



**REDE DE BIODIVERSIDADE E BIOTECNOLOGIA DA AMAZÔNIA LEGAL  
COORDENAÇÃO GERAL DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
BIODIVERSIDADE E BIOTECNOLOGIA - PPG-BIONORTE  
COORDENAÇÃO ESTADUAL DO TOCANTINS  
CÂMPUS UNIVERSITÁRIO DE PALMAS**

**MICHELE CEZIMBRA PERIM GATINHO**

**ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E ENSAIO TIME KILL COM EXTRATOS  
ETANÓLICOS VEGETAIS DO CERRADO TOCANTINENSE CONTRA  
BACTÉRIAS RESISTENTES À MÚLTIPLOS FÁRMACOS ISOLADAS DE  
LESÕES DE PÉS DIABÉTICOS**

**PALMAS-TO,  
MARÇO DE 2018.**



I

**REDE DE BIODIVERSIDADE E BIOTECNOLOGIA DA AMAZÔNIA LEGAL  
COORDENAÇÃO GERAL DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
BIODIVERSIDADE E BIOTECNOLOGIA - PPG-BIONORTE**

---

---

MICHELE CEZIMBRA PERIM GATINHO

**ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E ENSAIO “TIME KILL” COM EXTRATOS  
ETANÓLICOS VEGETAIS DO CERRADO TOCANTINENSE CONTRA  
BACTÉRIAS RESISTENTES À MÚLTIPLOS FÁRMACOS  
ISOLADAS DE LESÕES DE PÉS DIABÉTICOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Rede de Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia Legal - REDE BIONORTE Seção da Universidade Federal do Tocantins, área de Biotecnologia e Biodiversidade, como parte de requisitos necessários para obtenção do título de Doutorado.

Orientação: Profa. Dra. Maria Cristina da Silva Pranchevicius

PALMAS-TO,  
MARÇO DE 2018.

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

---

G261a Gatinho, Michele Cezimbra Perim.

Atividade antibacteriana e ensaio "Time-Kill" contra extratos etanólicos vegetais do Cerrado Tocantinense contra bactérias resistentes à múltiplos fármacos isoladas de lesões de pés diabéticos.. / Michele Cezimbra Perim Gatinho. – Palmas, TO, 2018.

142 f.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Tocantins – Câmpus Universitário de Palmas - Curso de Pós-Graduação (Doutorado) em Biodiversidade e Biotecnologia, 2018.

Orientadora : Maria Cristina da Silva Pranchevicius

1. Anacardium humile (St.) Hil. 2. Davilla nitida (Vahl) Kubitzki. 3. Atividade antibacteriana. 4. Infecções de pés diabéticos. I. Título

**CDD 660.6**

---

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).**

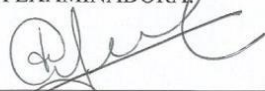
MICHELE CEZIMBRA PERIM GATINHO

**ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E ENSAIO TIME KILL COM EXTRATOS  
ETANÓLICOS VEGETAIS DO CERRADO TOCANTINENSE CONTRA  
BACTÉRIAS RESISTENTES À MÚLTIPLOS FÁRMACOS ISOLADAS DE  
LESÕES DE PÉS DIABÉTICOS**

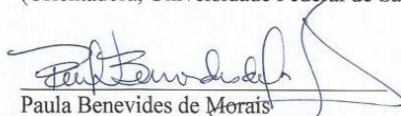
Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação Rede de Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia Legal - REDE BIONORTE Seção da Universidade Federal do Tocantins - UFT, área de Biotecnologia e Biodiversidade, em 05/03/2018, avaliada para obtenção do título de Doutorado, e aprovada em sua forma final pela professora orientadora e pela banca examinadora.

Data da aprovação: Palmas – TO. 05/03/2018

BANCA EXAMINADORA:




Maria Cristina da Silva Pranchevicius  
(Orientadora, Universidade Federal de São Carlos – UFSCar / BIONORTE)



Paula Benevides de Moraes  
(Universidade Federal do Tocantins – UFT / BIONORTE)



Solange Cristina Carreiro  
(Universidade Federal do Tocantins – UFT)



Guilherme Nobre Lima do Nascimento  
(Universidade Federal do Tocantins – UFT / BIONORTE)



Gabriela Ortega Coelho Thomazi  
(Universidade Federal do Tocantins – UFT)

## Dedicatória

Em primeiro lugar sempre a Deus pela oportunidade da realização de um sonho criado e cultivado desde sempre;

Ao meu esposo, Marcelo Antônio, pela paciência, conforto, carinho, amizade e amor até mesmo nos dias mais difíceis que pareceram não passar;

Aos meus filhos Lívia e Lucas;

Aos meus pais, Carlos Alberto e Ana Maria, que me proporcionaram o que há de melhor, a educação, aos meus irmãos Rafael, Priscilla, Fábio; à minha cunhada Ana Paula, aos meus sogros, Antônio Maria e Maria Elizabete, e aos meus cunhados Marina Helena e Marcus Antônio; à minha família como um todo, que sempre carrego em meu coração e no meu pensamento;

Ao meu avô João Perim (*in memoriam*);

Aos amigos do Laboratório da Saúde da UFT Palmas, cuja amizade e companheirismo foram essenciais para a conclusão deste trabalho, em especial aos que dividem o turno comigo, com carinho à minha amiga Joelma, que além de contribuir para a elaboração deste, não me deixou desistir nos momentos mais difíceis.

À minha orientadora, prof<sup>a</sup>. Dra. Maria Cristina da Silva Pranchevicius, pela oportunidade, pelo acolhimento e pelas horas dedicadas a me ensinar e auxiliar.

## Agradecimentos

À minha orientadora, Maria Cristina S. Pranchevicius, pela oportunidade, todo ensino, paciência e por ter acreditado no meu trabalho;

A todos da equipe do Complexo de Laboratórios da Saúde da UFT Palmas, meus colegas de setor, em especial ao turno da manhã, Cerize Rodrigues Lima Cardozo, Elga Lopes da Cunha Martins, Fabiana Daronch, Fabiano Luiz Irgang, Gabriela Ortega Coelho Thomazi, Gustavo da Silva Bezerra, Joelma da Costa Borges, Simone dos Santos Barros, por todo apoio técnico;

Ao Thiago de Cesaro, que no período de execução deste foi meu chefe imediato, que apoiou, compreendeu e facilitou a execução das minhas atividades no setor para que eu pudesse estudar;

Ao prof. Dr. Raphael Sanzio Pimenta, Dr<sup>a</sup> Prof.<sup>a</sup> Paula Benevides de Moraes e à Cristiane Coelho, do Laboratório de Microbiologia – LAMBIO, pelo auxílio com minhas dúvidas e empréstimo de materiais;

À professora Dra. Solange Carreiro que me ensinou o caminho da pesquisa;

Ao professor Guilherme Nobre pelo auxílio, prontidão e principalmente por me acalmar nos momentos de desespero;

À Prof<sup>a</sup>. Dra. Sandra Botelho pelas dicas e prontidão para ajudar;

Ao Dr. Thiago A. S. Araújo, do Laboratório de Etnobotânica Aplicada (LEA-UFRPE) / Laboratório de Produtos Naturais (LAPRONAT - UFPE), pela concessão dos extratos das plantas;

Aos professores do Colegiado Estadual do Programa Bionorte/Tocantins, meus colegas da turma 2014 e de 2015 que me acolheram tão bem no meu retorno da licença maternidade;

A Capes/CNPq pelo apoio;

A todos aqueles que de forma direta ou indireta me apoiaram, criticaram, e incentivaram para a construção do meu ideal.

“Sonhos determinam o que você quer. Ações determinam o que você conquista.”

Aldo Novak

## Resumo

O desenvolvimento de cepas bacterianas multirresistentes tornou-se uma preocupação global. As plantas medicinais têm sido exploradas como uma fonte potencial terapêutica para o tratamento de várias doenças e para o desenvolvimento de medicamentos mais eficazes contra infecções bacterianas. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a atividade antibacteriana do extrato de cascas e folhas de *Anacardium humile* (St.) Hil, extrato de cascas de *Davilla nitida* (Vahl.) Kubitski, e extrato de folhas de *Kalanchoe pinnata* (Lam.) Pers. contra bactérias resistentes a múltiplos fármacos isoladas de infecções do pé diabético, e também contra cepas de referência da American Type Culture Collection (ATCC). A atividade antibacteriana foi avaliada pelos métodos de Ágar Disco-Difusão (DD), Microdiluição em Caldo (MC), Ensaio “Checkerboard” e Ensaio “Time-Kill”. O extrato das cascas de *Davilla nitida* (Vahl.) Kubitski mostrou atividade antibacteriana expressiva contra todos os grupos de bactérias testadas. O método de microdiluição em caldo foi mais sensível que o método disco-difusão para determinar a atividade antibacteriana presente no extrato das cascas. O extrato de cascas inibiu o crescimento de bactérias com altos níveis de resistência aos antibióticos, como *Pseudomonas* spp. (100,00%), *Enterobacter* spp. (88,89%), *Staphylococcus aureus* (54,55%), *Streptococcus pneumoniae* (75,00%), *Staphylococcus saprophyticus* (92,86%). A combinação do extrato das cascas com antibióticos resultou em efeito aditivo contra a maioria das cepas testadas. O perfil cinético de tempo de morte do extrato de cascas mostrou propriedades bactericidas tempo-dependentes. Nossos resultados sugerem a presença de compostos bioativos nesta planta que podem ser utilizados para o desenvolvimento de novos agentes antibacterianos. O extrato de folhas de *Kalanchoe pinnata* (Lam.) Pers. mostrou atividade antibacteriana contra *Citrobacter* spp. (100,00%), *Citrobacter youngae* (ATCC-29935) (100,00%), *Enterobacter* spp. (33,33%), *Pseudomonas* spp. (66,67%), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC-27853) (100,00%). O extrato de folhas quando associado com antibiótico amoxicilina/ácido clavulânico ou cefoxitina não evidenciou qualquer potencialização da atividade antibacteriana contra as bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, sugerindo que extrato e antibióticos possuem mecanismos independentes relacionados à inibição do crescimento bacteriano. Nossos resultados mostraram que o extrato etanólico das folhas de *Kalanchoe pinnata* (Lam.) Pers. teve uma boa atividade antimicrobiana contra algumas bactérias resistentes a múltiplos fármacos. Entretanto, estudos adicionais e



mais específicos são recomendados para determinar a eficácia deste extrato no tratamento de infecções bacterianas. O extrato das cascas e folhas de *Anacardium humile* (St.) Hil, tanto no método Disco-difusão quanto em microdiluição em caldo, inibiu significativamente o crescimento das bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, como também o crescimento das bactérias comumente encontradas em lesões de pés diabéticos. Pelo método “Checkerboard”, a combinação do extrato das cascas (35,00%) e folhas (40,00%) sobre as bactérias Gram-negativas apresentaram efeitos sinérgicos semelhantes, enquanto que para as bactérias Gram-positivas, os extratos das folhas (45,00%) apresentaram um efeito sinérgico mais efetivo do que os extratos das cascas (17,50%). O perfil cinético “Time-Kill” apresentou atividade bactericida com propriedades dose e tempo dependente, sugerindo que os extratos das cascas e folhas podem potencializar os efeitos dos antibióticos, o que sugere que os extratos de *Anacardium humile* (St.) Hil podem ser usados com uma fonte alternativa de pesquisa para agentes antibacterianos com ação em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas resistentes a multidrogas. No entanto, o isolamento dos compostos bioativos e estudos adicionais devem ser realizados para entender os mecanismos de ação bactericida, para definir a real eficácia e os efeitos tóxicos.

**Palavras chave:** *Anacardium humile* (St.) Hil, *Davilla nitida* (Vahl) Kubitzki, *Kalanchoe pinnatum* (Lam.), atividade antibacteriana, infecções de pés diabéticos.

## Abstract

Development of multidrug resistant bacterial strains has become a global concern. Medicinal plants have been explored as a source of molecules with therapeutic potential for the treatment of various diseases and to the development of better drug against bacterial infections. Thus, the aim of this study was to evaluate the antibacterial activity of the bark and leaves extracts of *Anacardium humile* (St.) Hil, bark extract of *Davilla nitida* (Vahl.) kubitski, of leaf extract of *Kalanchoe pinnata* (Lam.) Pers. and against multidrug resistant bacteria isolated from diabetic foot infections, and also of reference strains from the American Type Culture Collection (ATCC). Antibacterial activity of the bark extract was evaluated by agar Disk-Diffusion (DD), Broth Dilution (BD), “Checkerboard” and “Time-Kill” methods. The bark extract of *Davilla nitida* (Vahl.) kubistki showed a significant antibacterial activity against all groups of bacteria tested. Broth dilution was more sensitive for determining the antibacterial activity of the bark extract than the Disk-Difusion method. The bark extract inhibited the growth of bacteria with high-levels of antibiotic-resistance, such as *Pseudomonas* spp. (100,00%), *Enterobacer* spp. (88,89%), *Staphylococcus aureus* (54,55%), *Streptococcus pneumoniae* (75,00%), *Staphylococcus saprophyticus* (92,86%). The combination of extract with antibiotics resulted in an additive effect against most of the strains tested. “Time-Kill” kinetics profiles of bark extract showed bactericidal and time-dependent properties. Our results suggest the presence of bioactive compounds in this plant that could be useful for the development of new antibacterial agents. The leaf extract of *Kalanchoe pinnata* (Lam.) Pers. showed antibacterial activity against *Citrobacter* spp. (100,00%), *Citrobacter youngae* (ATCC-29935) (100,00%), *Enterobacer* spp. (33.33%), *Pseumodonas* spp. (66.67%), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC-27853) (100.00%). Extract of leaf associated with amoxicillin/clavulanic acid or cefoxitin antibiotics did not show any potentiation of antibacterial activity against both Gram-positive and Gram-negative bacteria, suggesting that extract and antibiotics have independent mechanisms related to inhibition of bacterial growth. Our results showed that the ethanolic leaf extract of *Kalanchoe pinnata* (Lam.) Pers. had a good antimicrobial activity against some multidrug resistant bacteria. However, further and more specific studies, are recommended to determine the efficacy of this extract in the treatment of bacterial infections. Barks and leaves extracts of *Anacardium humile* (St.) Hil, both in the Disk-Difusion and Broth Dilution methods, inhibited the growth of

Gram-positive and Gram-negative bacteria, as well as the growth of bacteria commonly found in diabetic foot lesions. By the “Checkerboard” method, the combination of bark extract (35,00%) and leaves (40,00%) on Gram-negative bacteria had similar synergistic effects, while for Gram-positive bacteria, leaf extracts (45,00%) presented a synergistic effect more effective than the bark extracts (17,50%). The “Time-Kill” kinetic profile showed bactericidal activity with dose and time-dependent properties, suggesting that bark and leaf extracts may potentiate the effects of antibiotics, suggesting that *Anacardium humile* (St.) Hil extracts can be used with an alternative source of research for antibacterial agents acting on multidrug resistant Gram- positive and Gram- negative bacteria. However, the isolation of bioactive compounds and additional studies should be performed to understand the mechanisms of bactericidal action, to define real efficacy and toxic effects.

Keywords: *Anacardium humile* (St.) Hil, *Davilla nitida* (Vahl) Kubitzki, *Kalanchoe pinnatum* (Lam.), antimicrobial activity, diabetic foot infection

**Lista de Figuras**

Figura 01: <i>Davilla nítida</i> (Vahl) Kubitski .....	24
Figura 02: <i>Kalanchoe pinnatum</i> (Lam.) Pers .....	25
Figura 03: <i>Anacardium humile</i> (St.) Hil .....	27

**Lista de Abreviaturas / Siglas / Símbolos**

AMC (ACA) – Amoxicilina / ácido clavulânico

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ATCC – American Type Culture Collection

CBM (MBC) – Concentração Bactericida Mínima

CDC – Centro de Prevenção e Controle de Doenças

CEGEN – Conselho de Gestão de Patrimônio Genético

CFO – Cefoxitina

CIF (FIC) – Concentração Inibitória Fracionada

CIM (MIC) – Concentração Inibitória Mínima

CY - *Citrobacter youngae*

DD – Ágar Disco Difusão

EC - *Escherichia coli*

ES - *Enterobacter* spp

HPG – Hospital Geral Público de Palmas Doutor Francisco Ayres

ICIF – Índice de Concentração Inibitória Fracionada

IUCN – União Internacional da Conservação da Natureza

LACEN – Laboratório Central do Estado do Tocantins

MC – Microdiluição em caldo

NCCLS (CLSI) – National Committee for Clinical Laboratory Standards

OMS – Organização Mundial Da Saúde

PA - *Pseudomonas aeruginosa*

PM - *Proteus mirabilis*

PS - *Proteus* spp

PSS - *Pseudomonas* spp

RENISUS – Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde

SA - *Staphylococcus aureus*.

SE - *Staphylococcus epidermidis*

SP - *Streptococcus pyogenes*

SS - *Staphylococcus saprophyticus*

STA - *Streptococcus agalactiae*

STP - *Streptococcus pneumoniae*

THG - Transferência horizontal gênica

UFC/mL – Unidade Formadora de Colônias por mililitro

## Sumário

<b>Folha de rosto</b> .....	I
<b>Folha de aprovação</b> .....	III
<b>Dedicatória</b> .....	IV
<b>Agradecimentos</b> .....	V
<b>Epígrafe</b> .....	VI
<b>Resumo</b> .....	VII
<b>Abstract</b> .....	IX
<b>Lista de figuras</b> .....	XI
<b>Lista de abreviaturas, siglas e símbolos</b> .....	XII
<b>Sumário</b> .....	14
<b>Apresentação</b> .....	16
<b>1. Introdução</b> .....	17
<b>2. Referencial teórico</b> .....	20
2.1 Plantas medicinais, Cerrado e fitoterapia .....	21
2.1.1 <i>Davilla nítida</i> (Vahl) Kubitzki .....	24
2.1.2 <i>Kalanchoe pinnata</i> (Lam.) Pers .....	25
2.1.3 <i>Anacardium humile</i> (St.) Hil .....	26
2.2 Agentes antimicrobianos .....	28
2.2.1 Determinação da atividade antimicrobiana .....	30
2.2.2 Métodos complementares de avaliação .....	32
2.3 A microbiota de feridas de pés diabéticos e resistência antimicrobiana .....	33
2.4 A biotecnologia e os novos fármacos .....	37
<b>3. Objetivos</b> .....	39
3.1 Objetivo geral .....	40
3.2 Objetivos específicos .....	40
<b>4. Referências Bibliográficas</b> .....	41
<b>5. Artigos</b> .....	60
5.1 <i>Davilla nitida</i> (Vahl) Kubitzki .....	61
5.2 <i>Kalanchoe pinnata</i> (Lam.) Pers .....	78
5.3 <i>Anacardium humile</i> (St.) Hil .....	97

6.	<b>Conclusões</b> .....	129
6.1	<i>Davilla nitida</i> (Vahl) Kubitzki .....	130
6.2	<i>Kalanchoe pinnata</i> (Lam.) Pers.....	130
6.3	<i>Anacardium humile</i> (St.) Hil .....	130
7.	<b>Considerações finais</b> .....	131
8.	<b>Apêndices e Anexos</b> .....	133
8.1	Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa com Humanos da Universidade Federal do Tocantins .....	134
8.2	Autorização CEGEN .....	136
8.3	Lista de plantas RENISUS .....	138
8.4	Código de identificação das cepas bacterianas testadas neste estudo .....	140



## **Apresentação**

O presente trabalho relata o uso de plantas pertencentes ao Cerrado Tocantinense com o propósito de investigar a atividade antimicrobiana das plantas selecionadas como alternativa para utilizá-las como fitoterápicos que melhoram a saúde e o bem-estar da população que é acometida por lesões nos pés resultantes do diabetes.

Como objetivo deste trabalho buscamos determinar a atividade antibacteriana e a eficácia dos extratos brutos das plantas *Davilla nitida* (Vahl) Kubitzki. (Sambaibinha), *Anacardium humile* (St.) Hil (cajuzinho do Cerrado) e *Kalanchoe pinnata* (Lam.) Pers (Folha-Santa), pertencentes ao Cerrado do Estado do Tocantins, em bactérias resistentes a múltiplos fármacos, isoladas de lesões dos pés diabéticos de pacientes atendidos no Hospital Geral Público de Palmas Doutor Francisco Ayres, Tocantins, através da análise de Concentração Inibitória Mínima (CIM), Concentração Bactericida Mínima (CBM), Ensaio “*Checkerboard*” e Ensaio “*Time Kill*”.

O presente trabalho encontra-se organizado em três partes, sendo elas:

Parte I – Introdução, contendo o referencial teórico, objetivos do trabalho e a revisão bibliográfica;

Parte II – Os manuscritos submetidos para aprovação por revista científica, com no mínimo qualis B4;

Parte III – Considerações finais e conclusões do trabalho.

A metodologia utilizada encontra-se descrita nos artigos, bem como os resultados e discussão.

## **1. Introdução**

Pé diabético é o termo empregado para nomear as diversas alterações e complicações ocorridas, isoladamente ou em conjunto, nos pés e nos membros inferiores dos pacientes diabéticos. Essas lesões costumam ser resultado de uma série de alterações metabólicas, vasculares e neuropáticas, que atuam de forma sinérgica (CAIAFA et al, 2011; SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2015).

De acordo com Lipsky et al (2012) as bactérias Gram-positivas como *Streptococcus*  $\beta$ -hemolítico e *Staphylococcus aureus* são os patógenos predominantes nas infecções leves do pé diabético e as infecções de moderada gravidade tendem a apresentar mais de um microrganismo, como os cocos Gram-positivos e bacilos Gram-negativos, por exemplo, *Proteus mirabilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*. Quando as infecções são classificadas como graves, destaca a possibilidade de infecções polimicrobianas com cocos Gram-negativos e positivos, anaeróbios e aeróbios, ou apresentam cepas resistentes a diversos antibióticos (DUARTE, 2011; LIPSKY et al., 2012).

A crescente incidência de infecções causadas por microrganismos relatadas nos últimos anos, principalmente pela diminuição progressiva do perfil de sensibilidade aos antibacterianos, tem levado a verdadeiros dilemas terapêuticos na prática clínica, pois essas doenças infecciosas são responsáveis por elevadas taxas de mortalidade, inclusive para pacientes diabéticos portadores de ulcerações nos pés, e as infecções tornam-se mais complicadas devido o uso indiscriminado de antibióticos, contribuindo para o aumento do número de microrganismos patogênicos resistentes aos fármacos antimicrobianos disponíveis no mercado (RODRIGUES et al., 2011).

A ANVISA implantou como principal medida a Resolução da Diretoria Colegiada - RDC 20/11, que visa o controle na fase final do medicamento, mas não têm o controle no ato da prescrição médica, uma política de conscientização para o paciente, realização de registro em um segundo tratamento em uma falha na antibioticoterapia na primeira escolha, além de um sistema unificado com registros individuais de cada paciente, o que resulta em resultados não tão eficazes quanto esperado, após os anos de implantação (SOUZA, 2016).

Portanto, em razão ao aumento da resistência bacteriana às múltiplas drogas antimicrobianas surge a preocupação e procura por novas alternativas terapêuticas, como as plantas medicinais, que podem representar uma importante fonte para obtenção destes medicamentos (ROSA et al, 2012).

Produtos naturais oriundos de fontes vegetais parecem ser bastante promissores, uma vez que plantas produzem uma ampla variedade de compostos com propriedades terapêuticas (AHMAD; BEG, 2001). Estudos relatam que os antibióticos vegetais podem conter estrutura química que difere daquela dos antibióticos derivados de microrganismos, podendo regular o metabolismo intermediário de patógenos através de vários mecanismos, ativando ou bloqueando reações e síntese enzimática ou mesmo alterando a estrutura de membranas (MICHELIN et al., 2005).

A atividade antimicrobiana de extratos e óleos essenciais de plantas medicinais vem sendo comprovada em vários estudos realizados em países que possuem uma flora diversificada (HOLETZ et al., 2002; ADWAN et al., 2008; CHEN-LUNG et al., 2012). O Brasil possui a maior diversidade vegetal do planeta, distribuídas nos diferentes tipos de biomas: Floresta Amazônica, Cerrado, Mata Atlântica, Pantanal, Caatinga e Manguezal (ALBERNAZ, 2010; VIEIRA et al., 2010). O Cerrado é o bioma com uma das maiores estruturas vegetais, rico em espécies utilizadas na medicina popular, em função das suas características morfológicas, como xilopódios e cascas que possuem substâncias farmacologicamente ativas (VILAS BOAS, 2003), o que torna as plantas pertencentes ao bioma Cerrado uma fonte promissora para a descoberta de novos antimicrobianos.

Considerando o aumento do número de bactérias multirresistentes e o potencial terapêutico das plantas, o presente trabalho avaliou a atividade antibacteriana dos extratos brutos das plantas *Anacardium humile* (St.) Hil (cajuzinho do Cerrado), *Davilla nitida* (Vahl) Kubitzki. (Sambaibinha) e *Kalanchoe pinnata* (Lam.) Pers (Folha-Santa), pertencentes ao Cerrado do Estado do Tocantins, em bactérias resistentes a múltiplos fármacos, isoladas de pacientes diabéticos com lesões de pés e atendidos no Hospital Geral Público de Palmas Doutor Francisco Ayres, Tocantins.

## **1. Referencial Teórico**

## 1.1 Plantas medicinais, Cerrado e fitoterapia

O uso das plantas medicinais iniciou-se provavelmente na pré-história, quando os homens as utilizavam nas práticas de saúde para minimizar suas enfermidades, e esses conhecimentos empíricos sobre o seu uso terapêutico foram acumulados e passados de geração para geração (FERRO, 2008). Segundo dados da Organização Mundial da Saúde (BRASIL, 2006), oitenta por cento da população mundial depende da medicina tradicional para atender às suas necessidades de cuidados primários de saúde e grande parte desta envolve o uso de plantas medicinais, através de seus extratos vegetais ou seus princípios ativos (IUCN-União da Conservação do Mundo, 1993).

As plantas medicinais possuem uma diversidade em moléculas com diferentes estruturas, propriedades fisiológicas e físico-químicas, os metabólitos secundários (SIMÕES et al., 2004; GOBBO-NETO e LOPES, 2007). Estes metabólitos secundários são derivados de processos de biotransformação de macromoléculas, como carboidratos, lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos; os seus produtos garantem vantagens para a sobrevivência das plantas e a perpetuação das espécies (SIMÕES et al., 2004). Deste modo, as plantas medicinais estão dentre os produtos naturais, de grande interesse científico devido à possibilidade de empregá-las como fitofármacos, por proporcionarem grandes chances de obterem-se moléculas protótipos devido a diversidade de seus constituintes (DUARTE et al., 2004; MICHELIN et al., 2005; LIMA et al., 2006).

A fitoterapia, como ciência, é a área do conhecimento que busca o tratamento das doenças através das plantas medicinais, repousa sobre uma tradição secular, sendo amplamente difundida através de raizeiros e curandeiros. Neste contexto, as plantas medicinais são utilizadas sob diversas formas, desde chás, infusões, banhos até preparações mais elaboradas como extratos, tinturas, soluções, xaropes, cremes, pomadas, comprimidos, cápsulas, entre outros (SIMÕES et al., 2007).

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 desta padronização foi possível reproduzir medicamentos homogêneos em qualquer lugar do planeta (LAZARINI, 2004). Deste modo, 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 técnico-científicas 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). 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 da fitoterapia 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).

O Brasil possui a maior diversidade vegetal do planeta, com aproximadamente 55 mil espécies de plantas superiores, distribuídas nos diferentes tipos de biomas: Floresta Amazônica, Cerrado, Mata Atlântica, Pantanal, Caatinga e Manguezal (ALBERNAZ, 2010; VIEIRA et al., 2010). O Cerrado (savana neotropical) é o bioma com uma das maiores estruturas vegetais, com mais de 7.000 espécies nativas de plantas vasculares, e uma área de 2 milhões de km<sup>2</sup>, compondo um cenário de exuberante diversidade biológica e influente arcabouço cultural das populações que nele vivem (ALBERNAZ, 2010; VIEIRA et al., 2010; ROCHA et al., 2011). Constitui o segundo maior bioma da América do Sul depois da Floresta Amazônica (GARCIA, 2008). 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). Apesar da carência de estudos voltados para a identificação de plantas úteis do Cerrado, principalmente quando comparada à diversidade e à área ocupada, grande parte da flora do Cerrado tem sido amplamente explorada pelo conhecimento popular (FELFILI et al., 1998).

No Brasil, o Ministério da Saúde divulgou uma lista contendo 71 plantas medicinais que poderão ser usadas como medicamento pelo Sistema Único de Saúde (SUS). Entre elas foram selecionadas plantas com potencial para serem usadas contra diabetes, artrites, úlceras, hipertensão, inflamações e outras doenças crônicas (VENTURA, 2012). Desde 2007 o SUS financia medicamentos fitoterápicos feitos à base de espinheira santa (*Maytenus ilicifolia*), para gastrite e úlceras, e guaco (*Mikania glomerata*), para tosse e gripes, em apresentações na forma de cápsulas, comprimidos e xaropes, entre outras. Estes integram as listas de distribuição de medicamentos em 13 estados brasileiros. Em 2010 foram inclusos seis novos fitoterápicos, a fim de ampliar as opções terapêuticas para a população, a saber: alcachofra (*Cynara scolymus* L.), aroeira (*Schinus terebenthifolius* Raddi), cáscara sagrada (*Rhamnus purshiana* DC.), garra do diabo (*Harpagophytum procumbens*), isoflavona da soja (*Glycine max* (L.) Merr.) e unha de gato (*Uncaria tomentosa* (Willd. ex Roem. e Schult.)). Estas são ações do Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos cujos objetivos são inserir com segurança, eficácia e qualidade as plantas medicinais, os fitoterápicos e serviços relacionados à Fitoterapia no SUS. Estes medicamentos também são extraídos de espécies cultivadas no Brasil não ameaçadas de extinção seguindo a recomendação da Organização Mundial de Saúde (OMS) de que os países devem usar os recursos naturais disponíveis no próprio território para promover a atenção primária à saúde e contribuir para o uso sustentável da biodiversidade nacional (BRASIL, 2011).

Dentre as plantas propostas pelo Ministério da Saúde para uso pelo Sistema Único de Saúde estão a *Davilla nitida* (Vahl) Kubitzki (Sambaibinha), a *Kalanchoe pinnata* (Lam) Pers (Folha-Santa), a *Anacardium humile* St Hil (cajuzinho do Cerrado), que são pertencentes ao Cerrado do Estado do Tocantins e objetos de estudos do presente trabalho.



### 1.1.1 *Davilla nitida* (Vahl) Kubitzki - Sambaibinha

A família *Dilleniaceae* é formada por aproximadamente 300 espécies, exclusivamente tropicais, e sua maioria é formada por cipós e arbustos. No Brasil a espécie ocorre na Amazônia, Cerrado e Mata Atlântica, nos Estados de Roraima, Amapá, Pará, Amazonas, Tocantins, Acre, Rondônia, Maranhão, Piauí, Ceará, Paraíba, Pernambuco, Bahia, Goiás, Distrito Federal, Minas Gerais e Rio de Janeiro (FRAGA, 2012). Schultz (1984), relatou a distribuição da espécie dos gêneros *Davilla*, *Curatella*, *Tetracera* e *Doliocarpus*, nos Cerrados e em todo o Nordeste. Na Bahia, algumas espécies desta família são nativas e possuem aplicações como plantas medicinais pela população (DAVID et al., 2005). Entretanto, estudos fitoquímicos na literatura com espécies brasileiras ainda são raros e realizados de forma parcial.

*Davilla nitida* (Vahl) Kubitzki (figura 01), é uma planta conhecida popularmente como sambaibinha, cipó-de-fogo e lixeirinha de rama. É um arbusto de hábito trepador, também encontrado no Cerrado e pode atingir até quatro metros de altura. É amplamente utilizada pela população brasileira no tratamento de diferentes distúrbios, tais como, elefantíase, inchaço dos membros, úlcera, e atividade antimicrobiana (COIMBRA, 1942; CORRÊA, 1984).

Figura 01: *Davilla nitida* (Vahl) Kubitzki



Fonte: Perim (2016)

Kushima et al. (2009) demonstraram que os extratos metanólicos de *Davilla elliptica* e de *Davilla nitida* possuíam atividades gastroprotetora, sendo a atividade de *Davilla nitida* mais proeminente em relação à *Davilla elliptica*. Apesar desta diferença, o perfil fitoquímico qualitativo foi muito semelhante entre as duas espécies, constituído basicamente por polifenóis como flavonóides, taninos condensados e derivados do ácido fenólico (ácido gálico).

Frações do extrato hidroalcoólico de *Davilla rugosa* Poir foram avaliadas em cobaias (BACCHI, 1986; GUARALDO et al., 2001) e demonstrou-se que as substâncias das frações mais polares auxiliavam na proteção contra úlceras gástricas. David et al. (2005), também demonstraram que o extrato de caule de *Davilla rugosa* apresentou atividade de proteção para desenvolvimento de úlceras gástricas e que as substâncias ativas estavam nas frações mais polares.

Alguns trabalhos também demonstram que os extratos das folhas e casca de *Davilla elliptica* possuem atividade antimicrobiana contra *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Shigella* spp e *Candida albicans* (MICHELIN et al., 2005) e, em adição, o extrato de clorofórmio das folhas de *Davilla elliptica* sugerem efeito terapêutico potencial no controle microbiológico da tuberculose (LOPES et al., 2007).

### 1.1.2 *Kalanchoe pinnata* (Lam.) Pers – Folha-Santa

A Folha Santa (*Kalanchoe pinnata* (Lam.) Pers, *Bryophyllum pinnata*) (figura 02) é uma planta medicinal da família das *Crassulaceae* (*Crassulaceae* J. St-Hil). É originária da África, sublenhosa, perene, carnosas, que cresce até 1,5 metros. Suas flores são hermafroditas, penduladas, de cor verde (KAWA, 2014). É também popularmente conhecida como flor da fortuna, flor da vida, coraima, roda da fortuna, saião, dentre outros nomes. A parte mais utilizada das plantas são suas folhas e há séculos vem sendo utilizada como medicamento pelos povos indígenas e ribeirinhos (IHAA, 2016).

