

Atividade antimicrobiana de extratos de plantas no Semi-Árido Paraibano

Antimicrobial activity of extracts from Paraibano Semi-Arid plants

Maria do Socorro Vieira Pereira¹;
Onaldo Guedes Rodrigues²;
Francisco Marlon C. Feijó³;
Ana Célia R Athayde²;
Ednaldo Queiroga de Lima²;
Maria Raquel Querino de Sousa⁴.

Resumo

Os extratos alcoólicos de *Ruta graveolens* (casca e frutos), *Punica granatum*, *Caesalpinia pyramidalis* (casca), *Anacardium occidentale* (folhas), *Caesalpinia ferrea* (casca), foram produzidos pelo método de Soxhlet. Esses extratos foram usados para inibir o crescimento bacteriano sobre as cepas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* (Cepas *E. coli* LM9, *E. coli* LM10, *E. coli* LM11) e *Enterobacter gergoviae*, semeados em meio Muller Hinton usando o método bioautográfico e, em seguida, a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM). As placas foram lidas através da presença ou ausência de halos em volta dos discos e a sua área determinada em milímetros (mm) através do seu diâmetro. A análise dos dados indicou que os houve moderada inibição contra as diferentes linhagens bacterianas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *E. gergoviae* (LM56),.

Palavras-chaves: Atividade Antimicrobiana; Concentração inibitória mínima, Resistência microbiana.

Summary

The alcoholics extracts *Ruta graveolens* (peel and fruits), *Punica granatum*, *Caesalpinia pyramidalis* (peel), *Anacardium occidentale* (leaf), *Caesalpinia ferrea* (peel), were produced by the method of Soxhlet. These extracts were used to inhibit the bacterial growth of *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* (lineage *E. coli* LM9, *E. coli* LM10, *E. coli* LM11) and *Enterobacter gergoviae* that were sowed in medium Muller Hinton by bioautografic method and after the concentration inhibitory minimal determinated (CIM). The plates were read through the presence or absence of halos in turn of the disks. In agreement with the presence of halos, the same ones were measured in millimeters (mm) in relation at diameters them. The analyzed of data showed that occurred moderated inhibition about the *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Enterobacter gergoviae* bacterial lineages.

Key Worlds: Antimicrobial activity, concentration inhibitory minimal, Microbial resistance.

Introdução

No Brasil, a terapêutica antimicrobiana convencional é uma prática antiga que segue de acordo com o perfil internacional. A cada dia, novas drogas são lançadas no mercado e o seu uso adotado imediatamente. Inúmeros prejuízos têm sido enumerados em função do uso iatrogênico e abusivo de antimicrobianos de origem sintética ou natural. A resistência microbiana e a auto-

¹ Professora pela Universidade Federal da Paraíba, Dpto de Biologia Molecular, Campus I, Cidade Universitária - João Pessoa - PB - Brasil - CEP - 58051-900, E-mail: svieira@dbm.ufpb.br.

² Professor pela Universidade Federal de Campina Grande, UAMV/CSTR, Av. Universitária, Bairro Jatobá, s/n, patos – PB, CEP 58700910.

³ Universidade Federal Rural do Semi-árido – UFRSA, Dpto de Microbiologia, BR 110 - Km 47 Bairro Pres. Costa e Silva CEP 59625-900 Mossoró - Rio Grande do Norte.

⁴ Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE, R. Dom Manoel de Medeiros, s/n - Dois Irmãos CEP: 52171-900 - Recife/PE

medicação são alguns desses (VEGNI, 2004). Por outro lado, estudos etnobotânicos feitos em várias regiões do país têm sinalizado positivamente mostrando a intensificação da medicina tradicional. A vasta biodiversidade vegetal pode ser uma forma alternativa no combate as infecções microbianas (LOCHER, 1995). Contudo, os avanços nessa área tem esbarrado na carência de dados referentes a forma de uso, vias de administração, a ação biológica, composições químicas e controle de qualidade. Neste estudo objetivou-se investigar a atividade antimicrobiana dos extratos alcoólicos de arruda, casca e fruto de romã, casca de catingueira, folhas de cajueiro, e cascas de jucá sobre as cepas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Enterobacter gergoviae*.

