



UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

JOELMA DA COSTA BORGES

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE EXTRATO DE *BROSIMUM*
GAUDICHAUDII TRÉCUL. CONTRA BACTÉRIAS ISOLADAS DE
LESÕES DE PÉS DIABÉTICOS**

PALMAS - TO,
2016.

JOELMA DA COSTA BORGES

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE EXTRATO DE *BROSIMUM GAUDICHAUDII* TRÉCUL. CONTRA BACTÉRIAS ISOLADAS DE LESÕES DE PÉS DIABÉTICOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Tocantins, para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientação: Prof^ª Dr^ª Maria Cristina da Silva Pranchevicius

PALMAS - TO,
2016.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Tocantins

B732a Borges, Joelma da Costa.

Atividade Antimicrobiana de Extrato de *Brosimum Gaudichaudii* Trécul. Contra Bactérias Isoladas de Lesões de Pés Diabéticos. / Joelma da Costa Borges. – Palmas, TO, 2016.

100 f.

Dissertação (Mestrado Acadêmico) - Universidade Federal do Tocantins – Câmpus Universitário de Palmas - Curso de Pós-Graduação (Mestrado) em Ciências da Saúde, 2016.

Orientadora : Maria Cristina da Silva Pranchevicius

1. *Brosimum gaudichaudii* Trécul. 2. Extratos de plantas. 3. Bactérias Multirresistentes. 4. Concentração Inibitória Mínima. I. Título

CDD 610

TODOS OS DIREITOS RESERVADOS – A reprodução total ou parcial, de qualquer forma ou por qualquer meio deste documento é autorizado desde que citada a fonte. A violação dos direitos do autor (Lei nº 9.610/98) é crime estabelecido pelo artigo 184 do Código Penal.

Elaborado pelo sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFT com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

FOLHA DE APROVAÇÃO

JOELMA DA COSTA BORGES

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE EXTRATO DE *BROSIMUM GAUDICHAUDII TRÉCUL* CONTRA BACTÉRIAS ISOLADAS DE LESÕES DE PÉS DIABÉTICOS

Dissertação apresentada ao Mestrado Profissional em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Tocantins para a obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Aprovada em: 13/07/2016

BANCA EXAMINADORA

Sandra Maria Botelho Meriano

Profa. Dra. Sandra Maria Botelho - Presidente da Banca Examinadora
Instituição: Universidade Federal do Tocantins

Guilherme Nobre Leal

Prof. Dr. Guilherme Nobre Leal - Examinador
Instituição: Universidade Federal do Tocantins

Solange Cristina Carreiro

Profa. Dra. Solange Cristina Carreiro - Examinadora Externa
Instituição: Universidade Federal do Tocantins

DEDICATÓRIA

À Deus, pois tudo em minha vida é cuidadosamente permitido e conduzido por Ele. Ele me fortalece nesse momento e em todas as jornadas que graças a Ele pude percorrer.

Ao meu esposo Diego Cavalcanti, pelos quatro anos de companheirismo, mansidão, entre outros. Eu amo você!

Ao meu filho Davi Borges. Você é a razão do meu viver, e muito mais do que eu pedi a Deus.

Aos meus pais Samuel Borges e Eroudes Borges, que me deram além da vida, o amor, carinho, a oportunidade dos estudos, e sempre em oração por mim.

Aos meus irmãos, Leandro e Soraia, aos sobrinhos, Thaelly Monice e Samuelzinho, amo vocês!

À você Michele C. Perim, que foi, mais que uma amiga e colega, foi o braço direito, o braço amigo em todo o tempo, você me inspira. Obrigada é pouco para me expressar nesta dedicatória.

Dedico também aos irmãos e amigos que intercederam por minha vida, pelo início e também conclusão deste mestrado.

AGRADECIMENTOS

À minha querida orientadora Profa. Dra. Maria Cristina da Silva Pranchevicius, por me oferecer o voto de confiança e acolhimento, pela sabedoria, força, profissionalismo, competência, amizade, por acreditar em mim e pronta dedicada à orientação deste trabalho, pela disposição e paciência que teve comigo, mostrando-se solícita e participando ativamente na construção do trabalho esses anos. Muito obrigado do fundo do meu coração, você é muito importante para mim e sempre será!

Um agradecimento muito especial á você, amiga Michele C. Perim, pela habilidade com a qual me auxiliou no processo de construção desta pesquisa, pelo apoio e dedicação em todas as etapas desse trabalho, por me incentivar em vários momentos, pela contribuição com seu conhecimento, que foi sem sombra de dúvidas, essencial para a conclusão deste trabalho. Obrigado pela disponibilidade, sempre imediata, e por todas as orientações.

À você Thiago A. S. Araújo, sua equipe, e Carol Óliver pela contribuição com os extratos, essencial para realização dos meus experimentos.

À banca de qualificação composta pela Professora Dr^a Solange Cristina Carreiro, Professora Dr^a Ana Kleiber Pessoa Borges e Prof Dr Guilherme Nobre Leal pelas contribuições que enriqueceram este trabalho.

Dr^a Solange, Você também foi referência para mim!

À você Dr^a Sandra Maria Botelho, que, com ensinamentos, experiência me direcionou no caminho certo e meu deu a carta de aceite na seleção, além do espaço no laboratório de cultura de células. Você merece meu eterno agradecimento!

À você Roumayne L. Ferreira, que, com amizade e inteira prontidão, me ajudou de forma ativa neste projeto, cedendo as Cepas Padrão.

À você Ediana Vasconcelos da Silva pelas valiosas contribuições dispensadas quando sempre lhe procurei.

Gostaria também de agradecer a você Ilsamar Mendes Soares pela forma que se colocou pronto a me ajudar quando precisei.

Gostaria também de agradecer a você Nicole Peçonha, pela forma que se colocou pronto a me ajudar na estatísticamanhã, tarde, noite e até nos finais de semana e feriados.

À você amiga Cristiane Martins Coelho, pela doação de alguns reagentes que precisei, você sem sombra de dúvida, foi importante para este trabalho, pois sempre encontrou palavras de coragem para que eu de forma mais leve pudesse passar por essa etapa.

Ao melhor chefe que pude ter Thiago de Cesaro, que contribuiu de forma excepcional para que esse momento se tornasse real. A sua declaração me autorizando fazer esse mestrado, teve o peso certo para a realização deste sonho.

Ao colega e amigo Fabiano Irgang, que sempre esteve ao meu lado, mesmo antes da minha gestação, dando apoio técnico excepcional, carregando pesos, montando aulas para práticas laboratoriais. Valeu a ajuda amigo!

A colega Simone Barros que me cedeu gentilmente o livro de estatística para que eu pudesse nortear meus dados.

Aos demais colegas que aqui não deu para mencionar, que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho, minha gratidão. Agradeço muito a vocês não só pela ajuda profissional, mas pela ajuda pessoal, pois foram meus amigos o tempo todo. Vocês também foram referenciais para mim!

Ao Dr. Leonardo Baldaçara, Dr. Gerley Diaz de Castro, que com competência, foram meus professores, meus coordenadores neste mestrado, e desempenharam brilhante função. Dr. Leonardo Baldaçara, você foi mais que isso, foi um colega de pesquisa. Muito obrigada!

À Secretária da Pós-graduação em Ciência da Saúde Natália, pela disponibilidade, simpatia, gentileza e competência.

Finalmente, gostaria de agradecer à Universidade Federal do Tocantins, por abrir as portas para que eu pudesse realizar este sonho que é o meu título de Mestrado. Proporcionaram-me mais que a busca de conhecimento técnico e científico, mas uma LIÇÃO DE VIDA.

EPÍGRAFE

*“Como é feliz o homem que acha a sabedoria,
o homem que obtém conhecimento, pois a
sabedoria é mais proveitosa do que a prata e
rende mais do que o ouro.”*

Provérbios: 3- 13 e 14

RESUMO

Brosimum gaudichaudii Trécul. é uma planta da família Moreaceae, encontrada na região do cerrado do Brasil e tradicionalmente usada para o tratamento de pacientes com vitiligo. OBJETIVO: As atividades antimicrobianas do extrato etanólico das cascas do tronco e das folhas de *Brosimum gaudichaudii* Trécul. foram avaliadas contra 68 cepas multirresistentes de bactérias isoladas de lesões nos pés de pacientes diabéticos, e também 6 cepas ATCC, *Escherichia coli* (25922), *Pseudomonas aeruginosa* (27853), *Proteus mirabilis* (12453), *Citrobacter yougae* (29935), *Staphylococcus aureus* (25923), *Streptococcus pyogenes* (0015). MÉTODOS: A susceptibilidade das cepas bacterianas frente aos diferentes extratos foi avaliado através do método de difusão em disco e a microdiluição em caldo, utilizando a determinação da Concentração Inibitória Mínima e a Concentração Bactericida Mínima. A eficácia dos extratos e da metodologia utilizada foram analisadas por métodos estatísticos. RESULTADOS E DISCUSSÃO: A maior atividade antibacteriana contra a maioria das espécies bacterianas foi encontrada nos extratos das cascas de *Brosimum gaudichaudii* Trécul. No entanto, os extratos de folhas também apresentaram uma alta atividade antibacteriana contra *S. aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*, bactérias que se tornaram resistentes aos antibióticos mais comumente utilizados para tratar as infecções no pé de pacientes diabéticos. A metodologia de microdiluição em caldo foi mais eficaz para determinar a atividade antimicrobiana do que a difusão em disco, tanto para os extratos das cascas do caule como para as folhas de *Brosimum gaudichaudii* Trécul., o que sugere a necessidade de vários métodos para determinar a atividade antimicrobiana de extratos vegetais. Houve uma interação estatisticamente significativa entre antibióticos e extratos de cascas contra bactérias gram-positivas e também entre as combinações das cascas do caule e extratos de folhas contra bactérias gram positivas e gram negativas. Esses resultados sugerem a presença de compostos bioativos que podem sinergicamente contribuir para a atividade antibacteriana. CONCLUSÕES: Baseado nos resultados encontrados, os extratos das cascas do caule e das folhas de *Brosimum gaudichaudii* Trécul. podem ser um bom candidato na busca de um agente antimicrobiano natural contra cepas de bactérias multirresistentes.

Palavras - Chave: *Brosimum gaudichaudii* Trécul., bactérias multirresistentes, atividades antimicrobianas

ABSTRACT

INTRODUCTION: *Brosimum gaudichaudii* Trécul. is a plant of the *Moraceae* family, found in the Cerradoregion of Brazil and traditionally used for the treatment of patients with vitiligo. **OBJECTIVE:** In our study, antimicrobial activities of the ethanol stem bark and leaf extracts of *Brosimum gaudichaudii* Trécul. were evaluated against 68 multiresistant bacterial strains, which were isolated from diabetic foot patients, and 6 ATCC strain of *Escherichia coli* (25922), *Pseudomonas aeruginosa* (27853), *Proteus mirabilis* (12453), *Citrobacter yougae* (29935), *Staphylococcus aureus* (25923), *Streptococcus pyogenes* (0015). **METHODS:** The susceptibilities of the microbial strains to different plants extracts were tested using Disc Diffusion Method, Determination of Minimum Inhibitory Concentration using broth microdilution and Minimum Bactericidal Concentration. The efficacy of these extracts and of methodology used were analyzed by statistical methods. **RESULTS AND DISCUSSION:** The highest antibacterial activity against most bacterial species was shown by bark extracts of *Brosimum gaudichaudii* Trécul. However, the leaf extracts also showed high antibacterial activity against *S. aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*, bacteria that became resistant to the antibiotics most commonly used to treat Diabetic Foot Infections. Compared with disk diffusion, broth microdilution was more appropriate for quantitatively determining the antimicrobial activity of stem bark and leaf extracts of *Brosimum gaudichaudii* Trécul. However, our study suggested that the need to apply multiple methods when conducting *in vitro* antimicrobial susceptibility testing of plants extracts. There was a statistically significant interaction between antibiotics and bark extracts against gram positive bacteria and between the combinations of stem bark and leaf extracts against gram positive and gram negative bacteria. These results suggest the presence of bioactive compounds that may synergistically contribute to activity anti bacterial. **CONCLUSIONS:** On the basis of the present finding, *Brosimum gaudichaudii* Trécul. stem bark and leaf extract might be a good candidate in the search for a natural antimicrobial agent against the multiresistant bacterial strains.

Key words: *Brosimum gaudichaudii* Trécul., multiresistant bacterial strains, antimicrobial activities

LISTA DE QUADROS

Quadro 01: Código de identificação das bactérias testadas neste estudo	28
Quadro 02: Equivalência entre as diluições e as concentrações dos extratos testados	29
Quadro 03: Correlação dos métodos de Difusão em Ágar por Disco (DAD) e Microdiluição em Caldo (MC), através da concentração de extrato de cascas e de folhas de <i>Brosimum gaudichaudii</i> Trécul.	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 01: Número e porcentagem de inibição de crescimento das espécies de bactérias gram negativas e gram positivas, frente aos extratos de folhas, através do método de Difusão em Ágar por Disco (DAD) e Microdiluição em Caldo (MC)	36
Tabela 02: Número e porcentagem de inibição de crescimento das espécies de bactérias gram negativas e gram positivas, frente aos extratos de cascas, através do método de Difusão em Ágar por Disco (DAD) e Microdiluição em Caldo (MC)	37
Tabela 03: Número e porcentagem de inibição de crescimento das espécies de bactérias gram negativas e gram positivas, frente aos extratos de cascas e folhas, através do método de Difusão em Ágar por Disco (DAD) e Microdiluição em Caldo (MC)	38
Tabela 04: Eficácia dos extratos das cascas e folhas relacionados à resposta dos antibióticos e entre os extratos das cascas e folhas, para bactérias gram positivas e gram negativas	41

LISTA DE FIGURAS / GRÁFICOS

Figura 01: <i>Brosimum Gaudichaudii Trécul.</i>	24
Figura 02: Modelo para a leitura do halo de inibição	30
Figura 03: Representação esquemática do teste de Concentração Inibitória Mínima	31
Figura 04: Ilustração dos testes de Concentração Inibitória Mínima	31
Figura 05: Reação de oxirredução de Resazurina	32
Figura 06: Representação do teste com o revelador Resazurina	32
Figura 07: Representação do teste de Concentração Bactericida Mínima	33
Gráfico 01: Análise da viabilidade das bactérias para os extratos de cascas e folhas, através da concentração bactericida mínima	40

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMC – Amoxicilina / ácido clavulânico
ATCC – American Type Culture Collection
B. gaudichaudii – *Brosimum gaudichaudii*
B. subtilis – *Bacillus subtilis*
CBM – Concentração Bactericida Mínima
CEGEN – Conselho de Gestão do Patrimônio Genético
CIM (MIC) – Concentração Inibitória Mínima
CFO – Cefoxitina
CLSI (NCCLS) – Clinical and Laboratory Standarts Institute
CMH – Caldo Mueller Hinton
CEPH / UFT – Comitê de ética em pesquisa com humanos da Universidade Federal do Tocantins
CNPQ – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
DAD – Difusão em Ágar por Disco
DMSO – Dimetilsulfóxido
E. coli – *Escherichia coli*
HGP – Hospital Geral Público de Palmas Doutor Francisco Ayres
LABC / HSP – Laboratório Central do Hospital de São Paulo
LACEN – TO – Laboratório Central do Estado do Tocantins
LAPRONAT / UFPE – Laboratório de Produtos Naturais da universidade Federal de Pernambuco
LEA / UFRPE – Laboratório de Etnobotânica aplicada da Universidade Federal Rural de Pernambuco
MC – Microdiluição em caldo
PCA – Ágar para contagem de microrganismos
S. aureus – *Staphylococcus aureus*
S. epidermidis – *Staphylococcus epidermidis*
THG – Transferência horizontal Gênica

LISTA DE SÍMBOLOS

Abs – Absorbância
cm – centímetro
Fig - Figura
g– Grama
H - Hipótese
I – inibição do crescimento total
mg – Miligrama
mg/mL- Miligrama por mililitro
mL- Mililitro
mm– Milímetro
n - Número
nm – Nanômetro
 p – (rhô) Correlação
R - Resistente
S - Suscetível
UFC/mL = Unidades Formadoras de Colônia por mililitro
 μg –Micrograma
 $\mu\text{g/mL}$ –Micrograma por mililitro
 μL - Microlitro
 $\mu\text{L/ mL}$ – Microlitro por mililitro
* - significância à 5%

SUMÁRIO

FOLHA DE APROVAÇÃO	
DEDICATÓRIA	IV
AGRADECIMENTOS	V
EPÍGRAFE	VII
RESUMO	VIII
ABSTRACT	XIX
LISTA DE QUADROS	X
LISTA DE TABELAS	XI
LISTA DE FIGURAS	XII
LISTA DE ABREVIATURAS	XIII
LISTA DE SÍMBOLOS	XIV
SUMÁRIO	XV
1. INTRODUÇÃO	17
1.1 BACTÉRIAS, A MICROBIOTA DE PACIENTES COM LESÕES NOS PÉS DIABÉTICOS E RESISTÊNCIA ANTIBACTERIANA	17
1.2 AGENTES ANTIMICROBIANOS	18
1.2.1 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	20
1.2.1.2 DIFUSÃO EM ÁGAR POR PAPEL FILTRO	20
1.2.1.2 MICRODILUIÇÃO EM CALDO	20
1.2.1.3 CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA	21
1.2.1.4 CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA	21
1.3 A BIOTECNOLOGIA NA OBTENÇÃO DE NOVOS PRINCÍPIOS ATIVOS ANTIMICROBIANOS	21
1.4 FITOTERAPIA	22
1.5 <i>BROSIMUM GAUDICHAUDII</i> TRÉCUL	23
2. OBJETIVOS	26
2.1 OBJETIVO GERAL	26
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26
3. METODOLOGIA	27
3.1 CARACTERIZAÇÃO DA PESQUISA	27
3.2 QUESTÕES ÉTICAS	27
3.3 AUTORIZAÇÕES	27
3.4 PREPARO DOS EXTRATOS	27
3.5 AMOSTRA E PREPARO DAS CEPAS BACTERIANAS	28
3.6 ANÁLISE DOS EXTRATOS OBTIDOS	28
3.6.1 ENSAIO DE DIFUSÃO EM ÁGAR POR DISCO – DAD	29
3.6.2 DILUIÇÃO EM MICROPLACAS PARA DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA	30
3.6.3 VERIFICAÇÃO DA VIABILIDADE DOS MICRORGANISMOS E DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA – CBM	31
3.7 EFEITO DOS EXTRATOS FRENTE AO ANTIBIÓTICO TESTADO	33
3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA	33
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
4.1 AVALIAÇÃO DOS MÉTODOS TESTADOS – DAD E MC	35
4.2 AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES DOS EXTRATOS FRENTE AS BACTÉRIAS MULTIRRESISTENTES TESTADAS	37

	4.3 CORRELAÇÃO ENTRE AS METODOLOGIAS, DAD E MC, TESTADAS A PARTIR DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA	38
	4.4 VERIFICAÇÃO DA VIABILIDADE E CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA	40
	4.5 EFICÁCIA DOS EXTRATOS RELACIONADOS À RESPOSTA DOS ANTIBIÓTICOS TESTADOS	41
5	CONCLUSÕES	43
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	44
7	REFERÊNCIAS	45
8	APÊNDICES	57
	8.1 PARECER CONSUBSTANCIADO DO COMITÊ DE ÉTICA UFT	57
	8.2 AUTORIZAÇÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO DA PLANTA	59
9	ANEXO	61
	9.1 ARTIGO SUBMETIDO	61

1. INTRODUÇÃO

1.1 BACTÉRIAS, MICROBIOTA DE PACIENTES DIABÉTICOS COM LESÕES NOS PÉS DIABÉTICOS E RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA

As bactérias são células procarióticas desprovidas de núcleo e retículo endoplasmático, que sintetizam seu próprio DNA, RNA e proteína (COTRAN; KUMAR; COLLINS, 2000). São classificadas de acordo com as características estruturais do invólucro bacteriano e identificadas por suas propriedades tintoriais com o corante de Gram (RUBIN; FARBER, 1999).

A manutenção da forma bacteriana (bacilo, coco, etc.) é devido a presença da parede celular bacteriana, podendo ser divididas em dois grandes grupos: Gram positivas e Gram negativas. As diferenças entre esses dois grupos residem principalmente nas suas propriedades de permeabilidade e nos componentes de superfície. As principais diferenças reveladas pela coloração de Gram estão relacionadas a presença de uma membrana externa nas bactérias Gram negativas e de uma espessa camada de peptidoglicanos nas bactérias Gram positivas (SCHAECHTER *et al*, 2002).

Nas bactérias Gram positivas, a estrutura da parede celular é simples, constituída por uma espessa camada de peptidoglicano, que corresponde a 60% de sua composição (TAVARES, 2001). As muitas camadas de peptidoglicanos que são espessas impedem a passagem de compostos hidrofóbicos, devido a presença de açúcares e aminoácidos (SCHAECHTER *et al*, 2002). São importantes causadoras de infecções hospitalares e comunitárias, como várias infecções de pele, respiratórias e sepse. Nos últimos anos, houve surgimento e proliferação rápida de cepas resistentes, inclusive aos antibióticos mais modernos, como *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina - MRSA, enterococos resistentes à vancomicina e pneumococos resistentes a penicilina (WAREHAM *et al*, 2005; APPELBAUM; JACOBS, 2005; BHAVNANI; BALLOU, 2000).

A parede celular das bactérias Gram negativas é mais complexa, com uma fina camada de peptidoglicano, coberta por uma membrana externa constituída por lipopolissacarídeos, fosfolipídeos e proteínas (TAVARES, 2001). O seu interior possui características hidrofóbicas devido aos ácidos graxos e a parte polissacarídica externa constitui um ambiente hidrofílico. A membrana externa constitui uma barreira adicional à entrada de algumas substâncias como antibióticos (SILVA, 1999; TRABULSI *et al*, 1999). São organismos não esporulados, com motilidade variável, oxidase negativos, e que crescem em meios básicos, ricos, e seletivos. Anaeróbios facultativos (crescem em aerobiose e anaerobiose), fermentam a glicose com ou sem produção de gás, são catalase positivos, e reduzem nitrato a nitrito (ANVISA, 2013).

As infecções nos pés são uma das mais importantes causas de hospitalização de pacientes com diabetes. Esses tipos de infecções podem ocasionar uma complicação crônica e potencialmente incapacitante que resultam em morbidade e possível amputação, se não tratada adequadamente (GADEPALLI *et al.*, 2006; RAJA, 2007). Normalmente, as úlceras de pele são colonizadas por bactérias da microbiota normal da pele, que inclui principalmente os cocos Gram positivos, aeróbios e, eventualmente, anaeróbios (SADER, DURAZZO, 2003). Em infecções de pés diabéticos, apesar de alguns estudos demonstrarem que *E.coli*, *Proteus sp*, *Pseudomonas spp*, *S.aureus*, e *Enterococcus spp* são os patógenos mais frequentemente encontrados (OZER *et al.*, 2010; VISWANATHA *et al.*, 2002; RAJA, 2007), os organismos encontrados nesses tipos de infecções diferem não somente de paciente para paciente e hospital para hospital, como também geograficamente (EL-TAHAWY, 2000).

A resistência aos antibióticos é um dos maiores problemas no tratamento de pacientes diabéticos com infecções nos pés. Nessas lesões foram reportados a presença de bactérias multirresistente (MDR), *S. aureus* resistente a metilina (MRSA) e de bactéria gram negativas produtoras de β -lactamase de amplo-espectro (ESBL) (AKHI *et al.*, 2015; RAMAKANT *et al.*, 2011). A causa da multirresistência, na maioria das vezes, é ocasionada ao tratamento inadequado de antibióticos, a cronicidade da lesão, o reduzido efeito dos antibióticos na lesão e a frequente admissão hospitalar desses pacientes, o que ocasiona uma maior exposição aos organismos multirresistentes (HARTEMANN-HEURTIER *et al.*, 2004; OZER *et al.*, 2010)..

A importância dos antibióticos no aumento do fenômeno da resistência reside no seu papel selecionador de cepas resistentes, através da pressão seletiva resultante de seu emprego clínico, industrial, comercial e experimental. O mau uso clínico desses agentes antimicrobianos exerce papel selecionador dessas cepas resistentes e, provavelmente, é a principal causa da resistência (TAVARES, 2000).

A resistência aos antibióticos é um processo genético relacionado à existência de genes no microrganismo que codificam diferentes mecanismos e evitam a ação dos medicamentos. Ela pode ter origem em mutações que ocorrem no microrganismo durante seu processo reprodutivo ou através do intercâmbio de material genético (transferência horizontal gênica – THG) através da conjugação, transdução e transformação (TAVARES, 2000; UETANABARO; GÓES-NETO, 2006). A resistência é necessariamente específica contra um determinado antibiótico naqueles microrganismos produtores desta mesma substância (TAVARES, 2000).