Figura 02: *Kalanchoe pinnata* (Lam.) Pers



Fonte: Perim (2016)

Sua distribuição geográfica pelo Brasil está relatada na Amazônia, Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica, Pampa. As substâncias químicas da planta são flavonóides,

ácido succínico, ácido málico, triterpenos, esteróis, ácido cítrico e ácido láctico (GAIND; GUPTA, 1973). As folhas frescas são utilizadas na medicina popular com finalidade analgésica, antialérgica, antiartrítica, antibacteriana, antidiabética, antifúngica, antiinflamatória tópica, antilítica, antisséptica, bactericida, cicatrizante, depurativa, diurética, emoliente e hemostática (NASSIS et al., 1992; ALMEIDA et al., 2000). As folhas tostadas são úteis nas cefalalgias, e sua infusão é utilizada para combater os ergogitamentos linfáticos e inchaços por erisipela nas pernas (ARAÚJO, 2010).

Ribeiro et al. (2009) observaram atividade antimicrobiana do extrato de *Bryophyllum calycinum* contra *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*. Da Silva (2007) também demonstrou atividade antibacteriana frente à *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina, e Nassis et al. (1992) demonstraram propriedades analgésica, antibacteriana, antifúngica e antisséptica.

Rashmi et al. (2012) utilizando o extrato orgânico foliar de *Kalanchoe pinnata* (metanol, clorofórmio, éter de petróleo, acetona, acetato de etilo) também demonstraram atividade antimicrobiana nesta planta, pelo método de difusão em ágar, contra os patógenos humanos *Escherichia coli*, *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*.

### **1.1.3 *Anacardium humile* A. St. - Hil. - Cajuzinho do Cerrado**

O gênero *Anacardium* é conhecido pela produção de caju, um fruto comestível nutritivo produzido pelo cajueiro. Existem 11 espécies neste gênero, oito delas presentes no Brasil (SILVA-LUZ; PIRANI, 2014). Uma dessas espécies é *Anacardium humile* A. St.-Hil., presente no Cerrado *latu sensu* do Brasil, nos estados da Bahia, Distrito Federal, Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Paraná, Piauí, Rondônia, São Paulo e Tocantins (IPJBRJ, 2015). Esta espécie também é conhecida localmente como cajuzinho-do-Cerrado, caju, cajueiro-do-campo, caju-de-árvore-do-Cerrado e cajuhy (SILVA-LUZ; PIRANI, 2014) (figura 03).

Figura 03: *Anacardium humile* A. St. - Hil

Fonte: Perim (2016)

O óleo encontrado nas suas folhas é volátil e corrosivo, contendo ácido anacárdico e cardol, que são utilizados como antissépticos medicinais (BARROSO et al., 1999). Além de seus usos medicinais e industriais devido às suas propriedades antiulcerogênicas (LUIZ-FERREIRA et al., 2010), *Anacardium humile* (St.) Hil é usado como fonte de alimento para as populações locais que consomem pedúnculo e frutas, e a infusão das inflorescências é empregada contra tosse e para glicemia em diabéticos (ALMEIDA et al., 1998).

Assim como a grande maioria das espécies do Cerrado, *Anacardium humile* (St.) Hil tem importância biológica e socioeconômica. Os interesses antagônicos aumentam a necessidade de gerar informações biológicas na tentativa de adequar a exploração econômica, de modo que não haja utilização predatória ou, até mesmo, extinção da espécie (LONDE, 2005).

A literatura traz poucas referências sobre as atividades biológicas de *Anacardium humile* (St.) Hil, restringindo-se a estudos de germinação (CARVALHO et al., 2005), divergência genética entre as populações (LONDE, 2005), atividades inseticidas. Investigações fitoquímicas (FERREIRA, 2005) levaram ao isolamento de metabólitos secundários de *Anacardium humile*, como derivados de ácido gálico, catequinas e flavonóides. Estudos de substâncias bioativas realizados por Correia et al

(2006) e Araújo et al (2015), demonstraram a presença de flavonóides, terpenos, esteróides, xantonas e principalmente, lipídeos fenólicos e derivados.

## **1.2 Agentes antimicrobianos**

Os agentes antimicrobianos são definidos como drogas que têm a capacidade de inibir o crescimento de microrganismos, indicadas, portanto, apenas para o tratamento de infecções microbianas sensíveis (ANVISA, 2016). Os antimicrobianos correspondem a uma classe de fármacos que é consumida frequentemente em hospitais e na comunidade. Entretanto, são os únicos agentes farmacológicos que não afetam somente os pacientes que os utilizam, mas também interferem de forma significativa no ambiente hospitalar por alteração da ecologia microbiana (ANVISA, 2016).

A escolha do agente antimicrobiano adequado deve se embasar em vários critérios, como o histórico clínico do paciente, os resultados dos exames laboratoriais bioquímicos e microbiológicos e dos exames de imagem, somados ao grau de evidência sobre os desfechos associados a estes dados (OLIVEIRA, 2007). Estas informações devem ser observadas na elaboração da prescrição inicial de um agente antimicrobiano ou para a necessidade de mudança de um esquema terapêutico já iniciado (NEVES e COLET, 2015). O uso racional de antimicrobianos beneficia os pacientes internados na medida em que reduz os riscos de complicações e conseqüentemente o tempo de internação, os custos econômicos e organizacionais do hospital, além de proporcionar um serviço com melhor qualidade (OLIVEIRA, 2007).

Os agentes antimicrobianos podem ser classificados seguindo diversos critérios como a estrutura química, mecanismos de ação, espectro de ação entre outros (MIMS et al., 1999; SCHAECHTER et al., 2002). Dentre estes mecanismos de ação estão os inibidores de síntese de parede celular (penicilinas, ampicilinas, cefalosporinas, bacitracina, vancomicina), de síntese de proteínas, inibição de tradução (estreptomicina, gentamicina, tetraciclina, cloranfenicol, eritromicina), de síntese de ácidos nucleicos (novobiocina, quinolonas, rifampicina), de antagonismo metabólico (sulfas e derivados, trimetoprim, isoniazida), e da ligação à membrana citoplasmática (polimixinas,

ionóforos) (MIMS et al., 1999; TAVARES, 1999; SCHAECHTER et al., 2002; CÂMARA, 2011).

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 (HAIDA et al., 2007; RESCHKE; MARQUES; MAYWORM, 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 (COWAN, 1999). 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 (ANDERSON, 2005; JACOBY, 2005).

Algumas pessoas, apesar das campanhas, ainda desconhecem a regulamentação sobre a venda de antibióticos, implantada em 2010, como os idosos, que apresentam menor conhecimento, o que indica a necessidade de maior orientação a tal grupo populacional, e esta é a população que mais necessita de medicamentos. No entanto, quanto maior o nível socioeconômico maior a tentativa de compra de antibióticos sem prescrição (MULLER et al., 2015).

O problema da resistência microbiana 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 representa 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 disco difusão em ágar e diluição (macro e microdiluição) (ELOFF et al., 1998; AGRIPINO et al., 2004; LANGFIELD et al., 2004).

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 predizer a sensibilidade *in vitro* de bactérias frente aos agentes antimicrobianos (MAIA-ARAÚJO et al., 2011).

Nesta técnica, utilizam-se discos de papel de filtro impregnados com quantidades definidas do agente antimicrobiano, os quais 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). À partir da difusão ocorre o aparecimento de um halo, no qual não há crescimento do microrganismo, denominado halo de inibição (VANDEN BERGH; VLIETINCK, 1991), 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).

Segundo, Maia–Araújo (2011) a limitação da técnica de disco difusão está relacionada com a impossibilidade de garantir a quantidade exata que cada disco de papel consegue absorver quando embebido no agente antimicrobiano, possibilitando ainda o extravasamento de amostra em função da saturação da capacidade de absorção do disco, dificultando a obtenção de resultados mais precisos.

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 (ANVISA, 2003). A microdiluição em caldo corresponde à miniatura da técnica de diluição e utiliza placas de Elisa estéreis, com 96 poços, com o fundo em formato de “U”, para permitir a melhor visualização do crescimento

bacteriano que deve conter uma concentração bacteriana final de aproximadamente  $5 \times 10^4$  a  $5 \times 10^5$  UFC/ml em cada poço da placa (ANVISA, 2008).

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, 30 vezes mais sensível que outros métodos usados na literatura, de alto rendimento e permite determinar a concentração inibitória mínima (CIM), ou *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC) dos produtos em estudo (ELOFF et al., 1998; ALVES et al., 2008; OSTROSKY et al., 2008; SALAZAR-ARANDA et al., 2009; PALOMBO, 2011).

O ensaio para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM), 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 (WINN JR et al., 2008; CLSI, 2013). 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).

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 e, estes valores, quando comparados ao CIM, permitem avaliar se o composto é bacteriostático ou bactericida (FINEGOLD, 1990; LIMA et al., 2006; SUFFREDINI et al., 2007). O efeito será bactericida quando a contagem chega à zero em função do tempo, ou bacteriostático quando a contagem se mantém aproximadamente constante em função do tempo (SILVA et al., 2009). A técnica consiste na realização de macrodiluição em tubos de ensaio para a determinação inicial (CIM), e posteriormente as diluições são inoculadas em placas de petri contendo ágar Mueller Hinton, incubadas por 24 horas e onde não houver crescimento de colônias na placa, determina-se que esta é a concentração bactericida mínima (CBM), ou seja, a menor dose que visualmente apresentou inibição de crescimento e que na subcultura também não apresentou crescimento bacteriano (ANVISA, 2008). 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).



### 1.2.2 Métodos Complementares de avaliação

A terapia de combinação de agentes antimicrobianos pode ser usada para aumentar o espectro de ação, prevenir a emergência de mutantes resistentes e promover o sinergismo entre antimicrobianos (ELIOPOULOS, 1989). A terapia combinada é frequentemente recomendada para o tratamento de infecções bacterianas em unidades de terapia intensiva, onde a monoterapia não é suscetível a todos os patógenos possivelmente envolvidos, e o surgimento de resistência é uma ameaça (DRAGO et al., 2007). No entanto, a seleção de uma combinação adequada requer uma compreensão do potencial de interação entre os agentes antimicrobianos. Assim, foram desenvolvidos métodos que quantificam o efeito dessas combinações antimicrobianas sobre o crescimento bacteriano *in vitro* (JACKSON et al., 2009).

Os ensaios antimicrobianos “*Time Kill*” e “*Checkerboard*” são exemplos de metodologias desenvolvidas para esta finalidade, no entanto, não são rotineiramente aplicados por serem dispendiosos em tempo e materiais (SUEKE et al., 2010).

O ensaio “*Checkerboard*” é um teste de microdiluição que avalia combinações de agentes antimicrobianos contra diferentes microrganismos (NOGUEIRA, 2012). Os métodos de diluição em ágar ou de difusão em ágar utilizando discos também podem ser usados para essa finalidade. Esses testes avaliam a atividade de inibição ou bactericida de diferentes combinações com concentrações específicas em um tempo fixo. As interações são calculadas algebricamente e interpretadas como sinérgica, quando o efeito final é maior que a soma dos efeitos individuais; aditivo, se os resultados finais são semelhantes à soma dos efeitos individuais; indiferente, em que o mecanismo de ação de um medicamento não interfere no mecanismo de ação do outro, ou antagonista, no caso das ações das duas drogas que estão interagindo são opostas, comparando-as com as atividades dos agentes antimicrobianos testados individualmente (CASTRO, 2010; NOGUEIRA, 2012). Apesar destes testes não serem utilizados na rotina, devem ser considerados quando a previsibilidade de sinergismo é desconhecida, como ocorre com um novo agente antimicrobiano, ou quando a previsibilidade não é viável devido ao desenvolvimento de fatores de resistência bacteriana ou falhas no tratamento (ELIOPOULOS e MOELLERING Jr, 1996; PILLAI; MOELLERING, 2005; MITCHELL et al., 2012).

O método “*Time Kill*” é utilizado para avaliar os tempos em que as concentrações de um determinado agente antimicrobiano matam um isolado bacteriano,

e esse ensaio tem sido classificado como dependente da concentração ou do tempo, sendo usado para avaliar novos agentes antimicrobianos e combinações destes (NOGUEIRA, 2012). Além disso, confirmam o efeito paradoxal de tolerância e resistência fenotípica e ajudam a explicar as falhas de tratamento em situações clínicas em que a atividade bactericida pode ser crucial para a evolução dos doentes (ELIOPOULOS e ELIOPOULOS, 1988; ELIOPOULOS e MOELLERING Jr, 1996; MITCHELL et al., 2012).

### **1.3 A microbiota de feridas de pés diabéticos e resistência antimicrobiana**

Diabetes Mellitus é definido como um grupo de doenças metabólicas caracterizadas por hiperglicemia resultante de defeitos na secreção da insulina, na sua ação, ou em ambas (DAA, 2010). As complicações crônicas do diabetes incluem retinopatia, com perda potencial da visão, nefropatia, levando à falência renal, neuropatia periférica, com risco de úlceras nos pés, amputações, pé de Charcot, e neuropatia autonômica, causando sintomas gastrointestinais, genitourinários e cardiovasculares. Hipertensão e anormalidades no metabolismo das lipoproteínas são também encontradas em pacientes com diabetes (DAA, 2010). No diabetes tipo 2, pode haver um grau de hiperglicemia suficiente para causar complicações teciduais, porém sem sintomas clínicos, por um longo período antes do diagnóstico (DAA, 2010).

O pé (estrutura do tornozelo ou abaixo dele) diabético é a infecção, ulceração e/ou destruição de tecidos profundos associados com anormalidades neurológicas e vários graus de doença vascular periférica no membro inferior (BRASIL, 2010). Trata-se de uma complicação caracterizada pelo comprometimento tecidual decorrente do mau controle glicêmico, da neuropatia diabética e da doença vascular periférica e atualmente é um problema de saúde pública por representar a principal causa de amputações de membros inferiores e internações recorrentes (VIDAL, 2009). As amputações resultam em hospitalização prolongada, reabilitação e na necessidade de cuidados domiciliares e de serviços sociais (PEDROSA, 2001). Os locais mais comuns de aparecimento de lesões são os dedos dos pés, devido às pressões exteriores causadas por atrofia da musculatura, e os sulcos interdigitais pela ocorrência de fissuras e pequenos cortes, o que favorece a colonização de fungos na pele. As lesões quando

infectadas geralmente apresentam contaminação por bactérias nos tecidos superficiais e nos tecidos profundos, extremamente invasivos e de caráter polimicrobiano, responsáveis por amputação dos membros ou partes acometidas (VIDAL, 2009).

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). As alterações na microbiota da pele e, conseqüentemente, na microbiota que coloniza e infecta a úlcera, vão variar muito de paciente para paciente e estão relacionadas com o grau de contato com os centros médicos. Dessa maneira, pacientes que apresentam internações hospitalares e visitas ambulatoriais mais frequentes apresentarão alterações mais importantes na microbiota que coloniza e infecta a úlcera (SADER et al., 2001; SADER et al., 2003).

Em infecções de pés diabéticos, os organismos encontrados nesses tipos de infecções diferem não somente de paciente para paciente e hospital para hospital, como também geograficamente (EL-TAHAWY, 2000), apesar de alguns estudos demonstrarem que *Escherichia coli*, *Proteus* spp, *Pseudomonas* spp, *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus* spp são os patógenos mais frequentemente encontrados (VISWANATHA et al., 2002; RAJA, 2007; OZER et al., 2010).

De acordo com Lipsky et al. (2012) as bactérias Gram-positivas como *Streptococcus*  $\beta$ -hemolítico do grupo B, A, C, G de Lancefield, e especialmente *Staphylococcus aureus* são os patógenos predominantes nas infecções leves do pé diabético. Já as infecções de moderada gravidade tendem a apresentar mais de um microrganismo infectante tais como cocos Gram-positivos e bacilos Gram-negativos, *Proteus mirabilis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, e em infecções graves destaca a possibilidade de infecções polimicrobianas com cocos Gram-negativos e positivos, anaeróbios e aeróbios, ou apresentam bactérias resistentes a diversos antibióticos como *Staphylococcus* metilina-resistente, *Pseudomonas*, *Enterococcus* (DUARTE, 2011; LIPSKY et al., 2012).

*Staphylococcus aureus* é um coco Gram-positivo que reside sobre a pele, mucosas e trato respiratório superior e é incapaz de invadir a pele ou as membranas intactas. *Staphylococcus aureus* pode expressar uma grande variedade de fatores de virulência como proteínas de superfície que aderem a tecidos lesados, causando a redução da resposta imunológica (IWATSUKI et al., 2006).

*Streptococcus* são cocos Gram-positivos arranjados em cadeias (cordões) ou em duplas (forma de gota), catalase negativos. Embora esses microrganismos façam parte

da microbiota normal da pele, vias aéreas, aparelho gênito-urinário e trato intestinal, muitos deles são responsáveis por uma variedade de manifestações clínicas. Os estreptococos de maior importância clínica são *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pneumoniae* (BEVILÁQUA, 2011).

*Pseudomonas aeruginosa* são bastonetes Gram-negativos aeróbios, patógenos oportunistas presentes em infecções hospitalares, urinárias e sepse, estando mais suscetíveis pacientes com queimaduras, com cateterismo urinário, fibrose cística, diabetes e neutropenia (MARRA et al., 2006). A variedade de sítios de infecção e a aquisição de mecanismos de resistência revelam sua grande capacidade de adaptação ao meio.

*Escherichia coli* compreende um grupo de cepas de bacilos Gram-negativos aeróbios que habitam o trato intestinal de humanos e animais de sangue quente (GYLES et al., 2011). A espécie apresenta diversos sorotipos, ou seja, variações antigênicas capazes de causar diferentes infecções como entéricas, urinárias e bacteremias nosocomiais, utilizando diferentes combinações de fatores de virulência (MARRS; ZHANG; FOXMAN, 2005).

O gênero *Proteus* pertence à família *Enterobacteriaceae* e são amplamente distribuídos na natureza. O traço marcante que o diferencia de outros membros desta família é o “swarming”, uma diferenciação celular que facilita a movimentação e é importante no processo infeccioso (WILLIAMS; SCHWARZHOF, 1978; MOBLEY; BELAS, 1995). Bactérias deste gênero são bacilos Gram-negativos, dimórficos, anaeróbio facultativos, móveis com flagelos peritríqueos. Esses microrganismos exibem atividade proteolítica sob condições de aerobiose e anaerobiose facultativa. A desaminação oxidativa de aminoácidos e a habilidade de hidrolisar uréia com a produção de amônia e dióxido de carbono são as propriedades bioquímicas mais representativas deste gênero (NIELUBOWICZ; MOBLEY, 2010).

Os *Enterococcus* são microrganismos comensais do trato intestinal de seres humanos e animais. Nos seres humanos, também são comumente encontrados como membros das microbiotas do trato geniturinário, trato gastrointestinal e da cavidade oral, sendo *E. faecalis* e *E. faecium* as espécies mais frequentemente isoladas de seres humanos (TEIXEIRA et al., 2011). Por outro lado, os enterococos podem causar uma variedade de infecções oportunistas, dentre as quais se destacam as do trato urinário, bacteremias, endocardites, feridas cirúrgicas e crônicas, incluindo úlceras de decúbito (ZIRAKZADEH; PATEL, 2006).

As enterobactérias são bacilos Gram-negativos, fermentadores de glicose e anaeróbios facultativos, podem ser encontradas no solo, na água, em plantas e em animais (de insetos a humanos) (BRENNER, 1984). De maneira geral, todas as enterobactérias têm sido relacionadas com infecções da corrente sanguínea, periodontites, colangites e outras infecções intra-abdominais (PATERSON, 2006; LIVERMORE, 2012; LUPO et al., 2013).

A escolha da terapia antimicrobiana empírica dependerá das características de cada lesão, seja ela superficial ou profunda, leve, moderada ou aguda (SADER; PEREIRA, 2001). As infecções mais leves ou sem risco de perda do membro são normalmente causadas por estreptococos, estafilococos sensíveis à oxacilina e à maioria dos betalactâmicos (exceto penicilina, aminopenicilinas e algumas cefalosporinas orais) e eventualmente cocos Gram-positivos anaeróbios (SHEA, 1999; SADER; DURAZZO, 2003).

A resistência antimicrobiana é um dos maiores problemas da comunidade médica atualmente, já que uma prevalência cada vez maior de cepas panresistentes continua sendo relatada. Além do tratamento, a resistência antimicrobiana também tem grandes implicações financeiras e econômicas (SHARLAND; SAROEY; BEREZIN, 2015). Até 23.000 óbitos anuais são supostamente causados diretamente por essas infecções (CCDP, 2015). A situação fica mais complicada em países pobres em recursos devido à ausência de sistemas de vigilância efetivos, de diagnósticos laboratoriais e do acesso a antibióticos adequados em face das limitações financeiras.

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; BOMONO e SZABO, 2006; MIN et al., 2007), que 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 (ARAÚJO, 2011)

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).

#### **1.4 A biotecnologia e os novos fármacos**

No Brasil, o uso das plantas medicinais foi disseminado principalmente pela cultura indígena (SOUSA et al., 2008). No entanto, este potencial para a descoberta de plantas como fonte de novas drogas é pobremente explorado ou regulamentado, contrastando com o que ocorre em países como Alemanha, Estados Unidos e Canadá (CALIXTO, 2000; RATES, 2001; VEIGA-JUNIOR, 2008), que apresentaram um interesse maior pela fitoterapia e, ao invés de utilizar a infusão, cozimento ou tintura dos fármacos vegetais, passaram a usar formas farmacêuticas mais elaboradas, como os comprimidos, cápsulas e geléias (CUNHA et al., 2003).

A seleção de uma planta para estudo farmacológico é um passo muito importante. A escolha pode ser feita de várias maneiras através do uso tradicional, dos componentes químicos, da seleção randomizada ou da combinação de mais de um critério. A estratégia mais comum é o uso das fontes naturais na medicina popular, que é conhecida como etnofarmacologia (RATES, 2001; CARLINI, 2003; ALBUQUERQUE e HANAZAKI, 2006).

As plantas medicinais constituem um importante recurso terapêutico para o tratamento de doenças, principalmente em nações em desenvolvimento. Essas são utilizadas tanto na “medicina caseira”, que faz parte da cultura popular destes países, como de matéria-prima para elaboração de medicamentos fitoterápicos (CORDEIRO et al., 2006; ZAGO et al., 2009). Apesar de muitos tratamentos eficazes serem atribuídos aos metabólitos secundários das plantas, que são constituídos por uma variedade de substâncias bioativas, (BASILE et al., 2000; SATO et al., 2002; PAIVA et al., 2003), muitas espécies vegetais ainda carecem de estudos. No Brasil essa situação não é diferente, muitas dessas plantas são utilizadas 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).

Muitas companhias farmacêuticas estão conduzindo estudos para encontrar alternativas medicinais que apresentem efeitos mais específicos, como por exemplo, o tratamento com plantas medicinais (SOUSA et al., 2008). Existe um grande número de plantas medicinais cujo potencial terapêutico tem sido estudado e cujos mecanismos de ação têm sido investigados através de ensaios laboratoriais *in vitro* e *in vivo*, que têm gerado informações úteis para o desenvolvimento de novas farmacoterapias a partir de plantas para o tratamento mais eficaz com menos efeitos adversos (SOUSA et al., 2008).

Com este advento dos estudos farmacológicos, a engenharia genética abriu novos caminhos para obtenção de replicação de variedades diferentes de plantas com características bioquímicas superiores, aplicáveis àquelas que produzem metabólitos secundários, incentivando assim, a produção e comercialização de compostos secundários valiosos que ainda nem foram abordados, ou tiveram sua farmacocinética avaliada (PLETSCHI, 2004), sintetizando milhares de compostos em curto espaço de tempo, com técnicas de triagem que, em alta escala, permitem que sejam testados milhares de compostos simultaneamente (ZACCHINO et al., 2001), e o desenvolvimento de novos medicamentos recombinantes mais potentes e com ação seletiva em alvos moleculares bem definidos (BARREIRO, 2001).

Além disso, a presença de compostos bioativos com ampla atividade biológica e a perspectiva de utilização no tratamento de diversas doenças, incluindo doenças infecciosas, pode representar uma alternativa para a descoberta de novos agentes terapêuticos, inclusive os que possam ser utilizados no tratamento de doenças causadas por microrganismos multirresistentes (PORFIRIO et al., 2009). Portanto, a busca de compostos bioativos é uma área de intensa atividade e permanecerá assim por diversos anos, devido à crescente demanda por novos produtos naturais com atividade terapêutica (PLETSCHI, 2004).

## **2. Objetivos**



## 2.1 Objetivo Geral

Determinar a atividade antibacteriana dos extratos brutos das plantas *Davilla nitida* (Vahl) Kubitzki. (Sambaibinha), *Anacardium humile* (St.) Hil (cajuzinho do Cerrado) e *Kalanchoe pinnata* (Lam.) Pers (Folha-Santa), pertencentes ao Cerrado do Estado do Tocantins, em bactérias resistentes a múltiplos fármacos isoladas dos pacientes diabéticos com ulcerações nos pés, atendidos no Hospital Geral Público de Palmas Doutor Francisco Ayres, Tocantins.

## 2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a atividade antibacteriana das cascas de *Davilla nitida* (Vahl) Kubitzki (Sambaibinha), cascas e folhas de *Anacardium humile* (St.) Hil (cajuzinho do Cerrado) e das folhas de *Kalanchoe pinnata* (Lam.) Pers (Folha-Santa) em bactérias Gram-negativas e Gram-positivas;
- Avaliar a eficácia dos extratos das cascas e folhas para bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, através da inibição do crescimento das diferentes cepas, frente aos extratos das plantas (CIM);
- Analisar o melhor potencial de ação antimicrobiana dos extratos correlacionando as diferentes metodologias;
- Avaliar a eficácia dos extratos das cascas e folhas relacionados à resposta dos antibióticos comercialmente utilizados para bactérias Gram-positivas e Gram-negativas pelo ensaio “Checkerboard”;
- Determinar o tempo de morte das bactérias pelo ensaio “Time-Kill”.

### **3. Referências Bibliográficas**

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**, p.266-269, 2010.

ADWAN, G.M.; ABU-SHANAB, B.A.; ADWAN, K.M. In vitro activity of certain drugs in combination with plant extracts against *Staphylococcus aureus* infections. **Pakistan Journal of Medical Sciences**, v. 24, n. 4, p.541–544, 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.2, n.4, 2004.

AHMAD, I.; BEG, A.Z. Antimicrobial and phytochemical studies on 45 Indian plants against multi-drug resistant human pathogens. **Journal of Ethnopharmacology**, n.74, p.113-123, 2001.

AKERELE, O. Medicinal Plants and Primary Health Care: an Agenda for Action. **Fitoterapia**, n.5, p.355-63, 1988.

ALBERNAZ, L.C.; DE PAULA, J.E.; ROMERO, G.A.S.; SILVA, M.R.R.; GRELLIER, P.; MAMBU, L.; ESPINDOLA, L.S. Investigation of plants extracts in traditional medicine of the Brazilian Cerrado against protozoans and yeasts. **Journal of Ethnopharmacology**, v.1, n.131, p.116-121, 2010.

ALBUQUERQUE, U.P.; HANAZAKI, N. As pesquisas etnodirigidas na descoberta de novos fármacos de interesse médico e farmacêutico: fragilidades e perspectivas. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 16 (Supl.), p.678-689, 2006.

ALMEIDA, A.P.; SILVA, S.A.G.; SOUZA, M.L.M.; LIMA, L.M.T.R.; ROSSI-BERGMANN, B.; MORAES, V.L.; COSTA, S.S. Isolation and chemical analysis of a fatty acid fraction of *Kalanchoe pinnata* with a potent lymphocyte suppressive activity. **Planta Medica**, n.66, p.134-137, 2000.

ALMEIDA, S.P.; PROENÇA, C.E.B.; SANO, S.M.; RIBEIRO, J.F. **Cerrado: espécies vegetais úteis**. Planaltina, EMBRAPA – CPAC, p.464, 1998.

ALONSO, R.J. **Tratado de fitomedicina - bases clínicas e farmacológicas**. Buenos Aires: 1ª 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.5, n.31, p.1224-1229, 2008.

ANDERSON, K.L. Is bacterial resistance to antibiotic an appropriate example of evolutionary change? **Creation Research Society Quarterly**, n.41, p.318-326, 2005.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Conceito fitoterapia** (2016). Disponível em: [http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controlere/rede\\_rm/cursos/rm\\_controlere/opas\\_web/modulo1/conceitos.htm](http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controlere/rede_rm/cursos/rm_controlere/opas_web/modulo1/conceitos.htm). Acesso em: junho, 2017.

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

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Metodologia dos Testes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluição para Bactéria de Crescimento Aeróbico: Norma Aprovada – 6ªed. M7-A6, v.23, n.2**. Substitui a Norma M7-A5, v.20, n.2, 2003.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Técnica de Microdiluição** (2008). Disponível em: [http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controlere/rede\\_rm/cursos/atm\\_racional/modulo2/metodos2.htm](http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controlere/rede_rm/cursos/atm_racional/modulo2/metodos2.htm). Acesso em: jun, 2016.

ARAÚJO, I.S.A. Atividade antimicrobiana de plantas aromáticas que ocorrem no estado do Pará. **Dissertação Mestrado**. Universidade Estadual de Feira de Santana, 103p. 2011.

ARAÚJO, N.R.R. Avaliação in vitro da atividade antimicrobiana de extratos vegetais sobre microrganismos relacionados à lesão de mucosite oral. **Dissertação de mestrado**. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará, 80p. 2010.

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**, n.9, p.310 – 319, 2015.

AYRES, M.C.C.; BRANDÃO, M.S.; VIEIRA-JUNIOR, G.M.; MENOR, J.C.A.S.; SILVA, H.B.; SOARES, M.J.S.; CHAVES, M.H. Atividade antibacteriana de plantas úteis e constituintes químicos da raiz de *Copernicia prunifera*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.1, n.18, p. 90 – 97, 2008.

BACCHI, E.M. Ação anti úlcera e cicatrizante de algumas plantas brasileira. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, n.1, p.93-100, 1986.

BARON, E.J.; FINEGOLD, S.M. **Bailey & Scott's – diagnostic microbiology**, 8ªed. 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.

BARROSO, G.M.; AMORIM, M.P.; PEIXOTO, A.L.; ICHASO, C.L.F. **Frutos e sementes: morfologia aplicada à sistemática de dicotiledôneas**. Editora UFV, Viçosa, 1999.

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**, n.71, p.110-116, 2000.

BEVILÁCQUA, C. **Microbiologia – bacteriologia**. Apostila para curso técnico em patologia clínica. Col. Dr. Clóvis Beviláacqua, 32p. 2011.

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

BRASIL. Ministério da Saúde (2011). **SUS financia seis novos fitoterápicos**. Disponível em:

[http://portal.saude.gov.br/portal/aplicacoes/noticias/default.cfm?pg=dspDetalheNoticia&id\\_area=124&CO\\_NOTICIA=10896](http://portal.saude.gov.br/portal/aplicacoes/noticias/default.cfm?pg=dspDetalheNoticia&id_area=124&CO_NOTICIA=10896). Acesso em: 14 abr. 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. **Política nacional de plantas medicinais e fitoterápicos** / Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Assistência Farmacêutica. – Brasília: Ministério da Saúde (Série B. Textos Básicos de Saúde). 60 p. 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Estado de Saúde do Distrito Federal. **Grupo de trabalho internacional sobre pé diabético**. Consenso Internacional sobre pé diabético. Brasília: Secretaria de Estado de Saúde do Distrito Federal, 100p. 2010.

BRENNER, D.J. Facultatively anaerobic Gram-negative rods. Family I. *Enterobacteriaceae*. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, v.1, p.408–420, 1984.

CAIAFA, J.S.; CASTRO, A.A.; FIDELIS, C.; SANTOS, V.P.; SILVA, E.S.; SITRÂNGULO JR, C.J. Atenção integral ao portador de Pé Diabético. **Jornal Vascular Brasileiro**, 2011.

CALIXTO, J.B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytoterapeutic agents). **Brazilian Journal Medicine Biology Research**, n.33, p.179-189, 2000.

CÂMARA, B. **Mecanismos de ação dos antibióticos** (2011). Disponível em: <http://www.biomedicinapadrao.com.br/2011/03/mecanismos-de-acao-dos-antimicrobianos.html>. Acesso em: out, 2017.

CARLINI, E.A. Plants and the central nervous system. **Pharmacology Biochemistry Behavior**, n.75, p.501-512, 2003.

CARVALHO, M.; SANTANA, D.G.; RANAL, M.A. Emergência de plântulas de *Anacardium humile* St. Hil. (*Anacardiaceae*) avaliada por meio de amostras pequenas. **Revista Brasileira de Botânica**, n.28 (3), p.627-633, 2005.

CASTRO, R.D. Atividade Antifúngica do Óleo Essencial de *Cinnamomum zeylanicum* Blume (Canela) e de sua Associação com Antifúngicos Sintéticos sobre Espécies de

Candida. 170f. **Tese de Doutorado** (Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba. 2010.

CATÃO, R.M.R.; BARBOSA FILHO, J.M.; GUTIERREZ, S.J.C.; LIMA, E.O.; PEREIRA, M.S.V.; ARRUDA, T.A.; ANTUNES, R.M.P. Avaliação da atividade antimicrobiana de riparinas sobre cepas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* multirresistentes. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v.4, n.37, p.247-249, 2005.

CCDP. **Centers for Disease Control and Prevention** (2015). Disponível em: <http://www.cdc.gov/drugresistance/> . Acesso em: Jun, 2015

CHEN-LUNG, H.; PEI-CHUN, L.; YU-CHANG, S. Composition and antimicrobial activities of the leaf essential oil of *Machilus zuihoensis* from Taiwan. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 22, n.2, p. 277-283, 2012.

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.

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

COIMBRA, R. **Notas de Fitoterapia**. 1ª. Ed. Rio de Janeiro: Ed. Carlos da Silva Araújo S. A., n.87, 1942.

