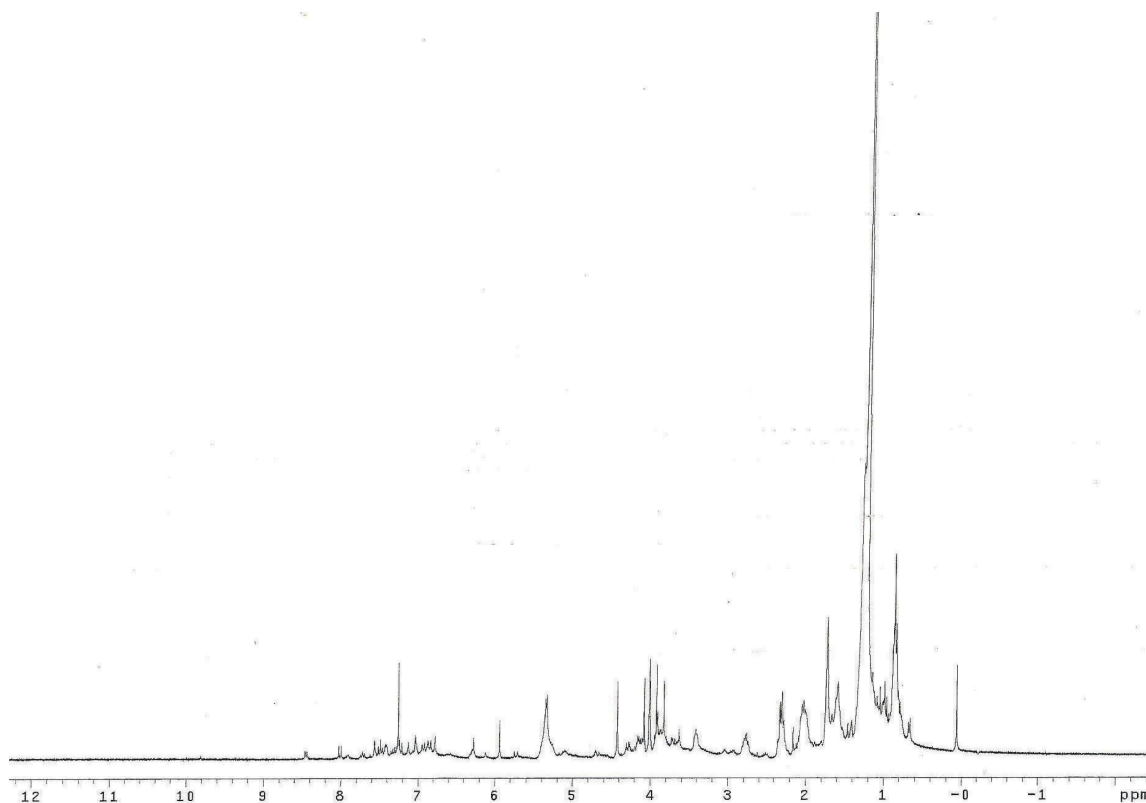
O espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) da fração ETFA8 (Espectro 6) apresenta um singleto em 4,39 δ característico de uma metoxila na posição 4 de alcalóides furoquinolínicos. O espectro mostra também dois singletos em 4,08 δ e

4,00 δ integrando para três hidrogênios cada, indicando a presença das metoxilas nas posições 7 e 8 em alcalóides furoquinolínicos. Um duplo dubleto em 8,35 δ ($J=7,8$ e $1,2$ Hz), um dubleto largo em 7,98 δ ($J=9,3$ Hz), um duplo duplo dubleto em 7,68 δ ($J=7,8, 7,2$ e $1,5$ Hz), sugerindo a presença de um anel aromático *orto* dissustituído, um dubleto em 7,53 δ ($J=2,7$ Hz) e um dubleto em 7,00 δ ($J=2,7$ Hz) característicos dos H das posições 2' e 3' do anel furano. A análise destes dados e a comparação com dados da literatura (PUSSET et al, 1991, WU et al, 2003; ANDRADE, 2004) indicam a presença de uma mistura de alcalóides furoquinolínicos, provavelmente evolitrina(2), esquimianina(3) e dictamina (4).



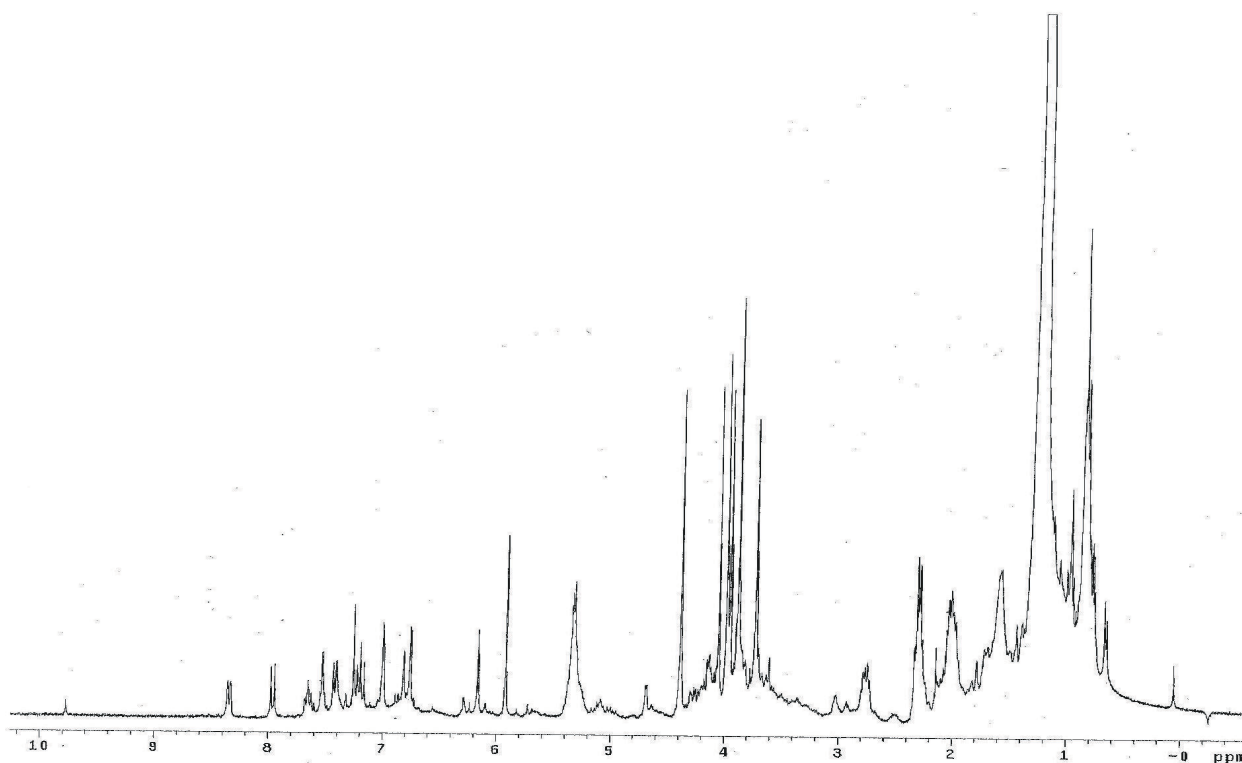
Espectro 6: RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) da fração ETFA8 extrato acetato de etila da folha de *E. trifolia*.