Revisão de literatura

Várias propriedades terapêuticas de plantas encontradas no Semi-árido brasileiro, sejam elas nativas ou exóticas, vêm sendo investigas. Espécies de *Ruta graveolens* são dotadas de diversas classes de compostos naturais com atividade biológica incluindo atividade fitotóxica, anti-fúngica e antimicrobiana (ALIOTTA *et al.*, 2000; De FEO *et al.*, 2002; OLIVA *et al.*, 2003; MEEPAGALA, 2005). O seu valor medicinal é evidenciado em função de vários metabólitos secundários contidos no seu extrato como furocoumarinos, alcalóides acridonicose bergaptenos (ZOBEL, 1989), rutin, metil-ester, cnidioside A, Metil-cnidioside e cnidioside B (IVANOVA, 2005). A sua atividade antibacteriana foi evidenciada por meio do estudo de sua ação perante linhagens de *Agrobacterias tumefaciens* (PORTER, 1991), *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* e *Salmonella infantis* (ALZOREK, 2003).

A *Caesalpinia ferre*, árvore robusta que ocorre na caatinga nordestina. Carvalho (1996) testou a atividade analgésica de seu extrato alcoólico em camundongos. Nakamura (2003) testou o extrato desta espécie contra câncer de pele em camundongos observando em vários estágios da carcinogênese.

Estudos químicos com extratos obtidos de *Punica granatum* L. tem revelado a presença de compostos polifenólicos. Glicosídeos flavonóides e taninos (1,2,4-tri-O-galloyl-fl-glucopyranose e 1,3,4-tri-O-galloyl-fl-glucopyrano) (HUSSEIN, 1997). A atividade antimicrobiana desta espécie tem sido relatada em vários estudos. Navarro (1996) relata a atividade contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Candida albicans*. Prashanth (2001), estudou a sua ação contra *Staphylococcus aureus* MTCC 737, *Escherichia coli* MTCC 723, *Klebsiella pneumoniae* MTCC 109, *Proteus _ulgaris* MTCC 1771, *Bacillus subtilis* MTCC 441, *Salmonella typhi* MTCC 537. Machado (2003) verificou a atividade de *P. granatum* contra cepas de *Staphylococcus aureus* metilicilina resistentes e sensíveis. Em todos os trabalhos acima citados, os resultados demonstraram o potencial fitoterapêutico desta espécie.

O extrato etanólico da espécie de *Caesalpinia pyramidalis* tem sido usado contra linhagens de *Escherichia coli*, (strain ATCC 25922) e *Staphylococcus aureus* resistentes (ATCC 25923) (LIMA, 2006) juntamente com o extrato de outras plantas encontradas no Brasil. O estudo fitoquímico feito nesta espécie revelou compostos fenólicos (ácido glicosil-fenilpropenóide), além de ácido 4-O-b-glucopyranosyloxy-Z.-7-ydroxycinnamic e ácido 4-O-b-glucopyranosyloxy-Z.-8-hydroxycinnamic. Aghatisflavone (MENDES, 2000).

A ação anti-microbiana de espécies de *Anacardium occidentale* têm sido investiga. Gonçalves (2005) estudou a ação do extrato desta espécie contra a diarreia em crianças causadas por rotavírus. Schmourlo (2005) estudou a atividade do extrato desta espécie contra os fungos *Candida albicans*, *Trichophyton rubrum* and *Cryptococcus neoformans*. Estudos realizados no Brasil com cromatografia líquida de alta performance nesta espécie, identificou vários compostos químicos, como; carotenóides (b-Carotene, a-carotene, b-cryptoxanthin, 9-cis- +13-cis-b-carotene, auroxanthin, 5,8-epoxy-cryptoxanthin, 5,8-epoxy-lutein, z-carotene) e ácido ascórbico (ASSUNÇÃO, 2003).

