

ARTIGO ORIGINAL

Avaliação de *Ibicella lutea* como agente antimicrobiano frente à *Staphylococcus aureus* *Assessment of *Ibicella lutea* as an antibacterial agent against *Staphylococcus aureus**

Lisiane Martins Volcão,¹ Tatiane Silveira Coelho,¹ Alvaro Vásquez,² Maria Pia Cerdeiras,² Pedro Eduardo Almeida da Silva,¹ Flávio Manoel Rodrigues da Silva Jr.,¹ Daniela Fernandes Ramos¹

¹Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, RS, Brasil.

²Universidad de La Republica de Uruguay, Montevideo, Uruguai.

Recebido em: 01/09/2016

Aceito em: 12/09/2016

Disponível online: 04/10/2016

daniFERAMOS@gmail.com

DESCRITORES

Extratos vegetais;
Infecções Bacterianas;
Antibacteriano.

KEYWORDS

Plant extracts;
Bacterial infections;
Anti-Bacterial Agents.

RESUMO

Justificativa e Objetivos: O estudo objetivou a avaliação da atividade antibacteriana de extratos brutos e frações de *Ibicella lutea*, na inibição do crescimento de *Staphylococcus aureus*, avaliando a combinação destes compostos e sua atividade citotóxica. **Métodos:** Para a atividade antibacteriana dos extratos foi utilizado o Teste de Microdiluição em Caldo, seguido do Teste *Checkerboard*. Os extratos que apresentaram atividade antibacteriana foram submetidos ao teste de citotoxicidade, com células macrofágicas e determinação do seu Índice de Seletividade (IS). **Resultados:** A fração de acetato de etila (AcOE) obteve o melhor potencial antibacteriano (6,25 µg/mL), entretanto nenhum dos compostos testados apresentaram atividade bactericida nas concentrações empregadas. Neste estudo pode-se observar uma ação aditiva entre as frações AcOE e metanólica (MeOH), sendo a interação entre os extratos brutos indiferente. De acordo com o teste de citotoxicidade, a fração AcOE apresentou um maior índice de sobrevivência das células macrofágicas (IC50%=30,35 µg/mL). Entretanto, quando calculado o IS, não houve resultados satisfatórios (IS < 10) para os extratos analisados. **Conclusões:** Neste estudo observou-se o potencial antibacteriano das frações AcOE e MeOH, assim como uma ação aditiva na combinação das frações, dando suporte para o isolamento e caracterização de seus componentes ativos. Apesar dos extratos não apresentarem um IS satisfatório, novos estudos de toxicidade devem ser realizados para determinar com segurança o potencial de uso dos produtos provenientes de *I. lutea*, como é o caso de medicamentos para uso tópico ou biocidas.

ABSTRACT

Background and Objectives: The study aimed to evaluate the antibacterial activity of crude extracts and fractions of *Ibicella lutea* in inhibiting the growth of *Staphylococcus aureus*, by evaluating the combination of these compounds and their cytotoxic activity. **Methods:** To analyze the antibacterial activity of the extracts, the microdilution test in broth was used, followed by the checkerboard test. The extracts that showed antibacterial activity were submitted to the cytotoxicity test, with macrophage cells and determination of their Selectivity Index (SI). **Results:** The ethyl acetate fraction (AcOE) obtained the best antibacterial potential (6.25 µg/mL); however, none of the tested compounds showed bactericidal activity at the used concentrations. This study shows an additive action between the AcOE and methanolic fractions (MeOH), being the interaction between the crude extracts indifferent. According to the cytotoxicity test, the AcOE fraction showed a higher survival rate of macrophages (50%CI = 30.35 µg/mL). However, when the SI was calculated, there were no satisfactory results (SI <10) for the analyzed extracts. **Conclusions:** This study analyzed the antibacterial potential of the AcOE and MeOH fractions, as well as an additive action in the combination of the fractions, supporting the isolation and characterization of their active components. Although the extracts did not show a satisfactory SI, further toxicity studies should be carried out to safely determine the potential for use of products derived from *I. lutea*, for topical or biocidal use.