O extrato diclorometânico do caule (ETCD) apresentou atividade antibacteriana frente a cepas padrão Gram positivas e isolados clínicos multirresistentes, como mostra a Tabela 4, p57. O espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) deste extrato (Espectro 7) apresentou diversos sinais na região alifática, deslocamentos químicos na região de 4,00 δ indicativos da presença de hidrogênios de metoxilas e sinais pouco intensos na região aos hidrogênios aromáticos.



Espectro 7: RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) do extrato diclorometânico do caule da *E. trifolia*

O extrato ETCD deu origem a fração ETCD 5 – Esquema 3, p30. Este também apresentou o mesmo espectro de atividade antibacteriana. No espectro de RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) desta fração (Espectro 8), é possível observar picos mais intensos na região aromática, diferente do espectro do extrato. Diante disto, foi dada continuidade ao processo de fracionamento, com o intuito de se obter uma fração bioativa mais purificada. A partir da fração ETCD 5 produziu-se a fração bioativa ETCD 5.26.

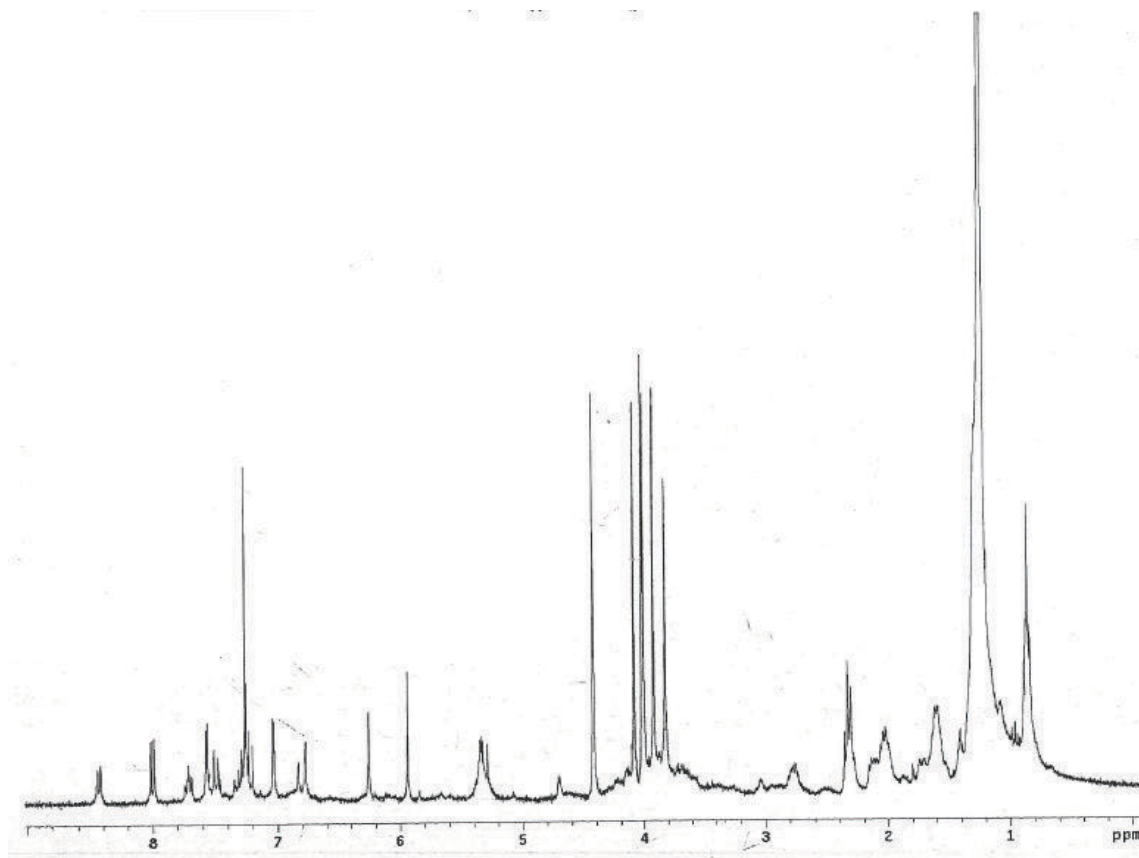


Espectro 8: RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) da fração ETCD 5 do extrato diclorometânico do caule da *E. trifolia*.

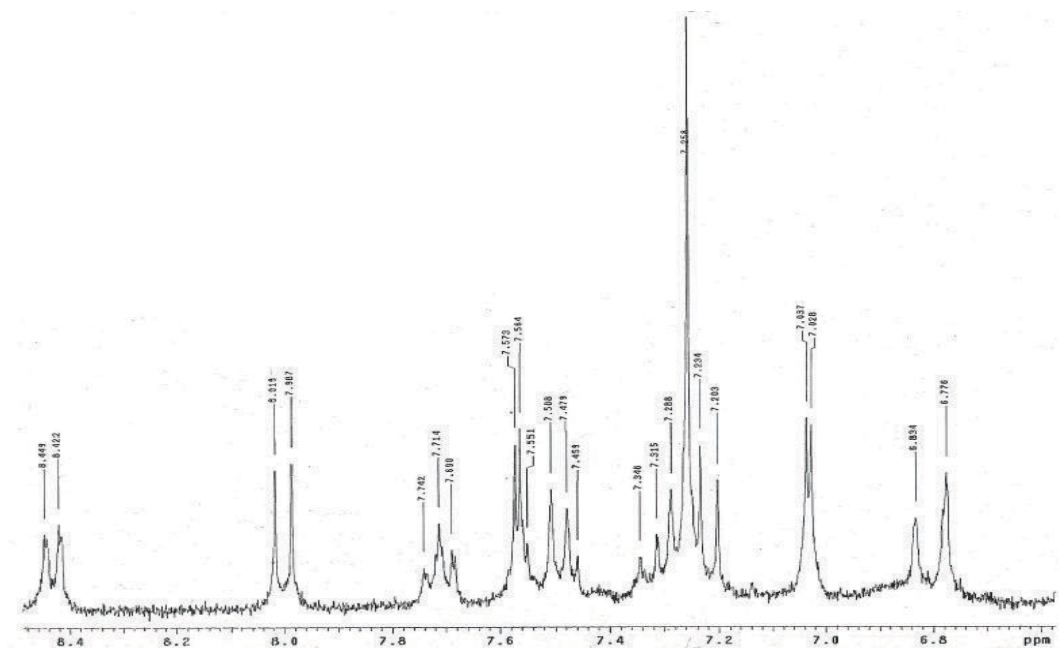
O espectro no UV/Vis (MeOH) da fração ETCD 5.26 mostrou 3 bandas de absorção na região entre 200 – 250 nm, referentes as transições $\pi - \pi^*$ dos elétrons das ligações sp^2 dos anéis aromáticos. O espectro no IV ($V_{\text{máx}}/\text{cm}$, KBr) apresentou bandas características de estiramento da ligação O-H em 3500 cm^{-1} , um estiramento da ligação C=O de aril cetona em 1750 cm^{-1} , uma deformação assimétrica da ligação CH_3 em 1480 cm^{-1} e um estiramento da ligação C-N de aril amina em 1250 cm^{-1} absorções características dos grupos funcionais de alcalóides acridônicos e furoquinolínicos (Wu et al, 2003).

O espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3), da fração ETCD 5.26 (Espectros 9 e 10) apresentou um duplo dubleto em $8,45\ \delta$ ($J= 8,1\text{Hz}$), e dubletos em $8,02\ \delta$ ($J= 9,6\text{Hz}$), $7,51\ \delta$ ($J= 8,7\text{Hz}$) característicos de hidrogênios aromáticos em relação *orto* e *meta* entre si. Dois singletos em $4,01\ \delta$ e $3,92\ \delta$ relativos as metoxilas. Um singlete de hidrogênio aromático na posição 4 em $6,78\ \delta$ e um sinal mais blindado em $3,82\ \delta$ correspondente a N-CH_3 . Foram observados também dois dubletos em $7,57\ \delta$ ($J= 2,7\text{Hz}$) e $7,04\ \delta$ ($J= 2,7\text{Hz}$) característicos de um anel furano 2,3 dissustituído. Dois singletos em $4,42\ \delta$ e $4,09\ \delta$ característicos de metoxilas em alcalóides

furoquinolínicos, sendo a primeira na posição 4 e a segunda na posição 7. A análise dos dados de RMN ^1H indica que existe uma mistura de alcalóides acridônicos e furoquinolínicos nesta fração. A comparação destes dados com a literatura permite afirmar que provavelmente estão presentes na fração ETCD 5. 26 a arborinina (1) e evolitrina (2).



Espectro 9: RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) da fração ETCD 5.26 do extrato diclorometânico do caule da *E. trifolia*.



Espectro 10: Expansão do Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) da fração ETCD5.26 do extrato diclorometânico do caule da *E. trifolia*.

4.2 Microbiológicos

4.2.1 Difusão em disco

Durante a realização do experimento, o controle negativo realizado com o dimetilsulfóxido (DMSO) não apresentou atividade antibacteriana, mostrando que o diluente dos extratos não interferiu na atividade dos produtos naturais testados; enquanto o controle de atividade realizado com disco de gentamicina frente às cepas padrão ATCC apresentou halos de inibição de crescimento bacteriano dentro da faixa estabelecida pelo CLSI – *S. aureus* ATCC 25923 19 a 27mm e *E. coli* ATCC 25922 19 a 26 mm (Tabelas 4 e 5). Foi possível observar que as cepas bacterianas Gram negativas testadas foram resistentes a todos os extratos da *E. trifolia* avaliadas, não apresentando halos de inibição de crescimento bacteriano. Foi possível constatar também que os extratos diclorometânico (ETRD), metanólico (ETRM) e metanólico acidificado (ETRMH) da raiz da planta não foram capazes de inibir o crescimento bacteriano das cepas bacterianas nas condições testadas.

Outros autores relatam atividade antimicrobiana de extratos vegetais originados da raiz, como os da *Hortia oreadica* (Rutaceae), *Physalis angulata* L. (Solanaceae) e *Zanthoxylum tingoassuiba* A. St. Hil. (Rutaceae), (SANTOS, 2001; BEN ABDELKADER et al, 2010; YANG et al, 2008; REGASINI et al, 2010; NETHAJI et al, 2009; RAMAN et al, 2010). Apesar destas evidências, a raiz da *E. trifolia* não apresentou atividade antimicrobiana. Esse fato é surpreendente, uma vez que a raiz é o órgão vegetal que mais mantém contato com as bactérias e fungos presentes no solo. Desta forma, a raiz estaria mais susceptível a produzir metabólitos com ação antimicrobiana que protegeria o vegetal da contaminação por microorganismos patogênicos. O que pode ter ocorrido foi a baixa concentração de substâncias bioativas na raiz, ocasionada pela não produção desses metabólitos pelo vegetal durante o período em que a planta foi coletada – viés da sazonalidade.

O óleo essencial das folhas da *E. trifolia* também não foi capaz de inibir o crescimento de nenhuma bactéria. Geralmente, óleos vegetais possuem atividade antibacteriana, por possuírem metabólitos secundários em altas concentrações. O óleo essencial da folha da *Feronia elephantum* Corr. (Rutaceae), por exemplo, foi ativo contra *Micrococcus luteus* (bactéria Gram-positiva), *Proteus mirabilis* (bactéria Gram-negativa), *Penicillium chrysogenum* e *Aspergillus niger* (fungos), com valores

de CIM de $0,31\pm 0,06$, $0,52\pm 0,10$, $0,20\pm 0,50$ e $0,26\pm 0,52$ mg/mL, respectivamente (JOSHI et al, 2011).

Quando extratos do caule da planta foram testados, foi possível verificar que o extrato metanólico acidificado (ETCM) não apresentou atividade bacteriana, porém o extrato diclorometânico (ETCD) foi capaz de inibir somente o crescimento das bactérias Gram positivas, as duas cepas ATCC e dois dos isolados clínicos hospitalares de *S. aureus*, apresentando médias de halos de inibição de 12,3, 13,0, 10,6 e 11,0 mm, respectivamente (Tabela 4). O mesmo perfil foi comprovado quando frações do extrato fizeram parte dos experimentos, sendo que das sete frações do extrato diclorometânico, somente a fração 5 (ETCD5) e a fração 26 das 32 frações da ETCD5 (ETCD5.26), foram capazes de inibir o crescimento das mesmas cepas Gram positivas e o isolado 03 de *S. aureus*, sendo que ETCD5 apresentou média de halos de 11,0, 15,3, 13,6, 16,0 e 16,3 mm e ETCD5.26 apresentou média de halos de 12,3; 13,0; 14,3 e 11,3mm, respectivamente (Tabela 4). A Figura 6 ilustra a atividade antibacteriana positiva da fração ETCD5 e negativa para as frações ETCD2 e ETCD3, frente a *S. aureus* ATCC 33591.

Em relação aos extratos das folhas, o óleo essencial e o extrato aquoso juntamente com suas frações não apresentaram resultados positivos nas condições testadas. Já o extrato acetato de etila (ETFA) e as frações 8 (ETFA8), 11 (ETFA11) e 12 (ETFA12) das 16 obtidas, assim como o extrato clorofórmico (ETFC) e a fração 2 (ETFC2), das 05 obtidas, apresentaram atividade antibacteriana frente às bactérias Gram positivas, as cepas ATCC e dois isolados clínicos hospitalares de *S. aureus*. É possível observar na Tabela 5 as médias de halos de inibição de crescimento bacteriano obtidos pelo extrato ETFA, 10,0, 10,3 e 24,6 mm frente a *S. aureus* ATCC 25923, isolados 01 e 02, respectivamente. As frações 08, 11 e 12, diferente do extrato ETFA, inibiu o *S. aureus* ATCC 33591, com médias de halos de inibição de 11,3 mm. ETFA8 inibiu também *S. aureus* ATCC 25923, isolados 01 e 02, com as seguintes médias de halos 10,0, 27,3 e 24,3 mm. ETFA11 inibiu o isolado 02 com média de halo de 11,6 mm e ETFA12 *S. aureus* ATCC 25923 com 10,3 mm. O extrato ETFC inibiu *S. aureus* ATCC 25923, isolados 01 e 02, com as respectivas médias de halos de 11,3, 11,3 e 20,0 mm, próximos aos da sua fração 02, 12,0, 15,3 e 10,3mm. Nenhum extrato da folha foi capaz de impedir o crescimento do isolado 03 de *S. aureus*.