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

CORDEIRO, C.H.G.; SACRAMENTO, L.V.S.; CORRÊA, M.A.; PIZZOLITTO, A.C.; LARA, E.H.G.; MORAIS, H.P. Avaliação farmacognóstica e atividade antibacteriana de extratos vegetais empregados em gel dentifrício. **Revista Brasileira Planta Medica**, n.8, p.173-82, 2006.

CORRÊA, M.P. **Dicionário das Plantas Úteis do Brasil**. Vol. II. Ministério da Agricultura - Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal, 266p. 1984.

CORREIA, S.J.; DAVID, J.P.; DAVID, M.J. Metabólitos secundários de espécies de *Anacardiaceae*. **Química Nova**, n.29, p.1287-1300, 2006.

COWAN, M.M. Plant products as antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Review**, n.12(4), p.564-82, 1999.

CUNHA, P.; SILVA, A.P.; ROQUE, O.R. **Plantas e produtos vegetais em fitoterapia**. Lisboa: Calouste Gulbenkian. 2003.

DA SILVA, J.G.; SOUZA, I.A.; HIGINO, J.S.; SIQUEIRA-JUNIOR, J.P.; PEREIRA, J.V.; PEREIRA, M.S.V. Atividade antimicrobiana do extrato de *Anacardium occidentale* Linn. em amostras multiresistentes de *Staphylococcus aureus*. **Revista Brasileira de farmacognosia**, v.17, n.4, 2007.

DAA - AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Position statements: standards of medical care in diabetes. **Diabetes Care**, 33 (suplemento 1), 2010.

DAVID, J.M.; SOUZA, J.C.; GUEDES, M.L.S.; DAVID, J.P. Estudo fitoquímico de *Davilla rugosa*: flavonóides e terpenóides. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.1, n.16, p.105-108, 2006.

DRAGO, L.; VECCHI, E.; NICOLA, L.; GISMONDO, M.R. In vitro evaluation of antibiotics combinations for empirical therapy of suspected methicillin resistant *Staphylococcus aureus* severe respiratory infections. **BMC Infectious Diseases**, n.111, p.1-7, 2007.

DUARTE, M.C.T.; FIGUEIRA, G.M.; PEREIRA, B.; MAGALHÃES, P.M.; DELARMELINA, C. Atividade antimicrobiana de extratos hidroalcolicos de espécies da coleção de plantas medicinais. CPQBA/UNICAMP. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, n.14, p.6-8, 2004.

DUARTE, M.C.T; FIGUEIRA, G.M.; SARTORATTO, A.; REHDER, V.L.; DELARMELINA, C. Anti-Candida activity of Brazilian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, n.97, p.305-311, 2005.



DUARTE, N.; GONÇALVES, A. Pé diabético. **Angiologia e Cirurgia Vascular**, v.7, n.2, 2011.

ELIOPOULOS, G.M. Synergism and antagonism. **Infection Disease Clinic North America**, n.3, p.399-406, 1989.

ELIOPOULOS, G.M.; ELIOPOULOS, C.T. Antibiotic combinations: should they be tested? **Clinical Microbiology Review**, n.1, p.139-156, 1988.

ELIOPOULOS, G.M.; MOELLERING Jr, R.C. **Antimicrobial combinations**. In: LORIAN, V. (Ed.), *Antibiotics in Laboratory Medicine*. 4th ed. Baltimore, Williams and Wilkins, MD, p.330-396, 1996.

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

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

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

FELFILI, J.M.; SILVA JÚNIOR, M.C.; FILGUEIRAS, T.S.; NOGUEIRA, P.E. Comparison of cerrado (sensu stricto) vegetation in central Brazil. **Ciência e Cultura**, v.4, n.50, p.237-243, 1998.

FERREIRA, A.L. Atividade antiulcerogênica da espécie *Anacardium humile* St. Hil (*Anacardiaceae*). **Dissertação de Mestrado**. Unicamp, 127p. 2005.

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

FRAGA, C. N. *Dilleniaceae*. In: Lista de Espécies da Flora do Brasil, Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2012/FB007351>>. Acesso em 6 março 2018.

GAIND, K.N.; GUPTA, R.L.P. Flavonoid glycosides from *Kalanchoe pinnata*. **Planta Medica**, v.20, n.4, p.368-73, 1973.

GARCIA, F. Estudo fitoquímico da fração AcOEt do extrato etanólico das folhas de *Arrabidaea brachypoda* (DC) Bureau – Bignoniaceae e atividades antioxidante e inibitória da enzima mieloperoxidase das substâncias isoladas. **Dissertação de mestrado** (Química na Área de Química Orgânica) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 101p. 2008.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N.P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo dos metabólitos secundários. **Química Nova**, v.2, n.30, p.374-381, 2007.

GUARALDO, L.; SERTIE, J.A.; BACCHI, E.M. Antiulcer action of the hydroalcoholic extract and fractions of *Davilla rugosa* Poiret in the rat. **Journal Ethnopharmacology**, n.76, p.191- 195, 2001.

GYLES, C.L.; PRESCOTT, J.F.; SONGER, J.G.; THOEN, C.O. **Pathogenesis of bacterial infections in animals**. Ed. editor^editors: John Wiley & Sons. 2011.

HAIDA, K.S.; PARZIANELLO, L.; WERNER, S.; GARCIA, D.R.; INÁCIO, C.V. Avaliação in vitro da atividade antimicrobiana de oito espécies de plantas medicinais. **Arquivo de Ciências e Saúde**, Unipar, n.11, p.185-192, 2007.

HOLETZ, F.B.; PESSINI, G.L.; SANCHES, N.R.; CORTEZ, D.A.G.; NAKAMURA, C.V.; DIAS FILHO, B.P. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Memorial do Instituto Oswaldo Cruz**, v.7, n.97, p.1027-1031, 2002.

IHAA Network. *Kalanchoe pinnata* (2016). Disponível em: <https://www.beneficiosdasplantas.com.br/folha-da-fortuna/>. Acesso em out, 2016.

IJBRJ. **Crassulaceae in Flora do Brasil 2020 em construção**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://reflora.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB22581>>. Acesso em: 06 Mar. 2018.

IPJBRJ - Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro (2015). *Anacardium humile* **St Hil.** Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/FichaPublicaTaxonUC/FichaPublicaTaxonUC.do?i d=FB15463&action=print> Acesso em: jul, 2017.

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

IWATSUKI, K.; YAMASAKI, O.; MORIZANE, S.; OONO, T. Staphylococcal cutaneous infections: Invasion, evasion and aggression. **Journal Dermatological Science**, n.42, p.203-214, 2006.

JACKSON, C.; AGBOKE, A.; VICTOR NWOKE, V. In vitro evaluation of antimicrobial activity of combinations of nystatin and *Euphorbia hirta* leaf extract against *Candida albicans* by the checkerboard method. **Journal of Medicinal Plants Research**, v.9, n.3, p.666-669, 2009.

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

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, p.1526-1543, 1999.

KAWA, L. *Kalanchoe pinnata* (2014). Disponível em: <[http://professoralucianekawa.blogspot.com.br/2014/06/kalanchoe-pinnata-folha-da-fortuna\\_25.html](http://professoralucianekawa.blogspot.com.br/2014/06/kalanchoe-pinnata-folha-da-fortuna_25.html)>. Acesso em: out, 2016.

KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D.; JANDA, W.M.; SCHRECKENBERGER, P.C.; WINN JR, W.C. **Diagnóstico microbiológico**, n.5, p.1465, 2001.

KUETEA, V.; NGAMENI, B.; SIMOC, C.C.; TANKEUC, R.K.; 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**, n.120, p.17–24, 2008.

KUSHIMA, H.; NISHIJIMA, C.M.; RODRIGUES, C.M.; RINALDO, D.; SASSÁ, M.F.; BAUAB, T.M.; DI STASI, L.C.; CARLOS, I.Z.; BRITO, A.R.M.S.; VILEGAS, W.; HIRUMA-LIMA, C.A. *Davilla elliptica* and *Davilla nitida*: gastroprotective, anti-inflammatory, immunomodulatory and anti-*Helicobacter pylori* action. **Journal Ethnopharmacology**, n.123, p.430–438, 2009.

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**, v.8, 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. 2-3, n.94, p.279-281, 2004.

LAZARINI. 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. 2004.

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.481-501, 2001.

LIMA, M.R.F.; XIMENES, C.P.A.; LUNA, J.S.; SANT'ANA, A.E.G. The antibiotic activity of some Brazilian medicinal plants. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, n.16, p.300-306, 2006.

LIPSKY, B.A.; BERENDT, A.R.; CORNIA, P.B.; PILE, J.C.; PETERS, E.J.G.; ARMSTRONG, D.G.; DEERY, H.G.; EMBIL, J.M.; JOSEPH, W.S.; KARCHMER, A.W.; PINZUR, M.S.; SENNEVILLE, E. Infectious Diseases Society of America Clinical Practice Guideline for the Diagnosis and Treatment of Diabetic Foot Infections. **Clinical Infectious Disease**. 2012.

LIVERMORE, D.M. Current epidemiology and growing resistance of Gram-negative pathogens. **Korean Journal of Internal Medicine**, v.27, n.2, p.128-142, 2012.

LONDE, L.N. Indução de respostas morfogenéticas em *Anacardium humile* (St.) Hil (*Anacardiaceae*) e análise da divergência genética entre populações. **Dissertação de Mestrado**, Instituto de Genética e Bioquímica, UFU, 140p. 2005.

LOPES, F.C.M.; PLACERES, M.C.P.; JORDÃO JÚNIOR, C.M.; HIGUCHI, C.T.; RINALDO, D.; VILEGAS, W.; LEITE, C.Q.F.; CARLOS, I.Z. Immunological and microbiological activity of *Davilla elliptica* St. Hil (*Dilleniaceae*) against

*Mycobacterium tuberculosis*. **Memorial Institute Oswaldo Cruz**, v. 6, n.102, p.769-72, 2007.

LUIZ-FERREIRA, A.; ALMEIDA, A.C.; COLA, M.; BARBASTEFANO, V.; ALMEIDA, A.B.; BATISTA, L.M.; FARIAS-SILVA, E.; PELLIZZON, C.H.; HIRUMA-LIMA, C.A.; SANTOS, L.C.; VILEGAS, W.; BRITO, A.R. Mechanisms of the gastric antiulcerogenic activity of *Anacardium humile* St. Hil on ethanol-induced acute gastric mucosal injury in rats. **Molecules**, n.15, p.7153-7166, 2010.

LUPO, A. et al. Non-phenotypic tests to detect and characterize antibiotic resistance mechanisms in *Enterobacteriaceae*. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v.77, n.3, p.179–194, 2013.

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

MARRA, R.A.; BAR, K.; BEARMAN, G.M.L.; WENZEL, R.P.; EDMOND, M.B. Systemic inflammatory response syndrome in adult patients with nosocomial bloodstream infection due to *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Infection**, n.53, p.30-35, 2006.

MARRS, C.; ZHANG, L.; FOXMAN, B. Escherichia coli mediated urinary tract infections: Are there distinct uropathogenic E. coli (UPEC) pathotypes? **FEMS Microbiology Letters**, n.252, p.183-190, 2005.

MICHELIN, D.C.; ILHA, S.M.; RINALDO, D.; SANNOMIYA, M.; SANTOS, L.C., VILEGAS, W.; SALGADO, H.R.N. Antimicrobial activity of *Davilla elliptica* St. Hill (*Dilleniaceae*). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, n.15, p.209-211, 2005.

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

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**, n.104, p.9469-74, 2007.

MITCHELL, G.; LAFRANCE, M.; BOULANGER, S.; SÉGUIN, D.L.; GUAY, I.; GATTUSO, M.; MARSAULT, E.; BOUARAB, K.; MALOUIN, F. Tomatidine acts in synergy with aminoglycoside antibiotics against multiresistant *Staphylococcus aureus* and prevents virulence gene expression. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, n.67, p.559- 568, 2012.

MOBLEY, H.L.T.; BELAS, R. Swarming and pathogenicity of *Proteus mirabilis* in the urinary tract. **Trends in Microbiology**, v.3, n.7, p.280-284, 1995.

MULLER, P.S.G.; et al. Regulamentação para a venda de antibióticos no Brasil e sua aceitação pela população. **Acta Biomedica Brasiliensia**, Rio de Janeiro, v.6, n.1, 2015.

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**, v.4, n.31, p.47-56, 2000.

NASSIS, C.Z.; HAEBISCH, E.M.A.B.; GIESBRECHT, A.M. Antihistamine activity of *Bryophillum calycinum*. **Brazilian Journal Medicine Biology Research**, n.25, p.929-36, 1992.

NEVES, C.; COLET, C. Perfil de uso de antimicrobianos e suas interações medicamentosas em uma uti adulto do Rio Grande do Sul. **Revista de Epidemiologia e Controle de Infecção**, v.2, n.5, p.65-71, 2015.

NIELUBOWICZ, G.R.; MOBLEY, H.L. Host-pathogen interactions in urinary tract infection. **Nature Reviews Urology**, v.7, p.430–441, 2010.

NOGUEIRA, L.B. Avaliação do potencial antimicrobiano de *Pouteria* spp. e de triterpenos quinonametídeos com enfoque no *Helicobacter pylori*. **Tese doutorado**, Universidade Estadual Paulista. 160p. 2012.

OLIVEIRA, W.L.; BRANCO, A.B. Avaliação da antibioticoterapia em pacientes internados no Hospital Regional do Guará – DF. **Comunicado ciência e Saúde**, v.2, n.18, p.107-14, 2007.

OSTROSKY, E.A.; MIZUMOTO, M.K.; LIMA, M.E.L.; KANEKO, T.M.; NISHIKAWA, S.O.; FREITAS, B.R. Métodos para avaliação da atividade

antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, p.301-307, 2008.

OZER, B.; KALACHI, A.; SEMERCI, E.; DURAN, N.; DAVUL, S.; YANAT, A.N. Infections and aerobic bacterial pathogens in diabetic foot infections. **African Journal of Microbiology Research**, v.4, n.20, p.2153-60, 2010.

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

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

PATERSON, D. L. Resistance in Gram-Negative Bacteria: *Enterobacteriaceae*. **The American Journal of Medicine**, v.119, n.6A, p.20–28, 2006.

PEDROSA, H.C. (Org.) **Grupo de Trabalho Internacional Sobre Pé Diabético**. Consenso Internacional sobre Pé Diabético. Tradução de Ana Cláudia de Andrade, Hermelinda Cordeiro Pedrosa. Brasília: Secretaria de Estado de Saúde do Distrito Federal. 126 p. 2001.

PILLAI, S.K.; MOELLERING, R.C. **Antimicrobial combinations. Antibiotics in laboratory medicine**. New York: Lippincott Williams & Wilkins, p.365–400, 2005.

PLETSCHI, M. **Compostos biologicamente ativos: A aplicação da biotecnologia à produção de compostos naturais biologicamente ativos**. Biotecnologia, ciência e desenvolvimento, p.12-15, 2004. Disponível em: [http://www.biotecnologia.com.br/revista/bio04/4hp\\_4.pdf](http://www.biotecnologia.com.br/revista/bio04/4hp_4.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**, n.40, p.39-44, 2007.

RASHMI, A.S.; ASHIMA, J.; PRIYANKA, K.; SANGEETA, S.; DIVYA, B.; DEEPAK, K.M. Antimicrobial and Antioxidant Activities of *Kalanchoe pinnata* Against Pathogens. **Journal of Pharmacy Research**, v.5, n.10, p.5062-5063, 2012.

- RATES, S.M.K. Plants as source of drugs. **Toxicon**, n.39,p.603- 613, 2001.
- RESCHKE, A.; MARQUES, L.M.; MAYWORM, M.A.S. Atividade antibacteriana de *Ficus benjamina* L. (*Moraceae*). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.2, n.9, p.67-70, 2007.
- RIBEIRO, C.M.; SOUZA, K.G.; RIBEIRO, T.T.; VIEIRA, A.R.; MENDONÇA, L.C.; BARBOSA, W.L.; VIEIRA, J.M.S. Avaliação da atividade antimicrobiana de plantas utilizadas na medicina popular da Amazônia. **Infarma**, v.21, n.1/2, p.45-49, 2009..
- RIOS, J.L.; RECIO, M.C. Medicinal plants and Antimicrobial activity - **Journal of Ethnopharmacology**, n.100, p.80-84, 2005.
- ROCHA, C.Q.; VILELA, F.C.; CAVALCANTE, G.P.; SANTA-CECÍLIA, F.V.; SANTOS-E-SILVA, L.; SANTOS, M.H.; GIUSTI-PAIVA, A. Anti-inflammatory and antinociceptive effects of *Arrabidaea brachypoda* (DC) Bureau roots. **Journal of Ethnopharmacology**, v.2, n.133, p.396-401, 2011.
- RODRIGUES, C.T.; BERGER, M.; SILVA, W.O.B.; SANTI, L.; GUIMARÃES, J.Á.; VAINSTEIN, M.H. **Avaliação da Atividade Antimicrobiana de Extratos de Sementes de Diferentes Plantas Brasileiras**. Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2011.
- ROSA, R.L.; BARCELOS, A.L.V.; BAMPI, G. Investigação do uso de plantas medicinais no tratamento de indivíduos com diabetes melito na cidade de Herval D' Oeste - SC. **Revista brasileira de plantas medicinais**, v.14, n.2, p.306-310, 2012.
- SADER, H.; DURAZZO, A. Antimicrobial therapy in diabetic foot infections. **Journal Vascular Brazilian**, v.2, n.1, p.61-6, 2003.
- SADER, H.S.; GALES, A.C.; PFALLER, M.A. Pathogen frequency and resistance patterns in Brazilian hospitals: Summary of results from three years of the SENTRY antimicrobial surveillance program. **Brazilian Journal Infect Disease**, n.5, p.200-14, 2001.
- SADER, H.S.; PEREIRA, C.A.P. **Atualização em Antimicrobianos**. In: Ramos, OL, Rothschild, HA, editores. *Atualização Terapêutica*. São Paulo: Editora Artes Médicas; p.300-17, 2001.



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

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

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.

SCHULTZ, A. **Introdução a Botânica Sistemática**. 4ª. Ed. Porto Alegre: Editora Universidade Federal do Rio Grande do Sul, v.2, p.121, 1984.

SHARLAND, M.; SAROEY, P.; BEREZIN, E.N. The global threat of antimicrobial resistance - The need for standardized surveillance tools to define burden and develop interventions. **Journal Pediatric**, n.91, p.410-2, 2015.

SHEA, K.W. Antimicrobial therapy for diabetic foot infections. A practical approach. **Postgraduate Medical journal**, v.106, n.85-6, p.89-94, 1999.

SILVA, M.T.N.; USHIMARU, P.I.; BARBOSA, L.N.; CUNHA, M.L.R.S.; FERNANDES JUNIOR, A. Antibacterial activity of plant essential oils against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* strains isolated from human specimens. **Revista brasileira de plantas medicinais**, v.11, n.3, 2009.

SILVA-LUZ, C.L.; PIRANI, J.R. **Anacardiaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro**. 2014. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB4381>. Acesso em: out, 2017.

SILVEIRA, L.M.S.; OLEA, R.S.G.; MESQUITA, J.S.; CRUZ, A.L.N.; MENDES, J.C. 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.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia, da planta ao medicamento**. 5ª ed. Florianópolis: Editora UFRGS. 2004.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. Org. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6ª ed. Porto Alegre: Ed UFSC; UFRGS. 2007.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES (2015). **Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes**. Disponível em: <http://www.diabetes.org.br/publico/>. Acesso em junho, 2016.

SOUSA, F.C.F.; MELO, C.T.V.; CITO, M.C.O.; FELIX, F.H.C.; VASCONCELOS, S.M.M.; FONTELES, M.M.F.; BARBOSA FILHO, J.M.; VIANA, G.S.B. Plantas medicinais e seus constituintes bioativos: Uma revisão da bioatividade e potenciais benefícios nos distúrbios da ansiedade em modelos animais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, n.4, p.642-654, 2008.

SOUZA, R.H.F. RDC 20/2011 - O controle de antimicrobianos: o que podemos esperar? **Monografia** (Farmácia), Universidade de Rio Verde (UniRV), 38p. 2016.

SUEKE, H.; KAYE, S.B.; NEAL, T.; HALL, A.; TUFT, S.; PARRY, C.M. An in vitro investigation of synergy or antagonism between antimicrobial combinations against isolates from bacterial keratitis. **Immunology Microbiology**, v.51, n.8, p.4151-4155, 2010.

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**, v.25, n.2, p.127-9, 2007.

TAVARES, W. Bactérias Gram-positivas problemas: resistência do estafilococo, do enterococo e do pneumococo aos antimicrobianos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.33, n.3, p.281-301, 2000.

TAVARES, W. **Manual de antibióticos e Quimioterápicos antiinfeciosos**, 2<sup>a</sup>ed., Atheneu: São Paulo, 792p. 1999.

TEIXEIRA, L.M.; CARVALHO, M.G.; SCHEWMAKER, P.L.; FACKLAM, R.R. *Enterococcus*. In: LANDRY, J.H.; WARNOCK, M.L.; D.W. *Manual of Clinical Microbiology*, edited by VERSALOVIC **American Society for Microbiology**, Washington, D.C. p.350-364, 2011.

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

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, p.47-69, 1991.

VEIGA-JUNIOR, V.F. Estudo do consumo de plantas medicinais na Região Centro-Norte do Estado do Rio de Janeiro: aceitação pelos profissionais de saúde e modo de uso pela população. **Revista Brasileira Farmacognosia**, n.18, p.308-313, 2008.

VENTURA, M.F. Uso de plantas medicinais por grupo de idosos de Unidade de Saúde de Campo Grande, Rio de Janeiro: Uma discussão para a implantação da fitoterapia local. **Dissertação: Especialização**. Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. 52p. 2012.

VIDAL, L. Avaliação do sistema de classificação de risco do pé, proposto pelo grupo de trabalho internacional sobre o pé diabético, hospital da polícia militar de Minas Gerais 2002-2007. **Dissertação de Mestrado**. Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 172 p. 2009.

VIEIRA, S.C.H.; SÓLON, S.; VIEIRA, M.C.; ZÁRATE, N.A.H. Levantamento de fitoterápicos manipulados em farmácias magistrais de Dourados-MS. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.20, n.1, p.28-34, 2010.

VILAS BOAS, O.M.C. (2003). **Farmacologia**. 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**, v.50, p.1013-6, 2002.

WILLIAMS, F.D.; SCHWARZHOF, R.H. Nature of the swarming phenomenon in *Proteus*. **Annual Review of Microbiology**, v.32, p.101–122, 1978.

WINN JÚNIOR, W.; ALLEN, S.; JANDA, W.; KONEMAN, E.; PROCOP, G.; SCHRECKENBERGER, P.; WOODS, G. **Diagnóstico Microbiológico: texto e atlas colorido**. Guanabara Koogan. 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**, p.47-75, 2001.

ZAGO, J.A.A.; USHIMARU, P.I.; BARBOSA, L.N.; FERNANDES JUNIOR, A. Sinergismo entre óleos essenciais e drogas antimicrobianas sobre linhagens de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* isoladas de casos clínicos humanos. **Brazilian Journal Pharmacognosy**, n.19, p.828-33, 2009.

ZIRAKZADEH, A.; PATEL, R. Vancomycin-resistant enterococci: colonization, infection, detection, and treatment. **Mayo Clinic Proceedings**, n.81, p.529-536, 2006.



## 4.1 Artigo 01: *Davilla nitida* (Vahl) Kubitzki

Taylor & Francis Online Access provided by CAPES [Log in](#) | [Register](#) [Cart](#)



# Natural Product Research

Formerly *Natural Product Letters*

This Journal
⌵
🔍

Advanced search

Submit an article
New content alerts
RSS
Citation search

[Current issue](#) | [Browse list of issues](#)

---

**This journal**

[Aims and scope](#)

**Journal news**

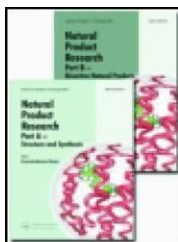
2016 Impact Factor 1.828 (©2017 Clarivate Analytics, 2016 Journal Citation Reports®)

Enjoy free online access and more by visiting our [Chemistry hub page](#).

### Periódicos

ISSN	Título	Área de Avaliação	Classificação
1478-6419	NATURAL PRODUCT RESEARCH	BIODIVERSIDADE	B3
1478-6419	NATURAL PRODUCT RESEARCH (PRINT)	BIODIVERSIDADE	B3
1478-6419	NATURAL PRODUCT RESEARCH	BIOTECNOLOGIA	B2
1478-6419	NATURAL PRODUCT RESEARCH (PRINT)	BIOTECNOLOGIA	B2

O artigo publicado pode ser consultado no endereço eletrônico:  
<https://doi.org/10.1080/14786419.2018.1443085>.



**Natural Product Research**  
Formerly Natural Product Letters



ISSN: 1478-6419 (Print) 1478-6427 (Online) Journal homepage: <http://www.tandfonline.com/loi/gnpl20>


## In vitro antibacterial and time-kill assay of ethanolic extract of *Davilla nitida* bark on multidrug resistant bacteria isolated from diabetic foot lesions

Michele Cezimbra Perim, Joelma da Costa Borges, Eulália Maria Lima da Silva, Thiago Antônio de Sousa Araújo, Ana Carolina Oliveira da Silva, Valéria Christiane da Silva, Solange Cristina Carreiro, Anderson Ferreira Cunha & Maria Cristina da Silva Pranchevicius

To cite this article: Michele Cezimbra Perim, Joelma da Costa Borges, Eulália Maria Lima da Silva, Thiago Antônio de Sousa Araújo, Ana Carolina Oliveira da Silva, Valéria Christiane da Silva, Solange Cristina Carreiro, Anderson Ferreira Cunha & Maria Cristina da Silva Pranchevicius (2018): In vitro antibacterial and time-kill assay of ethanolic extract of *Davilla nitida* bark on multidrug resistant bacteria isolated from diabetic foot lesions, *Natural Product Research*, DOI: 10.1080/14786419.2018.1443085

To link to this article: <https://doi.org/10.1080/14786419.2018.1443085>

 View supplementary material [↗](#)

 Published online: 23 Feb 2018.

 Submit your article to this journal [↗](#)

 View related articles [↗](#)

 View Crossmark data [↗](#)

Full Terms & Conditions of access and use can be found at  
<http://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=gnpl20>

SHORT COMMUNICATION



## *In vitro* antibacterial and time-kill assay of ethanolic extract of *Davilla nitida* bark on multidrug resistant bacteria isolated from diabetic foot lesions

Michele Cezimbra Perim<sup>a</sup>, Joelma da Costa Borges<sup>a</sup>, Eulália Maria Lima da Silva<sup>b</sup>, Thiago Antônio de Sousa Araújo<sup>a,c</sup>, Ana Carolina Oliveira da Silva<sup>d</sup>, Valéria Christiane da Silva<sup>e</sup>, Solange Cristina Carreiro<sup>a</sup>, Anderson Ferreira Cunha<sup>e</sup> and Maria Cristina da Silva Pranchevicius<sup>e</sup> 

<sup>a</sup>Universidade Federal do Tocantins, Palmas, Brazil; <sup>b</sup>Oklahoma Medical Research Foundation, Cell Cycle and Cancer Biology Research Program, Oklahoma City, OK, USA; <sup>c</sup>Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brazil; <sup>d</sup>Hospital de Base do Distrito Federal, SMHS, Brasília, Brazil; <sup>e</sup>Departamento de Genética e Evolução, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, Brazil

### ABSTRACT

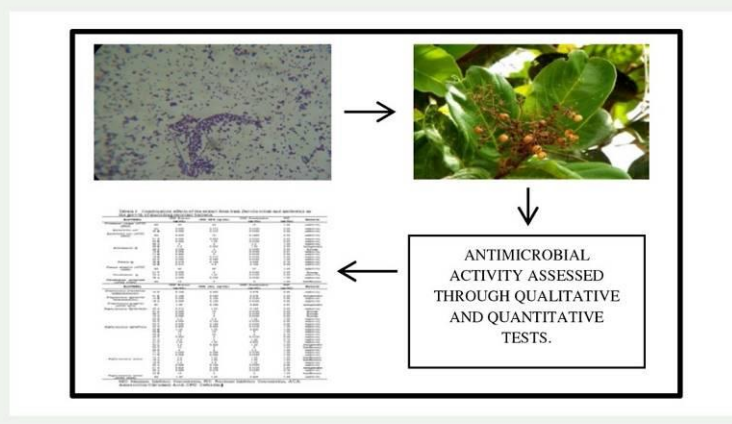
This study reported the antimicrobial activity of the bark extract of *Davilla nitida* on multidrug resistant bacteria isolated from Diabetic Foot Infections. Antibacterial activity of the bark extract was evaluated by agar Disk-Diffusion (DD), Broth Dilution (BD), Checkerboard and Time-kill methods. The extract showed a significant antibacterial activity against all groups of bacteria tested. BD was more sensitive for determining the antibacterial activity of the bark extract than the DD method. The bark extract inhibited the growth of bacteria with high-levels of antibiotic-resistance, such as *Pseudomonas* spp. (100.0%), *Enterobacter* spp. (88.89%), *Staphylococcus aureus* (54.55%), *Streptococcus pneumoniae* (75.0%), *Staphylococcus saprophyticus* (92.86%). The combination of extract with antibiotics resulted in an additive effect against most of the strains tested. Time-kill kinetics profiles of bark extract showed bactericidal and time-dependent properties. Our results suggest that the bark extract of *Davilla nitida* is a source of bioactive compounds, which may be useful against antibiotic-resistant bacteria.


### ARTICLE HISTORY


Received 28 July 2017  
Accepted 12 February 2018

### KEYWORDS

*Davilla nitida* (Vahl) Kubitzki; antimicrobial activity; multidrug resistant bacteria; diabetic foot infection



**CONTACT** Maria Cristina da Silva Pranchevicius  [mcspranc@gmail.com](mailto:mcspranc@gmail.com), [mcspranc@ufscar.br](mailto:mcspranc@ufscar.br)

 Supplemental data for this article can be accessed at <https://doi.org/10.1080/14786419.2018.1443085>.



## 1. Introduction

A diabetic foot infection is one of the serious complications associated with diabetes, and it is often characterized by the presence of the multi-drug resistant organisms in lesions (Dunyach-Remy et al. 2016). The emergence and spread of multi-resistant pathogens have caused the need for the discovery and development of new active agents capable of preventing the bacterial resistance mechanism (Barreiro and Bolzani 2009). Traditionally, plants have been considered a source of new drugs and many studies have shown the importance of Brazilian flora in this context (Araújo et al. 2015; Borges et al. 2017). Studies with methanol extract from the leaves of *Davilla nitida* (Vahl) Kubitzki (family *Dilleniaceae*), a specie commonly found in the Brazilian Cerrado biome, have shown anti-ulcerogenic, immunological and anti-*H. pylori* activities and this is possibly explained by the greater quantities of components such as terpenes, flavonoids, tannins and other compounds (Kushima et al. 2009). However, no data is available about the antibacterial activity of the bark extract of *Davilla nitida*. Thus, the aim of this present study was to evaluate antimicrobial activities of the ethanolic bark extract of *Davilla nitida* against multidrug resistant bacteria isolated from the diabetic foot lesions, and other strains obtained from the American Type Culture Collection.

## 2. Results and discussion

The antimicrobial activity of the bark extract of *Davilla nitida* (Vahl) Kubitzki, against gram-negative ( $n = 26$ ) and gram-positive bacteria ( $n = 48$ ), was tested by Disk Diffusion (DD) and Broth Dilution (BD) (Table S1) methods. By DD method, the sensitivities of the bacteria to the bark extract were assessed by measuring the inhibition halo of the microbial growth on the agar surface around the disks, and only values  $> 9$  mm were considered as active against bacteria (Bhalodia and Shukla 2011; Arora and Bhardwaj 1997). The bark extract was active against most gram-negative ( $n = 18$  (69.23%) to DD and  $n = 20$  (76.92%) to BD) and gram-positive ( $n = 32$  (66.67%) to DD and  $n = 32$  (66.67%) to BD) bacteria, thereby indicating a broad spectrum of antibacterial activity ( $n = 50$  (67.57%) to DD and  $n = 52$  (70.27%) to BD). Considering antibacterial activities of the bark extract of *Davilla nitida* against multidrug-resistant bacteria have not yet been reported, the high activity against both gram-negative and gram positive bacteria found in our study is very promising. BD methodology is widely used and extremely advantageous for the analysis of natural products, because it requires minimal sample quantities, it is a fast, reliable and low-cost method for Minimum Inhibitory Concentration (MIC) determination (Luber et al. 2003). By BD method, the bark extract of *Davilla nitida* presented substantial antimicrobial activity even at the lowest concentration (0.039 mg/mL,  $n = 22$ ) tested, of any of the evaluated bacterial groups ( $n = 74$ ), but especially for the gram-negative strains ( $n = 11$ ; 42.31%). Antimicrobial activity is very promising when MIC is below 0.1 mg/mL for plant extract (Ríos and Recio 2005). The differential in antibacterial activity of bark extract on gram-negative and gram-positive bacteria can be explained by the fact that some antimicrobial compounds have specific activity spectrum and therefore will not be active on certain categories or certain species of microorganisms (Yamamoto et al. 2016; Voukeng et al. 2016).