Material e Métodos

Confecção dos Extratos

As amostras vegetais foram identificadas e coletadas no Centro Zoobotânico da UFERSA e em seguida colocadas em estufa a 40 °C para secagem. As folhas foram trituradas em liquidificador industrial, enquanto que as cascas foram moídas em moinhos de navalha até uma granulometria de 20 mesh. Em seguida, as amostras foram pesadas e submetidas à extração metanólica em extratores Soxhlet. O metanol foi eliminado dos extratos por evaporação num rotaevaporador rotativo MA 120, com o banho a uma temperatura de 60 + 5°C e em seguida estocados em recipientes adequados à temperatura de 0 a 20°C até seu uso.

Determinação da Atividade Antimicrobiana

A atividade antimicrobiana em placas foi determinada pelo método de difusão em meio sólido para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM). A CIM foi considerada a menor concentração das substâncias que inibiu visivelmente o crescimento bacteriano. Como controle da atividade do extrato foi empregado à linhagem ATCC 29213 (NATIONAL, 1988). Os microrganismos foram semeados em meio sólido e testados com os extratos embebidos em discos de papel filtro e em seguida incubados a 37°C em estufa bacteriológica segundo método de Pelczar jr. (1996), com a solução estoque diluída a 5 % para cada amostra vegetal seguida de diluições seriadas variando ente 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32, sempre num volume de 20 µl, originados a partir do extrato padrão de cada amostra de concentração de 2-0.03 mg.mL⁻¹ (ELOFF, 1998).

Leitura das Placas

A leitura das placas levou em consideração a presença ou ausência de halos em volta dos discos. Os halos foram medidos em milímetros (mm) em relação ao seu diâmetro e a concentração inibitória mínima (CIM) (Tabela 01). Apresentou maior atividade antimicrobiana, quem apresentou maior halo (ELOFF, 1998).

Resultados e Discussão

A análise dos dados mostrou que os extratos usados neste modelo apresentaram atividade antimicrobiana sobre os microorganismos *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Enterobacter gergoviae*. Os resultados estão apresentados na tabela 01.

Tabela 01 – Atividade de diferentes tipos de extratos alcoólicos de *Ruta graveolens* (casca e frutos), *Punica granatum*, *Caesalpinia pyramidalis* (cascas), *Anacardium occidentale* (folhas) e *Caesalpinia férrea* (casca) sobre as linhagens bacterianas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* (Cepas - LM9, LM10, LM11) e *Enterobacter gergoviae*.

Linhagens	Diâmetros dos halos e inibição (mm)/ Concentração dos extratos mg.mL ⁻¹					
	Extrato Padrão	<i>Punica granatum</i> (casca)				
		Ext. 5%	1:2	1:4	1:8	1:16
<i>S. aureus</i> (LM5)	20	2	1	-	-	-
<i>E. coli</i> (LM9)	18	10	2	-	-	-
<i>E. coli</i> (LM10)	21	5	1	-	-	-
<i>E. coli</i> (LM11)	19	8	1	-	-	-
<i>E. gergoviae</i> (LM56)	22	11	4	-	-	-
ATCC 29213	16	-	-	-	-	-

Linhagens	Ext. 5%	<i>Punica granatum</i> (fruto)				
		1:2	1:4	1:8	1:16	1:32
<i>S. aureus</i> (LM5)	20	-	-	-	-	-
<i>E. coli</i> (LM9)	18	10	-	-	-	-
<i>E. coli</i> (LM10)	21	-	-	-	-	-
<i>E. coli</i> (LM11)	19	1	-	-	-	-
<i>E. gergoviae</i> (LM56)	22	1	-	-	-	-
ATCC 29213	16	1	-	-	-	-

Linhagens	Ext. 5%	<i>Ruta graveolens</i>				
		1:2	1:4	1:8	1:16	1:32
<i>S. aureus</i> (LM5)	20	-	-	-	-	-
<i>E. coli</i> (LM9)	18	8	1	-	-	-
<i>E. coli</i> (LM10)	21	-	-	-	-	-
<i>E. coli</i> (LM11)	19	-	-	-	-	-
<i>E. gergoviae</i> (LM56)	22	-	-	-	-	-
ATCC 29213	16	-	-	-	-	-