R Epidemiol Control Infec, Santa Cruz do Sul, 6(4):191-196, 2016. [ISSN 2238-3360]

Please cite this article in press as: VOLCÃO, Lisiane Martins et al. Avaliação de *Ibicella lutea* como agente antimicrobiano frente à *Staphylococcus aureus*. Revista de Epidemiologia e Controle de Infecção, Santa Cruz do Sul, v. 6, n. 4, out. 2016. ISSN 2238-3360. Disponível em: <<https://online.unisc.br/seer/index.php/epidemiologia/article/view/8200>>. Acesso em: 10 jan. 2017. doi:<http://dx.doi.org/10.17058/reci.v6i4.8200>.



Exceto onde especificado diferentemente, a matéria publicada neste periódico é licenciada sob forma de uma licença Creative Commons - Atribuição 4.0 Internacional. <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

INTRODUÇÃO

Espécies bacterianas pertencentes ao gênero *Staphylococcus* sp. são bactérias Gram positivas ubíquas, encontradas nos mais diversos sítios e hospedeiros, estão presentes tanto na microbiota animal quanto na microbiota de indivíduos saudáveis.^{1,2}

Apesar de serem constituintes naturais da microbiota humana, são causas comuns de infecções de pele e mucosas, sendo também responsáveis por um considerável número de infecções hospitalares com alto risco de sepse.^{3,4} Somado a isso, *Staphylococcus aureus* é o principal representante dos microrganismos causadores de toxinfecções alimentares causadas pelo consumo de alimentos contaminados por bactérias e/ou toxinas por estas produzidas, sendo ainda um dos principais agentes causadores de mastite bovina no sul do Brasil.⁵⁻⁷

Após a descoberta da penicilina por Fleming em 1929, acreditou-se que as infecções por *S. aureus* estariam controladas, entretanto alguns anos depois foram sendo identificados os primeiros casos de cepas resistentes dessa espécie.⁸ O aumento no consumo de antimicrobianos, tanto na saúde humana quanto em medicina veterinária, tem agravado o aumento da circulação de cepas bacterianas resistentes, incluindo cepas MRSA ou *methicillin-resistant Staphylococcus aureus*.^{9,10}

Diversos estudos têm demonstrado a eficácia de produtos provenientes de materiais vegetais como agentes antimicrobianos, inclusive contra micro-organismos resistentes.¹¹⁻¹³ Estes compostos naturais tendem a ter uma maior eficiência do que compostos sintéticos, não só pela diversidade de substâncias biologicamente ativas, mas também pela atuação como substratos de sistemas transportadores para o meio intracelular.¹⁴

Ibicella lutea (Lindl.) Van Eselt., é uma planta pertencente a família Martyniaceae, um grupo restrito a América do Sul.¹⁵ É conhecida popularmente como "Garra-do-Diabo" e utilizada na medicina popular uruguaia como antimicrobiano para o tratamento de infecções na pele e nos olhos.¹⁶ Levando em consideração o já demonstrado potencial desta planta como controle do crescimento de organismos patogênicos, este estudo teve como objetivo avaliar a atividade antibacteriana de extratos brutos e frações de *I. lutea* para inibição do crescimento de *Staphylococcus aureus*, assim como a combinação destes compostos e sua atividade citotóxica.^{11,16,17}

MÉTODOS

Preparação do Extrato. Para o estudo foram utilizados dois extratos brutos, etanólico e clorofórmico ($\text{CHCl}_3/\text{CH}_2\text{OH}$), provenientes de partes aéreas de *I. lutea*, assim como quatro frações originadas por cromatografia à vácuo do extrato clorofórmico (CHCl_3 ; $\text{CHCl}_3 + \text{AcOE}$ 80:20; AcOE ; MeOH). A extração foi realizada de acordo com o descrito por Cerdeiras et al. pelo Departamento de Farmacognosia da Faculdade de Química da Universidade da República do Uruguai/UDELAR – Uruguai, ressolubilizados em DMSO (dimetilsulfóxido).¹⁸ A coleta

dos espécimes foi realizada pelo grupo de pesquisa do Departamento de Botânica da mesma Universidade e identificadas por Alonso Paz. As amostras estão mantidas no Herbário MVFQ, catálogo Alonso Paz Et Bassagoda n° 2.456.