Table S1 also shows the remarkable inhibition of the strains-specific growth. The bark extract of *Davilla nitida* inhibited the growth of *Escherichia coli* ( $n = 2$ ; 100%), *Enterobacter* spp. ( $n = 8$ ; 88.89%), *Proteus* spp. ( $n = 3$ ; 42.86%), *Proteus mirabilis* (ATCC 12453) ( $n = 1$ ;

100.00%), *Pseudomonas* spp. ( $n = 3$ ; 100.00%), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 2753) (1; 100.00%) in both BD and DD methods. *Citrobacter youngae* (ATCC 29935) ( $n = 1$ ) and *Escherichia coli* (ATCC 25922) ( $n = 1$ ), used as control strains, were inhibited only by BD method. The bark extract was also effective against *Streptococcus pneumoniae* (alpha-hemolytic) ( $n = 1$ ; 50.0%), *Streptococcus agalatae* (beta-hemolytic) ( $n = 3$ ; 75.0%), *Streptococcus pyogenes* (ATCC 0015) ( $n = 1$ ; 100.00%), *Staphylococcus epidermidis* ( $n = 1$ ; 25.00%), *Staphylococcus saprophyticus* ( $n = 13$ ; 92.86%), *Staphylococcus aureus* ( $n = 12$ ; 54.55%), and *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) ( $n = 1$ ; 100.00%) in both the methods (DD and BD). It is interesting to note that often these bacteria exhibit high-level resistance to most of the broad-spectrum antibiotics (Dhanasekaran et al. 2003; Sivanmaliappan and Sevanan 2011). In fact, Perim et al. (2015) demonstrated that the bacteria, isolated from the diabetic foot lesions and used in this study, *Pseudomonas* spp., *Proteus* spp., and *Enterobacter* spp. were resistant to ampicillin, amoxicillin, aztreonam, norfloxacin, tetracycline, cefotaxime and polymyxin B; *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalatae* (beta-hemolytic), *Streptococcus pneumoniae* (alpha-hemolytic), and *Staphylococcus saprophyticus* were resistant to almost all antibiotics tested (azithromycin, amoxicillin/clavulanic acid, ceftiofur, cefalexin/cefalotin, erythromycin, oxacillin, penicillin, trimethoprim-sulfamethoxazole, and vancomycin) except for imipenem. Our results indicate the potential of this plant for the treatment of bacterial infections. However, further studies should be performed in order to identify the constituents responsible for these activities.

The combined effect of the extract from the bark of *Davilla nitida* with antibiotics Cefoxitin (CFO) for gram-negative bacteria and Amoxicillin/Clavulanic Acid (ACA) for gram-positive bacteria was validated by the checkerboard method (Table S2). The combination of CFO or ACA with *Davilla nitida* extract showed an additive effect when tested against most of the strain. For gram-negative bacteria ( $n = 20$ ), the bark extract in combination with CFO have an additive effect against 16 (80.0%) bacteria, however, synergism was observed only with two strains, *Pseudomonas* spp. and *Enterobacter* spp. For gram-positive bacteria ( $n = 32$ ), the association of *Davilla nitida* with antibiotic ACA showed an additive effect against 21 (65.63%) bacteria, and a synergistic activity against only three *Staphylococcus saprophyticus*. Synergistic and additive interactions are a result of a combined effect of active compounds from extracts and antibiotics (Stefanović et al. 2012). The association of plant extracts and antibiotics can lead to an additive effect, which can improve the antimicrobial activity against various multidrug-resistant strains (Aqil et al. 2006; Chaves et al. 2016). Therefore, the findings of the present work indicate that the *Davilla nitida* bark extract may be used in combination with CFO or ACA antibiotics in the treatment of bacterial infections.

The bactericidal activity of bark extracts against the gram-negative (Table S3) and gram-positive bacteria (Table S4) was determined using a time-kill assay. Results are presented in terms of the Log<sub>10</sub> CFU/mL change and are based on the conventional bactericidal activity standard, defined as being equal to a 3Log<sub>10</sub> CFU/mL or greater reduction in the viable colony count relative to the initial inoculum (Pankey and Sabath 2004; Olajuyigbe and Afolayan 2012a, 2012b). Our results showed a significantly rapid reduction in the average log of almost all viable cells. For the gram-negative bacteria (Table S3), with the 1 × MIC and 2 × MIC, the average log reduction in viable cell count for the ethanolic extract ranged between 0.000 Log<sub>10</sub> and 0.699 Log<sub>10</sub> CFU/mL after 6 and 12 h of interaction, and between 0.000 Log<sub>10</sub> and 0.602 Log<sub>10</sub> CFU/mL after 24 h interaction. At 2 × MIC, incubating the bacteria for 6 h resulted in the reduction of the viable cell count that ranged between 0.000

Log<sub>10</sub> and 0.602 Log<sub>10</sub> CFU/mL, while after 12 and 24 h of incubation, the average log reduction in the viable cell count ranged between 0.000 Log<sub>10</sub> and 0.301 Log<sub>10</sub>. For the gram-positive bacteria (Table S4), after 6 h of incubating the bacteria with the 1 × MIC and 2 × MIC, the average log reduction in the viable cell count ranged between 0.000 Log<sub>10</sub> and 0.903 Log<sub>10</sub> CFU/mL. After 12 h of incubation, the average log reduction in the viable cell count ranged between 0.000 Log<sub>10</sub> and 0.778 Log<sub>10</sub> CFU/mL, and after 24 h of incubation, the average log reduction in the viable cell count ranged between 0.000 Log<sub>10</sub> and 1.000 Log<sub>10</sub> CFU/mL. At 1.0 × MIC and after 24 h of incubation, a great reduction in cell density with the extract was observed with *Proteus* spp. (PS 40B), *Proteus mirabilis* (PM 12453), *Pseudomonas* spp. (PSS 23A, PSS 38A), *Citrobacter youngae* (CY 2269935), *Escherichia coli* (EC 6A), *Enterobacter* spp. (ES 01D), *Staphylococcus saprophyticus* (26C, 34C, 35A, 35B, 38B, 39D, 40C, 41C), *Staphylococcus aureus* (02C, 05C, 05D, 11A, 1D, 29A, 125923). At 2.0 × MIC, for gram-negative and gram-positive bacteria, the bacterial colonies were almost wiped out after both 12 and 24 h incubations. For 0.5 × MIC of the extract, there was a net growth for most of the bacteria gram-negative and gram-positive tested. The growth inhibition and efficacy of the bark extract of *Davilla nitida* were dose and time dependent in time-kill profiles for the tested bacteria. However, between 12 and 24 h incubation, the reduction in the number of viable cells with the 2 × MIC was greater than that observed with the 1 × MIC, in both gram-negative and gram-positive bacteria. Our results corroborate with other studies (Aiyegoro et al. 2009; Olajuyigbe and Afolayan 2012a, 2012b; Ojo et al. 2013), which demonstrated a high killing effect on 2 × MIC at longer duration of interaction. Also, the significant reduction in the cell counts (2 × MIC) after 12 h of incubation, for both groups of bacteria, shows that the extract was highly bactericidal.

### 3. Conclusion

Our data provide quantitative information using different approaches for the antibacterial activity of the bark extract of *Davilla nitida* against multidrug resistant bacteria. However, bioactive compounds responsible for this activity should be isolated, identified, and tested for toxic effects.

### Supplementary material

Experimental details relating to this paper are available online, alongside Tables S1–S5.

### Acknowledgements

The authors wish to thank the SESAU-TO and Thiago de Cesaro for facilitating the development of project, the LACEN-TO who kindly provided the control strains and Christopher Allen Ness for English translation support.

### Disclosure statement

No potential conflict of interest was reported by the authors.

## Funding

This work was supported by grants from CAPES-Brazil [AUX-PE-PNPD 2535/2011, process number 23038.007229]; and CNPq-Brazil [Universal, process number 485873/2013-3].

## ORCID

Maria Cristina da Silva Pranchevicius  <http://orcid.org/0000-0002-0416-7401>

## References

- Aiyegoro OA, Afolayan AJ, Okoh AI. 2009. *In vitro* antibacterial time kill studies of leaves extracts of *Helichrysum longifolium*. J Med Plants Res. 3(6):462–467.
- Aqil F, Ahmad I, Owais M. 2006. Evaluation of anti-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) activity and synergy of some bioactive plant extracts. Biotechnol J. 1:1093–1102.
- Araújo TAS, Peixoto Sobrinho TJS, Aguiar JS, Silva ACO, Brito FU, Silva TG, Amorim ELC, Pranchevicius MCS. 2015. Phytochemical, antioxidant and cytotoxic analysis of Brazilian Cerrado plants: Preliminary evidence of their antitumor activity. J Med Plants Res. 9:310–319.
- Arora DS, Bhardwaj SK. 1997. Antibacterial activity of some medicinal plants. Geo Bios. 24:127–131.
- Barreiro EJ, Bolzani VS. 2009. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. Quím Nova. 32:679–688.
- Bhalodia NR, Shukla VJ. 2011. Antibacterial and antifungal activities from leaf extracts of *Cassia fistula* L.: An ethnomedicinal plant. J Adv Pharm Technol Res. 2(2):104–109.
- Borges JDC, Perim MC, de Castro RO, Araújo TAS, Peixoto Sobrinho TJDS, da Silva ACO, Mariano SMB, Carreiro SC, Pranchevicius MCDS. 2017. Evaluation of antibacterial activity of the bark and leaf extracts of *Brosimum gaudichaudii* Trécul against multidrug resistant strains. Nat Prod Res. 22:1–5.
- Chaves TP, Fernandes FH, Santana CP, Santos JS, Medeiros FD, Felismino DC, Santos VL, Catão RM, Coutinho HD, Medeiros AC. 2016. Evaluation of the interaction between the *Poincianella pyramidalis* (Tul.) LP queiroz extract and antimicrobials using biological and analytical models. PLoS One. 11(5):e0155532.
- Dhanasekaran G, Sastry NG, Mohan V. 2003. Microbial pattern of soft-tissue infections in diabetic patients in South India. Asian J Diabetol. 5(5–6):8–10.
- Dunyach-Remy C, Ngba Essebe C, Sotto A, Lavigne JP. 2016. *Staphylococcus aureus* toxins and diabetic foot ulcers: role in pathogenesis and interest in diagnosis. Toxins. 8(12):209.
- Kushima H, Nishijima CM, Rodrigues CM, Rinaldo D, Sassá MF, Bauab TM, Di Stasi LC, Carlos IZ, Brito ARMS, Vilegas W, Hiruma-Lima CA. 2009. *Davilla elliptica* and *Davilla nitida*: gastroprotective, anti-inflammatory immunomodulatory and anti-*Helicobacter pylori* action. J Ethnopharmacol. 123:430–438.
- Luber P, Bartelt E, Genschow E, Wagner J, Hahn H. 2003. Comparison of broth microdilution, E test, and Agar dilution methods for antibiotic susceptibility testing of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. J Clin Microbiol. 41(3):1062–1068.
- Ojo SKS, Ejims-Erukwe O, Esumeh FI. 2013. In-vitro antibacterial time-kill assay of *Phyllanthus Amarus* and *Diodia Scandens* crude extracts on *Staphylococci* isolated from wounds and burns patients. IJPSI. 2(8):09–13.
- Olajuyigbe OOL, Afolayan AJ. 2012a. *In vitro* antibacterial and time-kill assessment of crude methanolic stem bark extract of *Acacia mearnsii* de wild against bacteria in shigellosis. Molecules. 17(12):2103–2118.
- Olajuyigbe OO, Afolayan AJ. 2012b. *In vitro* antibacterial and time-kill evaluation of the *Erythrina caffra* Thunb. extract against bacteria associated with diarrhoe. SciWorld J. 2012:738314.
- Pankey GA, Sabath LD. 2004. Clinical relevance of bacteriostatic versus bactericidal mechanisms of action in the treatment of gram-positive bacterial infections. Clin Infect Dis. 38(6):864–870.

- Perim MC, Borges JC, Celeste SRC, Orsolin EF, Mendes RR, Mendes GO, Ferreira RL, Carreiro SC, Pranchevicius MC. 2015. Aerobic bacterial profile and antibiotic resistance in patients with diabetic foot infections. *Rev Soc Bras Med Trop.* 48(5):546–554.
- Ríos JL, Recio MC. 2005. Medicinal plants and antimicrobial activity. *J Ethnopharmacol.* 100(1-2):80–84.
- Sivanmaliappan TS, Sevanan M. 2011. Antimicrobial susceptibility patterns of *Pseudomonas aeruginosa* from diabetes patients with foot ulcers. *Int J Microb.* 60:51–95.
- Stefanović OD, Stanojević DD, Comić LR. 2012. Synergistic antibacterial activity of *Salvia officinalis* and *Cichorium intybus* extracts and antibiotics. *Acta Pol Pharm.* 69(3):457–463.
- Voukeng IK, Beng VP, Kuete V. 2016. Antibacterial activity of six medicinal Cameroonian plants against gram-positive and gram-negative multidrug resistant phenotypes. *BMC Complement Altern Med.* 16(1):325.
- Yamamoto T, Matsui H, Yamaji K, Takahashi T, Overby A, Nakamura M, Matsumoto A, Nonaka K, Sunazuka T, Ōmura S, Nakano H. 2016. Narrow-spectrum inhibitors targeting an alternative menaquinone biosynthetic pathway of *Helicobacter pylori*. *J Infect Chemother.* 22(9):587–92.

## SUPPLEMENTARY MATERIAL

### **In Vitro Antibacterial and Time-kill Assay of Ethanolic Extract of *Davilla nitida* Bark on Multidrug Resistant Bacteria Isolated from Diabetic Foot Lesions**

<sup>a</sup>Michele Cezimbra Perim, <sup>a</sup>Joelma da Costa Borges, <sup>b</sup>Eulália Maria Lima da Silva, <sup>a,c</sup>Thiago Antônio de Sousa Araújo, <sup>d</sup>Ana Carolina Oliveira da Silva, <sup>e</sup>Valéria Christiane da Silva, <sup>a</sup>Solange Cristina Carreiro, <sup>e</sup>Anderson Ferreira da Cunha, <sup>e\*</sup>Maria Cristina da Silva Pranchevicius

<sup>a</sup>Universidade Federal do Tocantins; <sup>b</sup>Oklahoma Medical Research Foundation, Cell Cycle and Cancer Biology Research Program; <sup>c</sup>Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco; <sup>d</sup>Hospital de Base do Distrito Federal; <sup>e</sup> Universidade Federal de São Carlos, Departamento de Genética e Evolução.

<sup>e\*</sup>Corresponding author. Email: mcspranc@gmail.com

This study reported the antimicrobial activity of the bark extract of *Davilla nitida* on multidrug resistant bacteria isolated from Diabetic Foot Infections. Antibacterial activity of the bark extract was evaluated by agar Disk-Diffusion (DD), Broth Dilution (BD), Checkerboard and Time-kill methods. The extract showed a significant antibacterial activity against all groups of bacteria tested. BD was more sensitive for determining the antibacterial activity of the bark extract than the DD method. The bark extract inhibited the growth of bacteria with high-levels of antibiotic-resistance, such as *Pseudomonas* spp. (100.0%), *Enterobacter* spp. (88.89%), *Staphylococcus aureus* (54.55%), *Streptococcus pneumoniae* (75.0%), *Staphylococcus saprophyticus* (92.86%). The combination of extract with antibiotics resulted in an additive effect against most of the strains tested. Time-kill kinetics profiles of bark extract showed bactericidal and time-dependent properties. Our results suggest that the bark of *Davilla nitida* is a source of bioactive compounds, which may be useful against antibiotic-resistant bacteria.

**Keywords:** *Davilla nitida* (Vahl) Kubitzki, antimicrobial activity, multidrug resistant bacteria, diabetic foot infection

## Experimental

### *Study design*

Ethanollic Extract of *Davilla nitida* (Vahl) Kubitzki bark was 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 (Perim et al. 2015), 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) were used as control for comparison of MIC, inhibition zones.

### *Sample collection and preparation of extracts*

The bark of *Davilla nitida* (Vahl) Kubitzki for the preparation of voucher specimens and production of the extracts were 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). The plant was characterized and authenticated at the Biology Institute of the Federal University of Uberlandia-Brazil. A voucher specimen (HUFU 71.872) was prepared and deposited in the Herbarium of the Federal University of Uberlandia-Brazil.

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 1mm. 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 (Araújo et al. 2015).

### *Preparation of inoculum*

Active cultures 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 h at  $37^\circ\text{C}$ . The cultures were diluted with fresh MHB to achieve optical densities corresponding to  $2.0 \times 10^6$  colony forming units (CFU/ml) for bacteria species.

### *Disk diffusion assay*

The disc diffusion method was performed as previously described (Duraipandiyan et al., 2006). The Mueller-Hinton Agar (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 extract ranging from 20 mg/ml to 0.036 mg/ml. Pure DMSO-impregnated disc was used as a negative control, while Cefoxitin (CFO) disks (3000 mg/ml to 1.5 mg/ml) and Amoxicillin/Clavulanic Acid (ACA) disks (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, the results were recorded as the mean diameter (mm) of the zones of growth inhibition surrounding the discs, and presented as mean value. 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 (Arora and Bhardwaj 1997).

#### *Determination of Minimum Inhibitory Concentration*

The Minimum Inhibitory Concentration (MIC) was determined by broth microdilution technique (Gahlaut and Chhillar 2013). All the experiments were performed in triplicates. The final concentration of the extract used to evaluate the antimicrobial activity ranged from 20 to 0.036 mg/ml. CFO and ACA, used as a positive control for gram-negative and gram-positive bacteria, respectively, were at the same concentration. DMSO was used as negative control.

#### *Checkerboard Assay*

The checkerboard assay was assessed as previously described (Olajuyigbe and Afolayan 2012). The fractional inhibitory concentration (FIC) was derived from the lowest concentrations of the extract and the antibiotics in combination permitting no visible growth of the test organisms in the Mueller-Hinton broth after incubation for 24 h at 37 °C. FIC indices were calculated using the formula: FIC index = (MIC of extract in combination/MIC of extract alone) + (MIC of antibiotics in combination/MIC of antibiotics alone). Synergy was defined as  $\Sigma\text{FIC} \leq 0.5$ , additivity as  $0.5 < \Sigma\text{FIC} \leq 1$ , indifference as  $1 < \Sigma\text{FIC} \leq 4$ , and antagonisms as  $\Sigma\text{FIC} > 4$ . Each experiment was performed in triplicate, and the results were presented as mean values.

#### *Time-kill assay*

Time-kill assays were performed by the broth macrodilution method, according to the Ojo et al. (2013) and Olajuyigbe & Afolayan (2012). The extract of *Davilla nitida* was used at 0.5 x MIC, 1 x MIC and 2 x MIC concentrations. An inoculum containing approximately  $5 \times 10^5$  CFU/ml of gram-negative or gram-positive strains was introduced into the Mueller Hinton broth containing the extract and were incubated at 37°C. Samples were removed from culture at 6, 12 and 24h, diluted



serially and 100µl of the diluted samples were inoculated on Mueller Hinton agar and incubated at 37°C for 24h. After 24h the number of colonies were determined. Control samples included extract free MHB seeded with the test inoculums. Viable counts were calculated to give CFU/ml, and kill data were plotted with time against logarithm of the viable count. Each experiment was performed in triplicate and mean variance obtained. Bactericidal activity was defined as a reduction of 99.9% ( $\geq 3 \log_{10}$ ) of the total number of CFU/ml in the original inoculum. Bacteriostatic activity was defined as maintenance of the original inoculum concentration or a reduction of less than 99.9% ( $\geq 3 \log_{10}$ ) of the total number of CFU/ml in the original inoculum.

#### *Statistical Analysis*

Data processing and analysis were conducted using tools from Microsoft Excel 2016, STATA 12 and Biostat. Spearman's correlation coefficient and Fisher exact test were also used, in accordance with the objectives of the analyses and nature of the data, considered 5% significance.

**Table S1.** Antibacterial activity of ethanolic extract of *Davilla nitida* bark, against multi drug resistant strains isolated from the diabetic foot lesion

Gram negative (n=26)	IS	DD BARKS		BD BARKS	
		Concentration (range), mg/ml	Diameter of zone of inhibition (range), mm	Concentration (range), mg/ml	
<i>Citrobacter</i> spp.(n=1)	CS 26 B	0 (0-0-0)	0 (0-0-0)	0 (0-0-0)	
<i>Citrobacter youngae</i> ATCC (n=1)	CY 29935	0 (0-0-0)	0 (0-0-0)	20 (20-20-20)	
<i>Escherichia coli</i> (n=2)	EC 06 A	10 (20-5-5)	10 (12-9-9)	0.039 (0.078-0.019-0.019)	
	EC 20 B	5 (5-5-5)	10 (12-9-9)	0.039 (0.019-0.078-0.019)	
<i>Escherichia coli</i> ATCC (n=1)	EC 25932	0 (0-0-0)	0 (0-0-0)	0.625 (0.625-0-1.25)	
<i>Enterobacter</i> spp. (n=9)	ES 01 D	5 (2.5-10-2.5)	12 (14-12-10)	0.039 (0.039-0.039-0.039)	
	ES 02 B	1.25 (2.5-1.25-0)	14 (16-12-14)	0.039 (0.039-0.039-0.039)	
	ES 08 A	5 (1.25-5-10)	9 (7-11-9)	5 (10-2.5-2.5)	
	ES 08 B	10 (10-10-10)	9 (8-9-10)	2.5 (0-2.5-5)	
	ES 08 D	10 (10-20-5)	13 (13-12-14)	0.039 (0.078-0.019-0.019)	
	ES 10 E	0.156 (0.156-0.156-0.156)	11 (11-11-11)	0.039 (0.019-0.078-0.019)	
	ES 11 B	5 (10-5-0.019)	12 (14-12-10)	0.625 (0-0.625-1.25)	
	ES 13 B	5 (10-5-0)	11 (11-11-11)	0 (0-0-0)	
	ES 18 B	0 (0-0-0)	0 (0-0-0)	0.039 (0.039-0.039-0.039)	
<i>Proteus</i> spp. (n=7)	PS 04 A	2.5 (2.5-2.5-2.5)	15 (15-16-14)	0 (0-0-0)	
	PS 07 A	10 (5-20-5)	9 (9-9-9)	0 (0-0-0)	
	PS 21 D	0 (0-0-0)	0 (0-0-0)	0 (0-0-0)	
	PS 25 B	0 (0-0-0)	0 (0-0-0)	0 (0-0-0)	
	PS 25 C	0 (0-0-0)	0 (0-0-0)	0.039 (0.019-0.078-0.019)	
	PS 39 B	0 (0-0-0)	0 (0-0-0)	0.156 (0.156-0.156-0.156)	
	PS 40 B	1.25 (2.5-1.25-0)	11 (11-9-13)	0.312 (0.312-0-0.625)	
	PM 12453	1.25 (1.25-1.25-1.25)	11 (11-11-11)	20 (20-20-20)	
	<i>Proteus mirabilis</i> ATCC (n=1)	PSS 21 C	0.039 (0.039-0.039-0.039)	14 (14-15-13)	0.039 (0.039-0.039-0.039)
		PSS 23 A	5 (10-5-1.25)	11 (11-13-9)	0.039 (0.019-0.078-0.019)
PSS 38 A		0.039 (0.039-0.039-0.039)	14 (16-14-12)	0.039 (0.019-0.019-0.078)	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC (n=1)	PA 27853	0.156 (0.156-0.156-0.156)	11 (11-11-11)	10 (20-2.5-10)	
Gram positive (n=48)	IS	DD BARKS		BD BARKS	
		Concentration (range), mg/ml	Diameter of zone of inhibition (range), mm	Concentration (range) mg/ml	
<i>Streptococcus pneumoniae</i> (beta-hemolytic) (n=2)	STP 12 C	10 (5-20-5)	9 (10-9-8)	0.156 (0.156-0.156-0.156)	
	STP 13 C	0 (0-0-0)	0 (0-0-0)	0 (0-0-0)	
<i>Streptococcus agalatae</i> (alpha-hemolytic) (n=4)	STA 01 E	10 (5-20-5)	10 (10-10-10)	0.156 (0.156-0.156-0.156)	
	STA 10 C	0 (0-0-0)	1 (1-1-1)	0 (0-0-0)	
	STA 14 B	0.039 (0.039-0.039-0.039)	13 (16-14-9)	0.039 (0.039-0.039-0.039)	
	STA 18 C	1.25 (2.5-1.25-0)	15 (14-15-16)	0.039 (0.039-0.039-0.039)	
<i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC (n=1)	SP 0015	1.25 (2.5-1.25-0)	15 (14-16-15)	1.25 (0-1.25-2.5)	
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (n=4)	SE 05 B	0 (0-0-0)	0 (0-0-0)	0 (0-0-0)	
	SE 09 A	0 (0-0-0)	0 (0-0-0)	0 (0-0-0)	
	SE 09 B	0 (0-0-0)	0 (0-0-0)	0 (0-0-0)	
	SE 40 A	2.5 (0-2.5-5)	11 (11-11-11)	0.312 (0.312-0.625-0)	
<i>Staphylococcus saprophyticus</i> (n=14)	SS 01 C	0.156 (0.156-0.156-0.156)	9 (10-8-9)	0.039 (0.039-0.039-0.039)	
	SS 08 C	10 (20-5-5)	12 (12-10-14)	0.039 (0.039-0.039-0.039)	
	SS 13 A	0.156 (0.156-0.156-0.156)	11 (13-9-11)	0.039 (0.039-0.039-0.039)	
	SS 23 B	0 (0-0-0)	0 (0-0-0)	0 (0-0-0)	
	SS 25 D	20 (20-20-20)	10 (12-10-8)	2.5 (0-2.5-5)	
	SS 26 C	0.156 (0.156-0.156-0.156)	10 (12-10-8)	0.039 (0.039-0.039-0.039)	
	SS 34 C	0.625 (0.625-1.25-0)	11 (11-11-11)	0.039 (0.039-0.039-0.039)	
	SS 35 A	10 (5-5-20)	10 (10-12-8)	0.625 (0-0.625-1.25)	
	SS 35 B	20 (20-20-20)	9 (10-9-8)	0.625 (0.625-1.25-0)	
	SS 38 B	20 (20-20-20)	9 (9-9-9)	10 (10-0-20)	
	SS 39 D	20 (20-20-20)	13 (13-15-11)	10 (5-20-5)	
	SS 40 C	10 (5-5-20)	14 (16-12-14)	0.625 (0-0.625-1.25)	
	SS 41 A	10 (5-5-20)	10 (10-10-10)	2.5 (2.5-2.5-2.5)	
	SS 41 C	10 (20-5-5)	14 (16-12-14)	1.25 (2.5-1.25-0)	
<i>Staphylococcus aureus</i> (n=22)	SA 02 C	2.5 (2.5-2.5-2.5)	12 (12-14-10)	2.5 (0-2.5-5)	
	SA 05 A	0 (0-0-0)	0 (0-0-0)	0 (0-0-0)	
	SA 05 C	10 (20-0-10)	9 (9-9-9)	10 (0-10-20)	
	SA 05 D	10 (10-10-10)	15 (16-15-14)	5 (5-5-5)	
	SA 10 A	0 (0-0-0)	0 (0-0-0)	0 (0-0-0)	
	SA 10 B	0 (0-0-0)	0 (0-0-0)	0 (0-0-0)	
	SA 11 A	2.5 (2.5-2.5-2.5)	9 (8-11-8)	0.039 (0.039-0.039-0.039)	
	SA 11 C	0 (0-0-0)	0 (0-0-0)	0 (0-0-0)	
	SA 11 D	2.5 (0-2.5-5)	9 (9-9-9)	0.039 (0.039-0.039-0.039)	
	SA 12 A	10 (10-0-20)	12 (14-9-13)	0 (0-0-0)	
	SA 14 A	0.625 (0-0.625-1.25)	9 (9-11-8)	2.5 (0-2.5-5)	
	SA 18 A	10 (20-0-10)	12 (13-14-9)	2.5 (2.5-2.5-2.5)	
	SA 18 D	20 (20-20-20)	9 (11-8-8)	2.5 (2.5-5-0)	
	SA 20 A	1.25 (2.5-1.25-0)	14 (16-13-13)	0.039 (0.039-0.039-0.039)	
	SA 21 A	5 (5-5-5)	15 (16-14-15)	0.625 (0.625-1.25-0)	
	SA 21 F	0 (0-0-0)	0 (0-0-0)	0 (0-0-0)	
	SA 24 A	0 (0-0-0)	0 (0-0-0)	0 (0-0-0)	
	SA 24 B	0 (0-0-0)	8 (8-8-8)	0 (0-0-0)	
	SA 26 A	0 (0-0-0)	0 (0-0-0)	0 (0-0-0)	
	SA 29 A	0.156 (0.156-0.156-0.156)	9 (11-8-8)	0.039 (0.039-0.039-0.039)	
	SA 33 B	0 (0-0-0)	5 (5-5-5)	10 (0-10-20)	
	SA 36 B	0 (0-0-0)	6 (6-6-6)	0 (0-0-0)	
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC (n=1)	SA 25923	10 (0-20-10)	12 (14-10-12)	0.156 (0.156-0.156-0.156)	

DD = DisK diffusion. BD = Broth Dilution. IS: Identification of bacterial strains isolated or ATCC (29935; 25922; 12453; 27853; 0015; 25923). Gram negative bacteria: CS=*Citrobacter* spp.; CY=*Citrobacter youngae*; EC=*Escherichia coli*; ES=*Enterobacter* spp.; PS=*Proteus* spp.; PM=*Proteus mirabilis*; PSS=*Pseudomonas* spp.; PA=*Pseudomonas aeruginosa*. Gram positive bacteria:

STP=*Streptococcus pneumoniae*; STA=*Streptococcus agalactiae*; SP=*Streptococcus pyogenes*; SE=*Staphylococcus epidermidis*, SS=*Staphylococcus saprophyticus*; SA=*Staphylococcus aureus*. Quantities of bacteria (n). The concentration of the extract used to the antimicrobial activity ranged from 20 to 0.039 mg/ml. Inhibition (mm) Active  $\geq$  9mm. All the experiments were performed in triplicates, and the results were presented as mean values.

**Table S2.** Combination effects of the extract from bark *Davilla nitida* and antibiotics on the growth of multidrug resistant bacteria.