As bactérias também podem desenvolver resistência aos antibióticos por meio de alguns mecanismos bioquímicos abordados na literatura (JACOBY, 2005; HOOPER, 2005; BOMONO; SZABO, 2006; MIN *et al.*, 2007). Os mecanismos incluem: a) modificação química do antibiótico, através de enzimas específicas; b) alteração do sítio de ligação do antibiótico; c) substituição do sítio de ligação do antibiótico; d) diminuição da permeabilidade ao antibiótico; e) aumento da síntese de substrato com o qual o antibiótico compete; f) síntese de proteínas protetoras dos ribossomos.

A capacidade que os microrganismos possuem para a aquisição de mecanismos de resistência aos antibióticos impõe a necessidade permanente de pesquisas e o desenvolvimento de novos medicamentos a serem utilizados no combate e/ou controle dos microrganismos (AYRES *et al.*, 2008).

1.2 AGENTES ANTIMICROBIANOS

Os agentes antibacterianos podem ser classificados seguindo diversos critérios como a estrutura química, mecanismos de ação, espectro e ação entre outros (MIMS *et al.*, 1999; SCHAECHTER *et al.*, 2002), dentre estes estão os inibidores de síntese de parede celular, de síntese de proteínas, de síntese de ácidos nucleicos e da função da membrana plasmática (MIMS *et al.*, 1999; TAVARES, 1999; SCHAECHTER *et al.*, 2002).

Os antibióticos que atuam por esses mecanismos assemelham-se aos detergentes catiônicos, graças a presença, em sua molécula de grupamentos básicos NH_3^+ e de uma cadeia lateral de ácidos graxos. Quando alcançam a membrana citoplasmática, o ácido graxo mergulha na sua parte lipídica e a porção básica permanece na superfície. A intercalação de moléculas do agente antimicrobiano na membrana provocam sua desorganização, com saída dos componentes celulares e morte da bactéria. Por atuarem em estrutura comum a todas as células, todos esses agentes são igualmente tóxicos para o parasito e hospedeiro, sendo

empregados clinicamente em escala limitada (PELCZAR; CHAN; KRIEG, 1993; TRABULSI *et al.*, 1999; DE SOUZA *et al.*, 2003).

O aumento alarmante na incidência de novas doenças infecciosas e a resistência dos microrganismos aos medicamentos atuais ocasionou uma grande necessidade em descobrir novos compostos químicos com atividade antimicrobiana e, possivelmente, com novos mecanismos de ação (ADWAN *et al.*, 2010). Considerando a dificuldade de acesso ao meio hospitalar, às limitações no tratamento convencional e à distribuição escassa dos medicamentos, uma grande parte dos doentes recorre ao tratamento com extratos de plantas (SADER; DURAZZO, 2003). As plantas representam importantes fontes de substâncias biologicamente ativas, servindo para o desenvolvimento e a síntese de um grande número de medicamentos (SANDES; DIBLASI, 2000; HAIDA *et al.*, 2007). Os principais grupos de compostos com propriedades antimicrobianas, extraídos de plantas incluem: terpenóides, alcalóides, lectinas, polipeptídeos, substâncias fenólicas e polifenóis (fenóis simples, ácidos fenólicos, quinonas, flavonas, flavonóis e flavonóides), taninos e cumarinas (RESCHKE; MARQUES; MAYWORM, 2007; HAIDA *et al.*, 2007). Os compostos isolados de plantas são substâncias com estruturas químicas bem diferenciadas dos antibióticos obtidos a partir de bactérias, leveduras e de fungos filamentosos. Tais produtos podem atuar no metabolismo intermediário ativando enzimas, alterando a ação de inibidores que influenciam os nutrientes do meio, interferindo nos processos enzimáticos em nível nuclear ou ribossomal, provocando alterações nas membranas ou interferindo no metabolismo secundário (LIMA, 2001) independentemente de seu mecanismo de ação (JACOBY, 2005; ANDERSON, 2005).

Informações referentes à etnofarmacologia mostraram-se bastante importantes para o processo de descoberta de novos medicamentos. Em um total de 122 compostos naturais mundialmente comercializados, 80% possuem uso etnofarmacológico idêntico ou semelhante ao uso corrente desses medicamentos (FABRICANT; FARNSWORTH, 2001).

A etnofarmacologia é a ciência que estuda o conhecimento popular sobre medicamentos, de determinado grupo étnico ou social, relacionado a sistemas tradicionais de medicina, ou ainda, um ramo da biologia que estuda o uso terapêutico de plantas e animais pelas sociedades humanas, presentes ou passadas (ELISABETSKY, 2003). O método etnofarmacológico investiga as possibilidades e hipóteses referentes aos conhecimentos tradicionais, buscando empiricamente o que provoca os efeitos dos "medicamentos tradicionais". Uma das principais aplicações desta interdisciplina tem sido a descoberta de novos medicamentos. Sobre esta possibilidade, Albuquerque e Hanazakic (2006), destacam a necessidade de aperfeiçoamento nos estudos realizados nessa área quanto a precisão das informações etnográficas; descrição dos métodos usados incluindo referencial teórico; inclusão de informações sobre o diagnóstico de doenças e práticas relativas ao uso médico específico da planta pesquisada e atenção às informações sobre a proteção e os direitos de povos indígenas ou governo local. Dessa forma, o conhecimento das comunidades contribui para os estudos científicos e vice-versa (RABELO; BARROSO, 2011). Essa ação conjunta pode ser um valioso caminho de identificação das plantas úteis à produção de medicamentos (RABELO; BARROSO, 2011).

O problema da resistência microbiana é crescente e a perspectiva de uso de medicamentos antimicrobianos no futuro é incerta. A necessidade de encontrar novas substâncias com propriedades antimicrobianas para serem estudadas no combate a esses microrganismos representam um desafio no tratamento de infecções (CATÃO *et al.*, 2005). Portanto, devem ser tomadas atitudes que possam reduzir este problema como, por exemplo, controlar o uso de antibióticos e, desenvolver pesquisas para melhor compreensão dos mecanismos genéticos de resistência e continuar o estudo de desenvolvimento de novos

medicamentos, tanto sintéticos como naturais (NASCIMENTO *et al.*, 2000; HAIDA *et al.*, 2007).

1.2.1 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

O potencial antimicrobiano das plantas está associado à composição química de tais espécies. Usualmente é determinado por ensaios *in vitro* utilizando técnicas de difusão em ágar e diluição (macro e microdiluição) (ELOFF *et al.*, 1998; AGRIPINO *et al.*, 2004; LANGFIELD *et al.*, 2004).

1.2.1.1 DIFUSÃO EM ÁGAR POR PAPEL FILTRO

A técnica de disco-difusão é uma técnica preconizada pelo *National Committee for Clinical Laboratory Standards*– NCCLS e está normatizada como parâmetro de análise antimicrobiana na Farmacopéia Brasileira. Trata-se de um método laboratorial que pode ser empregado para prever a sensibilidade *in vitro* de bactérias frente aos agentes antimicrobianos (MAIA-ARAÚJO *et al.*, 2011)

Nesta técnica, utilizam-se discos de papel impregnados com quantidades definidas do antimicrobiano. Estes discos são colocados em contato com a superfície úmida do ágar, já semeado com uma suspensão microbiana. A amostra é absorvida pelo papel de filtro e o seu conteúdo se difunde no meio circundante. Após a incubação, na placa semeada com a suspensão bacteriana, ocorre o desenvolvimento das células no ágar e, simultaneamente, a difusão do antimicrobiano (COLE, 1994; KONEMAN *et al.*, 2001).

A partir da difusão ocorre o aparecimento de um halo, no qual não há crescimento do microrganismo, denominado halo de inibição (VANDEN BERGH; VLIETINCK, 1991).

Segundo Barry, 1991, a difusão do antimicrobiano leva à formação de um halo de inibição do crescimento bacteriano, cujo diâmetro é inversamente proporcional à concentração inibitória mínima (CIM) (JORGENSEN; TURNIDGE; WASHINGTON, 1999). A CIM é “a menor concentração que resulta na manutenção ou redução da viabilidade do inóculo” (LAMBERT; PEARSON, 2000).

O problema relatado por Maia – Araújo *et al.* (2011) é que é impossível garantir a quantidade exata que cada disco de papel consegue absorver quando embebido no extrato, possibilitando ainda o extravasamento de amostra em função da saturação da capacidade de absorção do disco, dificultando a obtenção de resultados mais precisos.

1.2.1.2 MICRODILUIÇÃO EM CALDO

Outra técnica amplamente utilizada é a microdiluição em caldo que consiste na determinação da sensibilidade *in vitro* de um microrganismo a um agente antimicrobiano, e para a confirmação do perfil de resistência detectado inicialmente pela técnica de difusão em ágar. Esta técnica é extremamente vantajosa quando se refere a produtos naturais, uma vez que são obtidos em quantidades mínimas. Além disso, é uma técnica de baixo custo, simples, rápida, é 30 vezes mais sensível que outros métodos usados na literatura, de alto rendimento e o mais importante, permitem determinar a concentração inibitória mínima (CIM) dos produtos em estudo (ELOFF *et al.*, 1998; COWAN, 1999; GABRIELSON *et al.*, 2002; LANGFIELD *et al.*, 2004; CUSHNIE; LAMB, 2005; ALVES *et al.*, 2008; OSTROSKY *et*

al., 2008; SALAZAR-ARANDA *et al.*, 2009; PALOMBO, 2011). Mesmo que existam alguns inconvenientes, tais como células de alguns microrganismos que se aderem na parede e no fundo do poço, precipitação de compostos presentes em alguns extratos e a coloração do extrato em concentração alta que poderão interferir na análise, essa técnica é a mais adequada (OSTROSKY *et al.*, 2008).

1.2.1.3 CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA

O ensaio para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM), ou *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC), é obtido através da macro ou microdiluição de compostos que consiste em se preparar diluições sucessivas do antimicrobiano a ser testado, em meios de cultura sólido ou líquido, semear o microrganismo e após a incubação verificar a menor concentração (maior diluição) do antimicrobiano que inibiu o crescimento do microrganismo (CLSI, 2013; WINN JR *et al.*, 2008). Após incubação, o crescimento do microrganismo é determinado pela leitura visual direta ou turbidimétrica pelo uso de espectrofotômetro em comprimento de onda apropriado (SILVEIRA *et al.*, 2009), assim como, pode-se mensurar a viabilidade e proliferação das células através de corantes indicadores de oxirredução como resazurina, Alamar blue, e Cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (DUARTE *et al.*, 2005), a concentração bactericida mínima (CBM).

1.2.1.4 CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA

A Concentração Bactericida Mínima – CBM, é a quantidade mínima de agente antimicrobiano necessária para inviabilizar a célula microbiana, ou seja, provocar danos irreversíveis a bactéria. Estes valores, quando comparados ao CIM, permitem avaliar se o composto é bacteriostático ou bactericida (BARON; FINEGOLD, 1990; LIMA, 2006; SUFFREDINI *et al.*, 2007).

1.3 A BIOTECNOLOGIA NA OBTENÇÃO DE NOVOS PRINCÍPIOS ATIVOS ANTIMICROBIANOS

Muitos tratamentos eficazes de patologias são atribuídos aos metabólitos secundários das plantas, que são constituídos por uma variedade de substâncias bioativas, e que têm despertado interesse científico devido a busca por novos medicamentos oriundos de plantas (BASILE *et al.*, 2000; SATO *et al.*, 2002; PAIVA *et al.*, 2003).

O uso de plantas medicinais no mundo, principalmente na América do Sul, contribui significativamente com os cuidados com a saúde. Muitas plantas são utilizadas no Brasil na forma de extrato bruto, infusões ou emplastos no tratamento de infecções comuns, sem quaisquer evidências científicas (HOLETZ *et al.*, 2002; COELHO DE SOUZA *et al.*, 2004), por isso a necessidade de validar cientificamente o uso das mesmas.

Os avanços constatados nos últimos anos nas áreas da química medicinal e da biologia molecular, possibilitaram o surgimento de novos alvos biológicos (SARTORI, 2005). A química combinatória permite sintetizar milhares de compostos em curto espaço de tempo, e técnicas de triagem em alta escala permitem que sejam testados milhares de compostos simultaneamente (ZACCHINO *et al.*, 2001) e os programas computacionais auxiliam na modelação de moléculas ativas e a biotecnologia vem desenvolvendo novos

medicamentos recombinantes mais potentes e com ação seletiva em alvos moleculares bem definidos (BARREIRO, 2001).

A produção industrial de compostos secundários das plantas é uma área de intensa atividade e permanecerá assim por diversos anos, devido à crescente demanda por novos produtos naturais (PLETSCHI, 2004). A engenharia genética abriu novos caminhos para obtenção de variedades diferentes de plantas com características bioquímicas superiores, aplicáveis aquelas que produzem metabólitos secundários, incentivando assim, a produção e comercialização de compostos secundários valiosos que ainda nem foram abordados, ou tiveram sua farmacocinética avaliada.

1.4 FITOTERAPIA

Fitoterápicos são medicamentos obtidos a partir de plantas medicinais. Eles são obtidos empregando-se exclusivamente derivados de droga vegetal (extrato, tintura, óleo, cera, exsudato, suco, e outros). Não é objeto de registro como medicamento fitoterápico, planta medicinal ou suas partes, após processos de coleta, estabilização e secagem, podendo ser íntegra, rasurada, triturada ou pulverizada. Os fitoterápicos, assim como todos os medicamentos, devem oferecer garantia de qualidade, ter efeitos terapêuticos comprovados, composição padronizada e segurança de uso para a população (ANVISA, 2014). A eficácia e a segurança devem ser validadas através de levantamentos etnofarmacológicos, documentações tecnocientíficas em bibliografia e/ou publicações indexadas e/ou estudos farmacológicos e toxicológicos pré-clínicos e clínicos. A qualidade deve ser alcançada mediante o controle das matérias-primas, do produto acabado, materiais de embalagem, formulação farmacêutica e estudos de estabilidade (ANVISA, 2014).

O uso da fitoterapia na atenção primária de saúde tem sido estimulado, principalmente em países em desenvolvimento, com o aval da Organização Mundial de Saúde, como uma estratégia política para minimizar desigualdades sociais e tornar a saúde um bem universal (AKERELE, 1988). O Sistema Único de Saúde (SUS), valorizando a importância dos fitoterápicos, ampliou no ano de 2009 a distribuição de fitoterápicos, e com isso o número de fitoterápicos financiados pelo SUS passou de dois para oito. Segundo o Ministério da Saúde (MS) *“a fitoterapia consiste em uma modalidade das práticas integrativas e complementares mais frequentemente encontrada no SUS”*, sendo identificada em 9% dos municípios pelo MS no ano de 2008 (MONTEIRO, 2012).

O uso das plantas medicinais teve início provavelmente na pré-história, quando homens iniciaram as práticas de saúde, utilizando plantas pelo instinto de sobrevivência, observando determinados efeitos para minimizar suas enfermidades, acumulando, assim, conhecimentos empíricos que foram passados de geração para geração (FERRO, 2008). No processo histórico das plantas medicinais, muitas civilizações descreveram o uso de vegetais como medicamentos em seus registros e manuscritos. Dados literários mostram que espécies vegetais utilizadas na prevenção ou cura de doenças são encontradas desde 50.000 anos atrás. O homem primitivo intuitivamente procurava suprir suas necessidades básicas como reprodução, nutrição e proteção, descobrindo nas plantas a forma de prevenir ou tratar doenças (DEVIENNE *et al.*, 2004).

As plantas medicinais, muitas vezes, foram usadas em rituais por seus efeitos alucinógenos. Seguiu pela China, e Índia, país tradicionalmente conhecido por uso de plantas medicinais, passando por Hipócrates, Galeno, alquimistas da idade média, e com a descoberta do Novo Mundo muitas plantas foram levadas para a Europa, mas pouco foi escrito sobre elas, ficando esta excepcional flora aguardando investigação. Em 1864, surgem

no continente europeu, muitos defensores da medicina natural e no norte da Inglaterra foi fundado o *National Institute of Medical Herbalists*, sendo a primeira entidade profissional de fitoterapia no mundo (CAVALLAZZI, 2006).

A padronização do uso de plantas medicinais teve início na década de 70, na Alemanha utilizando-se um marcador químico ou pelo próprio princípio ativo da planta, para garantir que o paciente que tomasse um medicamento fitoterápico, tivesse a certeza de que naquele comprimido ou cápsula estaria contida a quantidade reprodutível e necessária para fazer o efeito terapêutico. Através da padronização foi possível reproduzir medicamentos homogêneos em qualquer lugar do planeta, por exemplo, um extrato de *Ginkgo biloba* está padronizado mundialmente contendo 24% de flavonóides e 6% de lactonas (LAZARINI, 2004).

Segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), oitenta por cento da população mundial depende da medicina tradicional para atender às suas necessidades de cuidados primários de saúde e grande parte desta medicina tradicional envolve o uso de plantas medicinais, seus extratos vegetais ou seus princípios ativos (IUCN- União da Conservação do Mundo, 1993).

Estudos de Alonso (1998), demonstraram que a utilização de fitoterápicos, nos países desenvolvidos e nos países em desenvolvimento tem razões diferentes. Nos países considerados desenvolvidos a utilização dos fitoterápicos é ocasionada por uma resposta da população aos efeitos agressivos e iatrogênicos dos medicamentos de síntese, inclusive no combate a doenças infecciosas (KUETEA *et al.*, 2008), e nos países pobres, o uso das plantas medicinais é um recurso tradicional enraizado culturalmente na população. Neste contexto, têm-se registros de que o uso de plantas no combate a doenças microbianas é praticado desde a antiguidade e vem crescendo cada vez mais (RÍOS; RECIO, 2005).

Na América do Sul a utilização das plantas medicinais como opção de tratamento e sua comercialização depende das riquezas filogenéticas de cada país, bem de sua diversidade cultural e suas diferentes tradições culturais (ALONSO, 1998).

O país que contém a maior biodiversidade do mundo é o Brasil, contando com mais de 55.000 espécies catalogadas (SIMÕES, 2001). As regiões brasileiras com flora rica em plantas medicinais são: Floresta Amazônica, a Mata Atlântica, Pantanal Mato-Grossense, Cerrado e Caatinga (ALMEIDA, 2000).

O cerrado é bastante rico em espécies utilizadas na medicina popular, em função de características morfológicas, como xilopódios e cascas, que acumulam reservas e, com frequência, possuem substâncias farmacologicamente ativas (VILAS BOAS, 2003). Além disso, este bioma apresenta grande diversidade como ordem, famílias e gêneros e quanto maior for a diversidade taxonômica em níveis superiores, maior é o distanciamento filogenético entre as espécies e maior é a diferença e diversidade química entre elas, demonstrando assim, sua importância para pesquisas com plantas medicinais (FARNSWORTH, 1988).

1.5 **BROSIMUM GAUDICHAUDII TRÉCUL.**

A espécie *Brosimum gaudichaudii* Trécul. popularmente conhecida como inharé ou mama-cadela, é pertencente ao reino *Plantae*, filo *Magnoliophyta*, classe *Magnoliopsida*, ordem *Rosales*, família *Moraceae*, segundo Cronquist (1988). É uma família botânica constituída de 75 gêneros e 1.550 espécies. Grande parte desses gêneros é encontrada nas regiões tropicais. É conhecida por outros nomes populares, tais como: algodãozinho, amoreira do mato, fruta de cera, inharé e bureré, sua consistência é semelhante a uma goma, por isso apelidada de ‘goma de mascar do campo’ por populares (FERREIRA, 1973).

No Brasil existem 28 gêneros e 340 espécies, os mais comuns dessa família são: inharé, jaqueira, fruta-pão, figueira, gameleira, mata-pau, amoreira, mama-cadela (OLIVEIRA, 1997), também desta família, a amora (*Morus* sp), são exemplos de espécies introduzidas no Brasil que são bem conhecidas da população (LORENZI; MATOS, 2008). Os principais gêneros da família *Moraceae* são: *Antiáris* sp, *Antiaropsis* sp, *Artocarpus*, *Bagassa* sp, *Batocarpus* sp, *Bosqueiopsis* sp, *Brosimum* sp, *Broussonetia* sp, *Castilla* sp, *Clarisia* sp, *Craterogyne* sp, *Dorstenia* sp, *Fatoua* sp, *Ficus* sp, *Helianthostylis* sp, *Helicostylis* sp, *Hullettia* sp, *Maclura* sp, *Maquira* sp, *Mesogyne* sp, *Metatrophis* sp, *Milícia* sp, *Morus* sp, *Naucleopsis* sp, *Olmedia* sp (*Trophis* sp), *Olmediopsis* sp, *Parartocarpus* sp, *Perebia* sp, *Poulsenia* sp, *Pourouma* sp, *Prainea* sp, *Pseudolmedia* sp, *Scyphosyce* sp, *Sorocea* sp, *Sparattosyce* sp, *Streblus* sp, *Treculia* sp, *Trilepisium* sp, *Trophis* sp, *Trymatococcus* sp, *Utsetela* sp (WATSON; DALLWITZ, 1992).

A *Brosimum gaudichaudii* Trécul, (TRÉCUL, 1847) (Figura 1) pode ser encontrada na forma de arbusto ou arvoreta, atingindo até 4m de altura; possui ramos tortuosos e lactescentes; folhas simples, alternas, de consistência bem firme, com pecíolo - "cabinho" da folha - curto, face inferior aveludada, nervuras principais amareladas na face superior; a planta é monoica, ou seja, possui flores unissexuadas no mesmo indivíduo; as flores têm coloração verde - amareladas, são minúsculas, agrupadas na extremidade de pedúnculos pendentes das axilas das folhas, de maneira especialmente característica da espécie; os frutos são drupas, compostas pelo desenvolvimento e fusão dos ovários das diversas minúsculas flores reunidas, coloração alaranjada, alcançando 3 cm de diâmetro, comestível ao natural ou na forma de sorvetes e doces. Floresce entre os meses de junho e outubro e apresenta frutos maduros nos meses de setembro e novembro (SILVA *et al.*, 1994). A casca, entrecasca e as raízes são as partes mais utilizadas na medicina popular (ALMEIDA, 1998).



Figura 1: *Brosimum gaudichaudii* Trécul., *Moraceae*.
Fonte: Rocha, 2012.

As plantas de *Brosimum gaudichaudii* Trécul. caracterizam-se pela produção abundante de látex, sendo suas raízes, casca do caule e folhas amplamente empregadas na medicina popular em várias regiões do país (LORENZI; MATOS, 2008). É uma planta que ocorre em diversas partes do território brasileiro, mesmo sendo mais comum no bioma Cerrado, existe também nos seguintes estados: Amazonas, Pará, Maranhão, Ceará, Bahia, Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais São Paulo, Paraná e no Distrito Federal.

Estudos preliminares mostraram que os principais componentes de *B. gaudichaudii* são duas furanocumarinas, psoraleno e bergapteno (PATHAK *et al*, 1989; CAFFIERI *et al*, 1989; MCKEON, 1981). Castro *et al* (2011), verificou que casca e raiz de *B. gaudichaudii* possuem alto teor de furanocumarinas, em especial o psoraleno e o bergapteno. O extrato hidroalcoólico com 80% de etanol é ideal para a extração desses compostos (CASTRO *et al.*, 2011). Embora outras cumarinas como (+)2' S, 3' R-3-hidroximarmesina, xantiletina, luvangetina também foram isoladas dessa espécie (VIEIRA *et al*, 1999).

O extrato produzido por decocção ou infusão das raízes, folhas e/ou cascas da planta é utilizado topicamente para o tratamento do vitiligo e de outros problemas de pele (AGRA *et al.*, 2008). Adicionalmente, há relatos de que o decocto ou infuso dos ramos com folhas possui ação depurativa e contribui para a melhoria da circulação sanguínea (RODRIGUES e CARVALHO, 2001). O infuso de toda a planta também pode ser utilizado no tratamento de gripes, resfriados e bronquites (RODRIGUES; CARVALHO, 2001). No entanto, estudos referentes a atividade antimicrobiana desta planta são escassos.

Um estudo descritivo de *B. gaudichaudii*, conduzido por Jacomassi (2006), descreve a morfologia e histoquímica dos órgãos dessa planta. As informações relativas à região internervural das folhas indicam a presença em alta quantidade de compostos fenólicos e, em menor intensidade, de polissacarídeos, lipídeos, proteínas e amido (JACOMASSI *et al.*, 2007). Outro estudo corrobora esses dados e relata a presença abundante de flavonoides glicosilados no extrato das folhas de *B. gaudichaudii* (LOURENÇO, 2001).