Preparação do inóculo bacteriano. Como microrganismo teste foi utilizado *Staphylococcus aureus* ATCC 12598 semeado em meio Luria Bertani Ágar. Deste meio, foi retirada uma colônia bacteriana isolada e preparado um inóculo bacteriano em água salina (0,85%) a escala 1,5 de MacFarland, medida em espectrofotômetro a um comprimento de onda de 600nm (equivalente a $\lambda = 0,1$).¹⁹ Ao final dos testes, considerando as diluições realizadas, o inóculo final em cada poço da microplaca correspondeu a cerca de $1,5 \times 10^4$ a $1,5 \times 10^5$ UFC/mL.

Avaliação da Atividade Antibacteriana. A fim de determinar a atividade antibacteriana dos extratos e frações, foi utilizado o Teste de Microdiluição em Caldo, em duplicata, de acordo com metodologia descrita no CLSI M07-A9, onde foi determinada a Concentração Inibitória Mínima (CIM) necessária para inibir o crescimento bacteriano.¹⁹ *S. aureus* foi submetido a concentrações seriadas (1:2) dos extratos, as quais variaram de 200 µg/mL a 0,19 µg/mL. Foram adicionados a placa, controles de esterilidade do meio de cultivo (Caldo Muller Hinton – Himedia®), de sensibilidade da cepa (utilizando o antibiótico Ciprofloxacina – Sigma®), esterilidade dos extratos e frações, assim com um controle positivo de viabilidade do organismo teste. A placa foi incubada por 24h a uma temperatura de $36^\circ\text{C} \pm 1$, e após este período foi adicionado a todos os poços 30 µl de resazurina (0,02%), um indicador de viabilidade celular. A placa foi novamente incubada a $36^\circ\text{C} \pm 1$ por 1,3h para posterior leitura no espectrofotômetro a um comprimento de onda de 600 nm, onde os dados obtidos foram utilizados para o cálculo do IC90%. Neste cálculo foram utilizados os valores obtidos do controle de crescimento bacteriano total, sem interferência de agentes antimicrobianos, e do controle negativo composto apenas pelo meio de cultura. Estes valores foram utilizados para comparação com os obtidos dos poços testes para o cálculo real da porcentagem final da população bacteriana ao final da exposição. Para definir se o composto teste possui atividade bactericida ou apenas bacteriostática, utilizou-se 5 µl de meio do poço definido como CIM, assim como duas concentrações abaixo desta e uma acima, em 195 µl de um novo meio de cultura (Muller Hinton).²⁰ Esta placa foi incubada com as mesmas condições do teste anterior, e após este período foi determinada a Concentração Bactericida Mínima (CBM).

Checkerboard. Este método foi realizado para definir a interação entre os extratos e frações de *I. lutea* que apresentaram atividade antibacteriana nas concentrações utilizadas (≤ 200 µg/mL) e determinar a Concentração Inibitória Fracional destes (CIF) frente *S. aureus*.²¹ Foram utilizadas placas de microtitulação de 96 poços, meio de cultivo Muller Hinton (Himedia®) e condições de incubação ao final da preparação do experimento de 24h a uma temperatura de $36^\circ\text{C} \pm 1$. As placas foram preparadas adicionando um dos compostos diluídos em série no eixo X e o outro composto, previamente diluído,

no eixo Y. O inóculo foi transferido para cada poço teste da placa. Em todos os ensaios foram incluídos controle de esterilidade e crescimento da cepa bacteriana padrão.

Após o período de incubação, foi adicionado a todos os poços 30 µl de resazurina (0,02%) para leitura da CIM dos extratos combinados. O cálculo do CIF é feito pela fórmula: (CIM do extrato I combinado/CIM do extrato I sozinho) + (CIM do extrato II combinado/CIM do extrato II sozinho). Valores de CIF ≤ 0,5 considera-se atividade sinérgica, 0,5 > CIF ≤ 1 aditividade, 1 < CIF ≤ 2 indiferença e CIF > 2 a atividade entre os compostos é considera antagonista.