BACTERIA (Gram-negative, n = 20)		MIC CFO* (range), mg/ml		MIC Extract* (range), mg/ml		MIC (Extract + CFO)*, (range), mg/ml		FIC		
<i>Citrobacter youngae</i> (ATCC) (n=1)	CY 29935	20 (20-20-20)		20 (20-20-20)		10 (10-10-10)		1.00 (A)		
<i>Escherichia coli</i> (n=2)	EC 06 A	0.312 (0.312-0-0.625)		0.039 (0.078-0.019-0.019)		0.0195 (0.0195-0.0195-0.0195)		0.56 (A)		
	EC 20 B	0.312 (0.312-0.625-0)		0.039 (0.078-0.019-0.019)		0.0195 (0.0195-0.0195-0.0195)		0.56 (A)		
<i>Escherichia coli</i> (ATCC) (n=1)	EC 25922	10 (20-0-10)		0.625 (0-0.625-1.25)		0.625 (0-0.625-1.25)		0.52 (A)		
<i>Enterobacter</i> spp. (n=9)	ES 01 D	0.625 (0.625-1.25-0)		0.039 (0.078-0.019-0.019)		0.0195 (0.0195-0.0195-0.0195)		0.53 (A)		
	ES 02 B	1.25 (2.5-1.25-0)		0.039 (0.078-0.019-0.019)		0.0195 (0.0195-0.0195-0.0195)		0.52 (A)		
	ES 08 A	5 (2.5-10-2.5)		5 (5-5-5)		2.5 (2.5-2.5-2.5)		1.00 (A)		
	ES 08 B	0.625 (0.625-0-1.25)		2.5 (2.5-2.5-25)		1.25 (2.5-1.25-0)		2.50 (I)		
	ES 08 D	5 (2.5-10-2.5)		0.039 (0.039-0.039-0.039)		0.0195 (0.0195-0.0195-0.0195)		0.50 (S)		
	ES 10 E	2.5 (0-2.5-5)		0.039 (0.039-0.039-0.039)		0.0195 (0.0195-0.0195-0.0195)		0.51 (A)		
	ES 11 B	5 (2.5-10-2.5)		0.625 (0.625-0-1.25)		0.312 (0.312-0-0.625)		0.56 (A)		
<i>Proteus</i> spp. (n=2)	ES 18 B	0.312 (0.312-0-0.625)		0.039 (0.078-0.019-0.019)		0.0195 (0.0195-0.0195-0.0195)		0.56 (A)		
	PS 25 C	0.039 (0.078-0.019-0.019)		0.039 (0.078-0.019-0.019)		0.0195 (0.0195-0.0195-0.0195)		1.00 (A)		
	PS 39 B	0.156 (0.156-0.156-0.156)		0.078 (0.078-0.078-0.078)		0.039 (0.078-0.019-0.019)		0.75 (A)		
<i>Proteus mirabilis</i> (ATCC) (n=1)	PS 40 B	2.5 (0-2.5-5)		0.312 (0.312-0.625-0)		0.156 (0.156-0.156-0.156)		0.56 (A)		
<i>Pseudomonas</i> spp. (n=03)	PM 12453	20 (20-20-20)		20 (20-20-20)		10 (20-0-10)		1.00 (A)		
	PSS 21 C	5 (2.5-10-2.5)		0.039 (0.078-0.019-0.019)		0.0195 (0.0195-0.0195-0.0195)		0.50 (S)		
	PSS 23 A	1.25 (2.5-1.25-0)		0.039 (0.039-0.039-0.039)		0.0195 (0.0195-0.0195-0.0195)		0.52 (A)		
	PSS 38 A	0.039 (0.078-0.019-0.019)		0.039 (0.078-0.019-0.019)		0.0195 (0.0195-0.0195-0.0195)		1.00 (A)		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC) (n=1)	PA 27853	5 (2.5-10-2.5)		10 (10-10-10)		5 (5-5-5)		1.50 (I)		
BACTERIA (Gram-positive, n = 32)		MIC ACA* (range), mg/ml		MIC Extract* (range), mg/ml		MIC (Extract + ACA)*, (range), mg/ml		FIC		
<i>Streptococcus pneumoniae</i> (n=1)	STP 12C	0.625 (0.625-0.625-0.625)		0.156 (0.156-0.156-0.156)		0.078 (0.078-0.078-0.078)		0.62 (A)		
<i>Streptococcus agalactiae</i> (n=3)	STA 01E	0.039 (0.039-0.039-0.039)		0.156 (0.156-0.156-0.156)		0.078 (0.078-0.078-0.078)		2.50 (I)		
	STA 14B	0.156 (0.156-0.156-0.156)		0.039 (0.019-0.019-0.078)		0.0195 (0.0195-0.0195-0.0195)		0.63 (A)		
	STA 18C	0.156 (0.156-0.156-0.156)		0.039 (0.019-0.019-0.078)		0.0195 (0.0195-0.0195-0.0195)		0.63 (A)		
<i>Streptococcus pyogenes</i> (ATCC) (n=1)	SP 0015	0.156 (0.156-0.156-0.156)		1.25 (2.5-1.25-0)		0.625 (0.625-0.625-0.625)		4.51 (AN)		
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (n=1)	SE 40 A	1.25 (2.5-0-1.25)		0.312 (0-0.312-0.625)		0.156 (0.156-0.156-0.156)		0.62 (A)		
<i>Staphylococcus saprophyticus</i> (n=13)	SS 01C	10 (20-0-10)		0.039 (0.039-0.039-0.039)		0.0195 (0.0195-0.0195-0.0195)		0.50 (S)		
	SS 08C	5 (2.5-10-2.5)		0.039 (0.019-0.019-0.078)		0.0195 (0.0195-0.0195-0.0195)		0.50 (S)		
	SS 13 A	5 (5-5-5)		0.039 (0.019-0.019-0.078)		0.0195 (0.0195-0.0195-0.0195)		0.50 (S)		
	SS 25D	2.5 (0-2.5-5)		2.5 (2.5-2.5-2.5)		1.25 (2.5-0-1.25)		1.00 (A)		
	SS 26C	0.156 (0.156-0.156-0.156)		0.039 (0.039-0.039-0.039)		0.0195 (0.0195-0.0195-0.0195)		0.63 (A)		
	SS 34C	0.156 (0.156-0.156-0.156)		0.039 (0.019-0.019-0.078)		0.0195 (0.0195-0.0195-0.0195)		0.63 (A)		
	SS 35A	0.625 (0.625-0.625-0.625)		0.625 (0.625-1.25-0)		0.312 (0.312-0-0.625)		1.00 (A)		
	SS 35B	1.25 (2.5-0-1.25)		1.25 (0-2.5-1.25)		0.625 (0.625-1.25-0)		1.00 (A)		
	SS 38B	10 (10-0-20)		10 (20-0-10)		5 (2.5-10-2.5)		1.00 (A)		
	SS 39D	20 (20-20-20)		10 (20-0-10)		5 (2.5-10-2.5)		0.75 (A)		
	SS 40C	5 (2.5-10-2.5)		0.625 (0.625-1.25-0)		0.312 (0.312-0-0.625)		0.56 (A)		
	SS 41A	5 (5-5-5)		2.5 (2.5-2.5-2.5)		1.25 (2.5-1.25-0)		0.75 (A)		
	SS 41C	1.25 (2.5-1.25-0)		1.25 (2.5-1.25-0)		0.625 (0.625-1.25-0)		1.00 (A)		
	<i>Staphylococcus aureus</i> (n=12)	SA 02C	0.625 (0.625-0.625-0.625)		2.5 (2.5-0-5)		1.25 (0-2.5-1.25)		2.50 (I)	
		SA 05C	5 (5-5-5)		10 (20-10-0)		5 (5-5-5)		1.50 (I)	
		SA 05D	5 (2.5-10-2.5)		5 (2.5-10-2.5)		2.5 (0-2.5-5)		1.00 (A)	
		SA 11A	0.039 (0.078-0.019-0.019)		0.039 (0.019-0.019-0.078)		0.0195 (0.0195-0.0195-0.0195)		1.00 (A)	
		SA 11D	0.039 (0.078-0.019-0.019)		0.039 (0.19-0.019-0.078)		0.0195 (0.0195-0.0195-0.0195)		1.00 (A)	
		SA 14A	1.25 (1.25-1.25-1.25)		2.5 (0-2.5-5)		1.25 (1.25-1.25-1.25)		1.50 (I)	
		SA 18A	1.25 (2.5-1.25-0)		2.5 (2.5-2.5-2.5)		1.25 (2.5-1.25-0)		1.50 (I)	
		SA 18D	2.5 (0-2.5-5)		2.5 (0-2.5-5)		1.25 (1.25-1.25-1.25)		1.00 (A)	
		SA 20A	0.156 (0.156-0.156-0.156)		0.039 (0.019-0.019-0.078)		0.0195 (0.0195-0.0195-0.0195)		0.63 (A)	
		SA 21A	0.156 (0.156-0.156-0.156)		0.625 (0.625-1.25-0)		0.312 (0.312-0-0.625)		2.50 (I)	
SA 29A	0.078 (0.078-0.078-0.078)		0.039 (0.019-0.019-0.078)		0.0195 (0.0195-0.0195-0.0195)		0.75 (A)			
SA 33B	5 (2.5-10-2.5)		10 (20-0-10)		5 (2.5-10-2.5)		1.50 (I)			
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC) (n=1)	SA 25923	1.25 (0-2.5-1.25)		1.25 (2.5-1.25-0)		0.625 (0-0.625-1.25)		1.00 (A)		
Total		52								

IS: Identification of bacterial strains isolated or ATCC (29935; 25922; 12453; 27853; 0015; 25923). Quantities of bacteria (n). MIC: Minimum Inhibitory Concentration; FIC: Fractional Inhibitory Concentration index; ACA: Amoxicillin/Clavulanic Acid; CFO: Cefoxitin; MIC CFO= MIC values for cefoxitin (mg/ml); MIC ACA=MIC values for amoxicillin/clavulanic acid (mg/ml); MIC extract=MIC values for *Davilla* extract (mg/ml); I=indifferent effect; A= additive effect; S=synergistic effect; AN= antagonist effect. Each experiment was performed in triplicate (range), and the results were presented as mean values\*.

**Table S3.** In vitro time kill assessment of the extract from bark *Davilla nitida* against gram-negative bacteria.

Bacteria (IS)	Log <sub>10</sub> Kill 0.5 X MIC			Log <sub>10</sub> Kill 1 X MIC			Log <sub>10</sub> Kill 2 X MIC		
	6h	12h	24h	6h	12h	24h	6h	12h	24h
CY(29935)	0.778	0.778	0.301 <sup>+</sup>	0.477	0.477	0.000*	0.301	0.000	0.000*
EC (6A)	0.845	0.845	0.602 <sup>+</sup>	0.602	0.602	0.301 <sup>+</sup>	0.301	0.301	0.301 <sup>+</sup>
EC (20B)	0.778	0.778	0.301 <sup>+</sup>	0.477	0.477	0.000*	0.000	0.000	0.000*
EC (25922)	0.903	0.903	0.903 <sup>+</sup>	0.602	0.602	0.602 <sup>+</sup>	0.301	0.301	0.301 <sup>+</sup>
ES (01D)	0.477	0.477	0.000*	0.477	0.477	0.000*	0.301	0.000	0.000*
ES (02B)	0.954	0.954	0.778 <sup>+</sup>	0.699	0.699	0.301 <sup>+</sup>	0.477	0.301	0.000*
ES (08A)	0.845	0.845	0.699 <sup>+</sup>	0.699	0.699	0.602 <sup>+</sup>	0.301	0.301	0.301 <sup>+</sup>
ES (08B)	0.954	0.954	0.954 <sup>+</sup>	0.477	0.477	0.477 <sup>+</sup>	0.477	0.301	0.000*
ES (08D)	0.903	0.954	0.778 <sup>+</sup>	0.602	0.602	0.602 <sup>+</sup>	0.602	0.301	0.301 <sup>+</sup>
ES (10E)	0.845	0.778	0.778 <sup>+</sup>	0.699	0.477	0.477 <sup>+</sup>	0.477	0.000	0.000*
ES (11B)	0.699	0.699	0.699 <sup>+</sup>	0.699	0.477	0.477 <sup>+</sup>	0.301	0.301	0.000*
ES (18B)	0.602	0.301	0.301 <sup>+</sup>	0.602	0.301	0.301 <sup>+</sup>	0.301	0.301	0.000*
PS (25C)	0.778	0.778	0.477 <sup>+</sup>	0.477	0.477	0.301 <sup>+</sup>	0.301	0.000	0.000*
PS (39B)	0.903	0.903	0.845 <sup>+</sup>	0.699	0.699	0.602 <sup>+</sup>	0.602	0.301	0.000*
PS (40B)	0.477	0.000	0.000*	0.000	0.000	0.000*	0.000	0.000	0.000*
PM (12453)	0.699	0.699	0.602 <sup>+</sup>	0.301	0.000	0.000*	0.000	0.000	0.000*
PSS (21C)	0.778	0.778	0.778 <sup>+</sup>	0.477	0.477	0.477 <sup>+</sup>	0.000	0.000	0.000*
PSS (23A)	0.602	0.602	0.301 <sup>+</sup>	0.301	0.000	0.000*	0.000	0.000	0.000*
PSS (38A)	0.778	0.778	0.699 <sup>+</sup>	0.301	0.301	0.000*	0.000	0.000	0.000*
PA (27853)	0.845	0.778	0.699 <sup>+</sup>	0.602	0.301	0.301 <sup>+</sup>	0.301	0.000	0.000*
CFO	0.778	0.477	0.477 <sup>+</sup>	0.477	0.301	0.000*	0.301	0.000	0.000*

Gram-negative bacteria. CY: *Citrobacter youngae*; EC: *Escherichia coli*; ES: *Enterobacter* spp.; PS: *Proteus* spp.; PM: *Proteus mirabilis*; PSS: *Pseudomonas* spp.; PA: *Pseudomonas aeruginosa*; IS: Identification of bacterial strains isolated or ATCC (29935; 25922; 12453; 27853). CFO: Cefoxitin. Log reduction Factor: 0.254 CFU/ml; \*Bactericidal Activity < 0.254 CFU/ml; <sup>+</sup>Bacteriostatic Activity > 0.254 CFU/ml. All the experiments were performed in triplicates, and the results were presented as mean values.

**Table S4.** In vitro time kill assessment of the extract from bark *Davilla nitida* against gram-positive bacteria.

Bacteria (IS)	Log <sub>10</sub> Kill 0.5 X MIC			Log <sub>10</sub> Kill 1 X MIC			Log <sub>10</sub> Kill 2 X MIC		
	6h	12h	24h	6h	12h	24h	6h	12h	24h
STP (12C)	0.699	0.699	0.301 <sup>+</sup>	0.699	0.699	0.301 <sup>+</sup>	0.699	0.301	0.000*
STA (01E)	0.903	0.778	0.699 <sup>+</sup>	0.903	0.778	0.699 <sup>+</sup>	0.602	0.301	0.000*
STA (14B)	0.602	0.602	0.477 <sup>+</sup>	0.602	0.301	0.301 <sup>+</sup>	0.477	0.000	0.000*
STA (18C)	0.778	0.699	0.602 <sup>+</sup>	0.778	0.602	0.477 <sup>+</sup>	0.602	0.602	0.301 <sup>+</sup>
SP (0015)	0.778	0.699	0.699 <sup>+</sup>	0.699	0.699	0.699 <sup>+</sup>	0.602	0.477	0.477 <sup>+</sup>
SE (40A)	0.602	0.602	0.602 <sup>+</sup>	0.477	0.301	0.301 <sup>+</sup>	0.301	0.301	0.301 <sup>+</sup>
SS (01C)	0.699	0.699	0.477 <sup>+</sup>	0.778	0.699	0.699 <sup>+</sup>	0.602	0.301	0.301 <sup>+</sup>
SS (08C)	0.778	0.778	0.301 <sup>+</sup>	0.477	0.477	0.477 <sup>+</sup>	0.602	0.602	0.477 <sup>+</sup>
SS (13A)	0.602	0.477	0.477 <sup>+</sup>	0.699	0.301	0.301 <sup>+</sup>	0.477	0.477	0.477 <sup>+</sup>
SS (25D)	0.602	0.477	0.477 <sup>+</sup>	0.477	0.477	0.301 <sup>+</sup>	0.602	0.477	0.000*
SS (26C)	0.602	0.477	0.000*	0.602	0.000	0.000*	0.301	0.301	0.000*
SS (34C)	0.602	0.602	0.602 <sup>+</sup>	0.477	0.301	0.000*	0.301	0.301	0.000*
SS (35A)	0.477	0.000	0.000*	0.301	0.000	0.000*	0.301	0.000	0.000*
SS (35B)	0.602	0.477	0.477 <sup>+</sup>	0.301	0.000	0.000*	0.000	0.000	0.000*
SS (38B)	0.477	0.602	0.477 <sup>+</sup>	0.301	0.000	0.000*	0.000	0.000	0.000*
SS (39D)	0.301	0.301	0.000*	0.477	0.301	0.000*	0.000	0.000	0.000*
SS (40C)	0.602	0.000	0.000*	0.477	0.301	0.000*	0.000	0.000	0.000*
SS (41A)	0.699	0.699	0.602 <sup>+</sup>	0.602	0.301	1.000 <sup>+</sup>	0.301	0.000	0.000*
SS (41C)	0.602	0.000	0.000*	0.301	0.000	0.000*	0.301	0.000	0.000*
SA (02C)	0.778	0.602	0.000*	0.602	0.000	0.000*	0.301	0.000	0.000*
SA (05C)	0.301	0.000	0.000*	0.301	0.000	0.000*	0.477	0.000	0.000*
SA (05D)	0.602	0.000	0.000*	0.301	0.000	0.000*	0.477	0.000	0.000*
SA (11A)	0.301	0.301	0.301 <sup>+</sup>	0.477	0.000	0.000*	0.477	0.000	0.000*
SA (11D)	1.000	0.903	0.699 <sup>+</sup>	0.699	0.000	0.000*	0.477	0.000	0.000*
SA (14A)	0.845	0.778	0.699 <sup>+</sup>	0.699	0.699	0.699 <sup>+</sup>	0.301	0.000	0.000*
SA (18A)	0.903	0.903	0.903 <sup>+</sup>	0.845	0.699	0.699 <sup>+</sup>	0.301	0.000	0.000*
SA (18D)	0.602	0.602	0.602 <sup>+</sup>	0.602	0.301	0.301 <sup>+</sup>	0.602	0.602	0.301 <sup>+</sup>
SA (20A)	0.778	0.778	0.778 <sup>+</sup>	0.602	0.301	0.301 <sup>+</sup>	0.602	0.301	0.000*
SA (21A)	0.845	0.778	0.778 <sup>+</sup>	0.602	0.477	0.301 <sup>+</sup>	0.602	0.602	0.301 <sup>+</sup>
SA (29A)	0.699	0.699	0.602 <sup>+</sup>	0.699	0.301	0.000*	0.301	0.000	0.000*
SA (33B)	1.000	0.954	0.778 <sup>+</sup>	0.602	0.477	0.301 <sup>+</sup>	0.301	0.000	0.000*
SA (25923)	0.903	0.903	0.778 <sup>+</sup>	0.699	0.301	0.000*	0.477	0.301	0.000*
ACA	0.699	0.477	0.000*	0.778	0.602	0.602 <sup>+</sup>	0.602	0.477	0.301 <sup>+</sup>

Gram-positive bacteria (STP = *Streptococcus pneumoniae*; STA = *Streptococcus agalatae*; SP = *Streptococcus pyogenes*; SE = *Staphylococcus epidermidis*; SS = *Staphylococcus saprophyticus*; SA = *Staphylococcus aureus*). IS: Identification of bacterial strains isolated or ATCC (0015; 25923) ACA = Amoxicillin/Clavulanic Acid. Log reduction Factor = 0.233 CFU/ml.\*Bactericidal Activity < 0.233 CFU/ml; <sup>+</sup> Bacteriostatic Activity > 0.233 CFU/ml. All the experiments were performed in triplicates, and the results were presented as mean values.

## References

- Araújo TAS, Peixoto Sobrinho TJS, Aguiar JS, Silva ACO, Brito FU, Silva TG, Amorim ELC, Pranchevicius MCS. 2015. Phytochemical, antioxidant and cytotoxic analysis of Brazilian Cerrado plants: Preliminary evidence of their antitumor activity. *J Med Plant Res.* 9:310-319.
- Arora DS, Bhardwaj SK. 1997. Antibacterial activity of some medicinal plants. *Geo Bios.* 24:127-131.
- Duraipandiyan V, Ayyanar M, Ignacimuthu S. 2006. Antimicrobial activity of some ethnomedicinal plants used by Paliyar tribe from Tamil Nadu, India. *BMC. Compl Alt Med.* 6(35).
- Gahlaut A, Chhillar AK. 2013. Evaluation of antibacterial potential of plant extracts using resazurin based microtiter dilution assay. *Int J Pharm and Pharmacy Science.* 5(2):372-376.
- Ojo SKS, Ejims-E nukwe O, Esumeh FI. 2013. In-Vitro Antibacterial Time-Kill Assay Of *Phyllanthus Amarus* And *Diodia Scandens* Crude Extracts On *Staphylococci* Isolated From Wounds And Burns Patients. *Int J Pharm Sc Invention.* 2(8):09-13.
- Olajuyigbe OO, Afolayan AJ. 2012. In vitro antibacterial and time-kill assessment of crude methanolic stem bark extract of *Acacia mearnsii* de wild against bacteria in shigellosis. *Molec.* 17(2):2103-18.
- Perim MC, Borges JC, Celeste SRC, Orsolin EF, Mendes GO, Mendes RR, Ferreira RL, Carreiro SC, Pranchevicius MC. 2015. Aerobic bacterial profile and antibiotic resistance in patients with diabetic foot infections. *Rev Soc Bras MedTrop.* 48(5):546-554.

## 4.2 Artigo 2: *Kalanchoe pinnata* (Lam.) Pers. – Aguardando parecer

BRASIL

BOLETIM DO MUSEU PARAENSE EMÍLIO GOELDI

**CIÊNCIAS NATURAIS**

▶ Inicial ▶ Histórico ▶ Coleção ▶ Instruções ▶ Aquisição/Permuta ▶ Indexadores ▶ Corpo Editorial ▶ Equipe

**Acesse o número atual | v.12 n.1**  
Janeiro - Abril de 2017

- NO PRELO -  
V. 12 N. 2  
maio-agosto 2017

▶ ABEC - Associação Brasileira de Editores Científicos  
▶ CAPES - WebQualis  
▶ CNPq - Ética e Integridade na

### Periódicos

ISSN	Título	Área de Avaliação	Classificação
1983-9774	BOLETIM CENTRO DE PESQUISA E PROCESSAMENTO DE ALIMENTOS	BIOTECNOLOGIA	B4
0102-0323	BOLETIM DO CENTRO DE PESQUISA E PROCESSAMENTO DE ALIMENTOS (IMPRESSO)	BIOTECNOLOGIA	B4
1981-8122	BOLETIM DO MUSEU PARAENSE EMÍLIO GOELDI. CIÊNCIAS HUMANAS	BIOTECNOLOGIA	B4
1981-8114	BOLETIM DO MUSEU PARAENSE EMÍLIO GOELDI. CIÊNCIAS NATURAIS	BIOTECNOLOGIA	B4

Artigo submetido em 03/10/2017 e aguardando parecer dos revisores.

**Efeito dos extratos das folhas de *Kalanchoe pinnata* (Lam.) Pers. sobre bactérias resistentes a multidrogas**

**Effect of Leaf Extracts of *Kalanchoe pinnata* (Lam.) Pers. on multidrug resistant bacteria**

Michele Cezimbra Perim<sup>a</sup>, Joelma da Costa Borges<sup>a</sup>, Thiago Antônio de Sousa Araújo<sup>a,b</sup>, Ana Carolina Oliveira da Silva<sup>c</sup>, Natália Mazzolani Zucchini<sup>d</sup>, Solange Cristina Carreiro<sup>a</sup>, Anderson Ferreira da Cunha<sup>d</sup>, Maria Cristina da Silva Pranchevicius<sup>a,d\*</sup>

<sup>a</sup> Universidade Federal do Tocantins. Av. NS 15 s/n (109 Norte), Palmas-Tocantins 77010-210, Brasil

<sup>b</sup> Universidade Federal de Pernambuco. Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco. Rua Prof. Artur de Sá S/N, Cidade Universitária Recife-PE 50740-521, Brasil

<sup>c</sup> Hospital de Base do Distrito Federal. SMHS, Quadra 101, Área Especial, s/n - Asa Sul, Brasília - DF, 70330-150, Brasil

<sup>d</sup> Departamento de Genética e Evolução. Universidade Federal de São Carlos. Rod. Washington Luis, km 235, São Carlos-SP 13565-905, Brasil

**\* Corresponding author:**

Maria Cristina da Silva Pranchevicius, Departamento de Genética e Evolução. Universidade Federal de São Carlos. Rod. Washington Luis, km 235, São Carlos-SP 13565-905, Brasil

Tel.: phone +55 63 99246 7525, fax: +55 16 3351 8377

Email address: [mcspranc@gmail.com](mailto:mcspranc@gmail.com)

**Authors**

Michele Cezimbra Perim; fone: +55-63-99237-2687; e-mail: [michelle@mail.uft.edu.br](mailto:michelle@mail.uft.edu.br)

Joelma da Costa Borges; fone: +55-63-98137-8805; e-mail: [joelmacb@mail.uft.edu.br](mailto:joelmacb@mail.uft.edu.br)

Thiago Antônio de Sousa Araújo; fone: +55-81-99104-3531; email: [thiagocaruaru@hotmail.com](mailto:thiagocaruaru@hotmail.com)



Ana Carolina Oliveira da Silva; fone +55-61-99906-0582; e-mail: [carolina.ortopedia@gmail.com](mailto:carolina.ortopedia@gmail.com)

Natália Mazzolani Zucchini; fone +55-16-98180-4358; e-mail: [na.zucchini@gmail.com](mailto:na.zucchini@gmail.com)

Solange Cristina Carreiro; fone +55-63-99222-7656; e-mail: [solange@mail.uft.edu.br](mailto:solange@mail.uft.edu.br)

Anderson Ferreira da Cunha; fone +55-16-997655987; e-mail: [anderf2611@gmail.com](mailto:anderf2611@gmail.com)

Maria Cristina da Silva Pranchevicius; fone +55-16-98191-7525, email: [mcspranc@gmail.com](mailto:mcspranc@gmail.com)

### **Efeito dos extratos das folhas de *Kalanchoe pinnata* (Lam.) Pers. sobre bactérias resistentes a multidrogas**

### **Effect of Leaf Extracts of *Kalanchoe pinnata* (Lam.) Pers. on multidrug resistant bacteria**

#### **Resumo**

O desenvolvimento de cepas bacterianas multirresistentes tornou-se uma preocupação global. As plantas medicinais têm sido exploradas como uma fonte de moléculas com potencial terapêutico para o tratamento de várias doenças, e para o desenvolvimento de medicamentos mais eficazes contra as infecções bacterianas. Deste modo, o objetivo deste estudo foi avaliar a atividade antibacteriana do extrato etanólico das folhas de *Kalanchoe pinnata* (Lam.) Pers. contra bactérias resistentes a multidrogas, isoladas de pacientes diabéticos com lesões nos pés, e também de seis cepas de referência obtidas da American Type Culture Collection (ATCC). A atividade contra 74 cepas bacterianas foi determinada por métodos de disco difusão em ágar e de microdiluição em caldo. O extrato foi ativo contra diversas bactérias Gram-positivas e bactérias Gram-negativas em ambos os métodos propostos. No entanto, a microdiluição em caldo foi mais sensível para a detecção da atividade antibacteriana do extrato da planta. O extrato etanólico da folha de *Kalanchoe pinnata* (Lam.) Pers. mostrou atividade antibacteriana contra *Citrobacter* spp. (n = 1; 100,00%), *Citrobacter youngae* (ATCC-29935) (n = 1; 100,00%), *Enterobacter* spp. (n = 3; 33,33%), *Pseudomonas* spp. (n = 2; 66,67%), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC-27853) (n = 1; 100,00%). O extrato das folhas

associado com o antibiótico amoxicilina/ácido clavulânico ou cefoxitina não apresentou potencialização da atividade antibacteriana contra as bactérias Gram-positivas ou Gram-negativas, sugerindo que o extrato e os antibióticos possuem mecanismos independentes relacionados à inibição do crescimento bacteriano. Nossos resultados mostraram que o extrato etanólico das folhas de *Kalanchoe pinnata* (Lam.) Pers. possui uma boa atividade antimicrobiana contra algumas bactérias resistentes a multidrogas. No entanto, estudos adicionais e mais específicos são recomendados para determinar a eficácia deste extrato no tratamento de infecções bacterianas.

**Palavras-chave:** *Kalanchoe pinnata* (Lam.) Pers., atividade antimicrobiana, bactérias resistentes a multidrogas

**Efeito dos extratos das folhas de *Kalanchoe pinnata* (Lam.) Pers. sobre bactérias resistentes a multidrogas**

**Effect of Leaf Extracts of *Kalanchoe pinnata* (Lam.) Pers. on multidrug resistant bacteria**

### **Abstract**

Development of multidrug resistant bacterial strains has become a global concern. Medicinal plants have been explored as a source of molecules with therapeutic potential for the treatment of various diseases and to the development of better drug against bacterial infections. Thus, the aim of this study was to evaluate the antibacterial activity of ethanolic leaf extract of *Kalanchoe pinnata* (Lam.) Pers. against multidrug resistant bacteria isolated from diabetic foot infections, and also six reference strains from the American Type Culture Collection (ATCC). The activity against 74 bacteria was determined by agar disk-diffusion and broth dilution methods. The extract was active against Gram-positive bacteria and Gram-negative bacteria in both methods. However, the broth dilution method was more sensitive for the detection of antibacterial activity

of the plant extract. The ethanolic leaf extract of *Kalanchoe pinnata* (Lam.) Pers. showed antibacterial activity against *Citrobacter* spp. (n=1; 100,00%), *Citrobacter youngae* (ATCC-29935) (n=1; 100,00%), *Enterobacter* spp. (n=3; 33,33%), *Pseudomonas* spp. (n=2; 66,67%), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC-27853) (n=1; 100,00%). Extract of leaf associated with amoxicillin/clavulanic acid or cefoxitin antibiotics did not show any potentiation of antibacterial activity against both Gram-positive and Gram-negative bacteria, suggesting that extract and antibiotics have independent mechanisms related to inhibition of bacterial growth. Our results showed that the ethanolic leaf extract of *Kalanchoe pinnata* (Lam.) Pers. had a good antimicrobial activity against some multidrug resistant bacteria. However, further and more specific studies, are recommended to determine the efficacy of this extract in the treatment of bacterial infections.

**Keywords:** *Kalanchoe pinnata* (Lam.) Pers., antimicrobial activity, multidrug resistant bacteria

## Introdução

As bactérias patogênicas são consideradas como uma das maiores causas de morbidade e mortalidade em humanos (Djeussi *et al.*, 2013) e as infecção ocasionadas por esse tipo de patógeno constituem um grande problema de saúde pública. Organismos resistentes a multidrogas são comuns em pacientes diabéticos com úlceras nos pés (Lipsky, 2007) e constituem uma grande ameaça ao tratamento (Gadepalli *et al.*, 2006; Ramakant *et al.*, 2011). Algumas espécies de plantas são comumente usadas como fitoterápicos, pois possuem componentes biologicamente ativos com potencial para exercer atividades no tratamento de doenças e também funções antimicrobianas (Kuate, 2010; Chouna *et al.*, 2009, Adebisi, 1999).

*Kalanchoe pinnata* (Lam.) Pers. (sinônimo: *Bryophyllum pinnatum*) é um membro da família Crassulaceae. A planta é comumente distribuída em várias regiões (Judd *et al.*, 2009; Allorge-Boiteau, 1996) e usada na medicina popular da África tropical, Índia, China, Austrália e América tropical, Madagascar, Ásia e Havai (Yadav & Dixit, 2003) para tratar várias doenças e aflições, como hipertensão, distúrbios renais

e urinários (Lans, 2006), diarreia, flatulência e vômitos (Kamboj & Saluja, 2009), tosse e na profilaxia da asma (Salami *et al.*, 2013), icterícia (Yadav & Dixit, 2003), feridas, contusões e picadas de insetos (Pal & Nag Chaudhuri, 1991; Kirtikar & Basu, 1975), parto prematuro, distúrbios do sono induzidos por agitação, ansiedade, dor induzida por fraqueza e inflamação recorrente no sistema metabólico (Vademecum, 2013). Nessa planta foram identificadas várias substâncias fitoquímicas como alcaloides, fenóis, flavonoides, saponinas, taninos, triterpenoides, glicosídeos, carboidratos, esteróis e aminoácidos (Matthew *et al.*, 2013a). Esses componentes químicos são responsáveis por vários efeitos (Rajsekhar *et al.*, 2016) como antiprotozoário, antileishmanial (Muzitano *et al.*, 2006; Muzitano *et al.*, 2009, Willcox & Bodeker, 2004), anti-helmíntico (Majaz *et al.*, 2011), anticancerígeno (Devbhuti *et al.*, 2012; Mahata *et al.*, 2012), antimicrobiano (Akinpelu, 2000; Okwu & Nnamdi, 2011a, b), antiviral (Mahata *et al.*, 2012; Supratman *et al.*, 2001), antialérgicos (Cruz *et al.*, 2008; Cruz *et al.*, 2012), analgésico (Afzal *et al.*, 2012), antipirético (Biswas & Montal, 2015), anti-hipertensivo (Bopda *et al.*, 2014; Ghasi *et al.*, 2011; Ojewole, 2002), antidiabético (Goyal *et al.*, 2013; Matthew *et al.*, 2013b), hepatoprotetor (Afzal *et al.*, 2013; Yadav & Dixit, 2003), gastroprotetor (Pal & Chaudhuri, 1991; Sharma *et al.*, 2014), entre outros.

As plantas medicinais de diferentes ambientes produzem diversificados teores de compostos bioativos, resultando em respostas terapêuticas e atividades farmacológicas diversas (Dong *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2015). Considerando que existem poucos estudos sobre as atividades terapêuticas dos extratos de *Kalanchoe pinnata*, coletadas no estado do Tocantins, o presente projeto analisou a atividade antibacteriana do extrato etanólico das folhas dessa planta contra bactérias resistentes a multidrogas, isoladas de pacientes diabéticos com lesões nos pés, e também cepas do *American Type Culture Collection* (ATCC).

## **Material e métodos**

### *Desenho do estudo*

O extrato etanólico das folhas de *Kalanchoe pinnata* (Lam.) Pers. foi avaliado contra um total de 68 cepas bacterianas (*Citrobacter* spp; *Escherichia coli*, *Enterobacter* spp, *Proteus* spp, *Pseudomonas* spp, *Streptococcus agalataiae* (alfa-hemolítico), *Streptococcus pneumoniae* (beta-hemolítico), *Staphylococcus epidermidis*,

*Staphylococcus saprofiticus*, *Staphylococcus aureus*), isoladas de pacientes diabéticos com úlceras nos pés, que foram internados no Hospital Geral Público de Palmas Doutor Francisco Ayres (HGP), em Tocantins - Brasil, entre janeiro de 2013 a junho de 2013 (Perim *et al.*, 2015), e 6 cepas de bactérias ATCC (*Escherichia coli* (ATCC-25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC-27853), *Proteus mirabilis* (ATCC-12453), *Citrobacter yougae* (ATCC-29935), *Staphylococcus aureus* (ATCC-25923), *Streptococcus pyogenes* (ATCC-0015) obtidas do *American Type Culture Collection*.

#### *Coleta do espécime vegetal e preparo do extrato das folhas*

Para a preparação dos exemplares depositados em coleções (*voucher specimens*) e para a produção dos extratos foram coletadas as folhas de *Kalanchoe pinnata* (Lam.) Pers de janeiro a junho de 2013, na cidade de Palmas, estado do Tocantins, Brasil (10°10'58.45"S e 48°17'33.75"O). A planta foi caracterizada e autenticada no Instituto de Biologia da Universidade Federal de Uberlândia-Brasil. O *voucher specimens* (HUFU 71.870) foi preparado e depositado no Herbário da Universidade Federal de Uberlândia-Brasil.

As partes vegetais coletadas foram secas em estufa com circulação de ar e temperatura média de  $40 \pm 2^\circ\text{C}$ . 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 95%, 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  $40 \pm 2^\circ\text{C}$  até a produção de um extrato seco (Araújo *et al.*, 2012).

#### *Preparo da suspensão bacteriana*

As culturas ativas, que estavam preservadas em caldo mueller hinton em freezer  $-80^\circ\text{C}$  no laboratório de cultura de células da Universidade Federal do Tocantins, e foram preparadas através da transferência das bactérias em estoque para tubos contendo Caldo Mueller-Hinton (CMH) (Kasvi, Brazil) e incubadas sem agitação por 24h a  $37^\circ\text{C}$ . As culturas foram diluídas com CMH fresco a uma densidade ótica de  $2,0 \times 10^6$  unidades formadoras de colônias (UFC) para cada espécie bacteriana.

### *Ensaio de Difusão em Disco*

O método de difusão em disco foi realizado conforme descrito por Arullappan *et al* (2014) e Duraipandiyar *et al* (2006). Em placas de Petri contendo meio Ágar Mueller Hinton (AMH) a suspensão bacteriana (1,0 ml) foi uniformemente distribuída. Após 5 minutos, discos de papel brancos estéreis (Oxoid), com 6,0 mm de diâmetro impregnados com diferentes diluições (20 mg/ml a 0,039 mg/ml) do extrato, foram colocados na superfície do meio, sendo 6 discos por cada placa. Para controle negativo foram usados discos impregnados com controle DMSO, enquanto que discos de Cefoxitina (CFO) (3000 mg/ml a 1,5 mg/ml) e discos de Amoxicilina com Ácido Clavulânico (AAC) (2000 mg/ml a 0,9 mg/ml) foram usados como controle positivo, para bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, respectivamente. Foram adicionados um total de seis discos por placa. As placas foram incubadas a 37°C por até 48 horas. No final da incubação, as zonas de inibição formadas em volta dos discos foram medidas com paquímetro. Todos os testes foram feitos em triplicata e a avaliação da atividade bacteriana seguiu o seguinte critério de avaliação de acordo com o diâmetro do halo de inibição: 9-13 mm, moderadamente sensível;  $\geq 14$  mm, altamente sensível (Arora & Bhardwaj 1997).

### *Determinação da Concentração Inibitória Mínima*

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi determinada através da metodologia de Microdiluição em Caldo (MC) (Gahlaut & Chhillar, 2013). Todos os experimentos foram realizados em triplicata. A concentração dos extratos usados para validar a atividade antibacteriana foi de 20 a 0.039 mg/ml. Os antibióticos CFO e AAC, usados como controle positivo para as bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, respectivamente, foram utilizados nas mesmas concentrações (de 20 a 0.039 mg/ml). DMSO foi utilizado com controle negativo.