Dentre os medicamentos comerciais utilizados no Brasil, um deles está no mercado há cerca de 20 anos, sendo indicado para o tratamento do vitiligo, e contém em sua composição, segundo o fabricante, a “seiva bruta concentrada (400mg/comprimido) do vegetal *Brosimum gaudichaudii*”. De acordo com as informações técnicas do fabricante “o bergapteno - substância cristalina isolada da casca da raiz da *Moraceae B. gaudichaudii* - consiste de uma furanocumarina que possui ação fotossensibilizante aumentando a pigmentação da pele, justificando assim seu emprego no tratamento específico do vitiligo e nas discromias”, e não apresenta reações adversas (OKOBA, 2016).

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade antimicrobiana dos extratos brutos da planta *Brosimum gaudichaudii* Trécul., pertencente ao Bioma Cerrado do Estado do Tocantins, em bactérias isoladas dos pés diabéticos de pacientes atendidos no Hospital Geral Público de Palmas Dr. Francisco Ayres – Tocantins.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a atividade antimicrobiana dos extratos de cascas e folhas de *Brosimum gaudichaudii* Trécul. em bactérias Gram Negativas e Gram Positivas através da metodologia de Difusão em Ágar por Disco (DAD) e de Microdiluição em Caldo (MC);
- Analisar a eficácia e inibição do crescimento das diferentes cepas Gram Negativas e Gram Positivas, frente aos extratos das cascas e folhas de *Brosimum gaudichaudii* Trécul.;
- Analisar a viabilidade das bactérias Gram Negativas e Gram Positivas, utilizando os extratos das cascas e folhas de *Brosimum gaudichaudii* Trécul. através da Concentração Bactericida Mínima (CBM);
- Correlacionar a metodologia de Difusão em Ágar por Disco (DAD) com Microdiluição em Caldo (MC), através da Concentração Inibitória Mínima (CIM), para verificar o melhor potencial de ação antimicrobiano dos extratos de *Brosimum gaudichaudii* Trécul.;
- Avaliar a eficácia dos extratos das cascas e folhas relacionados à resposta dos antibióticos comercialmente utilizados para bactérias Gram Negativas e Gram Positivas.

3 METODOLOGIA

3.1 CARACTERIZAÇÃO DA PESQUISA

Foi analisada a atividade antimicrobiana dos extratos brutos de cascas e de folhas de *Brosimum gaudichaudii* Trécul. em amostras de bactérias isoladas de pacientes diabéticos com úlceras nos pés, que foram internados no Hospital Geral Público de Palmas Dr. Francisco Ayres (HGP), em Tocantins - Brasil, entre janeiro de 2013 a junho de 2013. A escolha das bactérias foi devido à alta prevalência de multirresistência apresentada por esses patógenos, em estudo prévio publicado por nosso grupo (PERIM *et al.*, 2015). O perfil fitoquímico, antioxidante e as análises citotóxicas da planta utilizada também já foram analisados e publicados por nosso grupo (ARAÚJO *et al.*, 2015). Este estudo adotou a metodologia da Microdiluição em Caldo (MC) e Difusão em Ágar por Disco (DAD) para as análises da susceptibilidade *in vitro* das bactérias frente aos extratos das cascas e folhas de *Brosimum gaudichaudii* Trécul., conforme padrões recomendados pelo *Clinical and Laboratories Standards Institute* (CLSI, 2013), para a análise da atividade antimicrobiana em ambientes clínicos.

3.2 QUESTÕES ÉTICAS

Para a coleta das amostras bacterianas, houve a submissão e apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa Humana da Universidade Federal do Tocantins (UFT) em Palmas (TO), protocolo nº 20/2011 (apêndice8.1). Deste modo, o trabalho desenvolvido respeitou os princípios éticos contidos na Declaração de Helsinki (2013) no que se refere à pesquisa clínica envolvendo seres humanos, assim como ao atendimento às legislações específicas do Brasil.

3.3 AUTORIZAÇÕES

A escolha da planta em estudo foi baseada na Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS e em trabalhos científicos publicados. Para a utilização das plantas houve o pedido a Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq, credenciado pelo Conselho de Gestão do Patrimônio Genético (CGEN/MMA), CEGEN / CNPq para acessar e remeter amostras de componentes do patrimônio genético para fins de pesquisa científica sem potencial de uso econômico. A autorização está sob o nº 010896/2013-9 (apêndice8.2).

3.4 PREPARO DOS EXTRATOS

As coletas do material botânico para a preparação dos extratos foram realizadas no período de 09 a 11 de abril de 2012, e 09 a 11 de agosto de 2015, na cidade de Palmas, Estado de Tocantins (10°10'58.45"S e 48°17'33.75"O).

Para os estudos, foram coletadas cascas e folhas da planta *Brosimum gaudichaudii* Trécul. da família *Moraceae*, cujo nome popular é Inharé. Os extratos puros foram preparados pelo Dr. Thiago A. S. Araújo. As partes vegetais coletadas foram secas em estufa com circulação de ar e temperatura média de 40 ± 2 °C. Em seguida foram pulverizadas em moinho vertical de facas tipo Willye e padronizadas em tamises, obtendo-se granulometria de 1 mm (16 Mesh). Os extratos foram preparados por maceração com etanol 99,5%. por 24 horas, na proporção de 1:20 (p/v). Após a maceração, o material foi filtrado em papel-filtro

e evaporado sob pressão reduzida à temperatura de 40 ± 2 °C até a produção de um extrato seco (ARAÚJO *et al*, 2012).

3.5 AMOSTRAS E PREPARO DAS CEPAS BACTERIANAS

Tratou-se de um estudo prospectivo, no qual foram incluídas amostras de pacientes diabéticos com úlceras nos pés que foram internados no Hospital Geral Público de Palmas Dr. Francisco Ayres (HGP), em Tocantins- Brasil, entre janeiro de 2013 a junho de 2013. As cepas estavam estocadas e fizeram parte de um estudo prévio realizado por Perim *et al*, 2015. As cepas para a validação dos testes foram cedidas pelo Laboratório Central do Tocantins, LACEN – TO.

As cepas bacterianas, estocadas em Caldo Mueller Hinton (CMH) acrescido de 20% de glicerol e mantidas a -20°C, foram repicadas em CMH (2mL), incubados por 24h a 37°C, ativadas utilizando-se tubos contendo caldo tioglicolato e incubadas por 24 horas. Alíquotas de 1 mL de cada cultura ativada foram transferidas para placas de petri contendo ágar Mueller Hinton, e incubadas à 37°C por, aproximadamente, 24 horas. Após o período de incubação, colônias isoladas foram transferidas para tubos contendo 2 mL de solução salina estéril (0,85%). A turvação da suspensão foi medida através de espectrofotômetro marca WPA Biowave II+ Biochrom, calibrado com comprimento de onda de 625 nm, com absorbância ajustada a 0,08 a 0,10, que corresponde a 0,5 da escala de Mc Farland ($\sim 10^8$ UFC/ml) (LIMA, 2006).

As bactérias utilizadas e seus respectivos códigos de identificação estão representadas no quadro 1. As cepas isoladas dos pacientes estão sob numeração 1 a 68. As cepas para a validação dos testes foram cedidas pelo Laboratório Central do Tocantins, LACEN – TO e estão sob numeração de 69 a 74.

Quadro 1: Código de identificação das bactérias testadas neste estudo.

CÓDIGO DAS CÉPAS	ESPÉCIE (N)
1 À 68	<i>Citrobacter</i> sp (01)
	<i>Escherichia coli</i> (02)
	<i>Enterobacter</i> sp (09)
	<i>Proteus</i> sp (07)
	<i>Pseudomonas</i> sp (03)
	<i>Streptococcus</i> alfa hemolítico grupo <i>pneumoniae</i> (02)
	<i>Streptococcus</i> beta hemolítico grupo <i>agalatae</i> (04)
	<i>Staphylococcus epidermidis</i> (04)
	<i>Staphylococcus saprophyticus</i> (14)
	<i>Staphylococcus aureus</i> (22)
69 À 74	<i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC 0015 (01)
	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 (01)
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 (01)
	<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 12453 (01)
	<i>Citrobacter yougae</i> ATCC 29935 (01)
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 (01)

3.6 ANÁLISE DOS EXTRATOS OBTIDOS

A análise da quantidade mínima dos extratos das plantas necessária para inibir o crescimento de um microrganismo específico, foi realizada através da Concentração Inibitória Mínima – CIM (ANTUNES *et al*, 2006). Como controle, os extratos vegetais das cascas (1,020g) e das folhas (1,080g) foram dissolvidos em Dimetilsulfóxido (DMSO) em parte por volume (p/v), a fim de obter uma solução com concentração de 20 mg/ml. O quadro 2 demonstra a equivalência entre as diluições e concentrações dos extratos testados.

Quadro 2: Equivalência entre as diluições e concentrações dos extratos testados.

Diluição	Concentração %	Concentração µg/ml
1:1	100	200
1:2	50	100
1:4	25	50
1:8	12,5	25
1:16	6,25	12,5
1:32	3,12	6,25
1:64	1,56	3,12
1:128	0,78	1,56
1:256	0,39	0,78
1:512	0,19	0,39
DMSO	0	0

3.6.1 ENSAIO DE DIFUSÃO EM ÁGAR POR DISCO (DAD)

Os testes de determinação da atividade antimicrobiana dos extratos foram realizados pela técnica de *spread plate*, com três repetições, utilizando 1,0 mL do inóculo bacteriano, distribuindo-o em uma placa de Petri 120 x 15 mm previamente esterilizada, na qual se adicionou 50 mL do ágar Mueller - Hinton fundido e resfriado a 45°C. O material foi homogeneizado girando-se a placa através de movimentos circulares. Após solidificação do meio, foram adicionados em cada placa, 7 discos de papel filtro de 6 mm cada, conservando 20 mm de distância para o desenvolvimento dos halos de inibição entre eles, previamente embebidos com 50 µL do extrato em suas diferentes concentrações. Como controle negativo foi utilizado o solvente Dimetilsulfóxido (DMSO).

As placas foram incubadas 24h, 48h e 72h, à 37°C, e após este período foram medidas, as zonas de inibição de crescimento (halos), em milímetros. A leitura foi realizada utilizando-se paquímetro e cada halo foi submetido a duas medições: duas no sentido vertical (X1 e Y1) e duas no sentido horizontal (X2 e Y2). A medida do halo correspondeu à média desses dois valores, descontada a medida do poço no sentido vertical (X1) e horizontal (X2), ou seja: $M_{\text{halo}} = [(Y1-X1) + (Y2-X2)] / 2$, conforme demonstrado na figura 02.

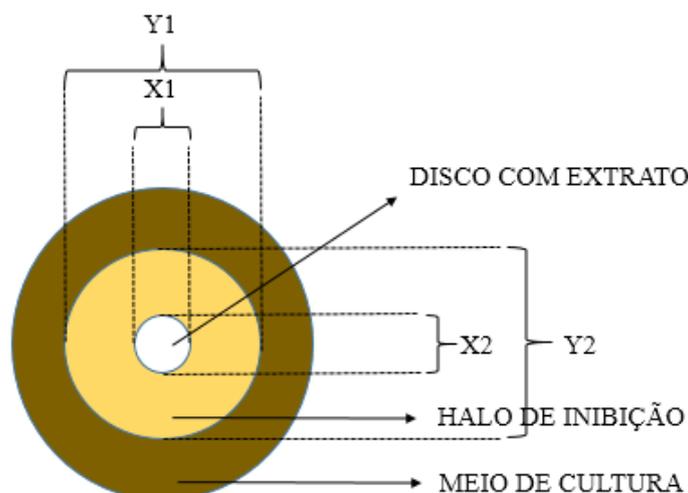


Figura 2: Modelo para leitura do halo de inibição. Fonte: Perim, 2013, p.34.

A presença de halos de inibição seguiu o seguinte critério de avaliação do diâmetro: < 6 mm, inativo; 6 - 8 mm, parcialmente ativo; 9 - 13 mm, ativo; \geq 14 mm, muito ativo (MOTHANA; LINDEQUIST, 2005; KARAMAN, *et al.*, 2001). O resultado final foi determinado pela média aritmética dos valores obtidos dos tamanhos dos halos (mm), conforme fórmula abaixo.

$$M_{\text{halo}} = \frac{(Y_1 - X_1) + (Y_2 - X_2)}{2}$$

A concentração inibitória mínima (CIM) foi considerada como a menor concentração do extrato capaz de inibir o crescimento bacteriano, (presença de halo de inibição de crescimento), após incubação por 24h / 37°C (CONSENTINO *et al.*, 1999).

3.6.2 DILUIÇÃO EM CALDO EM MICROPLACAS (MC)

Para a determinação mais precisa do CIM foi realizada a técnica de diluição em microplacas, 96 poços. Foi seguida a metodologia descrita segundo a norma M7-A6 do Manual Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2006), para as bactérias aeróbicas, e também o suplemento M100-S16 (CLSI, 2006a), para as bactérias fastidiosas, com algumas modificações (WINN JR, *et al.*, 2008). Os poços das microplacas (96) foram preenchidos com 80 μ L de CMH. Em seguida foram acrescentados 100 μ L das soluções dos extratos vegetais e realizada a diluição seriada conforme quadro 02, com auxílio de micropipetador multicanal. Adicionalmente foram distribuídos 20 μ L das suspensões dos microrganismos preparados conforme o item 3.5, em cada poço das microplacas. Como controle padrão foram utilizados os antibióticos amoxicilina/ ácido clavulânico (AMC 20 μ g) para bactérias gram positivas, e cefoxitina (CFO 30 μ g) para as bactérias gram negativas (HÖRNER *et al.*, 2008). A análise da CIM foi considerada como a menor concentração do

extrato vegetal capaz de inibir o crescimento de 90% das cepas (HÖRNER *et al.*, 2008). Também foram realizados o controle de crescimento bacteriano e o controle negativo dimetilsulfóxido DMSO (solvente), de acordo com a ilustração esquemática da figura 3.

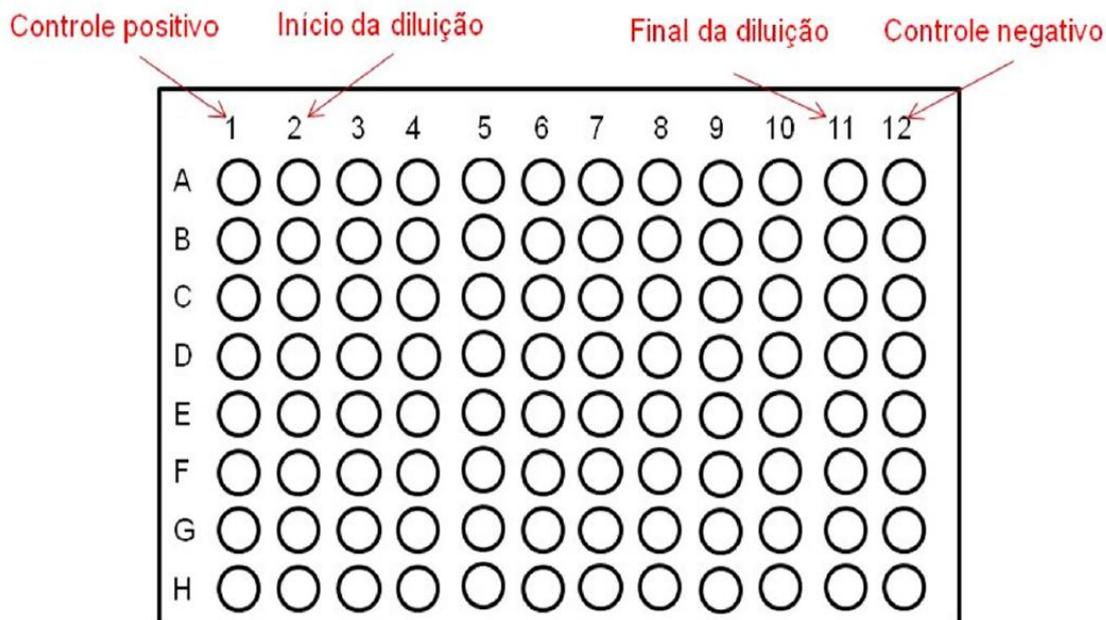


Figura 3: Representação esquemática dos testes CIM.

As microplacas foram incubadas em estufa a 37°C por 24 horas (figura 4). Os resultados foram analisados visualmente e classificados de acordo com a seguinte legenda: I = inibição de crescimento total, + = poucas colônias no fundo do poço, ++ = muitas colônias no poço, +++ = turvação. Todos os testes foram realizados com três repetições cada.

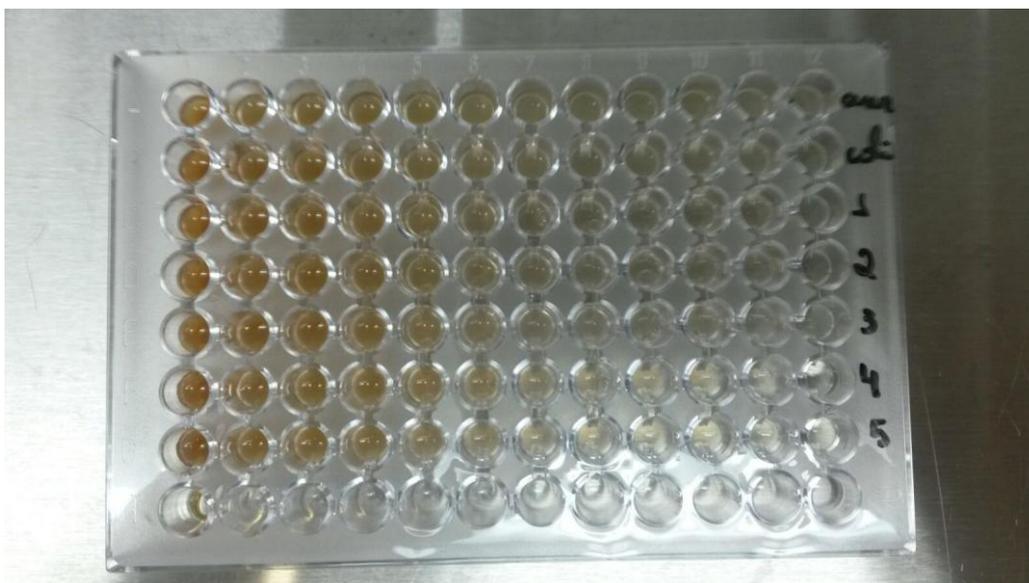


Figura 4: Representação do teste de Concentração Inibitória Mínima.

3.6.3 VERIFICAÇÃO DA VIABILIDADE DOS MICRORGANISMOSE DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA (CBM)

A viabilidade dos microrganismos foi realizada através do uso da resazurina (7-hidroxi-3H-phenoxazin-3-ona10-óxido), o indicador mais utilizado em condições de redução em meios de cultura (FUKUSHIMA *et al.*, 2003). O mecanismo baseia-se na redução da resazurina (cor púrpura) em resarufina (cor rósea), mostrado na figura 5. A resazurina possui uma correlação direta com a quantidade/proliferação de organismos vivos, que incluem células bacterianas (O'BRIEN *et al.*, 2000).

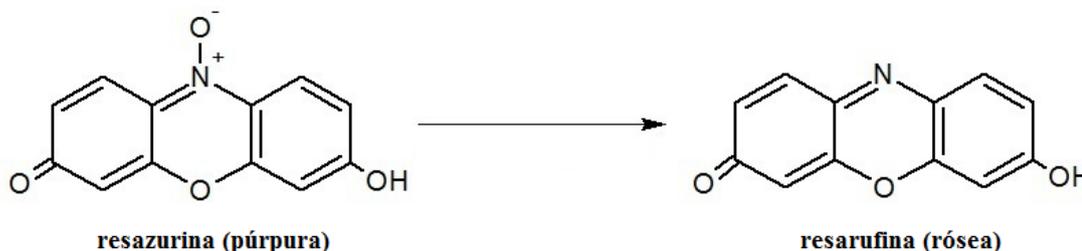


Figura 5: Reação de oxirredução da resazurina

As leituras foram realizadas com o revelador resazurina (100µg/mL), adicionando-se 30µL em cada orifício das microplacas nos testes com bactérias. No decorrer de 2 horas de incubação a 37°C, a presença de cor azul representa ausência de crescimento e de cor rosa, presença de crescimento bacteriano (PALOMINO *et al.*, 2002) (Figura 6).

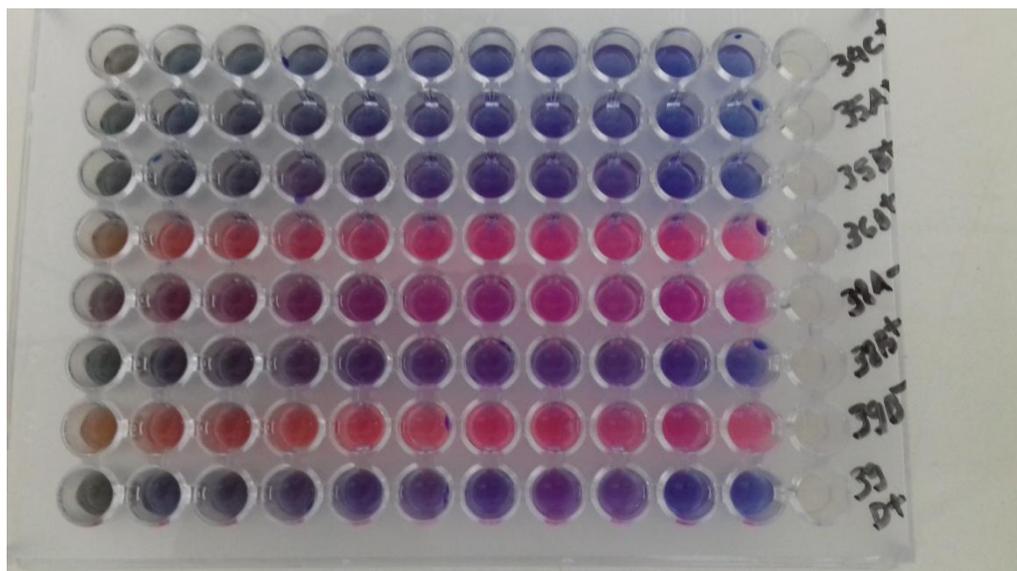


Figura 6: Representação do teste com revelador resazurina.

A determinação da concentração mínima de substância necessária para causar a eliminação de 99,9% do microrganismo (CBM – Concentração Bactericida Mínima) foi determinada pela imersão de hastes de madeira estéreis (swabs) no último poço róseo e no primeiro poço azul, que não apresentou coloração rósea, ou seja, que aparentemente não tiveram crescimento microbiano. Estas amostras foram inoculadas em placas contendo Ágar para contagem de microrganismos em placas (PCA). Incubou-se a 37°C por 24 horas para observação do crescimento microbiano (LIMA, 2006). A CBM foi determinada como a menor dose que visualmente apresentou inibição de crescimento (SUFFREDINI *et al.*, 2007). A figura 7 mostra a representação do teste CBM.

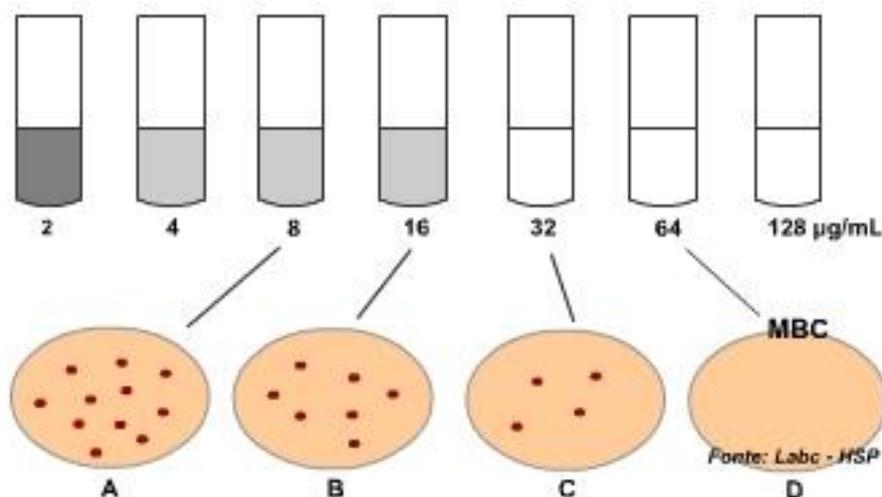


Figura 7: Representação do teste de Concentração Bactericida Mínima. Fonte: Laboratório Central do Hospital de São Paulo - Labc / HSP, 2016.