Duraipandiyan & Ignacimuthu (2009) avaliaram o extrato clorofórmico e acetato de etila das folhas da *Toddalia asiática* (Rutaceae) e encontraram zonas de inibição de 15 e 24mm, respectivamente, frente a *S. aureus* ATCC 25923 na concentração 2500mg/disco. Khulbe & Sati (2009) testou a atividade antibacteriana do extrato clorofórmico das folhas da *Boenninghausenia albiflora* (Rutaceae) pelo método difusão em disco e encontrou o halo de inibição de 11mm frente a *S. aureus*.

Tabela 4: Atividade antibacteriana de extratos e frações do Caule da *E. trifolia*, expressa pela média dos halos de inibição.

Cepas bacterianas	ETCD		ETCD5		ETCD5.26		G ₁₀
	x	σ	x	σ	x	σ	
ATCC							
<i>S. aureus</i> 25923	12,3	0,5	11,0	0,1	12,3	0,5	26
<i>S. aureus</i> 33591	13,0	1,0	15,3	0,5	13,0	2,6	24
<i>E. coli</i> 25922	-		-		-		24
<i>S. entérica</i> 13076	-		-		-		23
<i>P. aeruginosa</i> 27853	-		-		-		22
Isolados clínicos							
<i>S. aureus</i> 01	10,6	0,5	13,6	2,8	14,3	0,5	-
<i>S. aureus</i> 02	11,0	1,0	16,0	1,0	11,3	0,5	31
<i>S. aureus</i> 03	-		16,3	0,5	-		20

ETCD: extrato diclorometânico do caule, ETCD5: fração 5 de ETCD, ETCD5.26: fração 26 de ETCD5, (-) ausência de atividade antibacteriana; (x) média aritmética dos halos de inibição de crescimento bacteriano em mm; (σ) desvio padrão; (mm) milímetros; ATCC (American Type Collection Culutre); (G₁₀) gentamicina 10 μ g

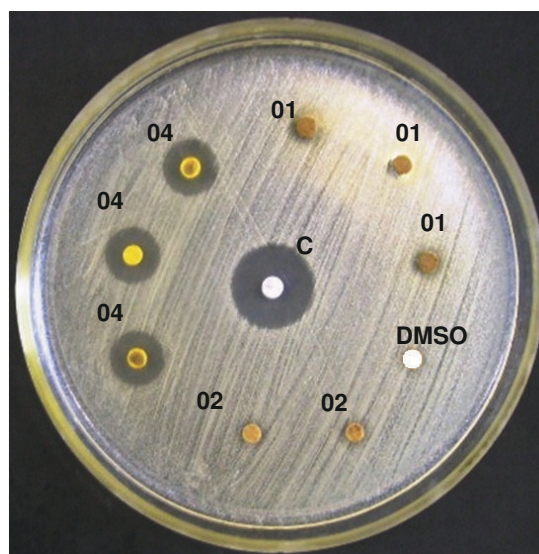


Figura 6: Teste de difusão em disco de frações do extrato diclorometânico do caule da *E. trifolia* frente a *S. aureus* ATCC 33591 - 01 e 02 - frações ETCD2 e ETCD3, respectivamente, não apresentando atividade antibacteriana; 04 - fração ETCD5 apresentando atividade antibacteriana positiva; (C) controle positivo do experimento com disco de gentamicina (10 μ g – LABORCLIN); dimetilsulfóxido (DMSO) controle negativo.

Tabela 5: Atividade antibacteriana de extratos e frações da folha da *E. trifolia*, expressa pela média dos halos de inibição.

Cepas bacterianas	ETFA		ETFA8		ETFA11		ETFA12		ETFC		ETFC2		G ₁₀
	x	σ	x	σ	x	σ	x	σ	x	σ	x	σ	
ATCC													
<i>S. aureus</i> 25923	10,0	0,1	10,0	0,1	-		10,3	0,5	11,3	1,5	12,0	0,1	26
<i>S. aureus</i> 33591	-		11,3	0,5	11,3	1,5	11,3	0,5	-		-		24
<i>E. coli</i> 25922	-		-		-		-		-		-		24
<i>S. entérica</i> 13076	-		-		-		-		-		-		23
<i>P. aeruginosa</i> 27853	-		-		-		-		-		-		22
Isolados Clínicos													
<i>S. aureus</i> 01	10,3	0,5	27,3	1,5	-		-		11,3	0,5	15,3	0,5	-
<i>S. aureus</i> 02	24,6	0,5	24,3	0,5	11,6	1,1	-		20,0	0,0	10,3	0,5	31
<i>S. aureus</i> 03	-		-		-		-		-		-		20

ETFA: extrato acetato de etila da folha, ETFA8: fração 8 de ETFA, ETFA11: fração 11 de ETFA11, ETFA12: fração 12 de ETFA, ETFC: extrato clorofórmico da folha, ETFC2: fração 2 de ETFC, (-) ausência de atividade antibacteriana; (x) média aritmética dos halos de inibição de crescimento bacteriano em mm; (σ) desvio padrão; (mm) milímetros; ATCC (American Type Collection Culture); (G₁₀) gentamicina 10μg

4.2.2 Concentração Inibitória Mínima e Bactericida Mínima

A Figura 7 apresenta o resultado do teste de microdiluição para determinação da CIM do extrato diclorometânico do caule frente a *S. aureus* ATCC 33591 e do extrato diclorometânico do caule e do extrato acetato de etila das folhas frente ao isolado 01 de *S.aureus*. É possível observar que nos poços onde não houve crescimento bacteriano não há alteração da coloração apresentada pelo meio de cultura, enquanto que a coloração vermelha obtida pela adição do corante vital 2,3,5-trifenil tetrazólio a 5% (TTC) confirma o crescimento bacteriano.

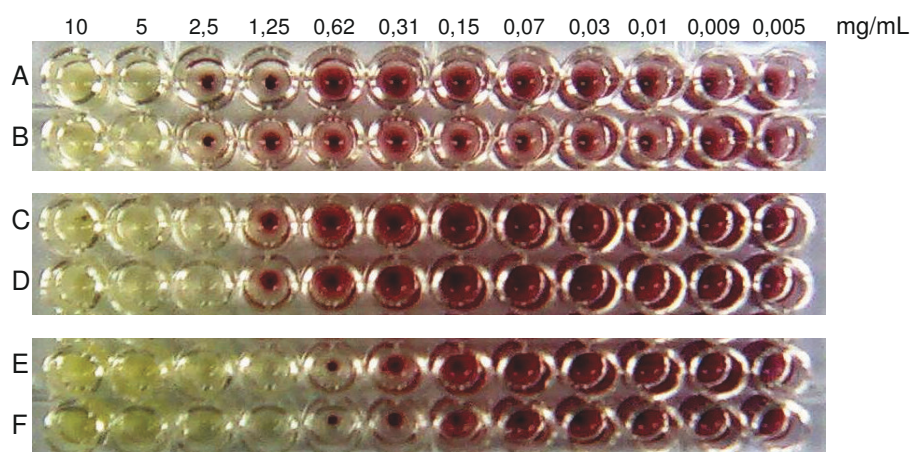


Figura 7: Teste de microdiluição para determinação da CIM de extratos de *E. trifolia*. Linhas A e B, extrato diclorometânico do caule frente ao *S.aureus* ATCC 33591; Linhas C e D, extrato diclorometânico do caule frente ao isolado 01 de *S. aureus*; Linhas E e F, extrato acetato de etila das folhas frente ao isolado 01 de *S. aureus*.