Linhagens	Ext. 5%	<i>Caesalpinia pyramidalis</i>				
		1:2	1:4	1:8	1:16	1:32
<i>S. aureus</i> (LM5)	20	14,8	8	2	1	1
<i>E. coli</i> (LM9)	18	2	-	-	-	-
<i>E. coli</i> (LM10)	21	1	-	-	-	-
<i>E. coli</i> (LM11)	19	14,6	10	2	-	-
<i>E. gergoviae</i> (LM56)	22	11,5	5,3	-	-	-
ATCC 29213	16	-	-	-	-	-

Linhagens	Ext. 5%	<i>Anacardium occidentale</i>				
		1:2	1:4	1:8	1:16	1:32
<i>S. aureus</i> (LM5)	20	-	-	-	-	-
<i>E. coli</i> (LM9)	18	-	-	-	-	-
<i>E. coli</i> (LM10)	21	16	10	-	-	-
<i>E. coli</i> (LM11)	19	1	-	-	-	-
<i>E. gergoviae</i> (LM56)	22	1	-	-	-	-
ATCC 29213	16	-	-	-	-	-

Linhagens	Ext. 5%	<i>Caesalpinia ferrea</i>				
		1:2	1:4	1:8	1:16	1:32
<i>S. aureus</i> (LM5)	20	17,4	11	5,6	1	1
<i>E. coli</i> (LM9)	18	-	-	-	-	-
<i>E. coli</i> (LM10)	21	1	-	-	-	-
<i>E. coli</i> (LM11)	19	-	-	-	-	-
<i>E. gergoviae</i> (LM56)	22	-	-	-	-	-
ATCC 29213	16	-	-	-	-	-

O extrato da catingueira (*Caesalpinia pyramidalis*), apresentou halo de inibição superior a 11mm, frente as linhagens bacteriana *Enterobacter gergoviae* (LM56), e superior a 14mm, frente as cepas de *E. coli* (LM11), e de *S. aureus* (LM5), estando de acordo com dados relatados por Lima

(2006). O extrato de jucá (*Caesalpinia ferrea*), apresentou halo superior à 17mm, frente à cepa de *S. aureus* (LM5), considerada uma ação antimicrobiana positiva.

O extrato de folha de cajueiro (*Anacardium occidentale*), apresentou halo de inibição superior a 16mm, frente a cepa de *E. coli* (LM10), concordando com os dados de Anesine (1979) que também encontrou atividade desta espécie sobre o *Aspergillus ninger* e Kudi (1999) e em *Pseudomonas aeruginosa* e *Helicobacter pylori* (ELLOF, 1998).

O extrato de folhas de arruda (*Ruta graveolens*), apresentou halo superior à 8mm, frente à cepa de *E. coli* (LM9), estando de acordo com os relatos de Ivanova (2005).

O extrato de fruto de romã (*Punica granatum*) apresentou halo de 11 mm, frente à cepa de *E. coli* (LM9), de acordo com os dados obtidos por Guevara (1993) que demonstrou a ação do extrato da planta sobre o *Vibrio cholerae* e também com resultados obtidos contra *E. coli* e *S. Aureus* visto pelo mesmo autor e por Machado (2003), e não estão de acordo com os dados obtidos contra *Cândida albicans* (PRASHANTH, 2001).

A ação antimicrobiana do extrato de *Punica granatum* L., também foi demonstrada por Peres (1994) em bactérias e por Zhang (1994) contra o *Herpes virus*. O extrato de casca de romã, apresentou halo de 10mm, frente à cepa de *E. coli*(LM9).(Tabela 1).

Conclusões

A análise dos dados demonstrou que os extratos usados, neste modelo, apresentaram atividade antimicrobiana sobre os microorganismos *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Enterobacter gergoviae*. O extrato alcoólico de *Caesalpinia pyramidalis* mostrou um melhor desempenho quando considerada a variedade de microorganismos sensíveis. Quanto à intensidade do efeito, a *Caesalpinia ferrea*, revelou uma atividade antimicrobiana mais eficiente.

Agradecimentos

Os autores agradecem à colaboração que têm recebido do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq do Brasil.