3.7 EFEITO DOS EXTRATOS FRENTE AOS ANTIBIÓTICOS TESTADOS

Os extratos foram testados semelhante ao proposto por Ostrosky *et al* (2008) e Pinto *et al* (2001), o teste padrão para antibiograma, com sua concentração ajustada para o padrão do antibiótico, Amoxicilina / Ácido clavulânico (ACM20 µg) para gram positivas e Cefoxitina (CFO 30 µg) para gram negativas, e os limites aceitáveis para as concentrações CIM (µg/mL) definidos para as cepas de referências e os diversos antimicrobianos são descritos segundo a norma M7-A6 do Manual Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2006) para as bactérias aeróbicas e também o suplemento M100-S16 (CLSI, 2006a), para as bactérias fastidiosas, com algumas modificações, e confirmados segundo CLSI, 2013. As inibições seguiram as concentrações adequadas dos antibióticos e classificadas da seguinte forma: Suscetível (S) - implica que as cepas sejam inibidas pela concentração usualmente alcançada quando as doses recomendadas do antimicrobiano são utilizadas adequadamente para o sítio da infecção; Resistência (R): implica que as cepas não sejam inibidas pela concentração usualmente alcançada quando as doses recomendadas do antimicrobiano são utilizadas adequadamente para o sítio da infecção. Após quantificado foi analisado através da estatística.

3.8 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados estatísticos foram executados pela determinação do percentual de sensibilidade das bactérias aos agentes antimicrobianos, considerando 5% de probabilidade, e trabalhados com o auxílio dos programas STATA 12, XLstats, GraphPad Prism, Action Stat e Microsoft Excel, versão 2010. Através das bases de dados (MIC casca, MIC folha, Difusão casca, Difusão folha, Resazurina casca, Resazurina folha e Antibióticos) foi realizado uma análise préviado comportamento e da distribuição dos dados para a escolha dotestesestatísticos adequados e análise dos mesmos. Primeiramente, foi avaliado o comportamento dos dados, através de gráficos e testes que avaliam se os dados seguem uma distribuição normal. A seguir, a análise foi feita com base em testes e análises não paramétricas. Diante do exposto, para realizar as correlações foi adotado a correlação de

Spearman e sua análise pode ser dada por: Correlação próxima de 1: Significa uma correlação perfeita positiva entre as duas variáveis. Correlação próxima de -1: Significa uma correlação perfeita negativa entre duas variáveis. Correlação igual a 0: Significa que não existe efeito entre as variáveis. Para a análise sobre o efeito/significância do antibiótico em relação à casca e a folha, foi realizado Teste Exato de Fisher, que permite verificar a independência entre duas variáveis de qualquer tipo que se apresentem agrupadas numa tabela de contingência. As hipóteses do teste são: H0: As variáveis são independentes, ou as variáveis não estão associadas; H1: As variáveis são dependentes, ou as variáveis estão associadas.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 AVALIAÇÃO DOS MÉTODOS TESTADOS – DAD E MC

Em nosso estudo, para o extrato das folhas, a metodologia MC apresentou uma maior atividade antimicrobiana maior do que a metodologia DAD, para todas as bactérias analisadas (47,30%) (Tabela 1). A menor atividade antimicrobiana das folhas encontradas no método DAD, pode ser devido a polaridade de componentes naturais, pois este pode afetar a difusão de componentes no meio de cultura (KLANCNIK *et al.*, 2010). Componentes com menos polaridade se difunde mais lentamente do que os componentes polares (MORENO *et al.*, 2006), o que pode dificultar a interpretação da atividade microbiana de produtos naturais. A atividade antimicrobiana foi similar para bactérias gram positivas (25,00%) e para as bactérias gram negativas (23,08 %), pelo método DAD. Os resultados demonstraram também uma atividade antimicrobiana similar, tanto para as bactérias gram positivas (50,00%) quanto para as bactérias gram negativas (42,31%) pelo método MC. Apesar de alguns estudos (BISWAS *et al.*, 2013; UBULOM PEACE *et al.*, 2013), utilizando extratos de plantas diferentes, demonstrarem uma atividade antimicrobiana maior contra as bactérias gram positiva e sugerirem que as bactérias gram negativas possuem uma membrana externa composta por lipossacarídeos (BROWN, 1975), que pode restringir a penetração do extrato da planta na bactéria, (BURT, 2004; QA'DAN *et al.*, 2005; RAMESHKUMAR *et al.*, 2007). Nossos dados sugerem que os extratos das folhas possuem compostos promissores na atividade antimicrobiana, tanto para as bactérias gram positivas quanto para as bactérias gram negativas.

Tabela 1: Número e porcentagem de inibição do crescimento das espécies de bactérias gram negativas e gram positivas, frente aos extratos das folhas, através do método de Difusão em Ágar por Disco (DAD) e Microdiluição em Caldo (MC).

BACTÉRIA	Folhas (DAD – Concentração mg/ml)										
	20	10	5	2,5	1,25	0,625	0,312	0,156	0,078	0,039	DMSO 100%
Gram Negativa (n = 26)	6 23,08%	6 23,08%	6 23,08%	6 23,08%	5 19,23%	4 15,38%	3 11,54%	0 0,00%	0 0,00%	0 0,00%	0 0,00%
Gram Positiva (n = 48)	12 25,00%	12 25,00%	12 25,00%	12 25,00%	11 22,92%	10 20,83%	9 18,75%	1 2,08%	0 0,00%	0 0,00%	0 0,00%
Total (n = 74)	18 24,32%	18 24,32%	18 24,32%	18 24,32%	16 21,62%	14 18,92%	12 6,22%	1 1,35%	0 0,00%	0 0,00%	0 0,00%

BACTÉRIA	Folhas (MC – Concentração mg/ml)										
	20	10	5	2,5	1,25	0,625	0,312	0,156	0,078	0,039	DMSO 100%
Gram Negativa (n = 26)	11 42,31%	11 42,31%	11 42,31%	7 26,92%	7 26,92%	5 19,23%	1 3,85%	0 0,00%	0 0,00%	0 0,00%	0 0,00%
Gram Positiva (n = 48)	24 50,00%	11 22,92%	11 22,92%	7 14,58%	7 14,58%	5 10,42%	1 2,08%	0 0,00%	0 0,00%	0 0,00%	0 0,00%
Total (n = 74)	35 47,30%	22 29,73%	22 29,73%	14 18,92%	14 18,92%	10 13,51%	2 2,70%	0 0,00%	0 0,00%	0 0,00%	0 0,00%

Extratos das folhas que apresentaram atividade antimicrobiana, nas concentrações de 20 mg/ml a 0,039 mg/ml.

O extrato das cascas de *Brosimum gaudichaudii* Trécul. também apresentou atividade antimicrobiana semelhante tanto para as bactérias gram negativas (42,31% e 53,85%) quanto para as bactérias gram positivas (50,00% e 45,83%), tanto para o método MC quanto para o método DAD, respectivamente (Tabela 2). A atividade contra as bactérias gram negativa e gram positiva, encontrada no extrato das cascas, sugere também que esta parte da planta pode ser um bom candidato à pesquisa por um agente antimicrobiano natural contra ambos tipos de bactérias. Apesar do estudo não apresentar o isolamento dos princípios ativos, as plantas medicinais são ricas em uma variedade de metabólitos secundários, que podem estar relacionados com atividade antimicrobiana (SHER, 2009). Além disso, Araujo *et al.* 2015, demonstrou que a *Brosimum gaudichaudii* Trécul. possui uma grande diversidade de metabólitos secundários, o que sugere que alguns desses compostos podem estar relacionados com atividade antimicrobiana encontrada. Estudos de isolamento dos princípios ativos serão necessários para a completa elucidação da atividade antimicrobiana da planta estudada.

Tabela 2: Número e porcentagem de inibição do crescimento das espécies de bactérias gram negativas e gram positivas, frente aos extratos das cascas, através do método de Difusão em Ágar por Disco (DAD) e Microdiluição em Caldo (MC).

BACTÉRIA	Cascas (DAD – Concentração mg/ml)										
	20	10	5	2,5	1,25	0,625	0,312	0,156	0,078	0,039	DMSO 100%
Gram Negativa (n = 26)	11 42,31%	11 42,31%	9 34,62%	8 30,77%	8 30,77%	7 26,92%	5 19,23%	0 0,00%	0 0,00%	0 0,00%	0 0,00%
Gram Positiva (n = 48)	24 50,00%	11 22,92%	11 22,92%	7 14,58%	7 14,58%	5 10,42%	1 2,08%	0 0,00%	0 0,00%	0 0,00%	0 0,00%
Total (n = 74)	35 47,30%	22 29,73%	20 27,03%	15 20,27%	15 20,27%	12 16,22%	6 8,11%	0 0,00%	0 0,00%	0 0,00%	0 0,00%
BACTÉRIA	Cascas (MC – Concentração mg/ml)										
	20	10	5	2,5	1,25	0,625	0,312	0,156	0,078	0,039	DMSO 100%
Gram Negativa (n = 26)	14 53,85%	14 53,85%	13 50,00%	11 42,31%	11 42,31%	8 30,77%	7 26,92%	2 7,69%	1 3,85%	1 3,85%	0 0,00%
Gram Positiva (n = 48)	22 45,83%	11 22,92%	11 22,92%	7 14,58%	7 14,58%	5 10,42%	1 2,08%	0 0,00%	0 0,00%	0 0,00%	0 0,00%
Total (n = 74)	36 48,65%	25 33,78%	24 32,43%	18 24,32%	18 24,32%	13 17,57%	8 10,81%	2 2,70%	1 1,35%	1 1,35%	0 0,00%

Extratos das cascas que apresentaram atividade antimicrobiana, nas oncentrações de 20 mg/ml a 0,039 mg/ml.

4.2 AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES FRENTE AS BACTÉRIAS MULTIRRESISTENTES TESTADAS

Nos últimos anos está ocorrendo um aumento preocupante no número de bactérias multirresistentes aos antibióticos disponíveis, entre essas bactérias estão as encontradas nas lesões dos pés de pacientes com diabetes, e isto tem ocasionado a necessidade de obter agentes antimicrobianos naturais e o desenvolvimento de novas drogas. Nesses tipos de lesões, as bactérias gram positivas como *Staphylococcus aureus* e os *Streptococcus* beta hemolítico (grupos A, C e G, especialmente o grupo B) são patógenos comumente isolados (MAZEN *et al.*, 2008; EL-TAHAWY, 2000; URBANCIC-ROVAN; GUBINA, 2009) e, entre as bacterias gram negativas são comumente encontrados os *Enterococci*, as *Enterobacteriaceae*, as *Pseudomonas aeruginosa*, e as cepas não fermentativas (PATHARE *et al.*, 1998). Em nosso estudo, quando analisamos a capacidade de inibição de crescimento das diversas cepas através dos extratos de cascas e folhas de *Brosimum gaudichaudii* Trécul., (tabela 3) foi observado que os extrato das folhas e cascas apresentaram uma significativa atividade antimicrobiana contra *S. aureus* isoladas dos pacientes com pés diabéticos e *S. aureus* controle (63,64 % e 100,00%), pelo método de MC e método DAD, respectivamente. As cascas pelo método de MC inibiu totalmente o crescimento de todos os *Streptococcus* beta hemolítico (100,00%) e as folhas apresentaram também uma significativa inibição (50,00%) dessas cepas pelo método DAD. Para as bactérias gram negativas, foi possível observar que os extratos das cascas possuíram uma maior atividade antimicrobiana do que as folhas para as bactérias gram negativas. É interessante observar que por ambas metodologias empregadas, os extratos provenientes de cascas e folhas inibiram em 66,67% as bactérias *Pseudomonas aeruginosa* isoladas dos pacientes diabéticos com lesões nos pés, um patógeno que possui um alto grau de resistência a maioria dos antibióticos de amplo espectro (SIVANMALIAPPAN *et al.*, 2011; DHANASEKARAN *et al.*, 2003). O extrato de cascas também apresentou uma significativa inibição nas bactérias *E. coli* isoladas dos

pacientes diabéticos com lesões nos pés em ambos os métodos (MC-100,00% a DAD-50,00%) e o extrato das folhas apresentou um maior poder de inibição pelo método MC (100,00%). O extrato das cascas por ambos métodos inibiu o crescimento de *Citrobacter* sp em 100,00%, enquanto que o extrato de folhas não apresentou atividade antimicrobiana para este tipo de cepa. O extrato das cascas pelo método MC também inibiu em 50,00% o crescimento de *Proteus* sp. Estudos realizados por Perim *et al.*, 2015, demonstraram que essas bactérias foram resistentes para a maioria dos antibióticos utilizados no tratamento desse tipo de úlceras de pés diabéticos. Portanto, os resultados apresentados sugerem a presença de um princípio ativo antibacteriano promissor nessa planta.

Tabela 3: Número e porcentagem de inibição do crescimento das espécies de bactérias gram negativas e gram positivas, frente aos extratos das cascas e folhas, através do método de Difusão em Ágar por Disco (DAD) e Microdiluição em Caldo (MC).

		<i>Brosimum gaudichaudii</i> Trécul			
BACTÉRIAS		DAD CASCAS	MC CASCAS	DAD FOLHAS	MC FOLHAS
		(%)	(%)	(%)	(%)
Gram Negativas	<i>Citrobacter</i> sp (n=1)	1	1	0	0
		100,00%	100,00%	0,00%	0,00%
	<i>Citrobacter yougae</i> ATCC 29935	0	0	0	0
		0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
	<i>Escherichia coli</i> (n=2)	1	2	0	2
		50,00%	100,00%	0,00%	100,00%
	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	1	1	1	0
		100,00%	100,00%	100,00%	0,00%
	<i>Enterobacter</i> sp (n=9)	4	4	2	5
		44,44%	44,44%	22,22%	55,56%
	<i>Proteus</i> sp (n=7)	2	4	1	2
		25,00%	50,00%	12,50%	25,00%
	<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 12453	1	0	0	0
		100,00%	0,00%	0,00%	0,00%
<i>Pseudomonas</i> sp (n=3)	2	2	2	2	
	66,67%	66,67%	66,67%	66,67%	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	0	0	0	0	
	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	
Gram Positivas	<i>Streptococcus</i> alfa hemolítico (n=2)	2	1	1	2
		100,00%	50,00%	50,00%	100,00%
	<i>Streptococcus</i> beta hemolítico (n=4)	0	4	2	0
		0,00%	100,00%	50,00%	0,00%
	<i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC 0015	1	1	1	1
		100,00%	100,00%	100,00%	100,00%
	<i>Staphylococcus epidermidis</i> (n=4)	1	1	1	1
		25,00%	25,00%	25,00%	25,00%
	<i>Staphylococcus saprofiticus</i> (n=14)	5	4	2	5
		35,71%	28,57%	14,29%	35,71%
<i>Staphylococcus aureus</i> (n=22)	14	10	4	14	
	63,64%	45,45%	18,19%	63,64%	
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	1	1	1	1	
	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	
Total Geral (n=74, 100%)	35	36	18	35	
	47,30%	48,65%	24,32%	47,30%	

4.3 CORRELAÇÃO ENTRE AS METODOLOGIAS, DAD E MC, TESTADAS A PARTIR DO CIM

Considerando os diferentes resultados encontrados nas metodologias de MC e DAD, para avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos de cascas e folhas, foi realizado a

correlação de Spearman, ajustadas pelo índice de Bonferroni (Quadro 3). Conforme podemos observar no quadro 3, para o extrato de cascas de *Brosimum gaudichaudii* Trécul. o CIM até a concentração de 0,3125 apresentou correlação entre ambas as metodologias. De acordo com Holetz *et al.*, 2002, os extratos que apresentam valores da CIM menor que 0,1mg/mL são considerados com boa atividade antimicrobiana, os que apresentam valores entre 0,1 e 0,5 mg/mL são considerados moderadamente ativos, entre 0,6 e 1 mg/mL são considerados fracos e quando a CIM for maior que 1 mg/mL o produto é considerado inativo (PRETTO, 2005; SOUZA, 2007). Outros autores (RIOS *et al.*, 1988) consideram que no MC a atividade antimicrobiana pode variar entre 0,25 e 0,4 mg/ml, enquanto que para o DAD a concentração para a obtenção de halo está entre 100 e 300 mg/ml. Portanto, apesar das diferentes concentrações encontradas na literatura, para classificar um extrato com atividade antimicrobiana, em nosso estudo, os extratos das cascas demonstraram ser ativos para ambas metodologias.

Quadro 3: Correlação dos métodos de Difusão em Ágar por Disco (DAD) e Microdiluição em Caldo (MC), através da concentração inibitória mínima de extrato de cascas e de folhas de Brosimum Gaudichaudii Trécul.

CORRELAÇÃO ENTRE MÉTODOS DAD E MC (DAD X MC)		
CONCENTRAÇÃO	EXTRATO DE CASCAS	EXTRATO DE FOLHAS
20 mg	0,5467*	0,1776
10 mg	0,5135*	0,1748
5 mg	0,5338*	0,0603
2.5 mg	0,4953*	-0,0049
1.25 mg	0,5604*	0,0203
0.625 mg	0,5561*	-0,0144
0.3125 mg	0,5477*	-0,0317
0.15625 mg	0,2492	-0,0703
0.078125 mg	0,2804	-0,0488
0.0390625 mg	0,3559	-0,0378

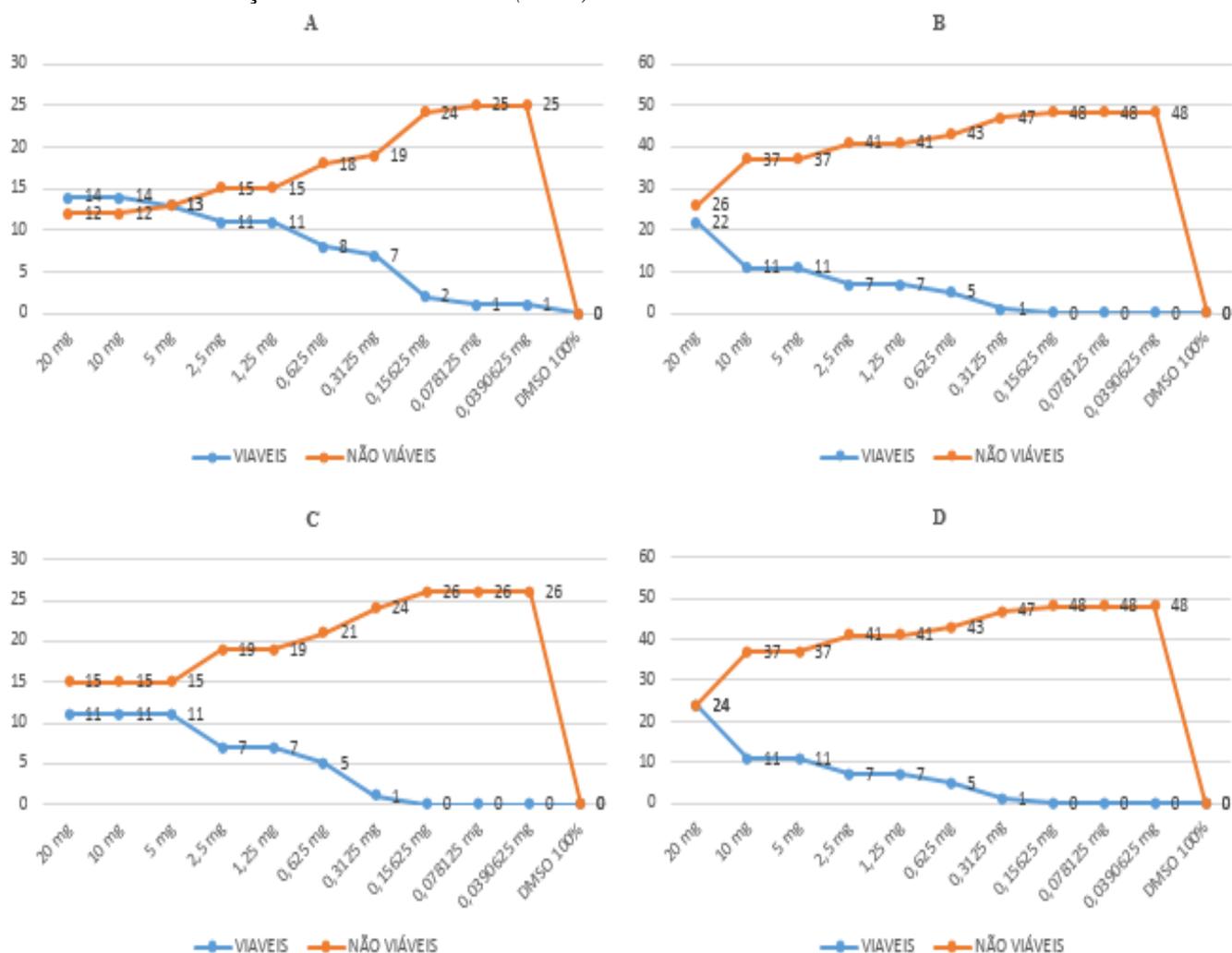
*Nível de significância a 5%, ajustado pelo Índice de Bonferroni.

O extrato das folhas também apresentou uma boa atividade antimicrobiana frente as concentrações testadas. Porém, os valores demonstram que a diminuição da concentração do extrato da folha não acompanha a inibição dos microrganismos, portanto, em ambas metodologias não houve correlação. Como em ambas metodologias, apesar de similares, indicam que os extratos das cascas foram mais efetivos na atividade antimicrobiana do que as folhas, sugere-se que isto pode estar relacionado a diversidade e quantidades variáveis de fitoconstituintes (ARAUJO *et al.*, 2015) com atividade antimicrobiana presentes nas diferentes partes da planta. Em adição, embora alguns autores propõem a utilização do método de difusão em disco para a análise antimicrobiana (NASCIMENTO *et al.*, 2000; KARAMAN *et al.*, 2003) e outros sugerem o método de microdiluição (OSTROSKY *et al.*, 2008), nossos resultados demonstram a necessidade de utilização de mais de um método para a obtenção de resultados confiáveis e/ou a padronização das metodologias empregadas para a avaliação da atividade antimicrobiana em extratos de plantas.

4.4 VERIFICAÇÃO DA VIABILIDADE E CBM

As CBM descritas para os extratos das cascas e folhas de *Brosimum Gaudichaudii* Trécul. nesse estudo estão apresentadas no gráfico 1. Foi observado que conforme as concentrações diminuíram, a viabilidade das bactérias acompanhou a concentração até sua inibição total. Para as bactérias gram negativas a menor concentração obtida foi de 0,0390625mg para o extrato de casca e 0,15625mg para o extrato de folha. Estes resultados estão de acordo com Suffredini, Varella, Younes (2007) que sugere concentrações maiores de extratos para a inibição de bactérias gram negativas, pois a estrutura da parede bacteriana nessas cepas favorece uma maior resistência. Para as bactérias gram positivas a menor concentração obtida foi de 0,15625mg para ambos os extratos testados, o que está de acordo com alguns estudos (MEYER *et al*, 1982; KUETE *et al*, 2007, 2008; MIMS *et al.*, 1999) que demonstraram que o valor da menor CBM obtida não foi mais de quatro vezes maior do que a CIM de agentes patogênicos correspondentes.

Gráfico 1: Análise da viabilidade das bactérias para os extratos de cascas e folhas, através da concentração bactericida mínima (CBM).



Na vertical, o número total de bactérias testadas, e na horizontal as concentrações testadas. Bactérias nas concentrações de 20 mg a 0.390625 mg. Azul: viáveis; Vermelhos: não viáveis. A – Bactérias Gram negativas / Extrato cascas; B - Bactérias Gram positivas / Extrato cascas; C - Bactérias Gram negativas / Extrato folhas; D - Bactérias Gram positivas / Extrato folhas.

4.5 EFICÁCIA DOS EXTRATOS RELACIONADOS À RESPOSTA DOS ANTIBIÓTICOS TESTADOS

A Tabela 4 demonstra a eficácia dos extratos das cascas e folhas relacionados à resposta do antibiótico padrão amoxicilina / ácido clavulânico para bactérias gram positivas, e cefoxitina para as bactérias gram negativas, respectivamente. Utilizou-se para os extratos de cascas e folhas a mesma concentração dos antibióticos e realizou-se o Teste Exato de Fisher.

Tabela 4. Eficácia dos extratos das cascas e folhas relacionados à resposta dos antibióticos e entre os extratos das cascas e folhas, para bactérias gram positivas e gram negativas.