Ensaio de Citotoxicidade. Para a avaliação da atividade citotóxica dos extratos, foram utilizadas células macrófagas J774A.1 (ATCC TIB-67). Em uma placa de microtitulação de 96 poços, foi adicionado 200 µl de suspensão contendo macrófagos (1x10⁵ cel/mL) cultivados em meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino, a placa foi mantida sob condições de umidade atmosférica de 5% CO₂ e 37°C por 24h. Logo após este período, as células foram expostas a diferentes concentrações dos extratos e frações (200 µg/mL - 0,78 µg/mL) que apresentaram atividade antibacteriana (CIM ≤ 200 µg/mL), sendo a placa incubada *overnight*. Para a leitura foi adicionado 30 µl de resazurina a 0,01%, e a IC50 (concentração que mantém a viabilidade de 50% das células) foi mensurada após 24h por espectrofotometria a 620 nm.²² O experimento foi realizado em duplicata.

Índice de Seletividade (IS). O índice de seletividade dos compostos foi calculado com base nos resultados da CIM e da IC50 de cada composto, com a seguinte fórmula: IC50/CIM. IS com valores maiores ou iguais a 10 indicam que o composto é 10 vezes menos tóxico para o macrófago em comparação a toxicidade para a célula bacteriana.²³

RESULTADOS

Foram avaliados dois extratos brutos de *I. lutea* (etanólico e clorofórmico) e quatro frações provenientes do extrato clorofórmico. Destes apenas dois compostos não foram ativos nas concentrações utilizadas no experimento (CIM > 200 µg/mL). Para os extratos brutos de *I. lutea* pode-se observar uma melhor ação do extrato etanólico (CIM = 100µg/mL) em comparação ao extrato clorofórmico (CIM = 200µg/mL) frente a *S. aureus* (Tabela 1). Quanto as frações do extrato, ressalta-se uma excelente atividade antibacteriana da fração AcOE (6,25 µg/mL) quando comparado com a atividade apresentada pelas outras frações testadas (Tabela 1).

Nenhum dos extratos brutos e frações apresentaram capacidade bactericida frente a *S. aureus*. Para a inibição de 90% da população bacteriana de *S. aureus*, foi necessária uma concentração de 18,27 µg/mL da fração AcOE de *I. luteae* 67,31 µg/mL para o a fração MeOH. Os extratos brutos foram eficientes para inibir 90% da população bacteriana em valores de 86,02 µg/mL e 135,82 µg/mL para o extrato etanólico e clorofórmico, respectivamente (Figura 1).

Tabela 1. Concentração Inibitória Mínima (CIM), Concentração Bactericida Mínima (CBM) e Concentração Inibitória 90% (IC90) dos extratos e frações de *Ibicella lutea* frente à *Staphylococcus aureus*.

Extrato	CIM (µg/mL)	CBM (µg/mL)	IC90 (µg/mL)
<i>I. lutea</i> solvente etanólico	100	>200	86,02
<i>I. lutea</i> solvente clorofórmico	200	>200	135,82
<i>I. lutea</i> CHCl ₃	>200	>200	-
<i>I. lutea</i> CHCl ₃ AcOE (80:20)	>200	>200	-
<i>I. lutea</i> AcOE	6,25	>200	18,27
<i>I. lutea</i> MeOH	100	>200	67,31