Referências Bibliográficas

- ALIOTTA, G., CAFIERO, G., De FEO, V., DI BLASIO, B., IACOVINO, R., OLIVA, A. Allelochemicals from rue (*Ruta graveolens* L.) and olive (*Olea europaea* L.) oil mill waste waters as potential natural pesticides. *Current Topics in Phytochemistry*. v. 3, p. 167–177, 2000.
- ALZOREKY, N.S.; ANKARA, K. Antibacterial activity of extracts from some edible plants commonly consumed in Asia. *International Journal of Food Microbiology*. v. 80. p. 223– 230, 2003.
- ANESINI C, PEREZ C. Screening of plants used in Argentine folk medicine for antimicrobial activity. *Revista Cubana de Medicina Tropical*. v. 31(1), p. 29-35, 1979.
- ASSUNÇÃO, R.B., MERCADANTE, A.Z. Carotenoids and ascorbic acid composition from commercial products of cashew apple (*Anacardium occidentale* L.). *Journal of Food Composition and Analysis*. v. 16. p. 647–657, 2003.
- CARVALHO, J.C.T., TEIXEIRA, J.R.M., SOUZA, P.J.C. Preliminary studies of analgesic and anti-inflammatory properties of *Caesalpinia ferrea* crude extract. *Journal of Ethnopharmacology*. v. 53, p. 175-178, 1996.
- DHARA, A. K. *et al.*, Preliminary studies on the ant inflammatory and analgesic activity of the methanolic fraction of the root extract of *Tragia involucrate* Linn. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 72, p. 265-268, 2000.
- DYMOCK, W. A *Pharmacolgrphia Indica*, v. 3, p. 270. Zain, Karachi, 1983.
- De FEO, V., DE SIMONE, F., SENATORE, F. Potential allelochemicals from the essential oil of *Ruta graveolens*. *Phytochemistry*. v. 61, p. 573–578, 2002.
- ELOFF, J.N.P. A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. *Planta Medicine.*, v. 64. p. 711-713, 1998.