ANTIBIÓTICO X CASCAS							
GRAM - / CIM (MC)	CASCAS		TOTAL	GRAM + / CIM (MC)	CASCAS		TOTAL
ANTIBIÓTICO (CFO)	RESISTENTE	SENSÍVEL		ANTIBIÓTICO (AMC)	RESISTENTE	SENSÍVEL	
RESISTENTE	11	12	23	RESISTENTE	17	4	21
SENSÍVEL	1	2	3	SENSÍVEL	15	12	27
TOTAL ($p = 0,56$)	12	14	26	TOTAL ($p = 0,06$)	32	16	48
ANTIBIÓTICO X FOLHAS							
GRAM - / CIM (MC)	FOLHAS		TOTAL	GRAM + / CIM (MC)	FOLHAS		TOTAL
ANTIBIÓTICO (CFO)	RESISTENTE	SENSÍVEL		ANTIBIÓTICO (AMC)	RESISTENTE	SENSÍVEL	
RESISTENTE	16	7	23	RESISTENTE	19	2	21
SENSÍVEL	1	2	3	SENSÍVEL	14	13	27
TOTAL ($p = 0,268$)	17	9	26	TOTAL ($p = 0,004$)	33	15	48
CASCAS X FOLHAS							
GRAM - / CIM (MC)	FOLHAS		TOTAL	GRAM + / CIM (MC)	FOLHAS		TOTAL
CASCAS	RESISTENTE	SENSÍVEL		CASCAS	RESISTENTE	SENSÍVEL	
RESISTENTE	11	1	12	RESISTENTE	28	4	32
SENSÍVEL	6	8	14	SENSÍVEL	5	11	16
TOTAL ($p = 0,012$)	17	9	26	TOTAL ($p = 0,000$)	33	15	48

Teste Exato de Fisher: p – valor, considerando significância (0.05); CIM: Concentração Inibitória Mínima; MC – Microdiluição em Caldo; Amoxicilina / Ácido Clavulânico (ACM 20 μ g) para gram positivas e Cefoxitina (CFO 30 μ g) para gram negativas.

Para as bactérias gram negativas, a relação antibiótico x cascas, com p-valor de 0,56 (unicaudal), e a relação antibiótico x folhas, com p-valor de 0,268 (unicaudal), ambas ao nível de significância de 5%, não demonstram evidências de que os efeitos das cascas e folhas estavam relacionados aos efeitos do antibiótico cefoxitina para este tipo de bactérias, deste modo, cascas, folhas e antibióticos apresentaram ações independentes. Diferentemente, para as bactérias gram positivas, a relação antibiótico x cascas, com p-valor de 0,06 (unicaudal), e a relação antibiótico x folhas, com p-valor de 0,004, ambas ao nível de significância de 5%, (unicaudal), demonstrou a hipótese de que as variáveis são dependentes, existindo evidências de que os efeitos das cascas e folhas estavam relacionados aos efeitos do antibiótico amoxicilina / ácido clavulânico para a inibição do crescimento desse tipo de bactérias. Há crescentes estudos sobre as ações de sinergismo através da interação sinérgica ou aditiva, ou o efeito deletérios através do desfecho tóxico ou antagonismo, entre antibióticos e extratos de plantas bioativas (ADWAN; MHANNA, 2008; WILLIAMSON, 2001). Apesar do foco de nossos estudos não ser a ação sinérgica entre antibióticos e os extratos de plantas, nossos resultados sugerem que as cascas podem ter princípios ativos que favorecem essa interação e potencialize a ação antimicrobiana. A relação cascas com folhas para as gram negativas e gram positivas, com p-valor de 0,012 (unicaudal) e p-valor de 0,000 (unicaudal), respectivamente, e ao nível de significância de 5%, demonstrou evidências de que os efeitos das cascas estavam associados aos efeitos das

folhas. Diferentemente dos animais, as plantas não possuem um complexo sistema imunológico adaptativo para a defesa contra os macro e microrganismos, deste modo, desenvolveu-se uma variedade de compostos fitoquímicos para sua proteção e muitos desses compostos atuam através de sinergismo. Embora, os compostos ativos não tenham sido isolados, os resultados sugerem que esses compostos podem estar interagindo entre si, pois sinergismo entre diferentes constituintes dos extratos tem sido documentado não somente para atividade antimicrobiana (SHAMI *et al.*, 2013) mas também para outras atividades farmacológicas (RASOANAIVO *et al.*, 2011; WILLIAMSON, 2001).

5 CONCLUSÕES:

Os extratos de cascas e de folhas de *Brosimum Gaudichaudii* Trécul. apresentaram atividade antimicrobiana frente às bactérias multirresistentes, com variações nos resultados de acordo com as partes da planta analisada, tipo de microrganismo e metodologia empregada para a avaliação;

- Avaliação das técnicas empregadas: Os resultados obtidos neste trabalho sugerem a CIM como uma técnica eficiente para avaliar a atividade antimicrobiana, pois apresentou maior sensibilidade. No entanto, nossos resultados demonstraram a necessidade de utilização de mais de um método para a obtenção de resultados confiáveis e/ou a padronização das metodologias empregadas para a avaliação da atividade antimicrobiana em extratos de plantas;

- Eficácia e inibição do crescimento das diferentes cepas Gram Negativas e Gram Positivas: Os extratos das cascas indicam uma maior atividade antimicrobiana contra as todas as bactérias. No entanto, assim como as cascas, as folhas também apresentaram resultados promissores na atividade antimicrobiana contra *S. aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*, bactérias com alto grau de resistência a maioria dos antibióticos de amplo espectro e comumente encontradas em lesões de pés de pacientes com diabetes

- Correlação das metodologias utilizadas, a partir do CIM obtido: A correlação entre os extratos das cascas e folhas, também demonstrou resultado promissor na eficácia de inibição das bactérias gram negativas e gram positivas, sugerindo também sinergismo entre os seus fitoconstituintes.

- Avaliação da eficácia dos extratos das cascas e folhas relacionados à resposta dos antibióticos comercialmente utilizados para bactérias Gram Negativas e Gram Positivas: A avaliação da eficácia dos extratos de cascas e folhas relacionados à resposta dos antibióticos, através do Teste exato de Fisher, sugere que compostos presentes nessas partes da planta podem ter efeitos de sinergismo (fitoconstituintes+antibióticos) para a inibição de bactérias gram positivas multirresistentes.

Baseado nos resultados encontrados, os extratos das cascas e folhas de *Brosimum gaudichaudii* Trécul. podem ser um bom candidato à pesquisa por um agente antimicrobiano natural contra cepas de bactérias multirresistentes.

Este trabalho contribui para ampliação do conhecimento científico sobre a atividade antimicrobiana de plantas da biodiversidade do cerrado Tocantinense, além de agregar valor a produtos dessa biodiversidade. Porém outros trabalhos deverão ser realizados para a complementação destes estudos e aplicações, com isolamento dos possíveis agentes antimicrobianos.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho contribui para ampliação do conhecimento científico, resultando na escrita de artigo científico (anexo 01) submetido à revista e aguarda aceite da equipe revisora.

Como perspectivas futuras, a realização de testes de sinergismo e também a análise de extratos fracionados a fim de obtenção do princípio ativo, bem como testes de citotoxicidade serão realizados.

7 REFERÊNCIAS

- ADWAN, G; ABU-SHANAB, B; ADWAN, K. Antibacterial Activities of Some Plant Extracts Alone and in Combination with Different Antimicrobials against Multidrug Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Strains - **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, 2010, p.266-269.
- ADWAN, G; MHANNA, M. *Staphylococcus aureus* Strains Isolated from Clinical Specimens. **Middle East Journal of Scientific Research**, 3 (3): 134-139, 2008.
- AGRA, M. F. et al. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 18, n. 3, p. 472-508, 2008.
- AGRIPINO, D.G.; LIMA, M.E.L.; SILVA, M.R.; MEDA, C.I.; BOLZANI, V.S.; CORDEIRO, I.; YOUNG, M.C.M.; MORENO, P.R.H. Screening of Brazilian plants for antimicrobial and DNA-damaging activities. I. Atlantic rain forest. Ecological station Juréia - Itatins. **Biota Neotropica**, v. 4, n. 2, 2004.
- AKERELE O. Medicinal Plants and Primary Health Care: an Agenda for Action. **Fitoterapia**. N. (5): 355-63, 1988.
- AKHI, M.T.; GHOTASLOU, R.; ASGHARZADEH, M.; et al. "Bacterial etiology and antibiotic susceptibility pattern of diabetic foot infections in Tabriz, Iran," **GMS Hygiene and Infection Control**, vol. 10, 2015.
- ALBUQUERQUE, U. P. de; HANAZAKI, N. As pesquisas etnodirigidas na descoberta de novos fármacos de interesse médico e farmacêutico: fragilidades e perspectivas. **Revista brasileira de farmacognosia**, João Pessoa, v. 16, supl. Dec. 2006.
- ALMEIDA, M. Z. **Plantas Mediciniais e ritualísticas**. Salvador: EDUFBA, 2000
- ALMEIDA, S.P. **Cerrado: Aproveitamento Alimentar**. Planaltina. EMBRAPA - CPAC. 1998.188p.
- ALONSO, R.J. **Tratado de fitomedicina - bases clínicas e farmacologicas**. Buenos Aires: I Ed.; Isis, 1998.
- ALVES, E.G.; VINHOLIS, A.H.C.; CASEMIRO, L. A.; FURTADO, N.A.J.C.; SILVA, M.L.A.; CUNHA, W.R.; MARTINS, C.H.G. Estudo comparativo de técnicas de *screening* para avaliação da atividade antibacteriana de extratos brutos de espécies vegetais de substâncias puras. **Química Nova**, v. 31, n. 5, p. 1224-1229, 2008.
- ANDERSON K.L. Is bacterial resistance to antibiotic an appropriate example of evolutionary change? **Creation Research Society Quarterly**, v. 41, p. 318-326, 2005.
- ANTUNES, R.M.P.; LIMA, E.O.; PEREIRA, M.S.V.; CÂMARA, C.A.; ARRUDA, T.A.; CATÃO, R.M.R.; BARBOSA, T.P.; NUNES, S.P.; DIAS, C.S.; SILVA, T.M.S. Atividade antimicrobiana *in vitro* e determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) de

Fitoconstituintes e produtos sintéticos sobre bactérias e fungos leveduriformes. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 4, p. 517 – 524, 2006.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Fitoterapia**. 2014. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/fitoterapicos/definicao.htm#>. Acesso: jun, 2016.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA – ANVISA. **Detecção e identificação de bactérias de importância médica: Módulo 6**. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Brasília: ANVISA, 2013. 149p.

APPELBAUM, P.C.; JACOBS, M.R. Approved and investigational antibiotics for treatment of severe infections caused by Gram-positive bacteria. **Current Opinion in Microbiology**. v. 8, p. 510 - 517, 2005.

ARAÚJO, T. A. S.; PEIXOTO SOBRINHO, T. J. S.; AGUIAR, J. S.; SILVA, A. C. O.; BRITO, F. U.; SILVA, T. G.; AMORIM, E. L. C.; PRANCHEVICIUS, M. C. S. Phytochemical, antioxidant and cytotoxic analysis of Brazilian Cerrado plants: Preliminary evidence of their antitumor activity. **Journal of Medicinal Plant Research**, v. 9, p. 310-319, 2015.

ARAÚJO, T.A.S.; ALMEIDA, V.T.C.; AMORIM, E.L.C.; ALBUQUERQUE, U.P. Habitat influence on antioxidant activity and tannin concentrations of *Spondiastuberosa* Arruda (*Anacardiaceae*). **Pharmaceutical Biology**, v. 50, n. 6, p. 754 – 759, 2012.

AYRES, M.C.C. et al. Atividade antibacteriana de plantas úteis e constituintes químicos da raiz de *Copernicia prunifera*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 18 n. 1, p. 90 - 97, Jan - Mar, 2008.

BARON, E.J; FINEGOLD, S.M. Bailey & Scott's – diagnostic microbiology, 8 ed. **The C.V. Mosby Company**: St. Louis, 1990.

BARREIRO, E.J. **Desenho de fármacos a partir de produtos naturais**. In: Yunes, R.A.; CALIXTO, J.B. Plantas medicinais sob a ótica da moderna química medicinal. Chapecó: Argos, p. 237-296, 2001.

BARRY, A.L. Procedures and theoretical considerations for testing antimicrobial agents in agar media. In: LORIAN, Antibiotics in Laboratory Medicine. 3. ed. Baltimore: **The Williams & Wilkins Company**, Md, 1991.

BASILE, A.; SORBO, S.; GIORDANO, S.; RICCIARDI, L.; FERREIRA, S.; MONTESANO, D.; COBIANCHI, C.R.; VUOTTO, M.L.; FERRARA, L. Antibacterial and allelopathic activity of extract from *Castanea sativa* leaves. **Fitoterapia**, v.71, p.110-116, 2000.

BHAVNANI, S.M.; BALLOW, C.H. New agents for Gram-positive bacteria. **Current Opinion in Microbiology**. v. 3, p. 528 - 234, 2000.

BISWAS, B.; ROGERS, K.; MCLAUGHLIN, F.; DANIELS, D.; YADAV, A. Antimicrobial Activities of Leaf Extracts of Guava (*Psidium guajava* L.) on Two Gram Negative and Gram-Positive Bacteria. **International Journal of Microbiology**. 7 p. 2013.

BOMONO R.A.; SZABO D. Mechanisms of multidrug resistance in *Acinetobacter* species, *Pseudomonas aeruginosa*. **Clinical Infectious Diseases**, v. 43, p. 49-56, 2006.

BROWN, M. R. W. *The role of the cell envelope in resistance*, p. 71-107.1975.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods a review, **International Journal of Food Microbiology**, vol. 94, no. 3, pp. 223–253, 2004.

CAFFIERI, S. et al. Photosensitizing furanocoumarins: photocycloaddition to unsaturated fatty acids. **Proceedings International Congress “Psoralens 1988”**, v.87, p.137-145, 1989.

CASTRO, T. F. et al. Optimization of extraction hydroalcoholic *Brosimum gaudichaudii* Trécul (moraceae). **9th International Congress of Pharmaceutical Sciences**. Ribeirão Preto, Brazil 2011.

CATÃO, R.M.R. et al. Avaliação da atividade antimicrobiana de riparinas sobre cepas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* multirresistentes. **RBAC**, v. 37, n. 4, p. 247 249, 2005.

CAVALLAZZI, M. L. **Plantas medicinais na atenção primária à saúde**. - Florianópolis, 2006. 144 f. Dissertação (Mestrado) Centro de Ciências Médicas. Universidade Federal de Santa Catarina.

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute. **Suggested Grouping of US-FDA Approved Antimicrobial Agents That Should Be Considered for Routine Testing and Reporting on Nonfastidious Organisms by Clinical Laboratories, M100-S23**. Wayne, PA: CLSI; 2013 Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Suggested Grouping of US-FDA Approved Antimicrobial Agents That Should Be Considered for Routine Testing and Reporting on Nonfastidious Organisms by Clinical Laboratories, M100-S23. Wayne, PA: CLSI; 2013

CLSI. **Manual Clinical and Laboratory Standards Institute**. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standards- 6th ed. Document M7-A6 performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA., 2006.

CLSI. **Manual Clinical and Laboratory Standards Institute**. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically: approved standards 6th ed. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Sixteenth informational supplement M100-S16 (tab 2J). Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA., 2006a.

COELHO DE SOUZA, G.; HAAS, A.P.S.; VON POSER, G.L.; SCHAPOVAL, E.E.S.; ELISABETSKY, E. Etnopharmacological studies of antimicrobial remedies in the South of Brazil. **Journal Ethnopharmacology**, v.90, p.135-143, 2004.

COLE, M.D. Key antifungal, antibacterial and anti-insect assays-a critical review. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 22, n. 8, pp. 837-856, 1994

CONSENTINO, S.; TUBEROSO, G.; PISANO, B.; SATTA, M.; MASCIA, V.; ARZEDI, E.; PALMAS, F. - In vitro antimicrobial activity and chemical composition of sardinian thymus essential oils. **Letters in Applied Microbiology Reviews**, v. 12, n. 4, p. 564 - 582, 1999.

COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. R. **Patologia estrutural e funcional**. 6ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2000.

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

CRONQUIST, A. **The evolution and classification of flowering plants**. The New York Botanical Garden, New York, USA.1988.

CUSHNIE, T.P.T.; LAMB, A.J. Antimicrobial activity of flavonoids – Review. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 26, p. 343-356, 2005.

DE SOUZA, M.M.; BELLA CRUZ, A.; SCHUHMACHER, M.B.; KREUGER, M.R.O.; FREITAS, R.A.; BELLA CRUZ, R.C. **Métodos de avaliação de atividade biológica de produtos naturais e sintéticos**. In: BRESOLIN, T.M.B.; CECHINEL FILHO, V. (Editores). Ciências Farmacêuticas: Contribuição ao desenvolvimento de novos fármacos e medicamentos. UNIVALI, Itajaí, 2003.

DECLARAÇÃO DE HELSINKI. Disponível em: <http://www.bioetica.org.br/?siteAcao=DiretrizesDeclaracoesIntegra&id=4>. Acesso em: jan. 2013.

DEVIENNE, K.S; RADDI, M.S.G; POZETTI, G.L. Das Plantas Mediciniais aos Medicamentos – **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, 6, 2004, p.11-14.

DHANASEKARAN G, SASTRY NG, MOHAN V. Microbial pattern of soft-tissue infections in diabetic patients in South India. **Asian Journal of Diabetology**. 2003;5(5-6):8–10.

DUARTE, M.C.T. et al. Anti-Candida activity of Brazilian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 97, p. 305-311, 2005.

ELIZABETSKY, E. Etnofarmacologia. **Ciências e Cultura**, vol.55, no.3. São Paulo, July / Sept. 2003.

ELOFF, J.N. A Sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plants extract for bacteria. **Planta Medica**, v. 64, n. 8, p. 711-713, 1998.

EL-TAHAWY, A.T. Bacteriology of diabetic foot. **Saudi Medical Journal**. 21:344 7. 2000.

FABRICANT, D. S.; FARNSWORTH, N. R. **The Value of Plants Used in Traditional Medicine for Drug Discovery.** *Environmental Health Perspectives*, 109, 2001, p. 69-75.

FARNSWORTH, N.R. **Screening plants for new medicines.** In: E.O. Wilson (ed) *Biodiversity*. Washington DC: Nac. Acad. Press. 521p. 1988.

FERREIRA, M. B. **Frutos comestíveis nativos do Distrito Federal.** *Cerrado*. v.5 n.9 p.25-29. 1973.

FERRO, D. **Fitoterapia: conceitos clínicos.** São Paulo: Editora Atheneu, 2008, 502p.

FUKUSHIMA, R.S.; WEIMER, P.J.; KUNZ, D.A. Use of photocatalytic reduction to hasten preparation of culture media for saccharolytic *Clostridium* species. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 34, n. 1, p. 22-26, 2003.

GABRIELSON, J.; HART, M.; JARELÖV, A.; KUHN, I.; MCKENZIE, D.; MÖLLBY, R. Evaluation of redox indicators and the use of digital scanners and spectrophotometer for quantification of microbial growth in microplates. **Journal of Microbiological Methods**, v. 50, p. 63-73, 2002.

GADEPALLI, R.; DHAWAN, B.; SREENIVAS, V.; KAPIL, A.; AMMINI, A.C.; CHAUDHRY, R. A clinic-microbiological study of diabetic foot ulcers in an Indian tertiary care hospital. *Diabetes Care* 2006; 29:1727-32. [16873771] [<http://dx.doi.org/10.2337/dc06-0116>].

HAIDA, K.S. et al. Avaliação *in vitro* da atividade antimicrobiana de oito espécies de plantas medicinais. **Arquivo de Ciências e Saúde Unipar**, v. 11, p. 185-192, 2007.

HARTEMANN - HEURTIER, A., ROBERT, J., JACQUEMINET, S., HA VAN, G., GOLMARD, J. L., JARLIER, V., et al. Diabetic foot ulcer and multidrug-resistant organisms: risk factors and impact. *Diabetic Medicine*. 21, 710–715. 2004. doi: 10.1111/j.1464-5491.2004.01237.x

HOLETZ, F.B. et al. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Memorial do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 7, p.1027-1031, 2002.

HOOPER, D.C. Pumps, nosocomial antibiotic resistance: a primer for hospital epidemiology. **Clinical Infection Diseases**, v. 40, p.1811-1817, 2005.

HÖRNER, M.; GIGLIO, V.F.; SANTOS, A.J.R.W.A.; WESTPHALEN, A.B.; INGLESIAS, B.A.; MARTINS, P.R.; AMARAL, C.H.; MICHELOT, T.M.; REETZ, L.G.B.; BERTONCHELI, C.M.; PARAGINSKI, G.L.; HORNER, R. Triazenos e atividade antibacteriana. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, n. 3, p. 441-449, 2008.

IUCN – THE INTERNATIONAL UNION FOR CONSERVATION OF NATURE AND NATURAL RESOURCES. **Guidelines on the conservation of medicinal plants.** Gland: Switzerland. 1993. 50 p.

JACOBY G.A. Mechanisms of resistance to quinolones. **Clinical Infection Diseases**, v. 41, p. 120-26, 2005.

JACOMASSI, E.; MOSCHETA, I. S.; MACHADO, S. R. Morfoanatomia e histoquímica de *Brosimum gaudichaudii* Trécul (Moraceae). **Acta Botanica Brasilica**, v. 21, n. 3, p. 575-597, 2007.

JACOMASSI, E. **Morfoanatomia e histoquímica de órgãos vegetativos e reprodutivos de *Brosimum gaudichaudii* Trécul (Moraceae)**. 2006. 81 (Doutorado). Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista - UNESP, Bocatú, SP, Brasil.

JORGENSEN, J.H.; TURNIDGE, J.D. & WASHINGTON, J.A. Antimicrobial susceptibility tests: dilution and disk diffusion methods. In: MURRAY, R.P. et al. **Manual of Clinical Microbiology**. 7. ed. **American Society for Microbiology**, Washington DC, 1999, p.1526-43.

KARAMAN, I.; ŞAHİN, F.; GÜLLÜCE, M.; ÖGÜTÇÜ, H.; ŞENGÜL, M. ADIGÜZEL, A. Antimicrobial activity of aqueous and methanol extracts of *Juniperus oxycedrus* L. **Journal of Ethnopharmacology**, v.85, p.231-235, 2003.

KARAMAN, S.; DIGRAK, M.; RAVID, U.; ILCIM, A. Antibacterial and antifungal activity of the essential oils of *Thymus revolutus* Celak from Turkey. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 76, p. 183 - 186, 2001

KLANCNIK, A.; PISKERNIK, S.; JERSEK, B. & MOZINA, S. S. Evaluation of diffusion and dilution methods to determine the antibacterial activity of plant extracts. **Journal Microbiological Methods** 81: 121-126. 2010.

KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D.; JANDA, W.M.; SCHRECKENBERGER, P.C.; WINN JR, W.C. **Diagnóstico microbiológico**. 5a. Edição, Medsi: Rio de Janeiro, p. 1465, 2001.

KUETE, V., WANSI, J.D., MBAVENG, A.T., KANA SOP, M.M., TCHO TADJONG, A., PENLAP BENG, V., ETOA, F.X., WANDJI, J., MARION MEYER, J.J., LALL, N. Antimicrobial activity of the methanolic extract and compounds from *Teclea afzelii* (Rutaceae). **South African Journal of Botany**, v. 74, n. 4, p. 572-576, 2008.

KUETE, V., EYONG, K.O., FOLEFOG, G.N., BENG, V.P., HUSSAIN, H., KROHN, K., NKENGFAK, A.E. Antimicrobial activity of the methanolic extract and of the chemical constituents isolated from *Newbouldia laevis*. **Pharmazie**. 62, 552-556. 2007.

KUETEA, V; NGAMENI, B; SIMOC; C.C; TANKEUC, R. KENGAP; NGADJUI, B. T; MEYERD, J.J.M; LALL, N; KUIATEA, J.R.; Antimicrobial Activity of the Crude Extracts and Compounds from *Ficus Chlamydocarpa* and *Ficus Cordata* (Moraceae) - **Journal of Ethnopharmacology**, 120, 2008, p.17-24.

LAMBERT, R. J. W.; PERSON, J. Susceptibility testing accurate and reproducible minimum inhibitory concentration (MIC) and non-inhibitory concentration (NIC) values. **Journal of Applied Microbiology**, vol. 88, p. 784-790, 2000.

LANGFIELD, R.D.; SCARANO, F.J.; HEITZMAN, M.E.; KONDO, M.; HMMOND, G.B.; NETO, C.C. Use of a modified microplate bioassay method to investigate antibacterial activity in the Peruvian medicinal plant *Peperomia galioides*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 94, n. 2-3, p. 279-281, 2004.

LAZARINI, 2004. In: CAVALLAZZI, M. L. **Plantas medicinais na atenção primária à saúde**. - Florianópolis, 2006. 144 f. Dissertação (Mestrado) Centro de Ciências Médicas. Universidade Federal de Santa Catarina.