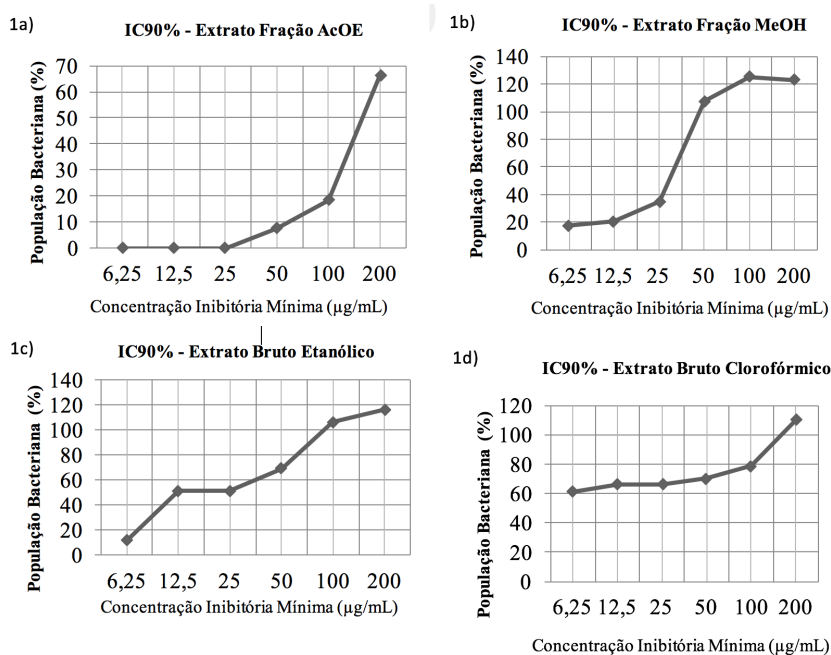


Figura 1. Percentual da população bacteriana de *Staphylococcus aureus* inibida pelas respectivas concentrações necessárias dos extratos brutos e frações de *Ibicella lutea*. 1a. Fração obtida com Acetato de Etila (AcOE); 1b. Fração obtida com Metanol (MeOH); 1c. Extrato bruto etanólico; 1d. Extrato bruto clorofórmico.

O teste Checkerboard foi realizado para aqueles compostos que apresentaram atividade antibacteriana nas concentrações testadas ao longo do experimento (200 µg/mL – 0,19 µg/mL). Ao avaliar a associação entre os extratos brutos de *I. lutea* e as frações obtidas com acetato de etila (AcOE) e metanol (MeOH) provenientes do extrato clorofórmico, observou-se uma ação aditiva entre as frações AcOE e MeOH, sendo que a interação entre os extratos brutos foi indiferente. Na figura 2 pode-se visualizar a concentração inibitória fracional dos extratos, incluindo os com atividade aditiva (2a). De acordo com o teste de citotoxicidade, o extrato que resultou em um maior índice de sobrevivência das células macrofágicas foi a fração AcOE, com IC50% de 30,35 µg/mL. Entretanto, quando calculado o IS, não houve resultados satisfatórios (IS < 10) para nenhum dos extratos analisados (Tabela 2).

DISCUSSÃO

Os extratos brutos etanólico e clorofórmico, e as frações (CHCl₃; CHCl₃ + AcOE 80:20; AcOE; MeOH) obtidas a partir deste segundo extrato bruto, foram testados como um potencial inibidor de *S. aureus*. O extrato com maior atividade antibacteriana foi a fração obtida com acetato de etila (CIM_{AcOE} = 6,25 µg/mL), entretanto a fração obtida com metanol apresentou uma atividade antibacteriana inferior (CIM_{MeOH} = 100 µg/mL), assim como as frações obtidas com etanol (CIM_{CHCl₃} ≥ 200 µg/mL) e com etanol + acetato de etila em proporção de 80:20 (CIM_{CHCl₃ + AcOE} ≥ 200 µg/mL). Assim como no presente estudo, Wallace & Vásquez demonstraram atividade antibacteriana destas mesmas frações (AcOE e MeOH) contra diferentes linhagens de *S. aureus*.¹⁶ Em extrações vegetais utilizando acetato de etila como solvente, podem-se obter compostos como flavanóides, taninos, saponinas e triterpenos, sendo que substâncias como estas possuem importantes atividades biológicas já descritas em outros estudos.^{24, 25}