### *Análise estatística*

O processamento e as análises dos dados foram conduzidos utilizando ferramentas como Excel 2016, STATA 12 e Biostat. O coeficiente de correlação de Spearman e o teste exato de Fisher foram também utilizados, de acordo com os objetivos das análises e a natureza dos dados, foram considerados 5% de significância.

## **Resultados e discussão**

A análise da atividade antibacteriana do extrato etanólico das folhas de *Kalanchoe pinnata* (Lam.) Pers. foi determinada pelos métodos de Difusão em Disco (DD) e Microdiluição em Caldo (MC) e está demonstrada na Tabela 1. O extrato das folhas de *Kalanchoe pinnata* (Lam.) Pers. apresentou atividade antimicrobiana contra as bactérias testadas, tanto pelo método de Difusão em Disco DD (37.84%) e MC (37.84%). Nossos resultados estão de acordo com outros estudos, que demonstraram a atividade antibacteriana de *Kalanchoe pinnata* (Lam.) Pers contra um amplo grupo de bactérias (Okwu & Nnamdi, 2011; Akinsulire *et al.*, 2007; Ofokansi *et al.*, 2005, Akinpelu, 2000). Estudos realizados por Akinpelu (2000), utilizando o método de difusão em ágar por meio de poços, demonstrou que o extrato metanólico das folhas de *Kalanchoe pinnata* (Lam.) Pers inibiu o crescimento de 5 bactérias Gram-positivas e 1 Gram-negativa a uma concentração de 25 mg/ml. Em nossos estudos foi possível observar que pelos métodos MC e DD, até a última concentração do extrato (0,039 mg/ml) houve inibição do crescimento em ambos os grupos de bactérias, no entanto, o método MC foi mais eficiente tanto para as bactérias Gram-negativas (26,92%) como para as Gram-positivas (18,75%). Esses resultados podem ser atribuídos a polaridade e outros componentes que afetam a difusão de componentes bioativos em baixas concentrações do extrato (Klancnik *et al.*, 2010). Além disso, estudos sugerem que o método MC é vantajoso para análises de produtos naturais (Palombo, 2011; Salazar-Aranda *et al.*, 2009), pois é rápido e viável para a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) (Luber *et al.*, 2003).

As cepas bacterianas, isoladas de pacientes diabéticos com úlceras nos pés, e analisadas nesse estudo foram caracterizadas como multirresistentes para a maioria dos antibióticos utilizados (Perim *et al.*, 2015). Nesses tipos de lesões, comumente são encontradas bactérias Gram-negativas como, *Enterococci*, *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa* (Bansal *et al.*, 2008; Pathare *et al.*, 1998) e também bactérias

Gram-positivas como *Staphylococcus aureus* e beta hemolítico (grupos A, C e G, especialmente o grupo B) (Urbancic-Rovan & Gubina 2009; El-Tahawy 2000). A tabela 2 apresenta os resultados dos testes com ambos os métodos (DD e MC), que indicaram que o extrato etanólico das folhas de *Kalanchoe pinnata* (Lam.) Pers inibiu o crescimento de *Citrobacter* spp. (n=1; 100,00%), *Citrobacter youngae* (ATCC-29935) (n=1; 100,00%), *Enterobacter* spp. (n=3; 33,33%), *Pseudomonas* spp. (n=2; 66,67%), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC-27853) (n=1; 100,00%). *Proteus* spp. foram inibidas em 28,57% (n=2) por DD e 14,29% (n=1) por MC, e não houve inibição do crescimento de *Proteus mirabilis* (ATCC-1245) e *Escherichia coli* pelo extrato. Utilizando os métodos DD e MC, o extrato das folhas de *Kalanchoe pinnata* (Lam.) Pers também inibiu o crescimento de *Streptococcus agalatae* (n=1; 50,00%), *Streptococcus pneumoniae* (n=3; 75,00%), *Streptococcus pyogenes* (n=1; 100,00%). As cêpas de *Staphylococcus saprophyticus* foram inibidas em 42,86% (n=6) por DD e 35,71% (n=5) por MC e *Staphylococcus aureus* em 31,82% (n=7) por DD e 40,91% (n=9) por MC. O extrato não inibiu o crescimento de *Staphylococcus epidermidis* e *Staphylococcus aureus* (ATCC-25923). Nossos resultados estão parcialmente de acordo com alguns estudos, que demonstraram atividade antimicrobiana de *Kalanchoe pinnata* (Lam.) Pers. contra *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Klebsiella aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa* (Akinsulire *et al.*, 2007; Okwu & Nnamdi, 2011; Ofokansi *et al.*, 2005, Akinpelu, 2000). Portanto, os dados obtidos nesse estudo sugerem que *Kalanchoe pinnata* (Lam.) Pers pode ser uma fonte de compostos antibacterianos, e pode justificar o uso popular dessa planta contra infecções cutâneas, abscessos e distúrbios gastrointestinais (Gill, 1992; Akinsulire *et al.*, 2007).

A Tabela 3 demonstra a correlação entre o extrato das folhas de *Kalanchoe pinnata* (Lam.) Pers com os antibióticos Cefoxitina (CFO) contra bactérias Gram-negativas e Amoxicilina com Ácido Clavulânico (AAC) contra bactérias Gram-positivas. Não houve correlação utilizando os extratos das folhas com os antibióticos CFO ou AAC, contra as bactérias Gram-negativas ( $p = 0,598$ ) e Gram-positivas ( $p = 0,768564$ ), respectivamente. Portanto, nossos resultados sugerem que os extratos das folhas e antibióticos apresentaram ações independentes para a inibição do crescimento desse tipo de bactérias. Estudos têm descrito vários compostos responsáveis pela ação antimicrobiana de *Kalanchoe pinnata* (Lam.) Pers, como os flavonóides 5 metil 4,5,7 trihidroxil flavonas e 4,3,5,7 tetrahidroxi 5 metil 5 propenamina antocianidinas e



também os fenantreno (Okwu & Nnamdi, 2011),  $\alpha$ -rhamnoisorobin (23), kaempferol rhamnosideo (17, 19–22) (Tatsimo *et al.*, 2012). Embora nesse estudo os compostos bioativos não tenham sido isolados, a atividade antimicrobiana dessa planta pode ser devido à presença desses e outros compostos.

### **Conclusão**

Os resultados apresentados nesse estudo sugerem a presença de compostos bioativos nas folhas de *Kalanchoe pinnata* (Lam.) Pers capazes de inibirem o crescimento de bactérias multirresistentes. No entanto, estudos adicionais devem ser realizados para isolar, validar e analisar a eficácia e toxicidade desses componentes como novos agentes antimicrobianos.

### **Agradecimentos**

Os autores agradecem a Secretaria de Saúde do Estado do Tocantins (SESAU-TO) e Thiago de Cesaro por facilitar o desenvolvimento do projeto e o Laboratório Central de Saúde Pública do Tocantins (LACEN-TO) que gentilmente forneceu as cepas controles. Este trabalho recebeu suporte financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) (AUX-PE-PNPD 2535/2011, Processo N: 23038.007229/2011/12)-Brasil e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (Universal, Processo N: 485873/2013-3)-Brasil.

### **Referências**

ADEBISI, L.A., 1999. Biodiversity conservation and Ethnobotany of selected sacred groves in Osun State, Department of forest Resources Management, Ph.D Thesis, University of Ibadan, Nigeria. 198p.

AFZAL, M., GUPTA, G., KAZMI, I., RAHMAN, M., AFZAL, O., ALAM, J., HAKEEM, K.R., PRAVEZ, M., GUPTA, R., ANWAR, F., 2012. Anti-inflammatory and analgesic potential of a novel steroidal derivative from *Bryophyllum pinnatum*. *Fitoterapia*, 83: 853-858.

AFZAL, M., KAZMI, I., ANWAR, F., 2013. Antineoplastic potential of *Bryophyllum pinnatum* Lam. on chemically induced hepatocarcinogenesis in rats. *Pharmacognosy Research*, 5: 247-253.

- AKINPELU, D.A., 2000. Antimicrobial activity of *Bryophyllum pinnatum* leaves. *Fitoterapia*. 71: 193-194.
- AKINSULIRE, O.R., AIBINU, I.E., ADENIPEKUN, T., ADELOWOTAN, T., ODUGBEMI, T., 2007. In vitro antimicrobial activity of crude extracts from plants *Bryophyllum pinnatum* and *Kalanchoe crenata*. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative medicines*. 4 (3): 338-344.
- ALLORGE-BOITEAU, L., 1996. Madagascar centre de speciation et d'origine du genre *Kalanchoe* (Crassulaceae). In: LOURENÇO, W.R., ed. *Biogéographie de Madagascar*. Paris: Éditions de l'ORSTOM, 137-145.
- ARAÚJO, T.A.S., ALMEIDA, V.T.C., AMORIM, E.L.C., ALBUQUERQUE, U.P., 2012. Habitat influence on antioxidant activity and tannin concentrations of *Spondiastuberosa Arruda* (Anacardiaceae). *Pharmaceutical Biology*, 50 (6), 754 -759.
- ARORA, D.S., BHARDWAJ, S.K., 1997. Antibacterial activity of some medicinal plants. *Geo Bios*, 24, 127-131.
- ARULLAPPAN, S.; RAJAMANICKAM, P.; THEVAR N.; KODIMANI, C.C., 2014. In Vitro Screening of Cytotoxic, Antimicrobial and Antioxidant Activities of *Clinacanthus nutans* (Acanthaceae) leaf extracts. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 13 (9), 1455-1461.
- BANSAL, E., GARG, A., BHATIA, S., ATTRI, A.K., CHANDER, J., 2008. Spectrum of microbial flora in diabetic foot ulcers. *Indian Journal Pathology Microbiology*, 51, 204-208.
- BISWAS, D., MONDAL, T.K., 2015. Evaluation of anti-pyretic activity of hydroalcoholic extract of *Kalanchoe pinnata* leaves against yeast-induced pyrexia in rat. *Int J Innovat Pharm Sci Res*, 3: 483-492.
- BOPDA, O.S., LONGO, F., BELLA, T.N., EDZAH, P.M., TAÏWE, G.S., BILANDA, D.C., TOM, E.N., KAMTCHOUING, P., DIMO, T., 2014. Antihypertensive activities of the aqueous extract of *Kalanchoe pinnata* (Crassulaceae) in high salt-loaded rats. *J Ethnopharmacology*, 153: 400-407.
- CHOUNA, J.R., NKENG-EFOUET, P.A., LENTA, B.N., DEVKOTA, P.K., NEUMANN, B., STAMM LER, H.G., KIMBU, S.F., SEWALD, N., 2009. Antibacterial endiandric acid derivatives from *Beilschmiedia anacardioides*. *Phytochemistry*. 70:684-688.
- CRUZ, E.A., REUTER, S., MARTIN, H., DEHZAD, N., MUZITANO, M.F., COSTA, S.S., ROSSI-BERGMANN, B., BUHL, R., STASSEND, M., TAUBE, C., 2012. *Kalanchoe pinnata* inhibits mast cell activation and prevents allergic airway disease. *Phytomedicine*, 19: 115-121.
- CRUZ, E.A., DA-SILVA, S.A.G., MUZITANO, M.F., SILVA, P.M.R., COSTA, S.S., ROSSI-BERGMANN, B., 2008. Immunomodulatory pretreatment with *Kalanchoe pinnata* extract and its quercitrin flavonoid effectively protects mice against fatal anaphylactic shock. *International Immunopharmacology*, 8: 1616-21.

- DEVBHUTI, D., GUPTA, J.K., DEVBHUTI, P., 2012. Studies on antitumour activity of *Bryophyllum calycinum* Salisb. against Ehrlich ascites carcinoma in Swiss Albino mice. *Journal of Pharmaceutical Science and Technology*, 2: 31-33.
- DJEUSI, D.E., NOUMEDEM, J.A.K., SEUKEP, J.A., FANKAM, A.G., VOUKENG, I.K.,
- DONG, J.E., MA X.H., WEI Q., PENG S.B., ZHANG S.C., 2011. Effects of growing location on the contents of secondary metabolites in the leaves of four selected superior clones of *Eucommia ulmoides*. *Ind Crop Prod*, 34: 1607-1614.
- DURAI PANDIYAN, V., AYYANAR, M., IGNACIMUTHU, S., 2006. Antimicrobial activity of some ethnomedicinal plants used by Paliyar tribe from Tamil Nadu, India. *BMC Complementary Alternative Medicine*, 6(35).
- EL-TAHAWY, A.T., 2000. Bacteriology of diabetic foot. *Saudi Medical Journal*, 21, 344- 347.
- GADEPALLI, R., DHAWAN, B., SREENIVAS, V., KAPIL, A., AMMINI, A. C., CHAUDHRY, R., 2006. A clinico-microbiological study of diabetic foot ulcers in an Indian tertiary care hospital. *Diabetes Care* 29, 1727–1732.
- GAHLAUT, A., CHHILLAR, A.K., 2013. Evaluation of antibacterial potential of plant extracts using resazurin based microtiter dilution assay. *International Journal Pharmacology and Pharmacy Science*, 5 (2), 372-376.
- GHASI, S., EGWUIBE, C., ACHUKWU, P.U., ONYEANUSI, J.C., 2011. Assessment of the medical benefit in the folkloric use of *Bryophyllum pinnatum* leaf among the Igbos of Nigeria for the treatment of hypertension. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 5: 83-92.
- GILL, L.S., 1992. In 'The ethnomedical uses of plants in Nigeria.' Published by University of Benin Press, University of Benin, Benin city, Edo State. 46, 143.
- GOYAL P, JAIN N, PANWAR NS, SINGH GK, NAGORI BP., 2013. Investigation of hypoglycemic and antidiabetic activities of ethanol extracts of *Kalanchoe pinnata* leaves in streptozocin-induced diabetic rats. *International Journal of Pharmacology and Toxicology* 3: 9-18
- JUDD, W.S., CAMPBELL, C.S., KELLOGG, E.A., STEVENS, P.F., DONOGHUE, M.J., 2009. *Sistemática vegetal: um enfoque filogenético*, 3rd edn. Porto Alegre: Artmed.
- KAMBOJ, A., SALUJA, A.K., 2009. *Bryophyllum pinnatum* (Lam) Kurz: phytochemical and pharmacological profile: a review. *Pharmacognosy Reviews* 3: 364–374
- KIRTIKAR, K.R., BASU, B.D., 1975. *Indian medicinal plants*, Vol.2. Dehradun: Bishen Singh Mahendra Pal Singh: 999.
- KLANCNIK, A., PISKERNIK, S., JERSEK, B., MOZINA, S.S., 2010. Evaluation of diffusion and dilution methods to determine the antibacterial activity of plant extracts. *Journal Microbiology Methods*, 81, 121-126.

- KUETE, V., 2010. Potential of Cameroonian plants and derived products against microbial infections: a review. *Planta Medica*, 76 (14) : 1479–1491.
- LANS, C.A., 2006. Ethnomedicines used in Trinidad and Tobago for urinary problems and diabetes mellitus. *Journal of ethnobiology and ethnomedicine*; 2: 45.
- LIPSKY, B. A., 2007. Empirical therapy for diabetic foot infections: are there clinical clues to guide antibiotic selection. *Clinical Microbiology and Infection*, 13, 351–353. 10.1111/j.1469-0691.2007.01697.x
- LIU W., LIU J., YIN D., ZHAO X., 2015. Influence of ecological factors on the production of active substances in the anti-cancer plant *Sinopodophyllum hexandrum* (Royle) T.S. Ying. *PLoS One*, 10(4):e0122981.
- LUBER, P., BARTELT, E., GENSCHOW, E., WAGNER, J., HAHN, H., 2003. Comparison of broth microdilution, E Test, and agar dilution methods for antibiotic susceptibility testing of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(3), 1062-1068.
- MAHATA, S., MARU, S., SHUKLA, S., PANDEY, A., MUGESH, G., DAS, B.C., BHARTI, A.C., 2012. Anticancer property of *Bryophyllum pinnata* (Lam.) Oken. leaf on human cervical cancer cells. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 12: 15.
- MAJAZ, Q.A., NAZIM, S., ASIR, Q., SHOEB, Q., BILAL, G.M., 2011. Screening of in-vitro anthelmintic activity of *Kalanchoe pinnata* roots. *International Journal of Research in Ayurveda and Pharmacy*, 2: 221-223.
- MATTHEW, S., JAIN, A.K., MATTHEW, C., KUMAR, M., BHOWMIK, D., 2013a. Antidepressant activity of ethanolic extract of plant *Kalanchoe pinnata* (Lam.) Pers. in mice. *Indian Journal of Research in Pharmacy and Biotechnology*, 1: 153-155.
- MATTHEW, S., SINGH, D., JAISWAL, S., JAYAKAR, M.K.B., BHOWMIK, D., 2013b. Antidiabetic activity of *Kalanchoe pinnata* (Lam.) Pers. in alloxan induced diabetic rats. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research* 6: 1-7.
- MUZITANO, M.F., FALCÃO, C.A.B., CRUZ, E.A., BERGONZI, M.C., BILIA, A.R., VINCIERI, F.F., ROSSI-BERGMANN, B., COSTA, S.S., 2009. Oral metabolism and efficacy of *Kalanchoe pinnata* flavonoids in a murine model of cutaneous leishmaniasis. *Planta Medica*, 75: 307-311.
- MUZITANO, M.F., TINOCO, L.W., GUETTE, C., KAISER, C.R., ROSSIBERGMANN, B., COSTA, S.S., 2006. The antileishmanial activity assessment of unusual flavonoids from *Kalanchoe pinnata*. *Phytochemistry*, 67: 2071- 2077.
- OFOKANSI, K.C., ESIMONE, C.O., ANELE, C.R., 2005. Evaluation of the in vitro combined antibacterialeffect of the leaf extracts of *Bryophyllum pinnatum* and *Ocimum gratissimum* (Labiatae). *Plant Product Research Journal*, 9: 6-10.
- OJEWOLE, J.A.O., 2002. Antihypertensive properties of *Bryophyllum pinnatum* {(Lam) Oken} leaf extracts. *American Journal of Hypertension*, 15: 34a.
- OKWU, D.E., NNAMDI, F.U., 2011(a). A novel antimicrobial phenanthrene alkaloid from *Bryophyllum pinnatum*. *Journal of Chemistry is a peer-reviewed*, 8: 1456–1461.

- OKWU, D.E., NNAMDI, F.U., 2011(b). Two novel flavonoids from *Bryophyllum pinnatum* and their antimicrobial Activity. *Pharmaceutical Chemistry Journal*; 3(2): 1-10.
- PAL, S., NAG CHAUDHURI, A.K., 1991. Studies on the anti-ulcer activity of a *Bryophyllum pinnatum* leaf extract in experimental animals. *Journal Ethnopharmacology*; 33: 97–102.
- PALOMBO, E.A., 2011. Traditional medicinal plant extracts and natural products with activity against oral bacteria: potencial application in the prevention and treatment of oral diseases. *Evidence Based Complementary and Alternative Medicine*, 1 – 15.
- PATHARE, N.A., BAL, A., TALVALKAR, G.V., ANTANI, D.U., 1998. Diabetic foot infections: a study of microorganisms associated with the different Wagner grades. *Indian Journal Pathology Microbiology*, 41, 437-441.
- PERIM, M.C., BORGES, J.C., CELESTE, S.R.C., ORSOLIN, E.F., MENDES, G.O., MENDES, R.R., FERREIRA, R.L., CARREIRO, S.C., PRANCHEVICIUS, M.C., 2015. Aerobic bacterial profile and antibiotic resistance in patients with diabetic foot infections. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 48 (5), 546 - 554.
- RAJSEKHAR, P.B., ARVIND BHARANI, R.S., RAMACHANDRAN, M., JINI ANGEL, K., RAJSEKHAR, S.P.V., 2016. The “Wonder Plant” *Kalanchoe pinnata* (Linn.) Pers.: A Review. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 6(03), 151-158.
- RAMAKANT, P., VERMA, A. K., MISRA, R., PRASAD, K. N., CHAND, G., MISHRA, A., AGARWAL, G., AGARWAL, A., MISHRA, S. K., 2011. Changing microbiological profile of pathogenic bacteria in diabetic foot infections: time for a rethink on which empirical therapy to choose? *Diabetologia*. 54, 58–64.
- SALAMI, E.O., OZOLUA, R.I., OKPO, S.O., EZE, G.I., UWAYA, D.O., 2013. Studies on the anti- asthmatic and antitussive properties of aqueous leaf extract of *Bryophyllum pinnatum* in rodent species. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 6:421–425.
- SALAZAR-ARANDA, R.; PÉREZ - LÓPEZ, L.A.; LÓPEZ - ARROYO, J.; ALANÍSGARZA, B.A.; TORRES, N.W., 2009. Antimicrobial and antioxidant activities of plants from northeast of Mexico. *Evidence - Based Complementary and Alternative Medicine*, 1-6.
- SHARMA, A.L., BHOT, M.A., CHANDRA, N., 2014. Gastroprotective effect of aqueous extract and mucilage from *Bryophyllum pinnatum* (Lam.) Kurz. *Ancient Science of Life*, 33: 252-258.
- SUPRATMAN, U., FUJITA, T., AKIYAMA, K., HAYASHI, H., MURAKAMI, A., SAKAI, H., KOSHIMIZU, K., OHIGASHI, H., 2001. Anti-tumour promoting activity of bufadienolides from *Kalanchoe pinnata* and *K. daigremontiana* × *tubiflora*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 65: 947-949.
- SUPRATMAN, U., FUJITA, T., AKIYAMA, K., HAYASHI, H., 2000. New insecticidal bufadienolide, bryophyllin C, from *Kalanchoe pinnata*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 64: 1310-1312.
- TATSIMO, S.J., TAMOKOU JDE, D., HAVYARIMANA, L., CSUPOR, D., FORGO, P., HOHMANN, J., KUIATE, J.R., TANE, P., 2012. Antimicrobial and antioxidant

activity of kaempferol rhamnoside derivatives from *Bryophyllum pinnatum*. BMC Research Notes 5: 158.

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

VADEMECUM, 2013. Gesellschaft Anthroposophischer Ärzte in Deutschland und der Medizinischen Sektion der Freien Hochschule für Geisteswissenschaft, Dornach, Schweiz. Vademecum Anthroposophische Arzneimittel, 3rd edition. Berlin: Der Merkurstab, 178–183.

WILLCOX, M.L., BODEKER, G., 2004. Traditional herbal medicines for malaria. British Medical Journal, 329: 1156–1159.

YADAV, N.P., DIXIT, V.K., 2003. Hepatoprotective activity of leaves of *Kalanchoe pinnata* Pers, Journal of Ethnopharmacology 86:197–202.

Tabela 1. Percentual de cepas sensíveis ao extrato etanólico das folhas de *Kalanchoe pinnata* (Lam.) Pers., determinada pelos métodos de Difusão em Disco (DD) e Microdiluição em Caldo (MC).

DD (mg/ml)											
BACTÉRIAS	20	10	5	2,5	1,25	0,625	0,312	0,156	0,078	0,039	DMSO 100%
Gram-negativas	10	10	10	9	8	8	5	4	3	3	0
(n = 26)	38,46%	38,46%	38,46%	34,62%	30,77%	30,77%	19,23%	15,38%	11,54%	11,54%	0,00%
Gram-positivas	18	17	16	14	11	10	9	5	3	2	0
(n = 48)	37,50	35,42	33,33	29,17	22,92	20,83	18,75	10,42	6,25	4,17	0,00
<b>Total</b>	<b>28</b>	<b>27</b>	<b>26</b>	<b>23</b>	<b>19</b>	<b>18</b>	<b>14</b>	<b>9</b>	<b>6</b>	<b>5</b>	<b>0</b>
<b>(n = 74)</b>	<b>37,84%</b>	<b>36,49%</b>	<b>35,14%</b>	<b>31,08%</b>	<b>25,68%</b>	<b>24,32%</b>	<b>18,92%</b>	<b>12,16%</b>	<b>8,11%</b>	<b>6,76%</b>	<b>0,00%</b>
MC (mg/ml)											
BACTÉRIAS	20	10	5	2,5	1,25	0,625	0,312	0,156	0,078	0,039	DMSO 100%
Gram-negativas	9	9	9	8	8	8	8	7	7	7	0
(n = 26)	34,62%	34,62%	34,62%	30,77%	30,77%	30,77%	30,77%	26,92%	26,92%	26,92%	0,00%
Gram-positivas	19	19	17	17	13	13	13	13	11	9	0
(n = 48)	39,58%	39,58%	35,42%	35,42%	27,08%	27,08%	27,08%	27,08%	22,92%	18,75%	0,00%
<b>Total</b>	<b>28</b>	<b>28</b>	<b>26</b>	<b>25</b>	<b>21</b>	<b>21</b>	<b>21</b>	<b>20</b>	<b>18</b>	<b>16</b>	<b>0</b>
<b>(n = 74)</b>	<b>37,84%</b>	<b>37,84%</b>	<b>35,14%</b>	<b>33,78%</b>	<b>28,38%</b>	<b>28,38%</b>	<b>28,38%</b>	<b>27,03%</b>	<b>24,32%</b>	<b>21,62%</b>	<b>0,00%</b>

Número de linhagens analisadas (n) e porcentagem (%).

Tabela 2. Percentual de cepas sensíveis ao extrato etanólico das folhas de *Kalanchoe pinnata* (Lam.) Pers. contra bactérias multirresistentes, determinada pelos métodos de Difusão em Disco (DD) e Microdiluição em Caldo (MC).

BACTÉRIAS		DD (%)	MC (%)
Gram-negativas (n=26)	<i>Citrobacter</i> spp (n=01)	1 (100,00%)	1(100,00%)
	<i>Citrobacter youngae</i> (ATCC-29935) (n=1)	1 (100,00%)	1(100,00%)
	<i>Escherichia coli</i> (n=02)	0 (0,00%)	0 (0,00%)
	<i>Escherichia coli</i> (ATCC-25922) (n=1)	0 (0,00%)	0 (0,00%)
	<i>Enterobacer</i> spp (n=09)	3 (33,33%)	3 (33,33%)
	<i>Proteus</i> spp (n=07)	2 (28,57%)	1 (14,29%)
	<i>Proteus mirabilis</i> (ATCC-1245) (n=1)	0 (0,00%)	0 (0,00%)
	<i>Pseudomonas</i> spp (n=03)	2 (66,67%)	2 (66,67%)
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC-27853) (n=1)	1 (100,00%)	1 (100,00%)
Gram-positivas (n=48)	<i>Streptococcus agalataiae</i> (alfa hemolítico) (n=02)	1 (50,00%)	1 (50,00%)
	<i>Streptococcus pneumoniae</i> (beta hemolítico) (n=04)	3 (75,00%)	3 (75,00%)
	<i>Streptococcus piogenes</i> (ATCC-0015) (n=1)	1 (100,00%)	1 (100,00%)
	<i>Staphylococcus epidermidis</i> (n=04)	0 (0,00%)	0 (0,00%)
	<i>Staphylococcus saprophyticus</i> (n=14)	6 (42,86%)	5 (35,71%)
	<i>Staphylococcus aureus</i> (n=22)	7 (31,82%)	9 (40,91%)
	<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC-25923) (n=1)	0 (0,00%)	0 (0,00%)
<b>TOTAL (n=74; 100%)</b>		<b>28 (37,84%)</b>	<b>28 (37,84%)</b>

A concentração dos extratos utilizado para analisar a atividade antimicrobiana foi de 20 (100,00%) a 0,039 (0,19%) mg/ml. Número de linhagens analisadas (n) e porcentagem (%).



Tabela 3. Análise estatística dos efeitos do extrato etanólico das folhas de *Kalanchoe pinnata* (Lam.) Pers. em combinação com antibióticos contra as bactérias multirresistentes.

<b>Antibiótico X Extrato das Folhas</b>			
Gram -/CIM-MC	EXTRATO DAS FOLHAS		TOTAL
CFO	Resistente	Sensível	
Resistente	11	11	22
Sensível	1	3	4
<b>TOTAL (<math>p = 0,598261</math>)</b>	<b>12</b>	<b>14</b>	<b>26</b>

<b>Antibiótico X Extrato das Folhas</b>			
Gram +/CIM-MC	EXTRATO DAS FOLHAS		TOTAL
AAC	Resistente	Sensível	
Resistente	13	16	29
Sensível	10	9	19
<b>TOTAL (<math>p = 0,768564</math>)</b>	<b>23</b>	<b>25</b>	<b>48</b>

CIM: Concentração Inibitória Mínima; MC: Microdiluição em Caldo; AAC: Amoxicilina com Ácido Clavulânico (2000 mg/ml); CFO: Cefoxitina (3000 mg/ml). Teste Exato de Fisher, nível de significância: p-valor <0.05.

### 4.3 Artigo 03 - *Anacardium humile* (St.) Hil - Á ser submetido

**Phytotherapy Research**

**Phytotherapy Research**

© John Wiley & Sons Ltd



Edited By: Elizabeth M. Williamson, Angelo A Izzo, Sung Hoon-Kim and Rajan Radhakrishnan

Impact Factor: 3.092

ISI Journal Citation Reports © Ranking: 2016: 19/60 (Chemistry Medicinal); 81/257 (Pharmacology & Pharmacy)

Online ISSN: 1099-1573

ISSN	Título	Área de Avaliação	Classificação
0951-418X	PTR. PHYTOTHERAPY RESEARCH	BIOTECNOLOGIA	B1

Este artigo será submetido a revista para avaliação dos revisores

## Title page

### **In vitro antibacterial activities of bark and leaf extracts of *Anacardium humile* (St.) Hil against multidrug resistant human pathogens**

Michele Cezimbra Perim<sup>a</sup>, Joelma da Costa Borges<sup>a</sup>, Eulália Maria Lima da Silva<sup>b</sup>, Thiago Antônio de Sousa Araújo<sup>a,c</sup>, Ana Carolina Oliveira da Silva<sup>d</sup>, Graziela Silva Rezende<sup>e</sup>, Solange Cristina Carreiro<sup>a</sup>, Anderson Ferreira da Cunha<sup>e</sup>, Maria Cristina da Silva Pranchevicius<sup>e\*</sup>

<sup>a</sup> Universidade Federal do Tocantins. Av. NS 15 s/n (109 Norte), Palmas-Tocantins 77010-210, Brazil

<sup>b</sup> Oklahoma Medical Research Foundation. Cell Cycle and Cancer Biology Research ProGram. 825 NE 13th Street, Oklahoma City, OK 73104, United States of America

<sup>c</sup> Universidade Federal de Pernambuco. Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco. Rua Prof. Artur de Sá S/N, Cidade Universitária Recife-PE 50740-521, Brazil

<sup>d</sup> Instituto de Ortopedia e Traumatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Rua Dr. Ovídio Pires de Campos, 333, Cerqueira César, São Paulo-SP 05403- 010, Brazil

<sup>e</sup> Departamento de Genética e Evolução. Universidade Federal de São Carlos. Rod. Washington Luis, km 235, São Carlos-SP 13565-905, Brazil

<sup>e\*</sup> Maria Cristina da Silva Pranchevicius: corresponding author.

## Authors

Michele Cezimbra Perim; phone: +55-63-99237-2687; e-mail: [michelle@mail.uft.edu.br](mailto:michelle@mail.uft.edu.br)

Joelma da Costa Borges; phone: +55-63-98137-8805; e-mail: [joelmacb@mail.uft.edu.br](mailto:joelmacb@mail.uft.edu.br)

Eulália Maria Lima da Silva; phone: +1-405-531-1707; e-mail: [eulaliamls@gmail.com](mailto:eulaliamls@gmail.com)

Thiago Antônio de Sousa Araújo; phone: +55-81-99104-3531; email: [thiagocaruaru@hotmail.com](mailto:thiagocaruaru@hotmail.com)

Ana Carolina Oliveira da Silva; phone +55-61-99906-0582; e-mail: [carolina.ortopedia@gmail.com](mailto:carolina.ortopedia@gmail.com)

Graziela Silva Rezende; phone: +55-44-99136-8518; e-mail: [grazi\\_9@msn.com](mailto:grazi_9@msn.com)

Solange Cristina Carreiro; phone +55-63-99222-7656; e-mail: [solange@mail.uft.edu.br](mailto:solange@mail.uft.edu.br)

Anderson Ferreira da Cunha; phone +55-16-99765-5987; e-mail: [anderf2611@gmail.com](mailto:anderf2611@gmail.com)

Maria Cristina da Silva Pranchevicius; phone +55-16-98191-7525, email: [mcspranc@gmail.com](mailto:mcspranc@gmail.com)

### **Abstract**

The development of multiresistant bacterial strains has become a global concern. Medicinal plants have been explored as a source of molecules with therapeutic potential for the treatment of various diseases and the development of more effective drugs against bacterial infections. The objective of this study is to evaluate the antibacterial activity of *Anacardium humile* (St.) bark and leaf extract against multidrug-resistant bacteria isolated from diabetic patients with diabetic foot infections (DFI) and reference strains obtained from the American Type Culture Collection (ATCC). The activity was determined by agar diffusion (DD), broth microdilution (BD), checkerboard, and time-kill methods. Leaf and bark extract with the DD and BB methods significantly inhibited the growth of Gram-positive and Gram-negative bacteria as well as the growth of bacteria commonly found in DFI, including *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalatae* (group B, beta hemolytic), *S. pneumoniae* (alpha-hemolytic), *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, and *Proteus*. By checkerboard method, the combination of bark extract (35%) or leaf (40%) with Cefoxitin on gram-negative bacteria had similar synergistic effects while the leaf extract (45%) showed greater synergistic effect

than bark extract (17.5%) in combination with Amoxicillin/Clavulanic Acid on gram-positive bacteria. The time-kill kinetic profile showed bactericidal activity with dose and time-dependent properties, suggesting that bark and leaf extracts may potentiate the effects of antibiotics. However, these extracts may also contain bioactive antibacterial compounds that act independently from the mechanism of action of the antibiotics tested as demonstrated by the effects found in DD and BD assays. Our data suggest that extracts of *A. humile* should be considered an alternative source of research for antibacterial agents acting on Gram-positive and Gram-negative multidrug-resistant bacteria. However, the isolation of bioactive compounds and additional studies should be performed to understand the mechanisms of bactericidal action and define its real efficacy and toxicity.