LIMA, M.R.F. et al. The antibiotic activity of some Brazilian medicinal plants. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 16, 2006. 300p.

LIMA, E.O. **Plantas e suas propriedades antimicrobianas: uma breve análise histórica**. In: YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. Plantas medicinais sob a ótica da moderna química medicinal. Chapecó: Argos. p. 481501. 2001.

LORENZI, H.; MATOS, J.F. **Plantas Medicinais no Brasil: Nativas e exóticas**. Nova Odessa. São Paulo. Brasil. 2008.

LOURENÇO, M. V. **Estudo comparativo dos constituintes químicos de Brosimum gaudichaudii Trécul e do medicamento "V"**. 141 (PhD). Instituto de Química de Araraquara, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". 2001.

MAIA-ARAÚJO, Y.L.F. Comparação entre duas técnicas utilizadas no teste de sensibilidade antibacteriana do extrato hidroalcoólico de própolis vermelha. **Scientia Plena**, 7, 046201. 2011.

MAZEN S. BADER, MD, MPH, Memorial University of Newfoundland School of Medicine, St. John's, Newfoundland, Canada. **American Family Physician**. 2008 Jul 1; 78 (1):71-79.

McKEON, J.J. PUVA for psoriasis. **American Pharmacology**, NS21, v.9, p.530-532, 1981.

MEYER, B.N.; FERRIGNI, N.R.; PUTNAM, J.E.; JACOBSEN, L.B. et al. Brine Shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta Médica**, v.45, p. 31-34, 1982.

MIMS, C.; PLAYFAIR, J. ROITT, I.; et al. **Microbiologia médica**. 2ªed. Manole: São Paulo, 1999, 584p.

MIN, L.I.; YUPING, L.A.I.; AMER, E.V.; DAVID, J.C.; DANIEL, E.S.; MICHAEL, O. Gram Positive Three-component Antimicrobial Peptidesensing System. **Proceeding National Academy Sciences**; 104: 9469-74. 2007.

MONTEIRO, M.V.M. **Estudo Químico, Avaliação da Atividade Antioxidante e Antibacteriana de Extratos Vegetais de Espécies do Gênero *Monstera* Frente a Bactérias Hospitalares** - Rio de Janeiro: UFRJ/2012. f.:127 Dissertação (mestrado)- UFRJ/ Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, 2012.

MORENO, S.; SCHEYER, T.; ROMANO, C. S. & VOJNOV, A. A. "Antioxidant and antimicrobial activities of rosemary extracts linked to their polyphenol composition". *Free Radical Research*. 40: 223–231, 2006.

MOTHANA, R.A.A.; LINDEQUIST, U. Antimicrobial activity of some medicinal plants of the island Soqotra. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 96, p. 177 - 181, 2005.

NASCIMENTO, G.G.F.; LOCATELLI, J.; FREITAS, P.C.; SILVA, G.L. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. *Brazilian Journal of Microbiology*, São Paulo, v.31, n.4, p.247-56, 2000.

O'BRIEN, J.; WILSON, I.; ORTON, T.; POGNAN, F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *European Journal of Biochemistry*, v. 267, n. 17, p. 5421-5426, 2000.

OKOBA, D. **Atividade antimicrobiana dos extratos hidroalcoólicos de frutos do pantanal: *Byrsonima cydoniifolia* A. Juss. (Canjiqueira), *Pouteria glomerata* (Miq.) Radlk. (Laranjinha de pacu) e *Vitex cymosa* Bert. (Tarumã)**. Dissertação (Mestrado em Saúde e Desenvolvimento) - Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS. 66p. 2016.

OLIVEIRA, M.C.; Vera, L.C. **Informatização do Herbário do museu nacional: *Moraceae***. Rio de Janeiro. 1997.

OSTROSKY, E.A.; MIZUMOTO, M.K.; LIMA, M.E.L.; KANECO, T.M.; NISHIKAWA, S.O.; FREITAS, B.R. Métodos para a avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CIM) de plantas medicinais. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, São Paulo, v.18, n.2, 2008.

OZER, B.; KALACHI, A.; SEMERCI, E.; DURAN, N.; et al. Infections and aerobic bacterial pathogens in diabetic foot infections. *African Journal of Microbiology Research*; 2010; 4 (20): 2153-60.

PAIVA, S.R.; FIGUEIREDO, M.R.; ARAGÃO, T.V.; KAPLAN, M.A.C. antimicrobial activity in vitro of plumbagin isolated from *Plumbago* species. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.98, p.959-961, 2003.

PALOMBO, E.A. Traditional medicinal plant extracts and natural products with activity against oral bacteria: potential application in the prevention and treatment of oral diseases. *Evidence Based Complementary and Alternative Medicine*, v. 2011, p. 1 - 15, 2011.

PALOMINO, J.C.; MARTIN, A.; CAMACHO, M.; GUERRA, H.; SWINGS, J.; PORTAELS, F. Resazurin Microtiter Assay Plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 46, n. 8, p. 2720-2722, 2002.

PATHAK, M. A.; et al. Melanogenic Potential of Various Furanocoumarins in normal and vitiginous skin. *Proc. Int. Congress "Psoralens 1988"*, v. 87, p.101, 1989.

PATHARE, N.A., BAL, A.; TALVALKAR, G.V. and ANTANI, D.U. Diabetic foot infections: a study of microorganisms associated with the different Wagner grades. **Indian. J. Pathol. Microbiol.** 41:437, 41. 1998.

PELCZAR JR, M.J.; CHAN, E.C.S.; KRIEG, N.R. **Microbiology: concepts and applications**. International Edition, 1993.

PERIM, MC. et al, 2015. Aerobic bacterial profile and antibiotic resistance in patients with diabetic foot infections. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** 48(5):546-554, Sep-Oct, 2015.

PLETSCHI, M. Compostos biologicamente ativos: A aplicação da biotecnologia à produção de compostos naturais biologicamente ativos. **Biotecnologia, ciência e desenvolvimento**, p.12-15. Disponível em: http://www.biotecnologia.com.br/revista/bio04/4hp_4.pdf. Acesso em: jul, 2016.

PINTO, T.J.A.; KANEKO, T.M.; OHARA M.T. **Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos**. 2a ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2003. 325p.

PRETTO, J. B. **Potencial antimicrobiano de extratos, frações e compostos puros obtidos de algumas plantas da flora catarinense**. 2005. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí-SC, 2005.

QA'DAN, F; THEWAINI, A.J.; ALI, D.A.; AFFI, R. et al. The antimicrobial activities of *Psidium guajava* and *Juglans regia* leaf extracts to acne-developing organisms. **The American Journal of Chinese Medicine**, 33(2): 197-204. 2005.

RABELO, C.; BARROSO, L. **Etnofarmacologia**. Disponível em: <https://www.ufmg.br/cienciaparatodos/wp-content/uploads/2011/05/03-etnofarmacologiaconhecimentopopularemparceriacomaciencia.pdf>. Acesso em: jul, 2016.

RAJA, N.S. Microbiology of diabetic foot infections in a teaching hospital in Malaysia: a retrospective study of 194 cases. **Journal Microbiology and Immunology Infect** 2007; 40: 39-44. [17 332905]

RAMAKANT, P.; VERMA, A.K.; MISRA, R.; et al., “Changing microbiological profile of pathogenic bacteria in diabetic foot infections: time for a rethink on which empirical therapy to choose?” **Diabetologia**, vol. 54, no. 1, pp. 58–64, 2011.

RAMESHKUMAR, N.; NAIR, S. *Vibrio rhizosphaerae* sp. nov., a novel red-pigmented species that antagonizes phytopathogenic bacteria. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 57: 2241–2246. 2007.

RASOANAIVO, P., et al. Whole plant extracts versus single compounds for the treatment of malaria: synergy and positive interactions. **Malaria Journal** 2011, 10 (Suppl 1):S4.

RESCHKE, A.; MARQUES, L.M.; MAYWORM, M.A.S. Atividade antibacteriana de *Ficus benjamina* L. (*Moraceae*). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 9, n. 2, p. 67-70, 2007.

RIOS, J.L.; RECIO, M.C. Medicinal plants and Antimicrobial activity - **Journal of Ethnopharmacology**, 100, 2005, p.80-84.

RIOS, J.L.; et al. Screening methods for natural products with antimicrobial activity: a review of the literature. **Journal of Ethnopharmacology**, 23: 127-149, 1988.

RODRIGUES, V. E. G.; CARVALHO, D. A. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais no domínio cerrado na região do Alto Rio Grande - Minas Gerais. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 25, n. 1, p. 102-123, 2001.

RUBIN, E; FARBER, J.L. **Patologia**. 3a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1999.

SCHAECHTER, M.; ENGLEBERG, N.C.; EISENSTEIN, B.I.; MEDOFF, G. **Microbiologia: Mecanismos das doenças infecciosas**, 3ªed. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 2002.

SADER H.S.; et al. Terapia antimicrobiana nas infecções do pé diabético. **Jornal Vascular Brasileiro**, v. 2, n. 1, p. 61 – 6, 2003.

SALAZAR-ARANDA, R.; PÉREZ - LÓPEZ, L.A.; LÓPEZ - ARROYO, J.; ALANÍSGARZA, B.A.; TORRES, N.W. Antimicrobial and antioxidant activities of plants from northeast of Mexico. **Evidence - Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2011, p. 1-6, 2009.

SANDES, A.R.R.; DI BLASI, G. Biodiversidade e Diversidade Química e Genética. **Biotecnologia**, n.13. p. 28-32, 2000

SARTORI, M.R.K. **Atividade antimicrobiana de frações de extratos e compostos puros obtidos das flores da *Acmela brasiliensis* Spreng (*Wedelia paludosa*) (*Asteraceae*)**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí-SC, 2005.

SATO, N.T.; TANAKA, H.; FUGIWARA, S.; HIRATA, M.; YAMAGUCHI, R.; ETOH, H.; TOKUDA, C. Antibacterial property of isoflavonoids isolated from *Erythrina variegata* against cariogenic oral bacteria. **Phytomedicine**, v.9, p. 427-433, 2002.

SCHAECHTER, M.; ENGLEBERG, N.C.; EISENSTEIN, B.I.; MEDOFF, G. **Microbiologia: Mecanismos das doenças infecciosas**, 3ªed., Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 2002.

SHAMI, A.M.; PHILIP, K.; MUNIANDY, S. Synergy of antibacterial and antioxidant activities from crude extracts and peptides of selected plant mixture. **BMC Complementary and Alternative Medicine**. 2013 Dec 16;13:360.

SHER, A. Antimicrobial activity of natural products from medicinal plants. **Gomal Journal of Medical Sciences**, v.7, n.1, p.72-79, 2009.

SILVA et al., 1994. In: **Estudo cienciométrico e etnobotânico sobre uma planta medicinal do cerrado mama-cadela (*Brosimum gaudichaudii* Trécul)**. ISSN 1983-4209 volume 07– número 02 – 2012.

SILVA, C.H.P.M. **Bacteriologia: Um texto ilustrado**. Eventos: Rio de Janeiro, 1999.

SILVEIRA, L.M.S. et al. Metodologias de atividade antimicrobiana aplicadas a extratos de plantas: comparação entre duas técnicas de ágar difusão. **Revista Brasileira de Farmacologia**, v. 90, n. 2, p. 124-128, 2009.

SIMÕES, C.M.O. (Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 3. ed. Porto Alegre: UFRGS, 2001.

SIVANMALIAPPAN T.S.; SEVANAN, M. Antimicrobial susceptibility patterns of *Pseudomonas aeruginosa* from diabetes patients with foot ulcers. **International Journal Microbiology**, 2011; 2011:605195.

SOUZA, T. M. **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-MIMOSOIDEAE)**. 2007. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Estadual de Paulista “Júlio Mesquita”, Araraquara - SP, 2007.

SUFFREDINI. I. B., VARELLA, A. D.; YOUNES, R.N. Minimal inhibitory concentration and minimal bactericidal concentration results from three selected antibacterial plant extracts from the Amazon and Atlantic Brazilian rain forests. **Revista Instituto Ciências e Saúde**, São Paulo, 25(2):127-9, 2007.

TAVARES, W. **Manual de antibióticos e quimioterápicos anti-infecciosos**. 3a ed. São Paulo: Atheneu; 2001.

TAVARES, W. Bactérias gram-positivas problemas: resistência do estafilococo, do enterococo e do pneumococo aos antimicrobianos. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 33, n. 3, p. 281-301, 2000.

TAVARES, W. **Manual de antibióticos e Quimioterápicos antiinfecciosos**, 2ªed., Atheneu: São Paulo, 1999, 792p.

TRABULSI, L.R.; ALTHERTHUM, F.; GOMPERTZ, O.F.; CANDEIAS, J.A.N. **Microbiologia**, 3ªed., Atheneu: São Paulo, 1999.

TRÉCUL, A. Sur la famille des Artocarpées. *Cp0''Uek0''Pcv0''Dqv.*, Sér. 3, 8: 38-157. 1847.

UBULOM PEACE; et al. Larvicidal effect of aqueous and ethanolic extracts of *Senna alata* on *Anopheles gambiae*, *Culex quinquefasciatus* and *Aedes aegypti*. **Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences**, Vol.26, No.3, May 2013, pp.561-566.

UETANABARO, A.P.T.; GÓES-NETO, A. Segurança alimentar: transferência horizontal de genes e alimentos transgênicos. **Sitientibus**, v. 35, p. 111-124, 2006.

URBANCIC-ROVAN, V., AND GUBINA, M. Bacteria in superficial diabetic foot ulcers. **Diabetical Medicine** 17:814 5. 2009.

VANDEN BERGHE, D.A.; VLIETINCK, A.J. Screening methods for antibacterial and antiviral agents from higher plants. In: DEY, P.M.; HARBONE, J.D. (Eds.). **Methods in Plant Biochemistry**. London: Academic Press, 1991. p. 47-69.

VIEIRA, I. J. C. et al. A new coumarins from *Brosimum gaudichaudii* Trecul. **Natural Products Letters**, v.13, n.1, p.47-52, 1999.

VILAS BOAS, O.M.C. **Farmacologia**. 2003. Disponível em: <http://pt.slideshare.net/pimentelwb/farmacologia-17214290>. Acesso em: jul, 2016.

VISWANATHAN, V.; JASMINE, J.J.; SNEHALATHA, C.; RAMACHANDRAN, A. Prevalence of pathogens in the diabetic foot infections in south Indian type 2 diabetic patients. **Journal Association Physicians, India**.2002; 50:1013-6.

WAREHAM, D.W. et al. Treatment of prosthetic valve infective endocarditis due to multi-resistant Gram-positive bacteria with linezolid. **Journal of Infection**. v. 52, p. 300 - 304, 2005.

WATSON, L.; DALLWITZ, M. J. The families of flowering plants: descriptions, illustrations, identification, and information retrieval. **Australian Systematic Botany** 4(4) p.681 – 695. 1992.

WILLIAMSON, E.M. Synergy and other interactions in phytomedicines. **Phytomedicine**. 2001 Sep;8(5):401-9.

WINN JÚNIOR W.; ALLEN S.; JANDA W.; KONEMAN E.; PROCOP G.; SCHRECKENBERGER, P.; WOODS, G. **Diagnóstico Microbiológico: texto e atlas colorido**. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. 1465p. 2008.

ZACCHINO, S. Estratégias para a descoberta de novos agentes antifúngicos. In: YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. **Plantas medicinais sob a ótica da moderna química medicinal**. Chapecó: Argos, 2001. p. 47-75.

8 APÊNDICES

8.1 - PARECER CONSUBSTANCIADO DO COMITÊ DE ÉTICA UFT

	CEP - COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS
PARECER CONSUBSTANCIADO	
PROJETO DE PESQUISA OU TIPO DE TRABALHO: PIBIC	PROCESSO Nº 020/2011
<p>O parecer consubstanciado do relator será utilizado como subsídio para o Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Universidade Federal do Tocantins elaborar seu parecer final.</p>	
1 - Identificação da Proposta de Projeto de Pesquisa/Trabalho de Conclusão de Curso	
<p>Título: Análise Bacteriológica dos pés Diabéticos de pacientes do Hospital Geral de Palmas e Hospital Oswaldo Cruz da cidade de Palmas - TO</p>	
<p>Coordenador do Projeto ou Professor Orientador do TCC: Maria Cristina da Silva Pranchevicius</p>	
<p>Pesquisadores: Rafael Rocha Mendes, Gabriela Oliveira Mendes e Maria Cristina da Silva Pranchevicius</p>	
<p>Curso/ Departamento/Faculdade: Medicina/ Universidade Federal do Tocantins</p>	
2 - Análise do Projeto de Pesquisa/Trabalho de Conclusão de Curso	
Relevante, informativo e gerador de conhecimento	
<p>2.1 - Objetivos e Adequação metodológica (Verificar a coerência da proposta, isto é, se estes de fato são os objetivos, compatibilidade entre os objetivos e fundamentação teórica e a metodologia ou tipo de ação, compreendendo coerência entre objetivos, procedimentos, meios de avaliação da pesquisa e capacidade do pesquisador desenvolver e fazer outros trabalhos similares.)</p>	
Sequencial, lógico e exequível.	
2.2 - Avaliação do Questionário a ser aplicado e do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	
TCLE simples; é mais uma autorização.	
2.3 - Revisão Bibliográfica	
Dentro do escopo do projeto.	
<p>3 - Qualificação do Pesquisador/Orientador (Indicar os trabalhos do Pesquisador/Orientador, salientando a atuação e experiência competitiva com o âmbito da orientação, qualificar a capacidade de produção científica/relacionar a atuação com o objeto de pesquisa/relacionar a Orientação do Curso)</p>	
O pesquisador é Doutor; varias Publicações.	
	
Parecer consubstanciado CEP - UFT - Página 1/2	

4 - Parecer conclusivo, recomendações e/ou sugestões:

Projeto bem simples;
Sugiro não aplicar questionário que se encontra em anexo, pois não está no escopo do trabalho.

5 - Petições: (Enumerar sucintamente as petições a serem sanadas pelo Coordenador do Projeto de Pesquisa/Trabalho de Conclusão do Curso)

Não se aplica

6 - Parecer Consubstanciado

Aprovado. X

Aprovado com ressalvas:

Pedência:

Não aprovado:

7 - Dados Pessoais do Membro do CEP-UFT

Nome Completo

COMITÊ DE ÉTICA em Pesquisa com Seres Humanos

Telefone(s):

(63) 99782821

Instituição:

Universidade Federal do Tocantins

Local:

Palmas/TO

Data:

06/07/2011

Assinatura:

Assinatura do Coordenador do CEP

Prof. Dr. Aparecido O. Borralhe
Presidente do Comitê de
Ética em Pesquisa
CEP-UFT

8.2 - AUTORIZAÇÃO PARA PATRIMÔNIO GENÉTICO DA PLANTA



4774244397754160

AUTORIZAÇÃO DE ACESSO E DE REMESSA DE AMOSTRA DE COMPONENTE DO PATRIMÔNIO GENÉTICO nº 010896/2013-9

O CONSELHO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO CIENTÍFICO E TECNOLÓGICO - CNPq, credenciado pelo Conselho de Gestão do Patrimônio Genético (CGEN/MMA), por meio da Deliberação CGEN nº 246, de 27 de agosto de 2009, para autorizar instituições nacionais, públicas ou privadas, que exerçam atividades de pesquisa e desenvolvimento nas áreas biológicas e afins, a acessar e remeter amostras de componente do patrimônio genético para fins de pesquisa científica sem potencial de uso econômico, neste ato representado pelo seu Diretor de Ciências Agrárias, Biológicas e da Saúde, nos termos da Portaria CNPq nº 104/2011, autoriza a instituição abaixo qualificada a acessar e remeter amostras de componentes do patrimônio genético.

Instituição: FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS - UFT

CNPJ: 051.497.260/0001-04

Representante Legal: WALDECY RODRIGUES

Cargo/Função: Pro-Reitor de Pesquisa e Pós-Graduação

CPF: 500.288.981-68 **RG:** 1674184

Projeto: Análises de substâncias de plantas, pertencentes ao Bioma Cerrado do Estado do Tocantins e de interesse ao Sistema Único de Saúde (SUS), com atividade antitumoral, citotóxica, mutagênica e antimicrobiana

Coordenador do Projeto: Maria Cristina da Silva Franchevicius

CPF: 103.549.478-77 **RG:** 173564653 - SSP / SP

Finalidade do projeto: Avaliação das atividades antimicrobiana, antitumoral, mutagênica e citotóxica, dos extratos bruto hidroalcoólico, das frações e subfrações dos extratos e dos compostos bioativos isolados das plantas *Anacardium humile* A.St-Hil.(Cajuzinho), *Brosimum gaudichaudii* Trécul (Inharé), *Davilla rugosa* Poir. (Sambalbinha), *Tabebuia avellanedae* Lorentz ex Griseb. (Ipê-roxo) encontradas no Bioma Cerrado do Estado do Tocantins.

Amostras a serem acessadas:

Grupos Taxonômicos: Espécie: *Anacardium humile* A.St-Hil. Nome popular: Cajuzinho Família: Anacardiaceae R. Br. Partes que serão utilizadas: Cascas e folhas Espécie: *Brosimum gaudichaudii* Trécul Nome popular: Inharé Família: Moraceae Gaudich. Partes que serão utilizadas: cascas e folhas Espécie: *Davilla rugosa* Poir. Nome popular: Sambalbinha Família: Dilleniaceae Salisb. Partes que serão utilizadas: cascas e folhas Espécie: *Tabebuia avellanedae* Lorentz ex Griseb. Nome popular: Ipê-roxo Família: Bignoniaceae Juss. Partes que serão utilizadas: cascas e folhas

Tipo de material/quantidade de amostras: Serão coletadas cascas e folhas, em torno de 20 ramos de cada planta.

Local de depósito de subamostra: FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS

Equipe do projeto: MARIA CRISTINA DA SILVA PRANCHEVICIUS / CPF 103.549.478-77

THIAGO ANTONIO DE SOUSA ARAUJO / CPF 007.614.904-85

ERIKA FERNANDA DE FARIA / CPF 036.288.301-75

THIESSA RIBEIRO VIEIRA / CPF 032.372.131-10

JOELMA DA COSTA BORGES / CPF 937.632.801-97

MICHELE CEZIMBRA PERIM / CPF 939.207.841-20

VIRGILIO RIBEIRO GUEDES / CPF 794.533.926-34

JAIR PEREIRA DA CUNHA JUNIOR / CPF 986.867.126-49

Validade da Autorização: 10/01/2014 a 10/01/2017

A instituição acima qualificada deverá enviar ao CNPq, por meio do Coordenador do Projeto, relatório anual sobre o andamento do projeto de pesquisa, nos termos do Decreto nº. 4.946/2003. O roteiro para confecção do relatório está disponível em <http://www.cnpq.br/web/guest/relatorio-de-atividades>. Os relatórios devem ser enviados ao CNPq em meio eletrônico, para o endereço app@cnpq.br e, preferencialmente, em formato .pdf.

Esta autorização está vinculada às informações, declarações e termos de compromisso firmados pelo coordenador do projeto e pelo representante legal, constantes do Processo nº 010896/2013-9. Atividades de acesso aos conhecimentos tradicionais associados, de acesso e de remessa de componente do patrimônio genético com finalidade comercial, aplicação industrial, bioprospecção ou desenvolvimento tecnológico não estão autorizadas.

Caso seja identificado uso econômico de produto ou processo, passível ou não de proteção intelectual, originado das amostras de componente do patrimônio genético acessado no âmbito desta autorização, a instituição beneficiada se compromete a adotar as providências cabíveis, nos termos da legislação vigente, junto ao CGEN/MMA.

Se ocorrer coleta de espécie não autorizada ou não identificada, deverá ser observado o que consta no Decreto nº 6.514, de 22/07/2008, no que refere à flora e fauna, e em particular sobre espécies ameaçadas de extinção ou de endemismo estrito.

A remessa de amostra de componente do patrimônio genético deverá ser precedida da assinatura do Termo de Transferência de Material (TTM) ou do Termo de Responsabilidade para Transporte de Amostra de Componente do Patrimônio Genético (TRTM). A remessa para instituições nacionais está isenta de autorização prévia. Contudo, a remessa para instituições sediadas no exterior depende de autorização prévia do CNPq, nos termos das resoluções do CGEN 15/2004 e 20/2006. Os modelos dos termos, assim como as citadas resoluções, estão disponíveis em <http://www.cnpq.br/web/guest/remessa-e-transporte> e devem ser enviados ao CNPq em meio eletrônico para o endereço app@cnpq.br, preferencialmente em formato .pdf. Ainda, para a remessa de componente do patrimônio genético para instituição sediada no exterior, deverá ser solicitada ao Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - IBAMA, por meio de formulário específico e mediante a apresentação de TTM ou TRTM, licença de exportação complementar a autorização de remessa, especialmente quando se tratar de remessa de espécies constantes nos Anexos da Convenção sobre o Comércio Internacional das Espécies da Flora e Fauna Selvagens em Perigo de Extinção (Cites).