Nos controles de esterilidade do meio de cultura e dos extratos não foi observado nenhum crescimento microbiano, enquanto que nos controles de crescimento bacteriano no caldo e no diluente dos extratos e frações (DMSO) foi observado crescimento total das bactérias testadas, mostrando que os mesmos não interferiram na atividade dos produtos naturais testados. O controle de atividade antibacteriana feito com a cepa ATCC 25923 do *S. aureus* frente ao cloranfenicol apresentou CIM dentro da faixa de leitura estabelecidas pelo CLSI ($8\mu\text{g/mL} \geq 32\mu\text{g/mL}$).

A Tabela 6 mostra os valores da concentração inibitória mínima (CIMs) e concentração bactericida mínima (CBMs) dos extratos e frações do caule que apresentaram atividade no teste de difusão em disco, frente a três cepas de bactérias pertencente a espécie Gram positiva *S.aureus*. O extrato diclorometânico (ETCD) inibiu o crescimento das cepas de *S. aureus* ATCC 25923, 33591 e de dois isolados clínicos 01 e 02, com as concentrações 2,5, 5,0, 2,5 e 5,0mg/mL, a fração ETCD5 inibiu com 5,0, 10,0, 5,0 e 5,0 mg/mL e a fração ETCD5.26 com 5,0mg/mL para todas as quatro bactérias. Todos os extratos e frações do caule apresentaram atividade bacteriostática, nas concentrações testadas, possuindo concentrações bactericidas mínimas (CBMs) maiores do que 10,0mg/mL.

Tabela 6: Concentrações Inibitórias e Bactericidas Mínimas (mg/mL) do extrato e frações do caule de *E. trifolia*

Metabólitos	<i>S. aureus</i>	CIM	CBM
ETCD	ATCC 25923	2,5	> 10,0
	ATCC 33591	5,0	> 10,0
	Isolado 01	2,5	> 10,0
	Isolado 02	5,0	> 10,0
ETCD5	ATCC 25923	5,0	> 10,0
	ATCC 33591	10,0	> 10,0
	Isolado 01	5,0	> 10,0
	Isolado 02	5,0	> 10,0
ETCD5.26	ATCC 25923	5,0	> 10,0
	ATCC 33591	5,0	> 10,0
	Isolado 01	5,0	> 10,0
	Isolado 02	5,0	> 10,0

ETCD: extrato diclorometânico do caule, ETCD5: fração 5 de ETCD, ETCD5.26: fração 26 de ETCD5.

As CIMs do extratos e frações do caule que apresentaram resultados positivos no teste de difusão em disco variaram de 2,5 a 10,0mg/mL. O melhor resultado obtido foi do extrato diclorometânico, que apresentou CIM de 2,5mg/mL frente a *S.aureus* ATCC 25923 e Isolado 01. Neste caso, o valor da CIM do extrato foi menor do que as das frações. Isso pode ser um indicio de que há um sinergismo entre as substâncias bioativas do extrato que contribuem para uma melhor atividade biológica. Pois a partir do momento em que o mesmo foi fracionado, suas frações foram perdendo a atividade antibacteriana, pelo fato de substâncias ficarem retidas na coluna cromatográfica. Esse fato é evidente, ao constatar o aumento da CIM das frações para 5,0mg/mL nas mesmas condições de teste.

A Tabela 7 apresenta os valores das CIMs e CBMs dos extratos e frações da folha que apresentaram atividade no teste de difusão em disco, frente a três cepas bacterianas da espécie Gram positiva *S.aureus*. O extrato acetato de etila (ETFA) inibiu o crescimento das cepas de *S. aureus* ATCC 25923 e dos dois isolados clínicos 01 e 02, com as concentrações 10,0, 1,25, e 5,0mg/mL, sendo que as CBMs excederam a concentração de 10,0mg/mL. A fração ETFA8 apresentou CIMs de 5,0, 0,625 e 2,5 mg/mL e CBMs maior que 10,0mg/mL para *S.aureus* ATCC 25923 e de 10,0 mg/mL para os dois isolados clínicos. O extrato clorofórmico (ETFC) inibiu o crescimento das cepas de *S. aureus* ATCC 25923 e dos dois isolados clínicos, com as concentrações 10,0, 2,5 e 2,5 mg/mL, sendo que as CBMs foram maiores que a concentração 10,0 mg/mL. A fração ETFC2 apresentou CIMs de 10,0, 1,25 e 2,5 mg/mL para e CBMs maior que 10,0mg/mL para *S.aureus* ATCC 25923, 1,25 mg/mL para o isolado clínico 01 e 2,5 mg/mL para o isolado clínico 02.

As CIMs do extratos e frações da folha que apresentaram resultados positivos no teste de difusão em disco variaram de 0,625 a 10,0mg/mL. Os melhores resultados foram obtidos por ETFA8 e ETFC2. A ETFA8 apresentou CIM de 0,625mg/mL e CBM de 10,0mg/mL e ETFC2 apresentou CIM e CBM de 1,25mg/mL. Os resultados das CIMs dos extratos das folhas estão de acordo com outros estudos que testaram a atividade antibacteriana de espécies da família Rutaceae. Costa et al (2010) analisou a atividade antibacteriana de extratos das folhas (clorofórmico e acetato de etila) e partes aéreas de duas Rutaceaes frente a *S. aureus* e encontrou CIMs que variaram de 1.0 a 5.0mg/mL. Os extratos clorofórmico e acetato de etila da *Toddalia asiática* (Rutaceae) apresentaram CIMs de 0.078mg/mL e 0.039mg/mL respectivamente, frente a *S. aureus* ATCC 25923 (DURAIPANDIYAN &

IGNACIMUTHU, 2009). O extrato etanólico da *Zanthoxylum zanthoxyloides* Lam. (Rutaceae) apresentou valores de MIC que variaram de 0.28 – 2.52 mg/mL frente a isolados clínicos de *S. aureus* (ADEBIYI et al, 2009). Sendo que o resultado foi negativo para uma MRSA e uma cepa padrão.

Tabela 7: Concentrações Inibitórias e Bactericidas Mínimas (mg/mL) de extratos e frações das folhas de *E. trifolia*

Metabólitos	<i>S. aureus</i>	CIM	CBM
ETFA	ATCC 25923	10,0	> 10,0
	Isolado 01	1,25	> 10,0
	Isolado 02	5,0	> 10,0
ETFA8	ATCC 25923	5,0	> 10,0
	Isolado 01	0,625	10,0
	Isolado 02	2,5	10,0
ETFC	ATCC 25923	10,0	> 10,0
	Isolado 01	2,5	> 10,0
	Isolado 02	2,5	> 10,0
ETFC2	ATCC 25923	10,0	> 10,0
	Isolado 01	1,25	1,25
	Isolado 02	2,5	2,5

ETFA: extrato de acetato de etila, ETFC: extrato clorofórmico, ETFA 8: fração 8 de ETFA, ETFC 2: fração 2 de ETFC.