## **1. Introduction**

Antimicrobial resistance (AMR) is a worldwide health concern. Bacterial resistance to antibiotics has increased, causing high morbidity and mortality (Sharma et al., 2005).

DFI are an increasingly common problem and the most frequent cause of diabetes-related hospitalization and limb amputation (Lavery et al., 2006). Frequently, these infections are polymicrobial, with a broad spectrum of multidrug-resistant pathogens (WHO, 2017).

Plants have been historically used to treat infectious diseases and may be a source for the discovery of new antibiotics. The antibacterial activity of plant extracts could be attributed to some constituents such as phenolic components and tannins (Cowan, 1999). Tannins are capable of attacking the proteins found on the walls and cell membrane of bacteria, resulting in damage and cell death (Doss et al., 2009; Scalbert,

1991). The mechanisms responsible for the antimicrobial activity of phenolic compounds include adsorption and disruption of microbial membranes, interaction with enzymes and substrates, and deprivation of metal ions (Daglia, 2012; Cowan, 1999).

The species *Anacardium humile* is a perennial plant widely distributed in the Brazilian Cerrado. Studies on the phytochemical profile of *A. humile*, especially for the bark of this species (Araújo et al., 2015), are limited. Recent findings demonstrated that the ethanolic extract of the leaf contains phenolic compounds derived from the gallic acid, catechins, and flavonoids (flavonoid glycosides and bioflavonoids) (Luiz-Ferreira et al., 2010), while the ethyl acetate fraction exhibits a high concentration of tannin compounds (Ferreira et al., 2012). Araújo et al. (2015) showed that *A. humile* bark and leaf have phytochemical similarity, with large amounts of phenolic compounds and tannins, and suggested that both parts of the plant may have similar therapeutic antitumor potential.

Studies on the therapeutic potential of *Anacardium humile* (St.) Hill, especially on its antibacterial activities, are scarce. Therefore, the objective of this study was to evaluate the antibacterial potential of the bark and leaf extracts of *Anacardium humile* in multidrug-resistant strains isolated from diabetic patients with foot ulcers.

## **2. Material and Methods**

### *Study design*

The antibacterial activity of *Anacardium humile* (St.) Hill bark and leaf were evaluated against a total of 74 bacteria, using the Disc Diffusion (DD) and

Microdilution in Broth (BD) methodology. Additionally, Checkerboard and Time-kill approaches were used against 60 bacteria. The difference in the number of samples in the methods occurred due to the inactivation of some strains during the tests. The bacteria analyzed were: *Citrobacter* spp.; *Escherichia coli*, *Enterobacter* spp., *Proteus* spp., *Pseudomonas* spp., *Streptococcus agalatae* (alpha-hemolytic), *Streptococcus pneumoniae* (beta-hemolytic), *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus aureus*, isolated from diabetic patients with foot ulcers, who were admitted to the General Public Hospital of Palmas Doutor Francisco Ayres (HGP), in Tocantins, Brazil, between January and June 2013 (Perim et al., 2015). The other bacterias in this study were obtained from American Type Culture Collection (ATCC), *Escherichia coli* (ATCC-25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC-25922), *Proteus mirabilis* (ATCC-12453), *Citrobacter yougae* (ATCC-29935), *Staphylococcus aureus* (ATCC-25923) and *Streptococcus pyogenes* (ATCC-0015).

#### *Plant Material and extraction*

*Anacardium humile* (St.) Hill bark and leaf were collected from January to June 2013 in the city of Palmas, state of Tocantins, Brazil (10°10'58.45"S e 48°17'33.75"W). The plant was characterized and authenticated at the Biology Institute of the Federal University of Uberlândia-Brazil. The specimens voucher (HUFU 72.823) was prepared and deposited in the Federal University Herbarium of the Federal University of Uberlândia, Brazil.

The collected plant parts were oven dried with circulation of air and average temperature of  $40 \pm 2^\circ$  C. Then they were pulverized in a Willye-type vertical mill and standardized in sieves, obtaining 1 mm granulometry (16 mesh). The extracts were

prepared by steeping with 95% ethanol, for 24 hours, at a ratio of 1:20 (w/v). After maceration, the material was filtered on filter paper and evaporated under reduced pressure at  $40 \pm 2^\circ\text{C}$  until the production of a dry extract (Araújo et al., 2012).

#### *Preparation of inoculum*

Active cultures were prepared by transferring the stock bacteria to tubes containing Mueller Hinton Broth (MHB) (Kasvi, Brazil) and incubated without shaking for 24h at  $37^\circ\text{C}$ . Cultures were diluted with fresh MHB at an optical density of  $2.0 \times 10^6$  colony forming units for each bacterial species.

#### *Disc Diffusion assay*

The method of disc diffusion was performed as previously described (Arullappan et al., 2014; Duraipandiyar et al., 2006). In previously sterilized Petri dishes, 25 ml Mueller Hinton (MH) Agar was dispensed. The bacterial suspension (1.0 ml) was evenly distributed and the inoculum was dried for 5 minutes. Sterile white paper discs (Oxoid), 6.0 mm in diameter were impregnated with different dilutions (20 mg/ml to 0.039 mg/ml) of the extract, pure DMSO impregnated into the disc was used as a negative control. Cefoxitin discs (CFO) (3000 mg/ml to 1.5 mg/ml) and amoxicillin with clavulanic acid (AAC) (2000 mg/ml to 0.9 mg/ml) were used as positive control for Gram-negative and Gram-positive bacteria, respectively. Plates were incubated at  $37^\circ\text{C}$  for 24 and 48 hours. At the end of the incubation, the zones of inhibition formed around the disks were measured with a caliper ruler. All tests were done in triplicate and the evaluation of the bacterial activity followed the criterion for inhibition halo diameter:  $<6$  mm, resistant; 6-8 mm, less sensitive; 9-13 mm, moderately sensitive;  $\geq 14$  mm, highly sensitive (Arora & Bhardwaj, 1997).



### *Determination of Minimum Inhibitory Concentration*

Minimal Inhibitory Concentration (MIC) was determined using Broth Microdilution (MB) methodology (Gahlaut & Chhillar, 2013). All experiments were performed in triplicate. The concentration of extracts used to validate antibacterial activity was 20 to 0.039 mg/ml. The antibiotics CFO and AAC, used as a positive control for Gram-negative and Gram-positive bacteria, respectively. The antibiotics concentration used were also from 20 to 0.039 mg/ml. DMSO was used as a negative control.

### *Checkerboard Assay*

Checkerboard assay followed the previously described methodology (Olajuyigbe & Afolayan, 2012). Fractional inhibitory concentration (FIC) was obtained from serial dilutions of extract combined with the antibiotic that inhibited the visible growth of the microorganism in Mueller Hinton broth after incubation at 37°C for 24h. The FIC indices were calculated using the formula:  $\text{FIC index} = (\text{MIC of extract in combination} / \text{MIC of individual extract}) + (\text{antibiotic MIC in combination} / \text{MIC of individual antibiotic})$ . Synergism was defined as  $\Sigma\text{FIC} \leq 0.5$ , additive as  $0.5 < \Sigma\text{FIC} \leq 1$ , indifferent as  $1 < \Sigma\text{FIC} \leq 4$ , and antagonistic as  $\Sigma\text{FIC} > 4$ .

### *Time Kill Assay*

Time-kill assay was performed by the broth macrodilution method, as described by Ojo et al. (2013) and Olajuyigbe & Afolayan (2012). The extract of *Anacardium humile*

(St) Hil was tested at concentrations 0.5xCIM, 1xCIM and 2xCIM. Inoculae containing approximately  $5 \times 10^5$  CFU/ml Gram-negative or Gram-positive strains were incubated at 37°C into Mueller Hinton broth containing the extract. Samples were removed from the culture at 6, 12 and 24h, serially diluted, and 100 µl of the diluted samples were inoculated on Mueller Hinton agar and incubated at 37°C for 24 h. After 24h, the number of colonies was determined. Control samples included MH broth without extract seeded with test inoculum. The viable colonies were calculated to provide CFU/ml, and the death data plotted against time against the logarithm of the viable count. Each experiment was performed with three replicates and the means and variances were obtained. The bactericidal activity was defined as a reduction of 99.9% ( $\geq 3 \log_{10}$ ) of the total number of CFU/ml of the initial inoculum. Bacteriostatic activity was defined as the maintenance of the initial inoculum concentration, or a reduction of less than 99.9% ( $\geq 3 \log_{10}$ ) of the total number of CFU/ml of the initial inoculum.

### *Statistical Analysis*

Data processing and analysis were conducted using tools as Excel 2016, STATA 12 and Biostat. Spearman's correlation coefficient and Fisher's exact test were also used, according to the objectives of the analyzes and the nature of the data, 5% of significance was considered.

### **3. Results and Discussion**

Due to the growing interest in utilizing the properties of new antimicrobial products in the fight against multiple drug-resistant bacteria, it is important to develop a better understanding of the current methods available for the screening and / or quantification of the antimicrobial effect of an extract or a pure compound for its applications in

human health (Balouiri et al., 2016). To evaluate the basis of the current methods available, we analyzed how efficiently the extract of the bark and leaf of *Anarcadium humile* inhibit bacteria growth. **Table 1** shows that, using the Microdilution Method in Broth (BD), the extract of the bark or leaf of *A. humile* was efficient in inhibiting the growth of many of the Gram-negative bacteria (bark: n=20, 76.92%; leaf: n=20, 76.92%) and Gram-positive (bark: n=40, 83.33%, leaf n=38, 79.16%). Compared with BD, the Disk Diffusion (DD) methodology was slightly less effective in detecting Gram-negative bacteria growth inhibition (bark: n=16, 61.53%, leaf: n=16, 61.53%) and Gram-positive (bark: n=32, 66.66%, leaf: n=28, 58.33%). The differences in the patterns of susceptibility observed with the two methods (DD and BD) can be explained by the differences in the diffusibility of the agar extract (Oliveira et al., 2007). Evaluation of extracts using agar diffusion assays may lead to a less accurate and even false negative result since the results are influenced by agar type, salt concentration, incubation temperature, and molecular size of the antimicrobial components (Maia-Araújo, 2011). It has been reported that the method of microdilution in broth is more sensitive than other methods (Eloff, 1998) and it is widely used and extremely advantageous for the analysis of natural products. The BD method is known to be low cost, simple, fast, and it is possible to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) of the products under study (Palombo, 2011; Salazar-Aranda et al., 2009; Ostrosky et al., 2008). Some findings have reported that Gram-positive bacteria are susceptible to plant extracts and antimicrobial chemical compounds due to bacterial cell wall properties (Kittika et al., 2007; Sharifa et al., 2008). On the other hand, Gram-negative bacteria have a higher tolerance to antibacterial compounds due to the presence of the lipopolysaccharide layer and the periplasmic space (Koohsari et al., 2005). Our results for the antimicrobial activity of *A. humile* bark and leaf extracts on Gram-

negative and Gram-positive bacteria was very similar. Additionally, the extracts were active against many multidrug-resistant bacteria at minimum concentrations (0.039 mg/ml). Therefore, our data suggests both parts of this plant contain bioactive compounds that can be used to screen for novel antibacterial agents.

The lesions in the feet of diabetic patients often present polymicrobial infections with multiple drug resistance profiles (Banu et al., 2015, Sivanmaliappan et al., 2011; Dhanasekaran et al., 2003). The most common bacteria found in these lesions are Gram-positive, such as *Staphylococcus aureus*, beta-hemolytic streptococci (group A, B, and others), and *Enterococcus*; Gram-negative, such as *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, and *Proteus* species; and also anaerobic bacteria (Shankar et al., 2005, Abdulrazak et al., 2005). The bacteria used in this work come from the studies of Perim et al. (2015), which showed that these strains were resistant to the traditional antibiotics used in the treatment of diabetic foot infections. Studies with extracts of *Anacardium humile* are scarce, and their effect against multiresistant bacteria isolated from clinical samples has not been studied. To determine whether *Anacardium humile* has some antibacterial impact in these clinical samples we used BD and DD methods. In both methodologies, the extracts showed significant antibacterial activity (**Table 1**) on *Staphylococcus aureus* strains, mainly in the lowest concentration used (0.039 mg/ml). Bark (DD; n=15, 68.18% and BD; n=19, 86.36%) and leaf (DD; n=13, 59.09% and BD; n=18, 81.82%) extracts inhibited clinical and ATCC (n= 1, 100%) *S. aureus* strains. Studies have documented that *S. aureus* is the most isolated pathogen in diabetic foot ulcers (Citron et al., 2007, Dang et al., 2003) and many of these are methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) (Smith et al., 2016). Leaf and bark extracts efficiently inhibited the growth of *Streptococcus pneumoniae* (alpha-hemolytic) (DD; n=1, 50%, BD, n=1, 50%), *Streptococcus agalatae* (B group, beta hemolytic) in 75% (DD and

BD, n=3), and *Streptococcus pyogenes* (ATCC, group A, alpha hemolytic) in 100% (DD and BD, n=1). *Streptococcus* group A rarely causes infection, but when it occurs, it causes severe tissue destruction (Edmonds, 2009). *Streptococcus* group B has been recognized as an important pathogen in diabetic foot infection (DFI), although *Streptococcus* groups C, E, F, and G may also be present (Legout et al., 2005).

The analysis of the antimicrobial activity in gram-negative strains using DD and BD methods (**Table 1**), showed that the extracts were able to inhibit the growth of clinical *Pseudomonas* spp. (leaf: DD and BD, n = 3 (100%); bark: DD and BD, n = 2 (66.67%), and of the ATCC strain (n = 1; 100%). The presence of *Pseudomonas* in DFI is notoriously resistant to most broad-spectrum antibiotics; moreover, these bacteria are invasive, often causing severe damage to diabetic foot ulcer tissues, and may lead to an increased risk of amputation of the lower limbs (Wahab et al., 2013, Dhanasekaran et al., 2003, Sivanmaliappan & Sevanan, 2011). Bark extract inhibited the growth of *Proteus* spp. in 57.14% (DD, n=4) and in 71.43% (BD, n=5), and leaf extract inhibited growth in 42.86% (DD, n=3) and 57.14% (BD, n=4). Bark and leaf extracts inhibited the growth of ATCC *Proteus mirabilis* (BD and DD, 100%). In both methodologies, the *E. coli* strains were inhibited 100% (n=2) by the leaf extract and 50% (n=1) by the bark extracts. The extract from the bark inhibited *Enterobacter* spp in 77.78% (DD and BB, n=7), and the leaf extract inhibited it in 77.8% (BD, n=7) and 66.67% (DD, n=6). Extracts from bark and leaf inhibited *Citrobacter* spp. (100%) and *Citrobacter youngae* (100%) only by the BD methodology. *E. coli* from ATCC strains were inhibited 100% only by bark extracts in the BD methodology. Araujo et al. (2015) showed that the bark and leaf extracts of *Anacardium humile* present high concentrations of phenolic compounds and tannins. Other studies have shown that tannins (Ferreira et al., 2012) and essential oils (Montanari et al., 2012) from *Anacardium humile* leaf are capable of

inhibiting the growth of *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Escherichia coli*. In our study, although the bioactive components of bark and leaf were not isolated, we could observe an antimicrobial activity. Therefore, these results suggest that this plant may be a source of bioactive molecules against infectious diseases caused by multidrug-resistant bacteria.

The effects of combinations of known antibiotics and plant extracts is a novel concept and can be beneficial by additive or synergistic interaction (Adwan & Mhanna, 2008). In our studies, the combination of the extract of the bark (**Table 2**) with the CFO antibiotic of Gram-negative bacteria introduced an additive effect synergistic with nine strains (45%). The synergistic effect was predominant and observed in 7 (35%) of the strains: 3 strains of *Enterobacter spp.* (ES10E, ES13B, ES18B), 1 of *Citrobacter spp.* (CS 26B), 1 of *Pseudomonas spp.* (PSS 23A), 1 of *Citrobacter youngae* (CY, ATCC 29935), and 1 of *Escherichia coli* strain (EC, ATCC 25922). The additive effect was observed in 2 strains (10.00%) of *Proteus spp.* (PS 25C, PS 39B). With Gram-positive bacteria, the extract of bark in combination with ACA showed an additive and synergistic effect in 16 strains (40%). The synergistic effects 7 (17.50%) corresponded to 3 strains of *Staphylococcus aureus* (SA 10A, SA 18D, SA 21F), 3 of *Staphylococcus saprophyticus* (SS 26C, SS 38B, SS 39D) and one strain of *Streptococcus pneumoniae* (STP 12C). The additive effect was observed in 9 (22.50%) strains, including 5 strains of *Staphylococcus aureus* (SA 05D, SA 11C, SA 24A, SA 24B, SA 36B), 2 of *Staphylococcus saprophyticus* (SS 23B, SS 25D), 1 of *Streptococcus agalactiae* (STA 10C), and 1 of *Staphylococcus epidermidis* (SE 09A). Our results showed that the bark extracts in combination with the CFO antibiotics have a greater synergistic action against Gram-negative bacteria whereas combining them with ACA antibiotics has a similar additive and synergistic action on Gram-positive bacteria. Therefore,

antimicrobial efficacy and the synergistic and additive interactions observed suggest that combined chemotherapy with *A. humile* bark or leaf extract has beneficial effects in the treatment of multidrug-resistant bacteria.

The effects of the combination of the leaf extract of *A. humile* with the antibiotic CFO on Gram-negative bacteria and the ACA antibiotic on Gram-positive bacteria is shown in **Table 3**. It was observed that leaf extracts in combination with CFO presented a synergistic effect in 8 (40%) Gram-negative strains; of these, there were 3 *Enterobacter spp.* (ES 02B, ES 13B, ES 18B), 2 *Proteus spp.* (PS 25C, PS 39B), 1 *E. coli* (EC 20B), and 1 *Citrobacter spp.* (CS 26B), and there were no additive effects. The combination of the leaf with the ACA antibiotic presented 18 (45%) synergistic effects and 2 (5%) additive effects, totaling 50% of additive effects with synergists. The synergistic effects were in clinical sample isolates and corresponded to 10 (50%) strains of *Staphylococcus aureus* (SA 05C, SA 11C, SA 11D, SA 18A, SA 18D, SA 21F, SA 24B, SA 26A, SA 29A, SA 36B), 1 (50%) *Staphylococcus epidermidis* (SE 40A), 4 (33.33%) *Streptococcus. S. pneumoniae* (STP 12C, STP 13C), and one (50%) strain of *Streptococcus agalactiae* (STA 14B). The additive effects corresponded to one strain of *Staphylococcus saprophyticus* and one strain of *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923).

We also compare the synergistic effects between the bark and leaf extracts. By comparison, for Gram-negative bacteria, bark extracts (35%) and leaf (40%) had similar synergistic effects, while for Gram-positive bacteria, leaf extracts (45%) had a synergistic effect that was much more efficient than the bark extracts (17.5%). The extracts, in combination with the antibiotics, demonstrated that the leaf (85%) in association with the antibiotic have the potential of more significant activity than the bark (52.5%) against all tested bacteria. These results are not complementary to the

similar effects of the bark and leaf extracts alone (**Table 1**) on inhibiting growth in Gram-negative and Gram-positive bacteria. Therefore, our results indicate that bark extracts and especially the leaf extracts could enhance the antibiotic's activities; however, these extracts may also contain bioactive compounds that act independently of the mechanisms of action for the antibiotics tested.

The time-kill kinetics assay is a method of assessing the rate of bacterial killing by the antimicrobial agent during a time interval (Petersen et al., 2006; Schaper et al., 2005). Time-kill profiles of the *A. humile* bark and leaf extract against the Gram-negative or Gram-positive isolates are presented in **Table 4** and **5**. Data are presented in terms of log<sub>10</sub> cfu/ml reduction and are based on the ability to improve the bactericidal activity of the tested antibiotics (CFO and ACA). Using bark extracts with the antibiotic CFO against Gram-negative bacteria (**Table 4**), the bactericidal effect corresponded to  $\leq 0.301$  cfu / ml. The bark extract in combination with CFO and 0.5XMIC eliminated strains of *Proteus spp.* (PS 21D, PS 25C, PS 39B) and *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) with 24 h of interaction. The 1XMIC of the extract was able to inhibit *Enterobacter spp.* (ES 10E, ES 13B) and *Pseudomonas spp.* (PSS 38A) at 6 h. Other strains were inhibited after 12 h, such as *Escherichia coli* (EC 20B; ATCC 25922), *Proteus spp.* (PS 40B), and *Pseudomonas aeruginosa* (PSS 23A). At 24 h of interaction, we observed that CS 26B, CY 29936, *Enterobacter spp.* (ES 08B), *Proteus spp.* (PS 04A), and *Proteus mirabilis* (ATCC 12453) were killed. The 2XMIC of the extract was able to reduce *Enterobacter spp.* within 6 h (ES 02B, ES 08B) and 12 h (ES 18 B); and within 24 hours, all strains were dead. The reduction in viable cell count observed in 0.5xMIC and 1xMIC were also noted in 2xMIC after 6,12, and 24 h of interaction.

For Gram-positive bacteria, the bactericidal effect was  $\leq 0.368$  CFU/ml. The 0.5XMIC of the extract killed *Staphylococcus saprophyticus* and *Staphylococcus aureus*



bacteria in 12 hours (SS 26C, SA ATCC 25923) and 24 hours (SS 08C, SS 13A, SA 24A). The 1XMIC extract killed 1 *Streptococcus agalatae* (STA 10C), 1 *Staphylococcus epidermidis* (SE 40A), 5 *Staphylococcus saprophyticus* (SS-23B, SS 34C, SS 39D, SS 40C, SS 41A), and *Staphylococcus aureus* (SA 11D, SA 14A, SA 21F, SA 26A, SA 29A, SA 36B) after 6 hours. After 12 hours of interaction, we noticed that eight more strains were reduced; 1 *Streptococcus pneumoniae* (STP 12C), 2 *Staphylococcus saprophyticus* (SS 25D, SS 38B), and 5 *Staphylococcus aureus* (SA 2C, SA 11C, SA 24A, SA 24B, SA 33B). At 24 hours plus, 2 strains were inhibited – 1 *Streptococcus pyogenes* (ATCC 0015) and 1 *Staphylococcus aureus* (SA 05A).

The strains suppressed at 0.5XMIC (n=6 - 15%, 24h) were also killed in the 1XMIC; therefore, of the 40 Gram-positive strains tested, the 1XMIC extract was able to kill 29 strains within 24 hours (72.50%). The 2XMIC of the extract eliminated 34 (85%) strains in 6 hours; of the 7 strains not eliminated (STP 13C, SE 09A, SS 35B, AS 10B, SA 12A, SA 18A, SA 18D), 5 strains were eliminated (STP 13C, SE 09A, SS 35B, SA 12A and SA18D) in 12 hours, and all strains were reduced after 24 hours of interaction. Initial Time-kill findings (0.5XMIC) in this study showed time-dependent bacterial inhibition levels that were different between the bacteria and the tested concentrations, regardless of whether they were Gram-negative or Gram-positive. However, from 1XMIC, there was a significant increase in the number of inviable cells, time and concentration-dependent, and the 2XMIC of the extract eliminated all the bacteria tested after 24 hours of interaction. It is well-documented that plant extracts are more effective against Gram-positive bacteria than Gram-negative bacteria, which may be due to their differences in cell wall composition (Ahmad & Beg, 2001). However, our data showed that the combination of the bark extract with antibiotics exhibited a

broad spectrum of activity against Gram-negative and Gram-positive bacteria, which is in agreement with our DD and BD results (**Table 1**).

The effects of *A. humile* leaf extract interactions with the ACA antibiotic on Gram-negative and Gram-positive bacteria are shown in **Table 5**. The interaction of the extract with the Gram-negative and Gram-positive bacteria at 2xMIC demonstrated a greater reduction in cell counts than observed in 1xMIC and 0.5xMIC. This result shows that the inhibition of leaf extract was bactericidal and dose and time-dependent. For Gram-negative bacteria, the 0.5xMIC of the extract inhibited the growth of 1 strain of *Enterobacter spp.* (ES 13B) after 12 h, 1 strain of *Citrobacter spp.* (CS 26B) and 1 strain of *Escherichia coli* (EC 25922), at 24 h of interaction. The interaction of the extract with the antibiotic at 1xMIC shows additional inhibition of the growth of 2 *Enterobacter spp.* (ES 2B, ES 10B) and 2 *Proteus spp.* (PS 04A, PS 39B), at 6h, 1 *Citrobacter youngae* (CY 29935), 2 *Enterobacter spp.* (ES 08B, ES 11B), 1 *Proteus spp.* (PS 40B), from 12 h, 1 (EC 20B) and 1 (PA 27853) at 24 h. At the end of 24h, 13 Gram-negative strains (65%) were killed. The interaction of the extract with the 2XMIC antibiotic eliminated 16 strains (80%) in 6 h of interaction. From 12 hours to 24 hours, all Gram-negative strains were dead. The interaction of *A. humile* leaf extract with ACA antibiotic against Gram-positive bacteria demonstrated that 0.5XMIC, 1 bacterium (SS 35B) was killed at 6 h, additionally 1 *Streptococcus pneumoniae* (STP 12C), 1 *Staphylococcus saprophyticus* (SS 38B) and 4 *Staphylococcus aureus*, 2 strains at 12 h (SA 05C, SA 11D) and 2 at 24 h (SA 18D, SA 24A). In addition to the bacteria eliminated in the 0.5XMIC, the 1.0XMIC extract eliminated 1 (SS 41A), 3 (SA 10A, SA 24B, SA 33B) at 6 hours, 1 *Streptococcus agalatae* (STA 14B), 1 *Staphylococcus epidermidis* (SE 09A), 1 *Staphylococcus saprophyticus* (SS 25D), 4 *Staphylococcus aureus* (SA 12A, SA 26A, SA 36B, SA 25923) at 12 h. At 24 h, another strain (STP

13C), 1 (STA 10C), 1 (SP 0015), 1 (SS 01C, SS 23B, SS 40C), 3 (SA 02C, SA 21A, SA 21F), totaling 27 (67.50%) dead strains. The extract in 2XMIC additionally inhibited 2 strains of *Enterobacter spp* (ES 08D, ES 18B), *Proteus spp.*; (*Staphylococcus aureus*, SA 05A, SA 05D, SA 10B, SA 29A), with a total of 50 dead strains (83.33%), 1 *Pseudomonas spp* (PSS 38A), 2 *Staphylococcus saprophyticus* (SS 26C, SS 39D), at 12 h only 1 strain *Staphylococcus saprophyticus* (SS 13A) was not killed, totaling 59 deaths (98.33%), and at 24 h all strains were killed. Our results again demonstrated significant inhibition of bacterial time and concentration dependent, both for Gram-negative and Gram-positive bacteria. Therefore, our data suggest that *A. humile* leaf extract can also be used as an alternative source of research for antibacterial agents acting on multidrug resistant bacteria.

Time-Kill studies are important because comprehensive information on the pharmacodynamics of a putative antibacterial agent cannot be obtained simply through endpoints such as MIC (Schaper et al., 2005). Therefore, Time-kill assays are required to quantify the pharmacodynamics of a putative antibacterial agent, quantifying the decrease in bacterial growth as a function of the time and concentration of the drugs used (Rezaeian et al., 2016, Sim et al., 2014, Schaper et al., 2005). For the purpose of comparison, at 24 h of interaction, for the Gram-negative or Gram-positive bacteria, the bark extract as well as the leaf (Table 4 and 5) had a very similar death rate in the 0.5XMIC (Gram-negative: barks (n=3, 15%), leaf n=3 (15%), Gram-positive peels n=5 (12.5%), leaf: n=7 (17.5%)) and 2.0XMIC (n = 29), while the number of samples was higher (100% death). For all bacteria, in the same period, bark extract in combination with CFO or ACA antibiotics for Gram-negative or Gram-positive bacteria, respectively, eliminated 13.33% of bacteria in 0.5XMIC, 75% in 1.0XMIC and all the bacteria were killed at 2.0XMIC. Leaf extract in combination with CFO or ACA

antibiotics for Gram-negative or Gram-positive bacteria, respectively, at 0.5XMIC eliminated 16.67% of bacteria, 1.0XMIC eliminated 66.67%, and 2.0XMIC eliminated all bacteria at the end of 24 h. Our Time-kill results corroborate with other studies (Ojo et al., 2013; Aiyegoro et al., 2009) which demonstrated a high death effect at 2XMIC and a longer time of interaction. Although bacterial killing by the bark and leaf extract in the Time-kill assay were dose- and time-dependent, our results were complemented and supported by the synergistic and additive effects found in the association of the extract with antibiotics as indicated by the assay checkerboard.

#### **4. Conclusion**

Our results demonstrated a significant antibacterial activity of bark or leaf extracts against Gram-negative and Gram-positive bacteria resistant to multidrug, and that the association of these extracts with the antibiotic CFO or ACA can potentiate the antimicrobial effect and decrease the time of the death of these pathogens. Our data suggest that extracts of *A. humile* can be used as an alternative source of research for antibacterial agents acting on Gram-positive and Gram-negative multidrug-resistant bacteria. However, the isolation of bioactive compounds and additional studies should be performed to understand the mechanisms of bactericidal action, and to define real efficacy and toxic effects.

#### **Acknowledgements**

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

strains. This work was supported by grants from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, AUX-PE-PNPD 2535/2011, Process N: 23038.007229)-Brazil and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Universal, Process N: 485873/2013-3)-Brazil.

## 5. References

- Abdulrazak A., Bitar Z.I., Al-Shamali A.A., Mobasher L.A. (2005). Bacteriological study of diabetic foot infections. *Journal Diabetes Complications*, 19 (3):138–141.
- Adwan G., Mhanna M. (2008). Synergistic Effects of Plant Extracts and Antibiotics on *Staphylococcus aureus* Strains Isolated from Clinical Specimens. *Middle-East Journal of Scientific Research*, 3 (3): 134-139.
- Ahmad I., Beg A.Z. (2001). Antimicrobial and phytochemical studies on 45 Indian medicinal plants against multi-drug resistant human pathogens. *Journal of Ethnopharmacology*, 74: 113–133.
- Aiyegoro O.A., Afolayan A.J., Okoh A.I. (2009). In vitro antibacterial time kill studies of leaves extracts of *Helichrysum longifolium*. *Journal of Medicinal Plants Research*, 3 (6): 462-467.
- Araújo T.A.S., Almeida V.T.C., Amorim E.L.C., Albuquerque U.P. (2012). Habitat influence on antioxidant activity and tannin concentrations of *Spondiastuberosa arruda* (Anacardiaceae). *Pharmaceutical Biology*, 50 (6): 754 – 759.
- 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. (2015). Phytochemical, antioxidant and

cytotoxic analysis of Brazilian Cerrado plants: Preliminary evidence of their antitumor activity. *Journal of Medicinal Plant Research*, 9: 310–319.

Arora D.S., Bhardwaj S.K. (1997). Antibacterial activity of some medicinal plants. *Geo Bios*, 24: 127–131.

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

Balouiri M., Sadiki M., Ibsouda S. K. (2016). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: a review. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 6: 71–79.

Banu A., Noorul-Hassan M.M., Rajkumar J. *et al.* (2015). Prospective study of Multidrug Resistant Bacteria causing Diabetic Foot Ulcers in South India. *Journal of Science*, 5 (8): 626–629.

Citron D.M., Goldstein E.J., Merriam C.V., Lipsky B.A., Abramson M.A. (2007). Bacteriology of moderate-to-severe diabetic foot infections and in vitro activity of antimicrobial agents. *Journal of Clinical Microbiology*, 45(9): 2819–2828.

Cowan MM. (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clin Microbiol Rev.*, 12(4), 564–82.

Daglia M. (2012). Polyphenols as antimicrobial agents. *Current Opinion in Biotechnology*, 23(2), 174–181.

- Dang C., Prasad Y., Boulton A., Jude E. (2003). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the diabetic foot clinic: a worsening problem. *Diabetic Medicine*, 20(2):159–161.
- Dhanasekaran G., Sastry N.G., Mohan V. (2003). Microbial pattern of soft-tissue infections in diabetic patients in South India. *Asian Journal of Diabetology*, 5 (5-6): 8–10.
- Doss A., Mubarack H. M., Dhanabalan R. (2009). Antibacterial activity of tannins from the leaves of *Solanum trilobatum* Linn. *Indian Journal of Science Technology*, 2(2), 41–43.
- Duraipandiyan V., Ayyanar M., Ignacimuthu S. (2006). Antimicrobial activity of some ethnomedicinal plants used by Paliyar tribe from Tamil Nadu, India. *BMC Complementary Alternative Medicine*, 6 (35).
- Edmonds M. (2009). The treatment of diabetic foot infections: focus on ertapenem. *Vascular Health Risk Management*, 5: 949–963.
- Eloff J.N. (1998). A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. *Planta Medica*, 64: 711–713.
- Ferreira RBF, Mendes C.S.O., Rodrigues C.G., Rocha J.C.M., Royo V.A., Valério H.M., Oliveira D.A. (2012). Antibacterial activity tannin-rich fraction from leaves of *Anacardium humile*. *Ciencia Rural*, 42: 1862–1863.
- Gahlaut A., Chhillar A.K. (2013). Evaluation of antibacterial potential of plant extracts using resazurin based microtiter dilution assay. *International Journal Pharmacology and Pharmacy Science*, 5 (2): 372–376.
- Kittika N., Natta L., Orapian K. (2007). Antibacterial Effect of Five Zingiberaceae Essential Oils. *Molecules*, 12 (8): 2047–2060.

Koohsari H., Ghaemi E.A., Sadegh Sheshpoli M., Jahedi M., Zahiri M. (2015). The investigation of antibacterial activity of selected native plants from North of Iran. *Journal of Medicine and Life*. 8 (2): 38–42.

Lavery L.A., Armstrong D.G., Wunderlich R.P., Mohler M.J., Wendel C.S., Lipsky B.A. (2006). Risk factors for foot infections in individuals with diabetes. *Diabetes Care*, 29: 1288–1293.