Brasília, 05 de Dezembro de 2013

Raquel de Andrade Lima Coelho
Diretor de Ciências Agrárias, Biológicas e da Saúde

Para visualizar a versão digital da Autorização de Acesso e de Remessa de Amostra de Componente do Patrimônio Genético, V.Sa. poderá utilizar a ferramenta disponibilizada pelo CNPq para esse fim na página <http://servicosweb.cnpq.br/visualizador/v/a> e informar o número do protocolo 4774244327754160 para recuperá-la do banco de dados do CNPq, ou poderá selecionar o arquivo salvo em seu computador (em formato PKCS7). V.Sa. pode também usar outro aplicativo disponível no mercado capaz de reconhecer arquivos no padrão PKCS7 para fazer a visualização e extração do documento.

9. ANEXO

9.1 ARTIGO SUBMETIDO

Chemistry and Biodiversity

Evaluation of Antibacterial Activity of the Bark and Leaves Extracts of *Brosimum gaudichaudii* Trécul Against Multi Drug Resistant (MDR) Strains –Manuscript Draft–

Manuscript Number:	
Article Type:	Full Paper
Corresponding Author:	Maria Cristina da Silva Pranchevicius, Ph.D Universidade Federal de Sao Carlos SAO CARLOS, SP BRAZIL
Corresponding Author E-Mail:	mcspiano@gmail.com
Other Authors:	Joelma da Costa Borges, Master Degree Michele Cazimbra Perlm, Master Degree Rodrigo Orlandini de Castro, PhD Thiago Antônio de Sousa Araújo, PhD Tadeu José da Silva Peixoto Sobrinho, PhD Ana Carolina Oliveira da Silva, Doctor of Medicine Solange Cristina Carneiro, PhD Sandra Maria Botelho Mariano, PhD
Keywords:	<i>Brosimum gaudichaudii</i> Trécul; multiresistant bacterial strains; antimicrobial activity
Manuscript Classifications:	Antibiotics; Biological activity; Drug discovery; Natural products
Suggested Reviewers:	<p>Delmo Correia Filho, PhD Principal Investigator, Universidade Federal do Triângulo Mineiro delmo@rsbmt.uftrm.edu.br The researcher is a physician who specialized in treatment and management of a range of infectious diseases.</p> <p>Foued Salmen Espindola, PhD Principal Investigator, Universidade Federal de Uberlândia foued@ufu.br The researcher is a natural product specialist.</p>
Opposed Reviewers:	
Abstract:	<p><i>Brosimum gaudichaudii</i> Trécul belongs to the plants family Moreaceae, and it is found throughout Brazilian cerrado. Antimicrobial activity of ethanol extracts obtained from bark and leaves of <i>B. gaudichaudii</i> was tested against 68 multiresistant bacteria strains isolated of diabetic foot infection and 6 others bacterial reference strains. Thus, antimicrobial activity of the extracts was evaluated by agar disk-diffusion, broth dilution and minimum bacterial concentration methods. The results indicated that bark extracts contained great antimicrobial activity against both gram-positive and gram-negative bacteria strains when compared to leaves extracts. Additionally, increased antimicrobial activity was observed when leaves extracts were tested against <i>S. aureus</i> and <i>Pseudomonas aeruginosa</i>. The antimicrobial activity found in the extracts from the bark and leaves were more suitable when it was defined by microdilution method. Significant correlation was also observed between the extracts from the bark and antibiotics against gram-positive bacteria strains. Similar, it was also observed between bark and leaves extracts against both gram-positive and gram-negative strains. These results suggest the presence of bioactive compounds containing antimicrobial activity in extracts obtained from the bark and leaves of <i>Brosimum gaudichaudii</i>. Furthermore, these extracts suggest pharmacological potential for the development new drugs to treat infections caused by multiresistant bacteria.</p>
Author Comments:	Dear Editor I am enclosing herewith a manuscript revised entitled "Evaluation of Antibacterial

	<p>Activity of the Bark and Leaves Extracts of <i>Brosimum gaudichaudii</i> Trécul Against Multi Drug Resistant (MDR) Strains" for possible publication in <i>Journal Chemistry & Biodiversity</i>. In this paper we seek analyze the antimicrobial activity of ethanol extracts obtained from bark and leaves of <i>B. gaudichaudii</i>, which are distributed in the Cerrado region of Brazil. Considering the Cerrado has one of the greatest biodiversity of plants among the different Brazilian biomes and there are a limited number of studies on the therapeutic potential of this plant, especially on antibacterial activity, the publication of our data in <i>Chemistry & Biodiversity</i>, will contribute to a better understanding of its therapeutic use. With the submission of this manuscript I would like to undertake that this manuscript has not been published, accepted for publication and that the authors did not declare any competing interests.</p>
Additional information:	
Question	Response
Dedication	
Submitted solely to this journal?	Yes
Has there been a previous version?	No

Title page**Evaluation of Antibacterial Activity of the Barks and Leaves Extracts of *Brosimum gaudichaudii* Trécul Against Multi Drug Resistant (MDR) Strains**

Joelma da Costa Borges^a)¹), Michele Cezimbra Perim^b)¹), Rodrigo Orlandini de Castro^c), Thiago Antônio de Sousa Araújo^a)^d), Tadeu José da Silva Peixoto Sobrinho^d), Ana Carolina Oliveira da Silva, Sandra Maria Botelho Mariano^a), Solange Cristina Carreiro ^e), Maria-Cristina da Silva Pranchevicius^{*a})^b)^f)

^a Curso de Mestrado Profissional em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Tocantins. Av. NS 15 s/n (109 Norte), Palmas-Tocantins 77010-210, Brazil (phone: +55-63-98137-8805, e-mail: joelmacb@mail.uft.edu.br)

^b Curso de Doutorado em Biodiversidade e Biotecnologia da Universidade Federal do Tocantins. Rede de Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia Legal. Av. NS 15 s/n (109 Norte), Palmas-Tocantins 77010-210, Brazil (phone: +55-63-99237-2687, e-mail: michelle@mail.uft.edu.br)

^cOklahoma Medical Research Foundation. Cell Cycle and Cancer Biology Research Program. 825 NE 13th Street, Oklahoma City, OK 73104, United States of America (phone: +1-405-496-3446, e-mail: decastror@omrf.org)

^dDepartamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências da Saúde. Rua Prof. Artur de Sá S/N, Cidade Universitária, Recife-PE. CEP: 50740-521, thiagocaruaru@hotmail.com@mail.uft.edu.br)

^eCurso de Mestrado em Agroenergia da Universidade Federal do Tocantins. Av. NS 15 s/n (109 Norte), Palmas-Tocantins 77010-210, Brazil (phone: +55-63-99222-7656, e-mail: solange@mail.uft.edu.br)

^{*f} Departamento de Genética e Evolução. Universidade Federal de São Carlos. Rod. Washington Luis, km 235, São Carlos-SP 13565-905, Brazil (phone: +55-63-99246-7525, e-mail: mcspranc@gmail.com)

¹) These authors contributed equally to this work and their names were order alphabetically.

^{*f}) Maria Cristina da Silva Pranchevicius: corresponding author.

Abstract

Brosimum gaudichaudii Trécul. belongs to the plants family Moreaceae, and it is found throughout Brazilian cerrado. Antimicrobial activity of ethanol extracts obtained from barks and leaves of *B. gaudichaudii* was tested against 68 multiresistant bacteria strains isolated of diabetic foot infection and 6 others bacterial reference strains. Thus, antimicrobial activity of the extracts was evaluated by agar disk-diffusion, broth dilution and minimum bacterial concentration methods. The results indicated that barks extracts contained great antimicrobial activity against both gram-positive and gram-negative bacteria strains when compared to leaves extracts. Additionally, increased antimicrobial activity was observed when leaves extracts were tested against *S. aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. The antimicrobial activity found in the extracts from the barks and leaves were more suitable when it was defined by microdilution method. Significant correlation was also observed between the extracts from the barks and antibiotics against gram-positive bacteria strains. Similar, it was also observed between barks and leaves extracts against both gram-positive and gram-negative strains. These results suggest the presence of bioactive compounds containing antimicrobial activity in extracts obtained from the barks and leaves of *Brosimum gaudichaudii*. Furthermore, these extracts suggest pharmacological potential for the development new drugs to treat infections caused by multiresistant bacteria.

Keywords: *Brosimum gaudichaudii* Trécul., multiresistant bacterial strains, antimicrobial activity.

1 Introduction

Diabetic foot infections (DFIs) constitute a major clinical and financial burden to the diabetic patients [1-4] and antibiotic resistance is considered to be a major threat in the treatment of DFI [5]. Emergence of resistance to multiple antimicrobial agents in pathogenic bacteria has become a significant public health threat as there are fewer, or even sometimes no, effective antimicrobial agents available for infections caused by these bacteria [6]. Historically plants have provided a great source of anti-infective compounds and searching for plants with antimicrobial activities has gained importance during recent years [7].

Several studies have evaluated the biodiversity richness of Brazilian flora, which is predicted to have great pharmacological potential of the plants that occur in the different ecosystems [8-9] especially plants belonging to the Cerrado biome. The *Brosimum gaudichaudii* Trécul. (BG), a plant belongs to Moreaceae family, is very abundant in the Cerrado region and Northeast of Brazil. This plant, which is also known as "inharé", "mamica de cadela", "mamacadela" and "algodão" (cotton), is used as a popular medicine [10-13]. Studies with *B. gaudichaudii* have shown the presence of phenolic compounds in all of the plant structures, including the reproductive parts, and the production of these compounds can be demonstrated by the presence of phenolic idioblasts [14-15]. Among these compounds, the best known are bergapten and psoralen, which are furocoumarins used in the treatment of vitiligo [11-12], [16-17].

There are limited number of studies which emphasis the remarkable therapeutic potential of *B. gaudichaudii* [18-19]. Thus, we investigated, *in vitro*, the possible antimicrobial activity of ethanol extracts from the barks and leaves of *B. gaudichaudii*. These tests were performed against a total of 68 multiresistant bacteria strains, which includes gram-positives and gram-negatives, isolated from

injuries to the feet of diabetic patients [20]. Also, six other strains obtained from the American Type Culture Collection were included in the tests. Thus, this study demonstrated that there was antimicrobial activity in extracts derived from barks and leaves of *B. gaudichaudii*, suggesting that the characterization of these bioactive compounds pharmacological has great potential for the developments of new therapies to treat infections caused by multiresistant bacteria.

2 RESULTS AND DISCUSSION

Several methods have been described in screenings to discover new compounds that contains antimicrobial activity from plant extracts [21]. Among these, the most frequently used are the disk-diffusion (DD) and broth dilution methods (BD) [21]. In this study, the analysis of potential antimicrobial activity in ethanol extracts from the leaves or barks of *B. gaudichaudii* was tested against 68 multiresistant bacteria strains isolated from injuries to the feet of diabetic patients and 6 others strains as described in Methods. Therefore, antimicrobial activity was observed when bacteria strains were incubated with the concentrations of leaves extracts tested. Extracts from the leaves showed similar antimicrobial activity in both gram-positive (50%) and gram-negative (42.31%) strains. More satisfactory antimicrobial activity was observed when these analyzes were performed using BD method compared to DD method, which demonstrated reduced antimicrobial activity in gram-negative strains (23.08%) (table 1). This could be due to the polarity of the other compounds present affecting the diffusion of bioactive elements in low concentration of the extracts [22]. Compounds containing low polarity have reduced diffusion while highly charged elements have better diffusion, what may cause false negative results in studies using simple extracts [23]. Similar results have been

reported in studies where plant extracts demonstrate higher antimicrobial activity against gram-positive bacteria [24-25]. It has been hypothesized that the reduced antimicrobial efficiency in gram-negative bacteria is due to the lipopolysaccharide layer covering peptidoglycan outer cell membrane, which blocks the access of bioactive compounds [26]. In contrast, gram-positive bacteria contain only a thin layer of peptidoglycan between the membranes allowing better permeability of antimicrobial compounds [27-29].

Ethanol extracts obtained from the barks of *B. gaudichaudii* demonstrated antimicrobial activity against both gram-positive and gram-negative strains (42.31% e 53.85%, respectively) when tested using BD or DD (50% e 45.83%, respectively) methods (table 2). This suggested that extracts obtained from the barks of the plant represent a potential pharmacological target to isolate bioactive agents and develop treatment for infections caused by both gram-negative and gram-positive bacteria. Although no bioagent has been isolated during our study which was only based on assays using crude extract from *B. gaudichaudii*, medicinal plants contain a rich variety active compounds with antimicrobial properties [30]. It has been demonstrated that extracts of *B. gaudichaudii* contain great variety of secondary metabolites that, indeed, can be related to the antimicrobial activity shown in our study [19]. Therefore, more studies are required to isolate and test antimicrobial compounds from extracts of *B. gaudichaudii*.

During the last few years, a threatening number of multiresistant bacteria strains have been reported by health organizations, which have caused limitations to treat infections by the commercial available antibiotics. A large number of those strains are found in injuries on the feet of diabetic patients. Thus, it is essential the development of alternative treatments and searching for antimicrobial compounds

to treat these patients. In this kind of injuries, gram-positive bacteria such as *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus* beta hemolytic (groups A, B, C and G) represent most of the pathogens that are isolated and characterized [31-33]. In the group of gram-negatives, the most frequent bacteria strains isolated are *Enterococci*, *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa*, and non-fermentative strains [34]. In this study, it was observed significant antimicrobial activity present in both barks and leaves extracts against *S. aureus* isolated from clinical patients [20] and strains acquired from ATCC when analysed by BD (63.64%) and DD (100%) methods (Table 3). Barks extracts were more efficient to inhibit of *Streptococcus* beta hemolytic growth (100%) while in leaves this inhibition was 50% (DD method). Also, the results demonstrated that barks extracts had great antimicrobial activity against gram-negative bacteria when compared to extracts from the leaves. Analysis using BD and DD methods showed that leaves extracts was able to inhibit 66,67% of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from clinical patients. This pathogen is highly resistant to most of broad-spectrum antibiotics [35-36]. Extracts from the leaves also inhibited growth of *E. coli* strains isolated from clinical patients. (BD-100% e DD-50%). In the control strain, this inhibition was 100% for both BD and DD methods. *Citrobacter* sp growth was 50% inhibited by barks extract while no antimicrobial activity was observed by leaves extracts. Barks extracts was able to inhibit 57.14% (BD-method) *Proteus* sp growth isolated from clinical patients. This strain has been characterized as multiresistant for the most antibiotics used in ulcer treatment [20]. Therefore, these demonstrated a potential pharmacological target to isolate compounds from *B. gaudichaudii* to develop treatment for this type of infection. Our results showed that standard ATCC strains of Gram-positive bacteria were more sensitive than Gram-negative ones towards the plant extracts studied.

These data are supported by other studies [37-38]. Some other studies have proposed a mechanism of the antimicrobial effects involves inhibition of various cellular processes, followed by an increase in plasma membrane permeability and finally ion leakage from the cells [39].

The differences in the results observed when distinct methods, BD and DD, were used to analyze antimicrobial activity in the plant extracts emphasizes the importance to develop a better understanding of the current methods available for screening and/or quantifying the antimicrobial effect of an extract or a pure compound for its applications in human health [40]. The analysis of correlation between the results and the methodologies applied in our study were made using Spearman method and adjusted by Bonferroni indices. Statistical analysis showed on table 4 indicated the leaves extracts of *B. Gaudichaudii* significant correlation between results obtained using BD and DD methods following the minimum inhibitory concentration (MIC) up to 0.312 mg/ml. Holetz and collaborators [41] indicate antimicrobial activity is considered excellent for MIC below 0.1mg/mL, moderated when MIC is between 0.1-0.5mg/mL, weak 0.5-1mg/mL and inexistent when MIC is above 1 mg/ML [42-43]. Studies using BD method [44] have reported that antimicrobial activity may vary from 0.25 to 0.4mg/mL while for DD methods this variation is between 100 to 300 mg/mL. Thus, the antimicrobial activity found at concentrations extracts from the barks and leaves indicated these indeed contain bioactive compounds when comparing results from both BD and DD methods. Although, the results analyzed from leaves extracts did not indicated good correlation between both methods. This suggests that the concentration of antimicrobial compounds could be associated with the variation in the amount of

phytoconstituents present in barks and leaves *B. Gaudichaudii* [19]. In addition, to analyze antimicrobial activity, some studies suggest to use DD method [45-46], while others suggest that microdilution method should be used [47]. Therefore, our observations indicated that both methodologies should be used in order to obtain reliable results to measure antimicrobial activity from plant extracts. These allow proper correlation analysis to compare the results and phytochemistry.

According to the minimum bactericidal concentration (MBC), it was observed that, in both barks and leaves extracts, bacteria viability direct followed the concentration of the extracts used on the experiments. The MCB obtained for gram-negative bacteria was 0.0390625mg in barks extracts while in extracts from the leaves it was 0.15625 mg (data not shown). These results are in agreement with studies reported by Suffredini, Varella, Younes [48], suggest that higher concentration of extracts is required to archive antimicrobial activity due tolipopolysaccharide layer recovering peptidoglycan outer cell membrane, which hamper the access of bioactive compounds. The MCB observed for gram-positive strains was 0,15625 mg in both barks and leaves extracts, which is in agreement with other studies that demonstrate an MBC clavulanic acid value is lower than 4-folds of MIC value [49-52].

To demonstrate the efficiency of the antimicrobial activity observed in the barks and leaves extracts, we performed experiments using the concentrations of the extracts and the following antibiotics: amoxicillin and clavulanic acid against gram-positive bacteria and cefoxitin against gram-negative bacteria. Thus, Fisher exact test was performed (Table 5). Statistical analysis of the correlation between barks extracts and the antibiotics, observed in gram-negative bacteria, had p-value

of 0.56 (one tail) and for the leaves it was 0.268 (one tail), both with significance level of 5%. These did not demonstrated evidences that the antimicrobial effect present in the extracts was correlated to cefoxitin, which indicated independent effects. Nevertheless, statistical analysis of the results obtained in experiments with gram-positive bacteria showed p-value of 0.06 (one tail) for the correlation between barks extracts and antibiotics while for the leaves the p-value was 0.004 (one tail), both considering 5% of significance level. This demonstrated dependent variables and, in fact, there was correlation of the extracts and the antibiotics (amoxicillin and clavulanic acid) to inhibit gram-positive bacteria growth. Currently, several studies have demonstrated synergistic, additive or deleterious effect between antibiotics and bioactive extracts from plants [53-54]. Moreover, the results suggested the barks extracts from *B. gaudichaudii* may contain bioactive compounds that, together antibiotics, could have its activity potentiated. The analysis of the correlation between barks and leaves extracts observed in gram-negative bacteria had p-value of 0.012 (one tail) while gram-negative bacteria this was 0.000 (one tail), both with significance level of 5%. Unlike superior animals, plants do not have an adaptive immunological system against macro or microorganism that led to establishment of phytochemistry compounds as a mechanism of defense.

In conclusion, this study demonstrated that there was antimicrobial activity in extracts derived from barks and leaves of *B. gaudichaudii*, suggesting that the characterization of these bioactive compounds pharmacological has great potential for the development of new drugs to treat infections caused by multiresistant bacteria.

Acknowledgements

The authors wish to thank the Secretaria de Saúde do Estado do Tocantins (Health Department of the State of Tocantins), SESAU–TO and Thiago de Cesaro for facilitating the development of project and the Laboratório Central de Saúde Pública do Tocantins (LACEN-TO) who kindly provided the control strains.

Financial Support

This work was supported by grants from CAPES (AUX-PE-PNPD 2535/2011 Process N: 23038.007229/2011/12) – Brazil and CNPq (Chamada Universal, Process N: 485873/2013-3) – Brazil. JCB, MCP, ROC, TASA, TJSPS, SMBM, SCC and MCSP are thankful to CAPES and CNPq.

Experimental Part

Study design

Ethanol extracts of the barks and leaves of *B. gaudichaudii* were tested against a total of both 68 clinical strains (*Citrobacter* sp; *Escherichia coli*, *Enterobacter* sp, *Proteus* sp, *Pseudomonas* sp, alpha-hemolytic *Streptococcus*, beta-hemolytic *Streptococcus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprofiticus*, *Staphylococcus aureus*), isolated from diabetic foot patients [20], and 6 reference strains from the American Type Culture Collection (*Escherichia coli* - 25922, *Pseudomonas aeruginosa* - 27853, *Proteus mirabilis* - 12453), *Citrobacter yougae* - 29935, *Staphylococcus aureus*- 25923, *Streptococcus pyogenes*- 0015). Preliminary phytochemical investigations of *B. gaudichaudii* was made for Araújo [19] and showed that the extract from the barks displayed a great diversity of secondary metabolites with the presence of 11 classes, the leaves exhibited high mean values of condensed tannins, flavonoids and coumarins.

Sample collection and preparation of extracts

The barks and leaves of *B. gaudichaudii* for the preparation of voucher specimens and production of the extracts was collected from January to June, 2013 in the city of Palmas, Tocantins State, Brazil (10°10'58.45" S and 48°17'33.75" W). This plant was chosen because they occur in high numbers throughout the Cerrado and there is a lack of studies analyzing their medicinal potential.

The plant parts were dried in a forced air oven at $40 \pm 2^\circ\text{C}$, pulverized in a vertical knife mill and then standardized in sieves (#18 US mesh) to yield a grain size of 1 mm. The extracts were prepared by maceration with ethanol for 48 hours (1:20, w/v), and then the material was filtered through filter paper and evaporated under reduced pressure at $40 \pm 2^\circ\text{C}$ until a dry extract was formed [55].

Preparation of inoculum

All strains were maintained in Nutrient Broth at 4°C and activated on Mueller Hinton Agar (MHA) (Kasvi, Brazil) plates 24 h prior to any antimicrobial test. Active cultures for experiments were prepared by transferring a loopful of cells from the stock cultures to test tubes of Mueller-Hinton broth (MHB) (Kasvi, Brazil) and incubated without agitation for 24 hrs at 37°C . The cultures were diluted with fresh Mueller-Hinton achieve optical densities corresponding to 2.0×10^6 colony forming units (cfu/ml) for bacteria species [56].

Disk diffusion assay

The disc diffusion method [57] were performed as previously described [58-59]. In vitro antimicrobial activity was screened by using MHA. The MHA plates were prepared by pouring 25 ml of molten media into sterile petriplates. The inoculum suspension (1.0 ml) was swabbed uniformly and the inoculum was allowed to dry

for 5 minutes. Sterile commercial blank discs (Oxoid), 6.0 mm diameter, were impregnated with different dilutions of the extracts ranging from 20 mg/ml to 0.036 mg/ml. Pure DMSO-impregnated disc was used as a negative control, while Cefoxitin disks (3000 mg/ml to 1.5 mg/ml) and Amoxicillin/Clavulanic Acid (2000 mg/ml to 0.9 mg/ml) were used as a positive control for gram negative and gram positive bacteria, respectively. The plates were kept for incubation at 37°C for 24 and 48 hrs. At the end of incubation, inhibition zones formed around the disc were measured with calipers. All tests were done in triplicate and the results were recorded as the mean diameter (mm) of the zones of growth inhibition surrounding the discs. The antibacterial activity was classified into the following types, such as >14 mm zone of inhibition –high sensitive, 9-13 mm zone inhibition-moderately sensitive, 6-8 mm zone of inhibition – less sensitive and <6 mm zone of inhibition – resistant [60].

Determination of Minimum Inhibitory Concentration and Minimum Bactericidal Concentration

The Minimum Inhibitory Concentration (MIC) was determined by broth microdilution technique using 96-well plates [61-63]. 100 µl of the (2mg/ml) crude extract were serially diluted two-fold with sterile distilled water in 96-well microtitre plates and 100 µl bacterial culture in MHB (Kasvi, Brazil) was added to each well. The densities of bacterial cultures were approximately 1.0×10^8 cfu/ml, obtained by adding 99 ml of MHB to 1 ml of each microorganism from the freshly prepared overnight bacterial culture in MHB [61], [64]. The microtitre plates were incubated overnight at 37°C [61]. Afterwards, 30 µl of Resazurin (7-Hydroxy-3H-phenoxazin-3-one 10-oxide) was added to each well to indicate microbial growth.