Normalmente, extratos vegetais apresentam atividade antimicrobiana frente a cepas Gram negativas, como é o caso das espécies *Pilocarpus spicatus* (SANTOS, 1997), *Physalis angulata* (SILVA, 2003) e *Lippia thymoides* (PINTO, 2006). Esta atividade não foi observada com os extratos da *E. trifolia*. A análise da polaridade dos solventes utilizados na preparação dos extratos com atividade positiva permite afirmar que a natureza química das substâncias com atividade antibacteriana é apolar. Isso pode explicar o fato desses extratos não apresentarem atividade frente as bactérias Gram negativas. Outros estudos do mesmo tipo, onde foram testados

produtos naturais com caráter apolar, no caso óleos voláteis, mostraram que as bactérias Gram negativas são menos sensíveis aos óleos essenciais do que as bactérias Gram positivas (BURT, 2004; APEL et al, 2006). Esse fato é explicado devido a presença da membrana de polissacarídeos que restringem a difusão dos compostos hidrofóbicos presentes nos óleos.

4.2.3 Bioautografia

No controle de esterilidade do meio de cultura e da placa de sílica gel não foi observado crescimento microbiano, enquanto que no controle de crescimento bacteriano no meio de cultura sob a sílica foi observado crescimento total das bactérias testadas, mostrando que os mesmos não interferiram na atividade dos produtos naturais testados. O controle de atividade antibacteriana feito com a cepa ATCC 25923 do *S. aureus* frente ao cloranfenicol na concentração 6µg/µL.

A Tabela 8 mostra os fatores de retenção (Rf's) – que variam de 0 a 1,0 - dos grupos de substâncias bioativas, elucidados através da técnica de bioautografia, dos extratos e frações do caule e folha, frente às cepas padrão e isolados clínicos de *S. aureus*. O extrato diclorometânico (ETCD) do caule apresentou os seguintes Rf's com atividade antibacteriana: 0,19, 0,66, 0,73 e 0,79 para *S.aureus* ATCC 25923, 0,19, 0,39, 0,62, 0,66, 0,73 para o isolado 01 e 0,66 e 0,73 para o isolado 02. A fração ETCD5 apresentou Rf's 0,69 e 0,74 para 25923, 0,51, 0,60 e 0,62 para 01 e 0,60, 0,69 e 0,74 para 02. O extrato acetato de etila (ETFA) apresentou Rf's 0,66 e 0,71 para 25923 e 01 e 0,19, 0,30, 0,71 para 02, enquanto o extrato clorofórmico(ETFC) apresentou 0,26, 0,33, 0,70 para 25923, 0,33, 0,39, 0,44, 0,66, 0,70, 0,79 para 01 e 0,33, 0,39, 0,44, 0,70, 0,79 para 02 e por fim a fração ETFC2 apresentou o Rf 0,75 como o bioativo para todas as três cepas.

A fração ETFA8 do extrato acetato de etila das folhas inibiu o crescimento de *S. aureus* ATCC 25923 e 33591 no Rf 0,68, enquanto a fração ETFC2.14, oriunda da fração 2 do extrato clorofórmico das folhas inibiu as mesmas cepas bacterianas nos Rfs 0,34 e 0,72.

Não foi encontrado dados na literatura referente a realização de bioautografia com espécies do gênero *Ertela*. Não foi possível comparar estes resultados com outros trabalhos realizados em que foi utilizado a técnica. Pois cada corrida

cromatográfica tem suas peculiaridades e não seria correto realizar analogias. Os dados dos testes bioautográficos guiaram os fracionamentos dos extratos bioativos.

Tabela 8 - Fatores de retenção (RFs) obtidos por bioautografia com os extratos de *E.trifolia*.

RFs \ <i>S. aureus</i>	CH ₂ Cl ₂ do caule						CHCl ₃ das folhas								
	ETCD			ETCD5			ETFA			ETFC			ETFC2		
	A	01	02	A	01	02	A	01	02	A	01	02	A	01	02
0,08	*														
0,17								*							
0,19	*	*													
0,26											*				
0,30								*							
0,33											*	*	*		
0,39		*									*	*			
0,44											*	*			
0,51					*										
0,60					*	*									
0,62		*													
0,64					*										
0,66	*	*	*				*	*				*			
0,69				*		*									
0,70											*	*	*		
0,71							*	*	*						
0,73	*	*	*												
0,74				*		*									
0,75															
0,77	*												*	*	*
0,79											*				
0,87												*			

(A) *S. aureus* ATCC 25923; (1 e 2) isolados clínicos hospitalares multiresistentes

5.0 CONCLUSÃO

O presente estudo possibilitou elucidar o perfil químico da espécie *E. trifolia* coletada no Estado da Bahia, aumentando assim o conhecimento sobre a flora regional e contribuindo com a quimiotaxonomia do gênero. Os alcalóides isolados da espécie - arborinina, esquimianina, dictamina e evolitrina - são comuns em outros exemplares de *E. trifolia*, corroborando os dados apresentados no Quadro 1, p23. Estes alcalóides, na forma pura ou em mistura, possivelmente são os responsáveis pela atividade antibacteriana da maricutinha.

A *E. trifolia* apresentou atividade frente bactérias Gram positivas, com valores de CIM relevantes. Os extratos das folhas foram os que apresentaram melhores resultados, com destaque para a fração ETFA8. Estes dados são inéditos na literatura científica e pode nortear outros projetos na área. O potencial apresentado, a torna elegível a maiores investigações com objetivo de desenvolver um possível agente antimicrobiano.

A pesquisa da composição química e atividade antimicrobiana dos espécimes não está encerrada. Os extratos e frações ainda estão sendo investigados e analisados em projetos de iniciação científica. Dessa maneira, espera-se elucidar outros metabólitos secundários e os possíveis mecanismos de ação responsáveis pela atividade antimicrobiana encontrada.

6.0 REFERÊNCIAS

ADEBIYI, A. O. et al. Antimicrobial and antioxidant activities of crude extracts of two Nigerian chewing sticks. **Pharmaceutical Biology**, v. 47, n. 4, p. 320-327, 2009.

ALMEIDA, M. Z. et al. Levantamento etnobotânico em comunidades terreiros: Manso Dandalungua Cocuazenza. **Jornal Brasileiro de Fitomedicina**, São Paulo, v. 5, n. 1 – 2, 2007.

AMBROZIN, A. R. P. **Estudo fitoquímico de plantas da família Rutaceae e Meliaceae visando o isolamento de substâncias protótipos para o desenvolvimento de novos fármacos antichagásicos e antileishmanioses**. 2004. 261 f. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2004.

AMOROZO, M. C. de M. **A abordagem etnobotânica na pesquisa de plantas medicinais: plantas medicinais - arte e ciência; um guia de estudo interdisciplinar**. São Paulo: Editora da Universidade Estadual Paulista, 1996. p. 47-67.

ANDRADE, M. R. **Alcalóides de Rutaceae: Química e atividade biológica**. 2003. 200 f. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2003.

AZEVEDO, V. M. **Recursos vegetais utilizados pelos quilombolas de Machadinho, Quissamã-RJ**. 2008. 119 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas / Botânica) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.

BALICK, M. J. Ethnobotany and identification of therapeutic agents from the rainforest. In: CIBA FOUNDATION SYMPOSIUM 154 - BIOACTIVE COMPOUNDS FROM PLANTS, 1990, Chichester: Wiley, 1990. p. 22 – 39.

BARBOSA FILHO, J. M. et al. Natural products with antileprotic activity. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, [S. l.], v. 17, n. 1, p. 141-148, 2007.

BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. **Química medicinal: as bases moleculares da ação dos fármacos**. [S. l.]: ARTMED Editora, 2001.

BEN ABDELKADER, H. et al. Antimicrobial activity of *Rhaponticum acaule* and *Scorzonera undulata* growing wild in Tunisia. **African journal of microbiology research**, v.4, n.19, p.1954-1958, 2010.