Sosa e Zunino ao testarem o extrato etanólico de *I. lutea*, não obtiveram inibição do crescimento bacteriano de *Proteus mirabilis*, uma espécie bacteriana de parede celular Gram negativa, demonstrando apenas efeitos em sua morfologia.¹⁷ Em nosso estudo não observamos inibição do crescimento de cepas deste mesmo grupo, *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii* (dados não listados neste artigo), apenas na espécie Gram positiva *S. aureus*. Com isso, poderíamos inferir que extratos desta planta obtidos com etanol, tenham uma ação sobre a membrana externa, composta principalmente por lipopolissacarídeos, presentes em bactérias Gram negativas, porém não tendo efeito significativo nas camadas de peptidoglicanos (presente tanto em bactérias Gram negativas quanto em Gram positivas). Somado a isto, estudos observam atividade bacteriana também de outros gêneros da mesma família de *Ibicella*, como *Martynia* sp. e *Craniolaria* sp., frente a espécies bacterianas Gram positivas e Gram negativas.²⁶⁻²⁸

Ao analisar a combinação das frações que apresentaram atividade antibacteriana (AcOE e MeOH) e a combinação dos extratos brutos etanólico e clorofórmico, podemos notar uma ação antibacteriana potencializada, quando as frações são combinadas, podendo este fato estar ligado a uma possível interação ou aumento na taxa de constituintes fitoquímicos análogos com atividade antibacteriana.²¹ Este fato demonstra que a combinação de produtos moderadamente ativos (como o caso da fração MeOH) decorre da possível ocorrência de substâncias ativos, as quais aumentam o potencial antibacteriano.

Apesar de ter sido observada uma concentração baixa da fração MeOH para a sobrevivência celular de 50% (IC50 = 30,35 µg/mL), em comparação com a fração AcOE e com os extratos brutos, nenhum dos extratos e frações testados para citotoxicidade apresentaram índice de seletividade satisfatório (> 10). Estes resultados demonstram que os compostos podem ser tão tóxicos para as células macrofágicas quanto para a célula bacteriana, entretanto algumas alternativas podem ser postas em

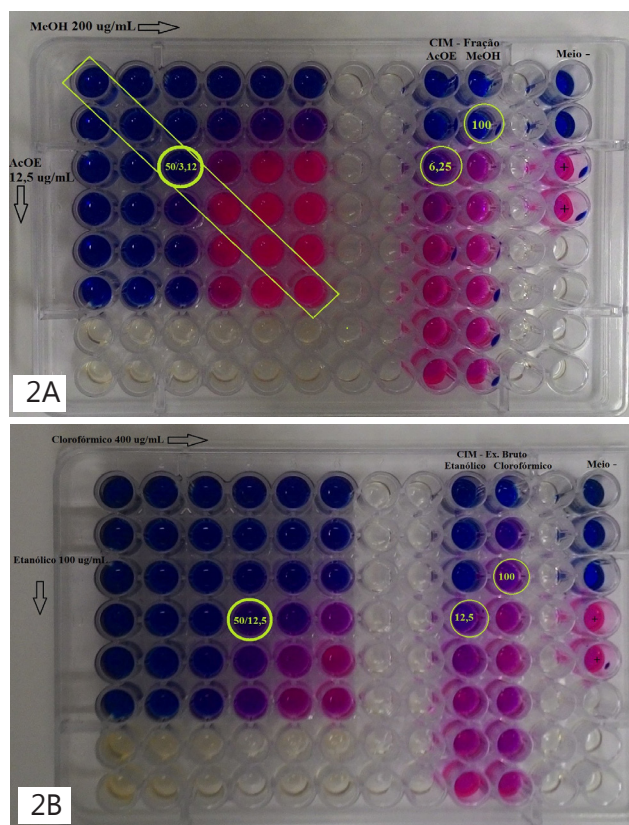


Figura 2. Checkerboard com os extratos brutos e frações provenientes de *Ibicella lutea* frente *Staphylococcus aureus*. 2A. Associação das frações AcOE e MeOH e suas Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) sozinhas e combinadas. 2B. Associação dos extratos brutos etanólico e clorofórmico e suas Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) sozinhas e combinadas.