- ELIANE S. NAKAMURA, E.S., KUROSAKI, F., ARISAWA, M. Cancer chemopreventive effects of a Brazilian folk medicine, Juca, on in vivo two-stage skin carcinogenesis. *Journal of Ethnopharmacology*. v. 81. p. 135-137, 2002.
- GONÇALVES, J.L.S., LOPES, R.C., OLIVEIRA, D.B., COSTA, S.S., MIRANDA, M.M.F.S., ROMANOSA, N.S.O. SANTOS, M.D. In vitro anti-rotavirus activity of some medicinal plants used in Brazil against diarrhea. *Journal of Ethnopharmacology*. v. 99. p. 403-407, 2005.
- GUEVARA, JM, CHUMPITAZ, J, VALENCIA, E. The in vitro action of plants on *Vibrio cholerae*, *Revista Gastroenterol*, Peru, v. 14(1), p. 27-31, 1994.
- HUSSEIN, S.M.; BARAKAT, H.H.; MERFORT, I.; NAWWAR, M.A.M. Tannins from the leaves of *punica granatum*. *Photochemistry*, v. 45, No, 4, pp. 819-823, 1997.
- IVANOVA, A.; MIKHOVA, B.; NAJDENSKIB, H.; TSVETKOVA, I.; KOSTOV, I. Antimicrobial and cytotoxic activity of *Ruta graveolens*. *Fitoterapia*. v. 76. p. 344-347, 2005.
- KIRTIKAR, K. R. *Indian Medicinal Plants*. Lolit Mohan Basu, Allahabad, p. 1606, 1935.
- KUDI, AC, UMOH, JU, EDUVIE, LO, GEFU, J., Screening of some Nigerian medicinal plants for antibacterial activity, *Journal of Ethnopharmacol*, (2), p. 225-8, 1999.
- KUBO J, LEE JR, KUBO I. Anti-*Helicobacter pylori* agents from the cashew apple. *Journal Agric Food Chem*, 47(2):533-7, 1999.
- LIMA, M.R.F., LUNA, J.S., SANTOS, A.F., Anti-bacterial activity of some Brazilian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*. v. 105, p. 137-147, 2006.
- LOCHER, C.P., BURCH, M.T., MOWER, H.F., BERESTECKY, J., DAVIS, H., VAN POEL, B., LASURE, A., VANDEN BERGHE, D.A., VLIETINCK, A.J. Anti microbial activity and anti complement activity of extracts obtained from selected Hawaiian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*. v. 49, p. 23-32, 1995.
- MACHADO, T.B., PINTO, A.V., PINTO, M.C.F.R., LEAL, I.C.R., SILVA, M.G., AMARAL, A.C.F., KUSTER, R.M., NETTO-DOS SANTOS, K.R. In vitro activity of Brazilian medicinal plants, naturally occurring naphthoquinones and their analogues, against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Antimicrobial Agents*. v. 21. p. 279-284, 2003.
- MENDESA, C.C., BAHIA, M.V., DAVIDA, J.M., DAVIDB, J.P.. Constituents of *Caesalpinia pyramidalis*. *Fitoterapia*. v. 71, p. 205-207, 2000.
- MEEPAGALA, K.M., SCHRADER, K.K., WEDGE, D.E., STEPHEN; DUKE, O. Algicidal and antifungal compounds from the roots of *Ruta graveolens* and synthesis of their analogs. *Phytochemistry*. v. 66. p 2689-2695, 2005.
- MOUCHREK, V. E. *Introdução a química de óleos essenciais*, Ed Universitária. Universidade Federal do Maranhão, 71 p. 2000.
- NAVARRO, V.; VILLARREAL, MA.LUISA; ROJAS, G.; LOZOYA, X. Antimicrobial evaluation of some plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of infectious diseases. *Journal of Ethnopharmacology*. v. 53, p. 143-147, 1996.
- OLIVA, A., MEEPAGALA, K.M., WEDGE, D.E., HARRIES, D., HALE, A.L., ALIOTTA, G., DUKE, S.O. Natural fungicides from *Ruta graveolens* L. leaves, including a new quinolone alkaloid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. v. 51, p. 890-896, 2003.
- PORTER, J.R. Host range and implications of plant infection by *Agrobacterium rhizogenes*, *Crit. Review Plant Science*. v. 10, n. (4), p. 387-421, 1991.
- PEREZ, C, ANESINI, C. In vitro antibacterial activity of Argentine folk medicinal plants against *Salmonella typhi*, *Revista Gastroenterol*, Peru, (1). P. 27-31, 1994.
- PELCZAR jr. M.J. *Microbiology Concepts and applications: means for cultivation of microorganisms*. 2ª Ed. Makron. São Paulo-SP, p. 149, 1996.
- PRASHANTH, D.; ASHA, M.K.; AMIT, A. Antibacterial activity of *Punica granatum*. *Fitoterapia*. v. 72. p. 171-173, 2001.
- SCHMOURLOA, G., MENDONÇA FILHO, R.R., ALVIANOB, C.S., COSTA, S.C., Screening of antifungal agents using ethanol precipitation and bioautography of medicinal and food plants. *Journal of Ethnopharmacology*. v. 96. p. 563-568, 2005.

- SIMÔES, C. M. O. *et al.*, *Farmacognósia: da planta ao medicamento*, 1º ed. Porto Alegre: Ed UFGS, 821 p. 1999.
- VEGNIA, F.E., M.L. PANCERIB, M.L., M. BIFFIC, M. Three scenarios of clinical claim reimbursement for nosocomial infection: the good, the bad, and the ugly. *Journal of Hospital Infection*. v. 56, p. 150–155, 2004.
- ZHANG, J, ZHAN, B, YAO, X, GAO, Y, SHONG, J. Antiviral activity of tannin from the pericarp of *Punica granatum* L. against genital Herpes virus in vitro. *Journal Ethnopharmacol.* v. 87 (1), p. 41-6, 1994.
- ZOBEL, A.M.;BROWN, S.A. Histochemical localization of furanocoumarins in *Ruta graveolens* shoots, *Canadian Journal Botanical.* v. 67, p. 915–921, 1989.