BERGENTHAL, D. et al. C-NMR-spektren einiger acridon-alkaloide. **Phytochemistry**, [S. l.], v. 18, p.161–163, 1979.

BHATTACHARYYAL, J.; SERUR, M.; CHERIYAN, U. O. Isolation of the alkaloids of *Monnlerla trilfolia*. **Journal of Natural Products**, v. 47, n. 2, p. 379-381, 1984.

BRASIL. **Farmacopéia Brasileira**. 4 ed., v. 1, 1988. 524 p.

BRUHN, J. G. The use of natural products in modern medicine. **Acta Pharmaceutica Nordica**, [S. l.], v.1, p. 117 – 130, 1989.

BUHNER, S.H. **Herbal antibiotics**: natural alternatives for treating drug – Resistant Bacteria (A medicinal herb guide). North Adams: Storey Books, 1999.

CAO, S. et al. Furoquinoline alkaloids of *Ertela (Monnieria) trifolia* (L.) Kuntze from the Suriname rainforest. **Phytochemistry**, [S. l.], v. 69, p. 553–557, 2008.

CAVE, A.; SOUZA, J.I. R. de; PARIS, R.R. Brazilian Rutaceae, *Monnieria trifolia* isolation of an alkaloid identified as arborinine. **Plantes Med. Phytother**, v. 5, p.327–329, 1971.

CLSI - A. CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests; Approved Standard - Tenth Edition. Standard M02-A10 of CLSI. Wayne, Pennsylvania: CLSI, v. 29, n. 1, 2009.

CLSI - B. CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; Approved Standard - Eighth Edition. Standard M07-A8 of CLSI. Wayne, Pennsylvania: CLSI, v. 29, n. 2, 2009.

CORREA, M. P. **Dicionario das Plantas Uteis do Brasil e das exoticas cultivas**. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, v. 1, 1926. p. 64.

COSTA, J. F. O. et al. Immunomodulatory and antibacterial activities of extracts from Rutaceae species. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, [S. l.], v. 20, n. 4, p. 502–505, 2010.

COWAN, M.M. Plant Products as Antimicrobial Agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, n. 4, p. 564-582, 1999.

DAVIES, J. How to discover new antibiotics: harvesting the parvome. **Current Opinion in Chemical Biology**, [S. l.], v. 15, p. 5–10, 2011.

DEWITT, S. H. Molecular Diversity Strategies. **Pharmaceutical News**, [S. l.], v. 1, p. 11 – 14, 1994.

DIEGUES, A. C. S. **O mito moderno da natureza intocada**. São Paulo: NUPAUB/CEMAR/USP, 1994. 169p.

DURAIKANDIYAN, V.; IGNACIMUTHU, S. Antibacterial and antifungal activity of Flindersine isolated from the traditional medicinal plant, *Toddalia asiatica* (L.) Lam. **Journal of Ethnopharmacology**, v.123, p.494–498, 2009.

ESQUENAZI, D. et al. Antimicrobial and antiviral activities of polyphenolics from *Cocos nucifera* Linn. (Palmae) husk fiber extract. **Research in Microbiology**, [S. l.], v.153, n. 10, p. 647-652, 2002.

FOURASTE, I.; GLEYE, J.; STANISLAS, E. Alkaloids of the leaves of *Monnieria trifolia*. **Plantes Med. Phytother**, v.7, p.216–224, 1973.

- GIULIETTI, A. M. **Plantas raras do Brasil**. Belo Horizonte, Minas Gerais: Conservação Internacional, 2009. 496 p.
- HO, K. Y. et al. Antimicrobial activity of tannin components from *Vaccinium vitis-idaea* L. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, [S. l.], v. 53, n. 2, p. 187-191, 2001.
- HOUGHTEN, R. A. Tools of the Trade Combinatorial Libraries: Finding the needle in the haystack. **Current Biology**, [S. l.], v. 4, n. 6, p. 564 – 567, 1994.
- HOSTETTMANN, K.; QUEIROZ, E. F.; VIEIRA, P. C. **Princípios ativos de plantas superiores**. São Carlos: EdUFSCar, 2003. p. 9-36.
- JANUÁRIO, A. H. **Estudo fitoquímico de *Esenbeckia grandiflora* e *Almeidea rubra* (Rutaceae)**. 1995. 200 f. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 1995.
- JOSHI, R. K. et al. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of the leaves of *Feronia elephantum* (Rutaceae) from north west Karnataka. **Natural Product Communications**, v.6, n.1, p.141-143, 2011.
- KHULBE, K.; SATI, S. C. Antibacterial activity of *Boenninghausenia albiflora* Reichb. (Rutaceae). **African journal of biotechnology**, v.8, n.22, p. 6346-6348, 2009.
- KING, S. R.; TEMPESTA, M. S. From shaman to human clinical trials: the role of industry in ethnobotany, conservation and community reciprocity. In: CIBA FOUNDATION SYMPOSIUM 185 - ETHNOBOTANY AND THE SEARCH FOR NEW DRUGS, 1994, Chichester: Wiley, 1994. p. 197 - 206.
- KING, S. R. Establishing reciprocity: biodiversity, conservation and new models for cooperation between forest-dwelling peoples and the pharmaceutical industry. In: INTELLECTUAL PROPERTY RIGHTS FOR INDIGENOUS PEOPLES: A SOURCE BOOK. SOCIETY FOR APPLIED ANTHROPOLOGY. Oklahoma City: T. Greaves, 1994, p. 69-82.
- LAL, B. et al. Isolation, synthesis and biological activity of Evolitrine and analogs. **ARKIVOC**, [S. l.], v. 3, n. 1, p.77-97, 2005.
- LEITÃO, S. G. et al. Screening of Central and South American plant extracts for antimycobacterial activity by the Alamar Blue test. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, [S. l.], v. 16, n. 1, p. 6-11, 2006.
- LIMA, I. O. et al. Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de *Candida*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.16, p.197-201, 2006.
- LIMA, M. R. F. et al. The antibiotic activity of some Brazilian medicinal plants. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, [S. l.], v. 16, n. 3, p. 300-306, 2006.
- MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA JÚNIOR, V. F. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, [S. l.], v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002.

MARTINS, L. T. Staphylococcus. In: TRABULSI, L. R. et al. **Microbiologia**. 3 ed. São Paulo: Atheneu, 1999. p.149-155.

MENG, J. C.; ZHU, Q. X.; THAN, R. X. New antimicrobial mono and sesquiterpenes from *Soroseris hookeriana* subsp. *Erysimoides*. **Planta Medica**, [S. l.], v. 66, n. 6, p. 541-544. 2000.

MESTER, I. Structural diversity and distribution of alkaloids in the Rutales. In: WATERMAN, P. G.; GRUNDON, M. F. (Eds.) **Chemistry and Chemical Taxonomy of Rutales**. London: Academic Press, 1983. p31-95.

MICHAEL, J. P. Quinoline, quinazoline and acridone alkaloids. **Natural Product Reports**, [S. l.], v. 25, n. 1, p. 166-187, 2008.

MICHELIN, D. C. et al. Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos vegetais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, [S. l.], v. 15, n. 4, p. 316-320, 2005.

NCUBE, B. et al. A comparative study of the antimicrobial and phytochemical properties between outdoor grown and micropropagated *Tulbaghia violacea* Harv. plants. **Journal of Ethnopharmacology**, [S. l.], v. 134, n. 3, p. 775–780, 2011.