Tabela 2. Citotoxicidade de *Ibicella lutea* em células macrofágicas. Relação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e da Concentração Inibitória de 50% (IC50) da população celular, com cálculo do Índice de Seletividade (IS).

Extrato/Fração	CIM (µg/mL)	CBM (µg/mL)	IC90 (µg/mL)
<i>Ibicella lutea</i> extrato bruto etanólico	100	76,58	0,76
<i>Ibicella lutea</i> extrato bruto clorofórmico	200	74,47	0,37
<i>Ibicella lutea</i> fração AcOE	6,25	30,35	4,8
<i>Ibicella lutea</i> fração MeOH	100	128,24	1,28

prática, como o isolamento do composto ativo ou retirada daquele composto que apresente toxicidade celular.²³ Apesar dos resultados obtidos nesta fase do estudo, é importante mencionar a pesquisa de Sosa e Zunino, onde não foi observada mutagenicidade ou efeitos tóxicos significativos em modelos animais por parte do extrato etanólico de *I. lutea*, considerando viável novos testes de toxicidade com extratos desta espécie vegetal.¹⁷ Além disso, é importante considerar que o IS é utilizado apenas como referência para a utilização farmacológica, fazendo com que compostos presentes no extrato desta planta possam ter função como biocidas, podendo ser utilizado em ambientes hospitalares para o controle de cepas bacterianas envolvidas em casos de infecções hospitalares. Novos estudos de toxicidade devem ser realizados para determinar com segurança o potencial de uso dos produtos provenientes de *I. lutea*, como é o caso de medicamentos para uso tópico e produtos biocidas.