The microtitre plates were further incubated at 37°C for 2 h. The colour change in the well was then observed visually. Any colour change observed from purple to pink or colourless was recorded as positive [65]. The lowest concentration of plant leaf extract at which colour change occurred was recorded as the MIC value [66]. All the experiments were performed in triplicates. The final concentration of the extracts used to evaluate the antimicrobial activity ranged from 20 to 0.036 mg/ml. Cefoxitin and Amoxicillin/Clavulanic Acid, used as a positive control for gram negative and gram positive bacteria, respectively, were at the same concentration (20 to 0.036 mg/ml). DMSO were used as negative control. The Minimum Bactericidal Concentration (MBC) were determined by sub-culturing the test dilutions on to a fresh solid medium and incubated further for 18-24 h. The highest dilution that yielded no bacterial/fungal growth on solid medium was taken as MBC [37], [48].

Statistical Analysis

Data processing and analysis were conducted using tools from Microsoft Excel, GraphPad Prism, STATA 12 and XLStat. Spearman's correlation coefficient and Fisher exact test were also used, in accordance with the objectives of the analyses and nature of the data.

References

- [1] k. Bakker, W.H. Van Houtum, P.C. Riley. The international diabetes federation focuses on the diabetic foot. *Curr. Diab. Rep.* 5, **2005**. 436–440.
- [2] N. Singh, D.G. Armstrong, B.A. Lipsky. Preventing foot ulcers in patients with diabetes. *J. Am. Med. Ass.* 293, **2005**. 217–228.
- [3] V. Turhan, M. Mutluoglu, A. Acar, M. Hatipoglu, Y. Onem, G. Uzun. Increasing incidence of Gram-negative organisms in bacterial agents isolated from diabetic foot ulcers. *J. Infect. Dev. Ctries.* 15, **2015**. 707–712.
- [4] S.K. Shahi, A. Kumar. Isolation and Genetic Analysis of Multidrug Resistant Bacteria from Diabetic Foot Ulcers. *Front Microbiol.* **2016** Jan 5;6:1464. doi: 10.3389/fmicb.2015.01464.
- [5] B.A. Lipsky. Empirical therapy for diabetic foot infections: are there clinical clues to guide antibiotic selection. *Clin. Microbiol. Infect.* 13, **2007**. 351–353.
- [6] A.P. Magiorakos, A. Srinivasan, R.B. Carey, Y. Carmeli, M.E. Falagas, C.G. Giske, S. Harbarth, J.F. Hindler, G. Kahlmeter, B. Olsson-Liljequist, D.L. Paterson, L.B. Rice, J. Stelling, M.J. Struelens, A. Vatopoulos, J.T. Weber, D.L. Monnet. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect.* **2012** Mar;18(3):268-81. doi: 10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x. Epub 2011 Jul 27.
- [7] J.C. Assob, H.L. Kamga, D.S. Nsagha, A.L. Njunda, P.F. Nde, E.A. Asongalem, A.J. Njouendou, B. Sandjon, V.B. Penlap. Antimicrobial and toxicological activities of five medicinal plant species from Cameroon traditional medicine. *BMC Complement Altern Med.* **2011** Aug 25;11:70.

[8] U.P. Albuquerque, J.M. Monteiro, M.A. Ramos, E.L.C. Amorim. Medicinal and magic plants from a public market in northeastern Brazil. *J. Ethnopharmacol.* **2007**. doi:10.1016/j.jep.2006.09.010.

[9] L.C. Di-Stasi. An integrated approach to identification and conservation of medicinal plants in the tropical forest – a Brazilian experience. *Plant Genetic Resources* 3: **2005**. 199 a 205.

[10] M. Macedo, A.R. Ferreira. Plantas hipoglicemiantes utilizadas por comunidades tradicionais na Bacia do Alto Paraguai e Vale do Guaporé, Mato Grosso-Brasil. *Rev Bras Farmacogn* 14(Supl. 1): **2004**. 45-47.

[11] M.F. Agra, P.F. França, J.M. Barbosa-Filho. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. *Rev Bras Farmacogn* 17: **2007**.114-140.

[12] M.F. Agra, K.N. Silva, I.J.L.D. Basílio, P.F. França, J.M. Barbosa-Filho. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. *Rev Bras Farmacogn* 18: **2008**. 472-508.

[13] L. C. da Cunha, J. R. de Paula; V. A. de Sá; M. E. P. Amorim, I. C. M. Barros; L. A. B. Brito; N. Silveira. Acute toxicity of *Brosimum gaudichaudii* Trécul. root extract in mice: determination of both approximate and median lethal doses. *Rev. bras. farmacogn.* vol.18 no.4 João Pessoa Oct./Dec. **2008**
<http://dx.doi.org/10.1590/S0102-695X2008000400006>

[14] E. Jacomassi, I.S. Moscheta, S.R. Machado. Morfoanatomia e histoquímica de *Brosimum gaudichaudii* Trécul. (Moraceae). *Acta Bot. Braz.* 21(3): **2007**. 575-597.

[15] E. Jacomassi, I.S. Moscheta, S.R. Machado. Morfoanatomia e histoquímica de órgãos reprodutivos de *Brosimum gaudichaudii* (Moraceae). *Rev. Braz. Bot.* 33: **2010**. 115-129.

[16] M. Macedo, A.R. Ferreira. Plantas medicinais usadas para tratamentos dermatológicos, em comunidades da Bacia do Alto Paraguai, Mato Grosso. *Rev Bras Farmacogn* 14 (Supl. 1): **2004**. 40-44.

[17] M.L.P., Neves, P.G.F. Neto, S.M.S. Silva, J.M. Araújo. Ensaio para detectar bergapteno na casca e no caule de *Brosimum gaudichaudii* Trec através da produção de melanina em actinomicetos. Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 12, supl., p. 53-54, **2002**. ISSN: 0102-695X.

[18] G.L. Pozetti, *Brosimum gaudichaudii* Trecul (Moraceae): da planta ao medicamento. *Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.*, v. 26, n.3, p. 159-166, 2005.

[19] T.A.S.Araujo, T.J.S. Peixoto Sobrinho, J.S. Aguiar, A.C.O. Silva, F.U. Brito, T.G. Silva, E.L.C. Amorim, M.C.S. Pranchevicius. Phytochemical, antioxidant and cytotoxic analysis of Brazilian cerrado plants: Preliminary evidence of their antitumor activity. *Journal of Medicinal Plant Research*, v. 9, p. 310-319, **2015**.

[20] M.C. Perim, J.C. Borges, S.R.C. Celeste, E.F. Orsolin, R.R. mendes, G.O.Mendes, R.L.Ferreira, S.C. Carreiro, M.C.S. Pranchevicius. Aerobic bacterial profile and antibiotic resistance in patients with diabetic foot infections. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*48(5):546-554, Sep-Oct, **2015**.

[21] M. Balouiri, M. Sadiki, S. K. Ibsouda. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis* Volume 6, Issue 2, April **2016**, Pages 71–79

[22] A. Klancnik, S. Piskernik, B. Jersek, S.S. Mozina. Evaluation of diffusion and dilution methods to determine the antibacterial activity of plant extracts. *J Microbiol Methods* 81: **2010**. 121-126.

[23] S. Moreno, T. Scheyer, C.S. Romano, A.A. Vojnov. Antioxidant and antimicrobial activities of rosemary extracts linked to their polyphenol composition " *Free Radic. Res.* 40: **2006**. 223–231.

[24] B. Biswas, K. Rogers, F. Mclaughlin, D. Daniels, A. Yadav. Antimicrobial Activities of Leaf Extracts of Guava (*Psidium guajava* L.) on Two Gram Negative and Gram-Positive Bacteria. *International Journal of Microbiology*. 7 p. **2013**.

[25] Ubulom Peace. Larvicidal effect of aqueous and ethanolic extracts of *Senna alata* on *Anopheles gambiae*, *Culex quinquefasciatus* and *Aedes aegypti* .*Pak. J. Pharm. Sci.*, Vol.26, No.3, May **2013**, pp.561-566

[26] M.R.W. Brown. *The role of the cell envelope in resistance*, p. 71-107.**1975**.

[27] S. Burt. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods a review, *International Journal of Food Microbiology*, vol. 94, no. 3, pp. 223–253, **2004**.

[28] F. Qa'dan, A.J. Thewaini, D.A. Ali, R. Affi. The antimicrobial activities of *Psidium guajava* and *Juglans regia* leaf extracts to acne-developing organisms. *Am J Chin Med*, 33(2): 197-204.**2005**.

[29] N. Rameshkumar & S. Nair. *Vibrio rhizosphaerae* sp. nov., a novel red-pigmented species that antagonizes phytopathogenic bacteria. *Int J Syst Evol Micr*57: 2241–2246. **2007**.

[30] A. Sher. Antimicrobial activity of natural products from medicinal plants. *Gomal Journal of Medical Sciences*, v.7, n.1, p.72-79, **2009**.

[31] S. Mazen, M.D. Bader. Memorial University of Newfoundland School of Medicine, St. John's, Newfoundland, Canada. *Am Fam Physician*. **2008** Jul 1;78(1):71-79.

[32] A.T. EL-Tahawy. Bacteriology of diabetic foot. *Saudi Med*. 21:344 7. **2000**.

[33] V. Urbancic-Rovan, AND M. Gubina. Bacteria in superficial diabetic foot ulcers. *Diabet. Med*. 17:814 5. **2000**.

[34] N.A. Pathare, A. Bal, G.V. Talvalkar and D.U. Antani. Diabetic foot infections: a study of microorganisms associated with the different Wagner grades. *Indian. J. Pathol. Microbiol*. 41:437, 41. **1998**.

[35] T.S. Sivanmaliappan, M. Sevanan. Antimicrobial susceptibility patterns of *Pseudomonas aeruginosa* from diabetes patients with foot ulcers. *Int J Microbiol* **2011**; 2011:605195.

[36] G. Dhanasekaran, N.G. Sastry, V. Mohan V. Microbial pattern of soft-tissue infections in diabetic patients in South India. *Asian Journal of Diabetology*. **2003**;5(5-6):8–10.

[37] M.S. Khan, A. Zaidi, P.A. Wani, M. Oves Role of plant growth promoting rhizobacteria in the remediation of metal contaminated soils *Environ. Chem. Lett.*, 7, **2009**, pp. 1–19

[38] R. Nair and S. Chanda. Activity of some medicinal plants against certain pathogenic bacteria strains. *Indian J. Pharmacol.*, 38(2): 2006, 142-144.

[39] S.E. Walsh, J.Y. Maillard, A.D. Russel, C.E. Catrenich, A.L. Charbonneau, and R.G. Bartolo, Activity and mechanism of action of selected biocidal agent on grampositive an-negative bacteria. *J. Appl. Microbiol*. 94: **2003**, 240- 47.

[40] M. Balouiri, M. Sadiki, S.K. Ibensouda. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis* 6 (2016) 71–79. **2016.**

[41] F.B. Holetz. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 97, n. 7, p.1027-1031, **2002.**

[42] J.B. Pretto. Potencial antimicrobiano de extratos, frações e compostos puros obtidos de algumas plantas da flora catarinense.2005. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí-SC, 2005.

[43] T.M. Souza. 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 *Stryphnondendron adstringens* (Mart.) Coville (LEGUMINOSAE-MIMOSOIDAE).2007. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Estadual de Paulista “Júlio Mesquita”, Araraquara - SP, 2007.

[44] J.L. Rios. Screening methods for natural products with antimicrobial activity: a review of the literature. *Journal of Ethnopharmacology*, 23: 127-149, **1988.**

[45] G.G.F. Nascimento, J. Locatelli, P.C. Freitas, G.L. Silva. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. *Brazilian Journal of Microbiology*, São Paulo, v.31, n.4, p.247-56, **2000.**

[46] S. Karaman, M. Digrak, U. Ravid, A. Ilcim. Antibacterial and antifungal activity of the essential oils of *Thymus revolutus* Celak from Turkey. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 76, p. 183 - 186, **2001.**

[47] E.A. Ostrosky, M.K. Mizumoto, M.E.L. Lima, T.M. Kaneco, S.O. Nishikawa, B.R. Freitas. Métodos para a avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CIM) de plantas medicinais. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, São Paulo, v.18, n.2, **2008**.

[48] I.B. Suffredini, A.D. Varella, R.N. Younes. Minimal inhibitory concentration and minimal bactericidal concentration results from three selected antibacterial plant extracts from the Amazon and Atlantic Brazilian rain forests. *Rev Inst Ciênc Saúde*, São Paulo, 25(2):127-9, **2007**.

[49] B.N. Meyer, N.R. Ferrigni, J.E. Putnam, L.B. Jacobsen. Brine Shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Médica*, v.45, p. 31-34, **1982**.

[50] V. Kuete, K.O. Eyong, G.N. Folefoc, V.P. Beng, H. Hussain, K. Krohn, A.E. Nkengfack. Antimicrobial activity of the methanolic extract and of the chemical constituents isolated from *Newbouldia laevis*. *Pharmazie*. 62, 552-556. **2007**.

[51] V. Kuete, J.D. Wansi, A.T. Mbaveng, Kana, S.O.P, A. Tcho Tadjong, V. Penlap Beng, F.X. Etoa, J. Wandji, J.J. Marion Meyer, N. LALL. Antimicrobial activity of the methanolic extract and compounds from *Teclea afzelii* (Rutaceae). *South African Journal of Botany*, v. 74, n. 4, p. 572-576, **2008**.

[52] C. Mims, J. Playfair, I. Roitt. *Microbiologia médica*. 2ªed. Manole: São Paulo, **1999**, 584p.

[53] G. Adwan & M. Mhanna. *Staphylococcus aureus* Strains Isolated from Clinical Specimens. *Middle-East Journal of Scientific Research*, 3 (3): 134-139, **2008**.

[54] E.M. Williamson. Synergy and other interactions in phytomedicines. *Phytomedicine*.**2001** Sep;8(5):401-9.

[55] T.A.S. Araújo, V.T.C. ALMEIDA, E.L.C. AMORIM, U.P. ALBUQUERQUE. Habitat influence on antioxidant activity and tannin concentrations of *Spondiastuberosa* Arruda (*Anacardiaceae*). *Pharmaceutical Biology*, v. 50, n. 6, p. 754 – 759, **2012**.

[56] M.R.F. Lima, C.P.A. Ximenes, J.S. Luna, A.E.G. Sant'Ana. The antibiotic activity of some Brazilian medicinal plants. *Rev Bras Farmacogn* 16: 300-306.**2006**.

[57] A.W. Bauer, W.M. Kirby, J.C. Sherris, M. Turck. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J Clin Pathol*. **1966** Apr;45(4):493–496

[58] V. Duraipandiyan, M. Ayyanar, and S. Ignacimuthu. Antimicrobial activity of some ethnomedicinal plants used by Paliyar tribe from Tamil Nadu, India. *BMC. Complement. Altern. Med.*, 6: 35. **2006**.

[59] S. Arullappan, P. Rajamanickam, N.Thevar and C.C.Kodimani. In Vitro Screening of Cytotoxic, Antimicrobial and Antioxidant Activities of *Clinacanthus nutans* (*Acanthaceae*) leaf extracts. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*;13 (9): 1455-1461.**2014**.

[60] D.S. Arora, S.K. Bhardwaj. Antibacterial activity of some medicinal plants. *Geo Bios* 24, 127-131.**1997**.

[61] M.D. Awouafack, P. Tane, V. Kuete, N. J. Eloff. Sesquiterpenes from the Medicinal Plants of Africa. *Medicinal Plant Research in Africa. Pharmacology and Chemistry*, **2013**, Pages 33–103.

[62] P. Cos, A.J. Vlietinck, D.V. Berghe, L. Maes. Anti-infective potential of natural products: How to develop a stronger in vitro 'proof-of-concept'. *J Ethnopharmacol* 106: 290-302. **2006**.

[63] D.A. Vanden Berghe, A.J. Vlietinck. Screening methods for antibacterial and antiviral agents from higher plants. In: P.M. Dey, J.D. Harbone (Eds.). *Methods in Plant Biochemistry*. London: Academic Press, **1991**. p. 47-69.

[64] M.M. Suleiman, L.J. McGaw, V. Naidoo, J.N. Eloff. Detection of antimicrobial compounds by bioautography of different extracts of leaves of selected South African tree species. *Afr. J. Trad. CAM*, 7(1): 64-78. **2010**.

[65] A. Gahlaut, A. K. Chhillar. Evaluation of antibacterial potential of plant extracts using resazurin based microtiter dilution assay. *Int J Pharm Pharm Sci*, Vol 5, Issue 2, 372-376.

[66] J.C. Palomino, A. Martin, M. Camacho, H. Guerra, J. Swings, F. Portaels. Resazurin Microtiter Assay Plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 46, n. 8, p. 2720-2722, **2002**.

Tables

Table 1. Antibacterial activity of *B. gaudichaudi* leaves extract determined disk-diffusion (DD) and broth dilution methods (BD)

		LEAVES (DD – mg/mL)										
BACTÉRIA		20	10	5	2,5	1,25	0,625	0,315	0,156	0,078	0,039	DMSO 100%
Gram Negativa (n = 26)		6 23,08%	6 23,08%	6 23,08%	6 23,08%	5 19,23%	4 15,38%	3 11,54%	0 0,00%	0 0,00%	0 0,00%	0 0,00%
Gram Positiva (n = 48)		12 25,00%	12 25,00%	12 25,00%	12 25,00%	11 22,92%	10 20,83%	9 18,75%	1 2,08%	0 0,00%	0 0,00%	0 0,00%
Total (n = 74)		18 24,32%	18 24,32%	18 24,32%	18 24,32%	16 21,62%	14 18,92%	12 16,22%	1 1,35%	0 0,00%	0 0,00%	0 0,00%
		LEAVES (BD – mg/mL)										
BACTÉRIA		20	10	5	2,5	1,25	0,625	0,315	0,156	0,078	0,039	DMSO 100%
Gram Negativa (n = 26)		11 42,31%	11 42,31%	11 42,31%	7 26,92%	7 26,92%	5 19,23%	1 3,85%	0 0,00%	0 0,00%	0 0,00%	0 0,00%
Gram Positiva (n = 48)		24 50,00%	11 22,92%	11 22,92%	7 14,58%	7 14,58%	5 10,42%	1 2,08%	0 0,00%	0 0,00%	0 0,00%	0 0,00%
Total (n = 74)		35 47,30%	22 29,73%	22 29,73%	14 18,92%	14 18,92%	10 13,51%	2 2,70%	0 0,00%	0 0,00%	0 0,00%	0 0,00%

Table 2. Antibacterial activity of *B. gaudichaudii* barks extract determined disk-diffusion (DD) and broth dilution methods (BD)

Casca (DAD – Concentração mg/ml)											
BACTÉRIA	20	10	5	2,5	1,25	0,625	0,312	0,156	0,078	0,039	DMSO 100%
Gram Negativa (n = 26)	11 42,31%	11 42,31%	9 34,62%	8 30,77%	8 30,77%	7 26,92%	5 19,23%	0 0,00%	0 0,00%	0 0,00%	0 0,00%
Gram Positiva (n = 48)	24 50,00%	11 22,92%	11 22,92%	7 14,58%	7 14,58%	5 10,42%	1 2,08%	0 0,00%	0 0,00%	0 0,00%	0 0,00%
Total (n = 74)	35 47,30%	22 29,73%	20 27,03%	15 20,27%	15 20,27%	12 16,22%	6 8,11%	0 0,00%	0 0,00%	0 0,00%	0 0,00%
Casca (MC – Concentração mg/ml)											
BACTÉRIA	20	10	5	2,5	1,25	0,625	0,312	0,156	0,078	0,039	DMSO 100%
Gram Negativa (n = 26)	14 53,85%	14 53,85%	13 50,00%	11 42,31%	11 42,31%	8 30,77%	7 26,92%	2 7,69%	1 3,85%	1 3,85%	0 0,00%
Gram Positiva (n = 48)	22 45,83%	11 22,92%	11 22,92%	7 14,58%	7 14,58%	5 10,42%	1 2,08%	0 0,00%	0 0,00%	0 0,00%	0 0,00%
Total (n = 74)	36 48,65%	25 33,78%	24 32,43%	18 24,32%	18 24,32%	13 17,57%	8 10,81%	2 2,70%	1 1,35%	1 1,35%	0 0,00%

Table 3. In vitro activity (%) of *B. gaudichaudii* barks and leaves extract against Multi Drug Resistant (MDR) strains determined disk-diffusion (DD) and broth dilution methods (BD)

<i>Brosimum gaudichaudii</i> Trécul				
BACTÉRIAS	DD BARKS (%)	BD BARKS (%)	DD LEAVES (%)	BD LEAVES (%)
<i>Citrobacter</i> sp (n=1)	1 100.00%	1 100.00%	0 0%	0 0%
<i>Citrobacter</i> <i>yougae</i> ATCC 29935	0 0%	0 0%	0 0%	0 0%
<i>Escherichia coli</i> (n=2)	1 50.00%	2 100.00%	0 0%	2 100.00%
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	1 100.00%	1 100.00%	1 100.00%	0 0%
<i>Enterobacter</i> sp (n=9)	4 44.44%	4 44.44%	2 22.22%	5 55.56%
<i>Proteus</i> sp (n=7)	1 14.29%	4 57.14%	1 14.29%	2 28.57%
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 12453	1 100.00%	0 0%	0 0%	0 0%
<i>Pseudomonas</i> sp (n=3)	2 66.67%	2 66.67%	2 66.67%	2 66.67%
<i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i> ATCC 27853	0 0%	0 0%	0 0%	0 0%
alfa hemolytic streptococci (n=2)	2 100.00%	1 50.00%	1 50.00%	2 100.00%
beta hemolytic streptococci(n=4)	0 0%	4 100.00%	2 50.00%	0 0%
<i>Streptococcus</i> <i>pyogenes</i> ATCC 0015	1 100.00%	1 100.00%	1 100.00%	1 100.00%
<i>Staphylococcus</i> <i>epidermidis</i> (n=4)	1 25.00%	1 25.00%	1 25.00%	1 25.00%
<i>Staphylococcus</i> <i>saprofiticus</i> (n=14)	5 35.71%	4 28.57%	2 14.29%	5 35.71%
<i>Staphylococcus</i> <i>aureus</i> (n=22)	14 63.64%	10 45,45%	4 18.19%	14 63.64%
<i>Staphylococcus</i> <i>aureus</i> ATCC 25923	1 100.00%	1 100.00%	1 100.00%	1 100.00%
Total (n=74. 100%)	35 47.30%	36 48.65%	18 24.32%	35 47.30%

Table 4. Correlation between disk diffusion and broth microdilution methods for antibacterial susceptibility testing of *B. gaudichaudii* barks and leaves extract against against Multi Drug Resistant (MDR) strains

Correlation between BD and methods		
Concentration (mg)	Barks	Leaves
20	0.5467*	0.1776
10	0.5135*	0.1748
5	0.5338*	0.0603
2.5	0.4953*	-0.0049
1.25	0.5604*	0.0203
0.625	0.5561*	-0.0144
0.3125	0.5477*	-0.0317
0.15625	0.2492	-0.0703
0.078125	0.2804	-0.0488
0.0390625	0.3559	-0.0378

*significance levels of 5%, with Bonferroni adjustments.

Table 5. Effects of the association of barks and leaves extracts with antibiotics and between the barks and leaves extracts against Multi Drug Resistant (MDR) strains by statistical analysis.

Antibióticos x Cascas							
Gram - / MIC-BD	BARKS		TOTAL	Gram + / MIC-BD	BARKS		TOTAL
CFO	Resistant	Susceptible		ACA	Resistant	Susceptible	
Resistant	11	12	23	Resistant	17	4	21
Susceptible	1	2	3	Susceptible	15	12	27
TOTAL ($p = 0.56$)	12	14	26	TOTAL ($p = 0.06$)	32	16	48
Antibióticos x Folhas							
Gram - / MIC-BD	LEAVES		TOTAL	Gram + / MIC-BD	LEAVES		TOTAL
CFO	Resistant	Susceptible		ACA	Resistant	Susceptible	
Resistant	16	7	23	Resistente	19	2	21
Susceptible	1	2	3	Susceptible	14	13	27
TOTAL ($p = 0.268$)	17	9	26	TOTAL ($p = 0.004$)	33	15	48
Cascas x Folhas							
Gram - / MIC-BD	LEAVES		TOTAL	Gram + / MIC-BD	LEAVES		TOTAL
BARKS	Resistant	Susceptible		BARKS	Resistant	Susceptible	
Resistant	11	1	12	Resistant	28	4	32
Susceptible	6	8	14	Susceptible	5	11	16
TOTAL ($p = 0.012$)	17	9	26	TOTAL ($p = 0.000$)	33	15	48

MIC: Minimum Inhibitory Concentration; **BD:** broth dilution method; **ACA:** amoxicillin and clavulanic acid (2000 mg/ml); **CFO:** Cefoxitin (3000 mg/ml). Fisher's exact test. It was adopted as the significance level p -value <0.05 .