NETHAJI, S.; MANOKARAN, C. Phytochemical analysis and antimicrobial activity of *Heliotropium indicum* L. and *Coldenia procumbens* L. **Journal of pure and applied microbiology**, v.3, n.1, p.195-198, 2009.

NIELSEN, J. **Combinatorial chemistry**. Society of Chemical Industry, London, p. 902–5, 1994.

NORDMANN, P. The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. **The Lancet Infectious Diseases**, [S. l.], v. 9, n. 4, p. 228-236, 2009.

OSTROSKY, E. A. et al. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, [S. l.], v. 18, n. 2, p. 301-307, 2008.

PENNA, C. et al. Antimicrobial activity of Argentine plants used in the treatment of infectious diseases. Isolation of active compounds from *Sebastiania brasiliensis*. **Journal of Ethnopharmacology**, [S.l.], v. 77, p.37-40, 2001.

PESAVENTO, G. et al. A. Antimicrobial resistance profile of *Staphylococcus aureus* isolated from raw meat: A research for methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **Food Control**, [S. l.], v. 18, n. 3, p. 196 – 200, 2007.

PINTO, C. P. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais de *Lippia thymoides* (Verbenaceae). In: XIX SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, Salvador, 2006. **Anais do XIX Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil**, Salvador: 2006.

PIRANI, J.R. **Estudos taxonômicos em Rutaceae**: Revisão de *Helietta* e *Balfourodendron* (Pteleinae). Análise cladística de Pteleinae. Sinopse de Rutaceae do Brasil. Tese de livre-docência, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1999.

PIRANI, J.R.. Ertela. In: LISTA DE ESPÉCIES DA FLORA DO BRASIL. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2010. Disponível em:<<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2010/FB000553>>. Acesso em: 18 mar. 2011.

PRANCE, G.T. What is ethnobotany today? **Journal of Ethnopharmacology**, [S.l.], v. 32, p. 209 - 216, 1991.

PUSSET, J. et al. Isolation and 2D NMR studies of alkaloids from *Comptonella sessilifolia*. **Planta Medica**, [S. l.], v. 57, p. 153-155, 1991.

RAMAN, B. V.; RAMKISHORE, A. S.; MAHESWARI, M. U. Antibacterial Activities of Some Folk Medicinal Plants of Eastern Ghats. **Journal of pure and applied microbiology**, v.3, n.1, p.187-194, 2009.

REGASINI, L. O. et al. Antimicrobial activity of *Pterogyne nitens* Tul., Fabaceae, against opportunistic fungi. **Brazilian journal of pharmacognosy**, v.20, n.5, p.706-711, 2010.

REUTERS. Desenvolvimento de superbactérias ameaça futuro da medicina. **Globo**, Rio de Janeiro, abr. 2011. Seção Ciência e Saúde. Disponível em: <<http://g1.globo.com/ciencia-e-saude/noticia/2011/04/desenvolvimento-de-superbacterias-ameaca-futuro-da-medicina.html>>. Acesso em: 10 abr. 2011.

RODRIGUES Jr, C. J. **Mecanismos de resistência das plantas aos agentes patogênicos**. Lisboa: Junta de Investigações Científicas do Ultramar, 1980. p.23.

ROSEGHINI, R. **Efeitos do alcalóide arborinina e do flavonóide rutina, extraídos de plantas nativas da Bahia, sobre funcionalidade e viabilidade de células de baço e timo mutino in vitro**. 2005. 94 f. Dissertação (Mestrado em Imunologia) – Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2005.

RUNYORO, D. K. B. et al. Screening of Tanzanian medicinal plants for anti-Candida activity. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v.6, n. 11, p.1-10, 2006.

SANTOS, F. A. Antibacterial activity of essential oils from *Psidium* and *Pilocarpus* species of plants. **Phytotherapy Research**, v. 11, n. 1, p. 67-69, fev. 1997.

SANTOS, J. A. A. **Estudo químico, bioquímico e farmacológico dos extratos de *Physalis angulata* L. para verificação da atividade moluscicida**. 2001. 56 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) – Fundação Oswaldo Cruz, 2001.

SAÚDE-GUIMARÃES, D. A.; FARIA, A. R. Substâncias da natureza com atividade anti-*Trypanosoma cruzi*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, [S. l.], v. 17, n. 3, p. 455-465, 2007.

SEVERINO, V. G. P. et al. Determination of the antibacterial activity of crude extracts and compounds isolated from *Hortia oreadica* (Rutaceae) against oral pathogens. **Brazilian Journal of Microbiology**, [S. l.], v. 40, p. 535-540, 2009.

SILVA FILHO, A. R. DOS R. E; GUTIERREZ, I. E. M DE; ALMEIDA, M. Z. **Aspectos ritualísticos e medicinais das plantas utilizadas em um terreiro de candomblé, Salvador, Ba, Brasil**. 2008. 30f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) – Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2008.

SILVA, M. T. G. **Estudo de métodos para determinação da atividade antimicrobiana de *Physalis angulata* L.** 2003. 66 f. Dissertação (Mestrado em Vigilância Sanitária) – Fundação Oswaldo Cruz, 2003.

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5 ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS / Editora UFSC, 2003.

SOEJARTO, D. D. Potential consequences of plant extinction in the United States. In: AMERICAN CHEMICAL SOCIETY SYMPOSIUM SERIES, 534. Washington: DC, 1993, p. 96 - 111.

SOUZA, E. L. et al. Inhibitory action of some essential oils and phytochemicals on the growth of various moulds isolated from foods. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.48, n. 2, p. 245-250, 2005.

SOUZA, T. M. de. **Estudo farmacognóstico e avaliação da atividade antimicrobiana e citotóxica de preparações cosméticas contendo o extrato de folhas de *Myrciaria cauliflora* O. Berg. (Myrtaceae) e de casca de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (Leguminosae-mimosoidae)**. 2007. 181f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Estadual Paulista, 2007.

SPELLBERG, B. et al. The epidemic of antibiotic-resistant infections: a call to action for the medical community from the Infectious Diseases Society of America. **Clinical Infectious Diseases**, [S. l.], v. 46, p. 155–64, 2008.

VIEIRA, P. C.; KUBO, I. Molluscicidal acridone alkaloids from *Angostura paniculata*: isolation, structures, and synthesis. **Journal of Natural Products**, v.55, p.1112, 1992.

WANSI, J. D. et al. Antiplasmodial activities of furoquinoline alkaloids from *Teclea afzelii*. **Phytotherapy Research**, v. 24, n. 5, p. 775–777, 2010.

WATERMAN, P.G. The chemical systematic of alkaloids: a review emphasising the contribution of Robert Hegnauer. **Biochemical Systematics and Ecology**, [S. l.], v. 27, n.4, p.395-406, 1999.

WOJTASZEK, P. Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection. **Biochemical Journal**, v. 322, p. 681-692, 1997.

WU, T. et al. Cytotoxic and antiplatelet aggregation principles of *Rruta graveolens*. **Journal of the Chinese Chemical Society**, v. 50, p. 171-178, 2003.

YANG, C. H.; CHENG, M. J.; LEE, S. J. Z. Secondary metabolites and cytotoxic activities from the stem bark of *Zanthoxylum nitidum*. **Planta Médica**, v. 74, n. 9, p.1046, 2008.

YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**. Santa Catarina: Argos, 2001. 524p.