REFERÊNCIAS

1. Fritz AS, Hogan PG, Hayek G, et al. *Staphylococcus aureus* colonization in children with community-associated *Staphylococcus aureus* skin infections and their household contacts. *Arch Pediatr Adolesc Med* 2012;166(6):551-57. doi: 10.1001/archpediatrics.2011.900
2. Burns A, Shore AC, Brennan GI, et al. A longitudinal study of *Staphylococcus aureus* colonization in pigs in Ireland. *Vet Microbiol* 2014;174(3-4):504-13. doi: 10.1016/j.vetmic.2014.10.009
3. Landrum ML, Neumann C, Cook C, et al. Epidemiology of *Staphylococcus aureus* blood and skin and soft tissue infections in the US military health system, 2005-2010. *JAMA* 2012;308(1):50-9. doi: 10.1001/jama.2012.7139
4. Tong SYC, Davis JS, Eichenberger E, et al. *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations and management. *Clin Microbiol Rev* 2015;28(3):603-61. doi: 10.1128/CMR.00134-14
5. Pu S, Wang F, Ge B. Characterization of toxin genes and antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolates from Louisiana retail meats. *Foodborne Path Dis* 2011;8(2):299-306. doi: 10.1089/fpd.2010.0679
6. Bandeira FS, Pícolo T, Zani JL, et al. Frequência de *Staphylococcus aureus* em casos de mastite bovina subclínica na região sul do Rio Grande do Sul. *Arquivos do Instituto Biológico* 2013;80(1):1-6.
7. Saab AB, Zamprognia TO, Lucas TM, et al. Prevalence and etiology of bovine mastitis in the Nova Tebas, Paraná. *Semina: Ciências Agrárias* 2014;35(2):835-44. doi: 10.5433/1679-0359.2014v35n2p835
8. Davies J, Davies D. Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiol Mol Biol Rev* 2010;74(3):417-33. doi: 10.1128/MMBR.00016-10
9. Boeckel TPV, Gandra S, Ashok A, et al. Global antibiotic consumption 2009 to 2010: an analysis of national pharmaceutical sales data. *Lancet Infect Dis* 2014;14(8):742-50. doi: 10.1016/S1473-3099(14)70780-7.
10. Davis MF, Iverson AS, Baron P, et al. Household transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and other staphylococci. *Lancet Infect Dis* 2012;12(9):703-16. doi: 10.1016/S1473-3099(12)70156-1
11. Asai T, Hara N, Fujimoto Y. Fatty acid derivatives and dammarane triterpenes from the glandular trichome exudates of *Ibicella lutea* and *Proboscidea louisiana*. *Phytochem* 2010;71(8-9):877-94. doi: 10.1016/j.phytochem.2010.02.013.
12. Gull I, Saeed M, Shaukat H, et al. Inhibitory effect of *Allium sativum* and *Zingiber officinale* extracts on clinically important drug resistant pathogenic bacteria. *Annals Clin Microbiol Antimicrobiol* 2012; 11(8): doi: 10.1186/1476-0711-11-8
13. Samy RP, Manikandan J, Qahtani MA. Evaluation of aromatic plants and compounds used to fight multidrug resistant infections. *Hind Publish Corp* 2012;2013>1-17. doi: 10.1155/2013/525613
14. Harvey AL, Edrada-Ebel R, Quinn RJ. The re-emergence of natural products for drug Discovery in the genomics era. *Nature Rev: Drug Discov* 2015;14(2):111-29. doi: 10.1038/nrd4510
15. Giuliatti AM, Harley RM. Flora da Bahia: Martyniaceae. *Sitientibus série Ciências Biológicas* 2013;13(1):381-84. doi: 10.13102/scb318
16. Wallace F, Vásquez A. Anti-*Staphylococcus* Activity of *Ibicella lutea* Compounds. *Latin Ame J Phar* 2011;30(5):1025-27.
17. Sosa V, Zunino P. Effect of *Ibicella lutea* on uropathogen *Proteus mirabilis* growth, virulence and biofilm formation. *J Infect Dev Ctries* 2010;3(10):762-70. PMID:20009277
18. Cerdeiras MP, Fernández J, Soubes M, et al. A new antibacterial compound from *Ibicella lutea*. *J Ethnoph* 2000;73:521-25.
19. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests. 2012;32(1).
20. Said A, Del Olmo E, Leal CH, et al. Manual de técnicas de bioavaliación de nuevos agentes anti-tuberculosis. España: CIBIN IMSS 2006. 221p.
21. Pauli GF, Case RJ, Inui T, et al. New perspective on natural products in TB drug research. *Life Sci* 2005;78(5):485-94. doi: 10.1016/j.lfs.2005.09.004
22. Ahmed AS, Gogal Jr. RM, Walsh JE. A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes: an alternative to [3H] thymidine incorporation assay. *J Immunol Methods* 1994;170(2):211-24.
23. Pavan FR, Maia PIS, Leite SRA, et al. Thiosemicarbazones, semicarbazones, dithiocarbazates and hydrazide/hydrazones: Anti - *Mycobacterium tuberculosis* activity and cytotoxicity. *Eur J Med Chem* 2010;45(5):1898-905. doi: 10.1016/j.ejmech.2010.01.028
24. Shai LJ, McGaw LJ, Aderogba MA, et al. Four pentacyclic triterpenoids with antifungal and antibacterial activity from *Curtisia dentata* (Burm. F) C.A. Sm leaves. *J Ethnoph* 2008; 119(2):238-44. doi: 10.1016/j.jep.2008.06.036
25. Ding Q, Yanng L-X, Yang H-W, et al. Cytotoxic and antibacterial triterpenoids derivatives from *Clematis ganpiniana*. *J Ethnoph* 2009;126(3):382-5. doi: 10.1016/j.jep.2009.09.028
26. Dhingra AK, Chopra B, Mittal SK. *Martynia annua* L.: a review on its ethnobotany phytochemical and pharmacological profile. *J Pharmacog Phytochem* 2013;1(6):135-40.

27. González MA. Aromatic abietane diterpenoids: their biological activity and synthesis. *Nat Prod Rep* 2015;32(5):684-704. doi: 10.1039/c4np00110a
28. Kalaichelvi K, Dhivya SM. Phytochemical screenig and antibacterial activity of leaf extract of *Martynia annua* L. and *Premna latifolia* Roxb. *J Med Plants Stu* 2016;4(4):84-87.