Legout M., Assal P., Rohner P., *et al.* (2005). Severe *Streptococcus agalactiae* infection of the diabetic foot. A deleterious role of *Streptococcus agalactiae*. *La Presse Medicale*, 34: 491–494.

Luiz-Ferreira A., Almeida A.C., Cola M., Barbastefano V., Almeida A.B., Batista L.M., Farias-Silva E., Pellizzon C.H., Hiruma-Lima C.A., Santos L.C., Vilegas W., Brito A.R. (2010). Mechanisms of the gastric antiulcerogenic activity of *Anacardium humile* St. Hil on ethanol-induced acute gastric mucosal injury in rats. *Molecules*, 15: 7153–7166.

Maia-Araújo Y.L.F. (2011). Comparação entre duas técnicas utilizadas no teste de sensibilidade antibacteriana do extrato hidroalcoólico de própolis vermelha. *Scientia Plena*, 7: 046201.

Montanari R.M., Barbosa L.C., Demuner A.J., Silva C.J., Andrade N.J., Ismail F.M., Barbosa M.C. (2012). Exposure to *Anacardiaceae* volatile oils and their constituents induces lipid peroxidation within food-borne bacteria cells. *Molecules*. 17 (8): 9728–9740.

Ojo S.K.S., Ejims-Erukwe O., Esumeh F.I. (2013). *In-Vitro* Antibacterial Time-Kill Assay Of *Phyllanthus amarus* And *Diodia scandens* Crude Extracts On Staphylococci Isolated From Wounds And Burns Patients. *International Journal of Pharmaceutical Science Invention*, 2 (8), 09–13.



Olajuyigbe O.O., Afolayan A.J. (2012). Synergistic Interactions of Methanolic Extract of *Acacia mearnsii* De Wild. with Antibiotics against Bacteria of Clinical Relevance. *International Journal of Molecular Sciences*, 13 (7): 8915–8932.

Oliveira G.F., Furtado N.A.J.C., Silva-Filho A.A., Martins C.H.M., Bastos J.N., Cunha W.R., Silva M.L.A. (2007). Antimicrobial activity of *Syzygium cumini* (Myrtaceae) leaves extract. *Brazilian Journal Microbiology*, 38: 381–384.

Ostrosky E.A., Mizumoto M.K., Lima M.E.L., Kaneko T.M., Nishikawa S.O., Freitas B.R. (2008). Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 18: 301–307.

Palombo E.A. (2011). Traditional medicinal plant extracts and natural products with activity against oral bacteria: potencial application in the prevention and treatment of oral diseases. *Evidence Based Complementary and Alternative Medicine*, 1–15.

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

Petersen P.J., Labthavikul P., Jones C.H., Bradford P.A (2006). In vitro antibacterial activities of tigecycline in combination with other antimicrobial agents determined by checkerboard and time-kill kinetic analysis. *J Antimicrob Chemother*, 57(3):573–576.

Rezaeian S.H., Attaran S., Pourianfar H.R. (2016). Time-kill kinetics and antibacterial activity of crude methanolic extract of *Thymus daenensis* Celak. *Biomedical Research*, 27: 489–493.

- Salazar-Aranda R., Pérez-López L.A., López-Arroyo J., Alanígarza B.A., Torres N.W. (2009). Antimicrobial and antioxidant activities of plants from northeast of Mexico. *Evidence - Based Complementary and Alternative Medicine*, 2011: 1–6.
- Scalbert A. (1991). Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry*, 30 (12): 3875–3883.
- Schaper K.J., Schubert S., Dalhoff A. (2005). Kinetics and quantification of antibacterial effects of beta-lactams, macrolides, and quinolones against Gram-positive and Gram-negative RTI pathogens. *Infection*, 33: 3–14.
- Shankar E.M., Mohan V., Premalatha G. *et al.* (2005). Bacterial etiology of diabetic foot infections in South India. *European Journal of Internal Medicine*, 16: 567–570.
- Sharifa A.A., Neoh Y.L., Iswadi M.I., Khairul O., Abdul Halim M., Jamalubin M., Mohamed Azman A.B., Hing H.L. (2008). Effects of Methanol, Ethanol and Aqueous Extract of *Plantago majoron* Gram Positive Bacteria, Gram Negative Bacteria and Yeast. *Annals of Microscopy*, 8: 42–44.
- Sharma R., Sharma C.L., Kapoor B. (2005). Antibacterial resistance: current problems and possible solutions. *Indian Journal Medicine Research*, 59 (3): 120–9.
- Sim J.H., Jamaludin N.S., Khoo C.H., Cheah Y.K., Abdul Halim S.N.B., Seng H.L., Tiekink E.R.T. (2014). *In vitro* antibacterial and time-kill evaluation of phosphane-gold(I) dithiocarbamates, R<sub>3</sub>PAu[S<sub>2</sub>CN(iPr)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH] for R = Ph, Cy and Et, against a broad range of Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Gold Bull*, 47: 225–236.
- Sivanmaliappan T.S., Sevanan M. (2011). Antimicrobial Susceptibility Patterns of *Pseudomonas aeruginosa* from Diabetes Patients with Foot Ulcers. *International Journal of Microbiology*, 2011: 6051–6095.

Smith K., Collier A., Townsend E.M., O'Donnell L.E., Bal A.M., Butcher J., Mackay W.G., Ramage G., Williams C. (2016). One step closer to understanding the role of bacteria in diabetic foot ulcers: characterising the microbiome of ulcers. *BMC Microbiology*, 16: 54.

Wahab W.F.A., Bakhiet M.A., Mahadi S.E.I.D.I., Mahmoud S.M., Widataal A.H., *et al.* (2013) Diabetic Foot Infections with *Pseudomonas*: Jabir Abueliz Diabetic Center Khartoum Experience. *Clinical Research Foot Ankle*, 3: 001.

World Health Organization. (2017). Antimicrobial Resistance Global Report on Surveillance 2017. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/en/>.

**Table 1.** Antibacterial activity of ethanolic extract of *Anacardium humile* (St.) Hil, against multidrug resistant strains, by agar diffusion (DD), broth microdilution (BD) methods.

Gram-negative (n=26)		DD BARK		DD LEAF		BD BARK	BD LEAF	
IS	Concentration (mg/mL)	Zone of inhibition (mm)	Concentration (mg/ml)	Zone of inhibition (mm)	Concentration (mg/ml)	Concentration (mg/ml)	Concentration (mg/ml)	
								<i>Citrobacter</i> spp. (n=1)
<i>Citrobacter youngae</i> ATCC (n=1)	CY 29935	0.000	0	0.000	0	0.039	0.039	
<i>Escherichia coli</i> (n=2)	EC 06 A	0.000	0	5	13	0.000	0.039	
	EC 20 B	0.039	12	0.039	10	0.039	0.039	
<i>Escherichia coli</i> ATCC (n=1)	EC 25922	0.000	0	0.000	0	0.039	0.000	
<i>Enterobacter</i> spp. (n=9)	ES 01 D	5	14	10	14	1.25	10	
	ES 02 B	0.039	11	10	11	0.039	0.039	
	ES 08 A	0.039	15	5	13	0.625	5	
	ES 08 B	10	13	10	14	0.039	0.039	
	ES 08 D	2.5	13	0.000	0	2.5	0.039	
	ES 10 E	10	14	10	10	0.039	10	
	ES 11 B	0.039	9	5	9	5	0.039	
	ES 13 B	0.000	0	0.000	0	0.000	0.000	
	ES 18 B	0.000	0	0.000	0	0.000	0.000	
<i>Proteus</i> spp. (n=7)	PS 04 A	0.039	12	10	13	20	10	
	PS 07 A	2.5	15	2.5	13	0.039	0.039	
	PS 21 D	0.039	15	0.039	15	0.039	0.039	
	PS 25 B	0.000	0	0.000	0	0.000	0.000	
	PS 25 C	0.000	0	0.000	0	10	10	
	PS 39 B	0.000	0	0.000	0	0.000	0.000	
	PS 40 B	0.039	11	0.000	0	0.039	0.000	
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC (n=1)	PM 12453	5	9	10	13	5	10	
<i>Pseudomonas</i> spp. (n=3)	PSS 21 C	0.039	15	0.039	15	0.039	0.039	
	PSS 23 A	0.000	0	2.5	11	0.000	0.039	
	PSS 38 A	0.156	11	0.039	14	0.039	0.039	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC (n=1)	PA 27853	0.312	11	0.156	12	0.312	0.156	
Gram-positive (n=48)		DD BARK		DD LEAF		BD BARK	BD LEAF	
IS	Concentration (mg/ml)	Zone of inhibition (mm)	Concentration (mg/mL)	Zone of inhibition (mm)	Concentration (mg/ml)	Concentration (mg/ml)	Concentration (mg/ml)	
								<i>Streptococcus pneumoniae</i> alpha-hemolytic (n=02)
	STP 13 C	0.039	10	0.000	0	0.039	0.000	
<i>Streptococcus agalatae</i> beta-hemolytic (n=04)	STA 01 E	0.039	10	0.000	0	0.039	0.000	
	STA 10 C	10	10	10	10	0.039	0.039	
	STA 14 B	0.039	11	0.039	11	0.039	0.312	
	STA 18 C	0.000	0	0.039	10	0.000	0.039	
<i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC (n=01)	SP 0015	0.039	10	0.039	10	0.039	0.039	
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (n=04)	SE 05 B	0.000	0	0.000	0	0.039	0.039	
	SE 09 A	0.000	0	0.000	0	0.000	0.039	
	SE 09 B	0.039	13	1.25	12	0.039	0.039	
	SE 40 A	0.039	11	0.000	0	0.039	0.000	
<i>Staphylococcus saprophyticus</i> (n=14)	SS 01 C	0.039	9	0.039	10	0.039	5	
	SS 08 C	0.039	12	0.039	10	5	0.039	
	SS 13 A	5	9	0.000	0	0.039	5	
	SS 23 B	0.000	0	0.000	0	0.039	0.039	
	SS 25 D	0.000	0	5	10	0.039	0.039	
	SS 26 C	0.000	0	0.000	0	0.039	0.000	
	SS 34 C	0.039	12	0.156	11	0.039	0.039	
	SS 35 A	0.039	10	10	9	0.039	10	
	SS 35 B	0.039	9	0.039	10	0.039	0.039	
	SS 38 B	0.000	0	0.000	0	0.000	0.000	
	SS 39 D	0.000	0	0.000	0	0.000	0.039	
	SS 40 C	20	11	0.039	14	20	10	
	SS 41 A	0.039	12	0.039	15	0.039	0.039	
	SS 41 C	0.039	11	10	13	0.039	0.000	
	<i>Staphylococcus aureus</i> (n=22)	SA 02 C	0.039	11	0.039	12	0.039	0.039
		SA 05 A	0.039	14	10	12	10	0.039
		SA 05 C	0.039	12	0.000	0	0.039	5
SA 05 D		0.039	11	0.039	10	0.039	0.039	
SA 10 A		0.000	0	20	10	0.039	0.039	
SA 10 B		0.039	14	0.000	0	0.039	0.039	
SA 11 A		10	10	2.5	9	0.039	2.5	
SA 11 C		0.000	0	0.000	0	0.039	0.000	
SA 11 D		0.039	9	0.039	9	0.039	0.039	
SA 12 A		0.039	15	0.039	12	0.039	0.039	
SA 14 A		0.039	15	5	12	0.000	0.039	
SA 18 A		10	11	10	11	0.039	0.039	
SA 18 D		0.000	0	0.039	12	0.000	10	
SA 20 A		0.039	9	0.000	0	0.039	0.000	
SA 21 A		0.039	11	0.000	0	0.039	0.039	
SA 21 F		0.000	0	0.000	0	0.039	0.039	
SA 24 A		0.000	0	0.000	0	0.039	0.039	
SA 24 B		0.000	0	0.000	0	0.039	0.000	
SA 26 A		0.039	9	0.000	0	0.039	0.039	
SA 29 A		0.039	11	0.039	12	0.039	0.039	
SA 33 B		0.039	13	0.039	10	0.039	0.039	
SA 36 B		0.000	0	0.039	12	0.000	0.000	
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC (n=01)	SA 25923	20	11	0.000	0	20	10	

DD=Disc diffusion. MC=Microdilution. IS: Identification of bacterial strains isolated or ATCC (29935; 25922; 12453; 27853; 0015; 25923). Gram-negative bacteria: CY=*Citrobacter youngae*; EC=*Escherichia coli*; ES=*Enterobacter* spp.; PS=*Proteus* spp.; PM=*Proteus mirabilis*; PSS=*Pseudomonas* spp.; PA=*Pseudomonas aeruginosa*. Gram-positive bacteria: STP=*Streptococcus pneumoniae*; STA=*Streptococcus agalactiae*; SP=*Streptococcus pyogenes*; SE=*Staphylococcus epidermidis*, SS=*Staphylococcus saprophyticus*; SA=*Staphylococcus aureus*. The concentration of the extract used to the antimicrobial activity ranged from 20 to 0.039 mg/ml. Inhibition (mm) Active  $\geq$  9mm.

**Table 2.** Combination effects of the extract from bark *Anacardium humile* (St.) Hil and antibiotics on the growth of multidrug resistant bacteria.

<b>BACTERIA</b> (Gram-negative, n = 20)	<b>IS</b>	<b>MIC</b> Extract (µg/ml)	<b>MIC</b> CFO (µg/ml)	<b>MIC</b> Combination (µg/ml)	<b>FIC</b> (µg/ml)	<b>Remarks</b>
<i>Citrobacter</i> spp. (n=1)	CS 26B	5	0	3,12	0,062	Synergistic
<i>Citrobacter youngae</i> (ATCC) (n=1)	CY 29935	10	0	5	0,500	Synergistic
<i>Escherichia coli</i> (n=1)	EC 20B	0,19	0,19	0,19	2,000	Indifferent
<i>Escherichia coli</i> (ATCC) (n=1)	EC 25922	5	0	2,5	0,500	Synergistic
<i>Enterobacter</i> spp. (n=7)	ES 02B	1,56	6,25	1,56	1,249	Indifferent
	ES 08B	2,5	5	2,5	1,500	Indifferent
	ES 08D	1,56	12,5	1,56	1,124	Indifferent
	ES 10E	3,12	5	0,78	0,265	Synergistic
	ES 11B	0,78	5	0,78	1,015	Indifferent
	ES 13B	2,5	0	0,78	0,312	Synergistic
	ES 18B	6,25	0	0,39	0,062	Synergistic
<i>Proteus</i> spp. (n=5)	PS 04A	2,5	10	5	2,500	Antagonism
	PS 21D	0,19	0,19	0,19	2,000	Indifferent
	PS 25C	3,12	0	3,12	1,000	Additive
	PS 39B	2,5	0	2,5	1,000	Additive
	PS 40B	2,5	5	2,5	1,050	Indifferent
<i>Proteus mirabilis</i> (ATCC) (n=1)	PM 12453	2,5	2,5	25	2,000	Indifferent
<i>Pseudomonas</i> spp. (n=02)	PSS 23A	5	0	2,5	0,500	Synergistic
	PSS 38A	0,78	0,78	0,78	2,000	Indifferent
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC) (n=1)	PA 27853	1,56	1,56	1,56	2,000	Indifferent
<b>BACTERIA</b> (Gram-positive, n = 40)	<b>IS</b>	<b>MIC</b> Extract (µg/ml)	<b>MIC</b> ACA (µg/mL)	<b>MIC</b> Combination (µg/ml)	<b>FIC</b> (µg/ml)	<b>Remarks</b>
<i>Streptococcus pneumoniae</i> (n=2)	STP 12C	5	0	2,5	0,500	Synergistic
	STP 13C	6,25	2,5	6,25	3,500	Antagonism
<i>Streptococcus agalactiae</i> (n=2)	STA 10C	3,12	5	1,56	0,812	Additive
	STA 14B	0,39	1,56	1,56	5,000	Antagonism
<i>Streptococcus pyogenes</i> (ATCC) (n=1)	SP 0015	0,39	5	0,78	2,156	Antagonism
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (n=2)	SE 09A	0,78	0	0,78	1,000	Additive
	SE 40A	0,78	5	2,5	3,705	Antagonism
<i>Staphylococcus saprophyticus</i> (n=12)	SS 01C	0,39	5	3,12	8,624	Antagonism
	SS 08C	0,19	2,5	1,56	8,834	Antagonism
	SS 13A	0,19	2,5	2,5	14,157	Antagonism
	SS 23B	2,5	0	2,5	1,000	Additive
	SS 25D	2,5	0	1,56	0,624	Additive
	SS 26C	6,25	0	3,12	0,499	Synergistic
	SS 34C	0,39	0,39	0,39	2,000	Indifferent
	SS 35B	0,19	0,19	0,19	2,000	Indifferent
	SS 38B	5	0	2,5	0,500	Synergistic
	SS 39D	10	0	5	0,500	Synergistic
	SS 40C	5	10	5	1,500	Indifferent
	SS 41A	2,5	2,5	2,5	2,000	Indifferent
<i>Staphylococcus aureus</i> (n=20)	SA 02C	0,39	2,5	6,25	18,525	Antagonism
	SA 05A	0,19	5	3,12	17,045	Antagonism
	SA 05C	1,56	5	1,56	1,312	Indifferent
	SA 05D	1,56	5	0,78	0,656	Additive
	SA 10A	3,12	0	0,78	0,250	Synergistic
	SA 10B	0,19	0,19	0,19	2,000	Indifferent
	SA 11C	6,25	0	3,12	0,499	Additive
	SA 11D	3,12	6,25	3,12	1,499	Indifferent
	SA 12A	2,5	2,5	2,5	2,000	Indifferent
	SA 14A	1,56	2,5	1,56	1,624	Indifferent
	SA 18A	2,5	5	2,5	1,500	Indifferent
	SA 18D	10	0	5	0,500	Synergistic
	SA 21A	5	5	5	2,000	Indifferent
	SA 21F	10	0	5	0,500	Synergistic
	SA 24A	2,5	0	2,5	1,000	Additive
	SA 24B	6,25	0	6,25	1,000	Additive
	SA 26A	0,19	0,19	0,19	2,000	Indifferent
	SA 29A	0,19	0,19	0,19	2,000	Indifferent
SA 33B	6,25	5	3,12	1,123	Indifferent	
SA 36B	3,12	0	3,12	1,000	Additive	
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC) (n=1)	SA 25923	5	10	5	1,500	Indifferent
<b>Total</b>	<b>60</b>					

MIC: Minimum Inhibitory Concentration; FIC: Fractional Inhibitory Concentration; ACA: Amoxicillin/Clavulanic Acid; CFO: Cefoxitin. Quantities of bacteria (n). American Type Culture Collection (ATCC). IS: Identification of bacterial strains isolated or ATCC (29935; 25922; 12453; 27853; 0015; 25923). Gram-negative bacteria: CY=*Citrobacter youngae*; EC=*Escherichia coli*; ES=*Enterobacter* spp.; PS=*Proteus* spp.; PM=*Proteus mirabilis*; PSS=*Pseudomonas* spp.; PA=*Pseudomonas aeruginosa*. Gram-positive bacteria: STP=*Streptococcus pneumoniae*; STA=*Streptococcus agalactiae*; SP=*Streptococcus pyogenes*; SE=*Staphylococcus epidermidis*; SS=*Staphylococcus saprophyticus*; SA=*Staphylococcus aureus*.

**Table 3.** Combination effects of the extract from leaf *Anacardium humile* (St.) Hil and antibiotics on the growth of multidrug resistant bacteria.

<b>BACTERIA</b> (Gram-negative, n = 20)	<b>IS</b>	<b>MIC</b> Extract (µg/ml)	<b>MIC</b> CFO (µg/ml)	<b>MIC</b> Combination (µg/ml)	<b>FIC</b> (µg/ml)	<b>Remarks</b>
<i>Citrobacter</i> spp. (n=1)	CS 26B	5	0	2,5	0,500	Synergistic
<i>Citrobacter youngae</i> (ATCC) (n=1)	CY 29935	10	0	2,5	0,250	Synergistic
<i>Escherichia coli</i> (n=1)	EC 20B	0,19	0,19	0,19	2,0000	Indifferent
<i>Escherichia coli</i> (ATCC) (n=1)	EC 25922	2,5	0	12,5	0,500	Synergistic
<i>Enterobacter</i> spp. (n=7)	ES 02B	2,5	5	2,5	1,500	Indifferent
	ES 08B	2,5	5	2,5	1,500	Indifferent
	ES 08D	5	0	2,5	0,500	Synergistic
	ES 10E	2,5	5	2,5	1,500	Indifferent
	ES 11B	2,5	2,5	2,5	2,000	Indifferent
	ES 13B	5	0	2,5	0,500	Synergistic
	ES 18B	10	0	5	0,500	Synergistic
<i>Proteus</i> spp. (n=5)	PS 04A	5	5	5	2,000	Indifferent
	PS 2 D	0,19	0,19	0,19	2,000	Indifferent
	PS 25C	3,12	0	1,56	0,500	Synergistic
	PS 39B	3,12	0	1,56	0,500	Synergistic
	PS 40B	1,56	0	1,56	1,000	Indifferent
<i>Proteus mirabilis</i> (ATCC) (n=1)	PM 12453	2,5	5	2,5	1,050	Indifferent
<i>Pseudomonas</i> spp. (n=02)	PSS 23A	0,78	12,5	3,25	4,426	Antagonism
	PSS 38A	0,19	0,19	0,19	2,000	Indifferent
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC) (n=1)	PA 27853	0,78	0,78	0,78	2,000	Indifferent
<b>BACTERIA</b> (Gram-positive, n = 40)	<b>IS</b>	<b>MIC</b> Extract (µg/ml)	<b>MIC</b> ACA (µg/mL)	<b>MIC</b> Combination (µg/ml)	<b>FIC</b> (µg/ml)	<b>Remarks</b>
<i>Streptococcus pneumoniae</i> (n=2)	STP 12C	2,5	5	6,25	0,500	Synergistic
	STP 13C	10	0	2,5	0,250	Synergistic
<i>Streptococcus agalactiae</i> (n=2)	STA 10C	2,5	5	6,25	2,000	Indifferent
	STA 14B	1,56	1,56	1,56	0,500	Synergistic
<i>Streptococcus pyogenes</i> (ATCC) (n=1)	SP 0015	2,5	5	6,25	1,500	Indifferent
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (n=2)	SE 09A	10	0	2,5	1,500	Indifferent
	SE 40A	10	0	3,12	0,500	Synergistic
<i>Staphylococcus saprophyticus</i> (n=12)	SS 01C	6,25	2,5	1,56	1,500	Indifferent
	SS 08C	2,5	5	2,5	2,000	Indifferent
	SS 13A	10	0	5	0,500	Synergistic
	SS 23B	10	0	5	0,500	Synergistic
	SS 25D	6,25	2,5	1,56	2,000	Indifferent
	SS 26C	10	0	2,5	2,000	Indifferent
	SS 34C	1,56	0,78	0,78	0,500	Synergistic
	SS 35B	6,25	3,12	0,39	0,500	Synergistic
	SS 38B	10	0	5	1,000	Additive
	SS 39D	10	0	2,5	1,050	Indifferent
	SS 40C	2,5	5	3,12	4,426	Antagonism
	SS 41A	2,5	5	0,39	2,000	Indifferent
<i>Staphylococcus aureus</i> (n=20)	SA 02C	6,25	2,5	1,56	2,000	Indifferent
	SA 05A	2,5	5	2,5	3,750	Antagonism
	SA 05C	10	0	5	0,250	Synergistic
	SA 05D	2,5	5	2,5	3,750	Antagonism
	SA 10A	5	10	5	2,000	Indifferent
	SA 10B	20	0	5	3,750	Antagonism
	SA 11C	10	0	10	0,250	Synergistic
	SA 11D	6,25	2,5	3,12	0,312	Synergistic
	SA 12A	6,25	2,5	3,12	0,873	Additive
	SA 14A	6,25	2,5	6,25	1,500	Indifferent
	SA 18A	2,5	5	2,5	0,500	Synergistic
	SA 18D	2,5	5	3,12	0,500	Synergistic
	SA 21A	10	0	5	0,873	Additivity
	SA 21F	5	0	5	0,250	Synergistic
	SA 24A	10	0	2,5	1,500	Indifference
	SA 24B	10	0	3,12	0,187	Synergistic
	SA 26A	6,25	0	6,25	0,500	Synergistic
	SA 29A	0,19	0,19	0,19	0,250	Synergistic
	SA 33B	0,78	5	0,78	1,872	Indifferent
	SA 36B	0,78	5	0,78	0,234	Synergistic
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC) (n=1)	SA 25923	0,78	0	0,78	0,873	Additive
<b>Total</b>	<b>60</b>					

MIC: Minimum Inhibitory Concentration; FIC: Fractional Inhibitory Concentration; ACA: Amoxicillin/Clavulanic Acid; CFO: Cefoxitin. Quantities of bacteria (n). American Type Culture Collection (ATCC). IS: Identification of bacterial strains isolated or ATCC (29935; 25922; 12453; 27853; 0015; 25923). Gram-negative bacteria: CS=*Citrobacter* spp.; CY=*Citrobacter youngae*; EC=*Escherichia coli*; ES=*Enterobacter* spp.; PS=*Proteus* spp.; PM=*Proteus mirabilis*; PSS=*Pseudomonas* spp.; PA=*Pseudomonas aeruginosa*. Gram-positive bacteria: STP=*Streptococcus pneumoniae*; STA=*Streptococcus agalactiae*; SP=*Streptococcus pyogenes*; SE=*Staphylococcus epidermidis*, SS=*Staphylococcus saprophyticus*; SA=*Staphylococcus aureus*.

**Table 4.** In vitro time kill assessment of the extract from bark *Anacardium humile* (St.) Hill against Gram-negative and Gram-positive bacteria.

Gram negative IS	Log <sub>10</sub> Kill 0.5XMIC			Log <sub>10</sub> Kill 1XMIC			Log <sub>10</sub> Kill 2XMIC		
	6h	12h	24h	6h	12h	24h	6h	12h	24h
CS 26B	1.079	0.903	0.778 <sup>+</sup>	1.000	0.602	0.000*	0.000	0.000	0.000*
CY 29935	1.176	1.079	1.000 <sup>+</sup>	1.079	0.778	0.000*	0.778	0.000	0.000*
EC 20B	0.954	0.602	0.602 <sup>+</sup>	0.778	0.301	0.000*	0.699	0.602	0.000*
EC 25922	0.954	0.602	0.602 <sup>+</sup>	0.778	0.301	0.000*	0.000	0.000	0.000*
ES 02B	1.146	0.903	0.699 <sup>+</sup>	0.699	0.477	0.477 <sup>+</sup>	0.000	0.000	0.000*
ES 08B	1.079	1.000	0.954 <sup>+</sup>	0.845	0.699	0.699 <sup>+</sup>	0.301	0.000	0.000*
ES 08D	0.903	0.903	0.699 <sup>+</sup>	0.699	0.477	0.000*	0.000	0.000	0.000*
ES 10E	0.699	0.699	0.602 <sup>+</sup>	0.301	0.000	0.000*	0.000	0.000	0.000*
ES 11B	1.000	0.845	0.778 <sup>+</sup>	0.477	0.000	0.000*	0.000	0.000	0.000*
ES 13B	0.845	0.699	0.699 <sup>+</sup>	0.000	0.000	0.000*	0.000	0.000	0.000*
ES 18B	1.176	1.000	0.954 <sup>+</sup>	0.954	0.699	0.477 <sup>+</sup>	0.477	0.000	0.000*
PS 04A	1.079	0.903	0.845 <sup>+</sup>	0.845	0.699	0.301*	0.000	0.000	0.000*
PS 21D	0.699	0.602	0.301*	0.000	0.000	0.000*	0.000	0.000	0.000*
PS 25C	0.778	0.477	0.301*	0.301	0.000	0.000*	0.000	0.000	0.000*
PS 39B	0.954	0.477	0.301*	0.778	0.477	0.477 <sup>+</sup>	0.477	0.000	0.000*
PS 40B	0.845	0.778	0.477 <sup>+</sup>	0.477	0.000	0.000*	0.000	0.000	0.000*
PM 12453	1.146	0.845	0.602 <sup>+</sup>	0.778	0.477	0.301*	0.000	0.000	0.000*
PSS 23A	1.041	1.000	0.699 <sup>+</sup>	0.477	0.000	0.000*	0.000	0.000	0.000*
PSS 38A	0.903	0.699	0.699 <sup>+</sup>	0.000	0.000	0.000*	0.000	0.000	0.000*
PA 27853	0.699	0.477	0.301*	0.000	0.000	0.000*	0.000	0.000	0.000*
Gram positive IS	Log <sub>10</sub> Kill 0.5XMIC			Log <sub>10</sub> Kill 1XMIC			Log <sub>10</sub> Kill 2XMIC		
	6h	12h	24h	6h	12h	24h	6h	12h	24h
STP 12C	0.845	0.778	0.778 <sup>+</sup>	0.699	0.000	0.000*	0.000	0.000	0.000*
STP 13C	1.176	1.113	1.000 <sup>+</sup>	0.845	0.845	0.500 <sup>+</sup>	0.477	0.000	0.000*
STA 10C	0.954	0.903	0.778 <sup>+</sup>	0.301	0.000	0.000*	0.000	0.000	0.000*
STA 14B	0.602	0.477	0.477 <sup>+</sup>	0.602	0.602	0.477 <sup>+</sup>	0.000	0.000	0.000*
SP 0015	0.954	0.903	0.845 <sup>+</sup>	0.699	0.477	0.000*	0.000	0.000	0.000*
SE 09A	1.079	1.041	1.041 <sup>+</sup>	0.903	0.845	0.778 <sup>+</sup>	0.602	0.301	0.000*
SE 40A	0.903	0.778	0.477 <sup>+</sup>	0.301	0.301	0.000*	0.000	0.000	0.000*
SS 01C	1.000	0.699	0.602 <sup>+</sup>	0.699	0.602	0.602 <sup>+</sup>	0.301	0.301	0.000*
SS 08C	0.477	0.477	0.000 <sup>+</sup>	0.000	0.301	0.000*	0.000	0.000	0.000*
SS 13A	0.602	0.602	0.000*	0.000	0.301	0.301*	0.000	0.000	0.000*
SS 23B	0.778	0.778	0.477 <sup>+</sup>	0.000	0.477	0.301*	0.301	0.000	0.000*
SS 25D	0.903	0.699	0.602 <sup>+</sup>	0.602	0.000	0.000*	0.000	0.000	0.000*
SS 26C	0.602	0.301	0.000*	0.000	0.000	0.000*	0.000	0.000	0.000*
SS 34C	0.778	0.778	0.477 <sup>+</sup>	0.301	0.301	0.301*	0.000	0.000	0.000*
SS 35B	0.845	0.845	0.699 <sup>+</sup>	0.699	0.699	0.477 <sup>+</sup>	0.477	0.000	0.000*
SS 38B	1.000	0.954	0.845 <sup>+</sup>	0.477	0.000	0.000*	0.000	0.000	0.000*
SS 39D	0.699	0.602	0.477 <sup>+</sup>	0.000	0.000	0.000*	0.000	0.000	0.000*
SS 40C	0.845	0.845	0.699 <sup>+</sup>	0.000	0.000	0.000*	0.000	0.000	0.000*
SS 41A	0.477	0.477	0.477 <sup>+</sup>	0.000	0.000	0.000*	0.000	0.000	0.000*
SA 02C	1.041	0.845	0.477 <sup>+</sup>	0.477	0.000	0.000*	0.000	0.000	0.000*
SA 05A	0.954	0.699	0.602 <sup>+</sup>	0.778	0.477	0.000*	0.000	0.000	0.000*
SA 05C	1.113	0.845	0.602 <sup>+</sup>	0.301	0.000	0.000*	0.000	0.000	0.000*
SA 05D	1.041	1.041	0.954 <sup>+</sup>	0.845	0.699	0.602 <sup>+</sup>	0.301	0.301	0.000*
SA 10A	0.699	0.778	0.602 <sup>+</sup>	0.602	0.477	0.477 <sup>+</sup>	0.000	0.000	0.000*
SA 10B	0.954	0.954	0.778 <sup>+</sup>	0.845	0.699	0.699 <sup>+</sup>	0.477	0.477	0.000*
SA 11C	0.845	0.699	0.602 <sup>+</sup>	0.602	0.000	0.000*	0.000	0.000	0.000*
SA 11D	0.699	0.602	0.602 <sup>+</sup>	0.301	0.301	0.301*	0.000	0.000	0.000*
SA 12A	0.903	0.845	0.845 <sup>+</sup>	0.954	0.954	0.778 <sup>+</sup>	0.602	0.301	0.000*
SA 14A	0.903	0.699	0.699 <sup>+</sup>	0.301	0.000	0.000*	0.000	0.000	0.000*
SA 18A	1.176	1.079	1.041 <sup>+</sup>	1.041	0.954	0.778 <sup>+</sup>	0.602	0.602	0.000*
SA 18D	1.113	1.000	0.954 <sup>+</sup>	0.699	0.699	0.477 <sup>+</sup>	0.477	0.000	0.000*
SA 21A	1.079	0.845	0.778 <sup>+</sup>	0.477	0.301	0.000*	0.000	0.000	0.000*
SA 21F	0.699	0.699	0.477 <sup>+</sup>	0.000	0.000	0.000*	0.000	0.000	0.000*
SA 24A	0.477	0.477	0.301*	0.000	0.000	0.000*	0.000	0.000	0.000*
SA 24B	0.845	0.845	0.602 <sup>+</sup>	0.477	0.301	0.301*	0.000	0.000	0.000*
SA 26A	0.845	0.699	0.699 <sup>+</sup>	0.000	0.301	0.000*	0.000	0.000	0.000*
SA 29A	0.903	0.778	0.477 <sup>+</sup>	0.301	0.301	0.000*	0.000	0.000	0.000*
SA 33B	1.000	0.954	0.602 <sup>+</sup>	0.602	0.301	0.301*	0.000	0.000	0.000*
SA 36B	0.477	0.477	0.301*	0.301	0.000	0.000*	0.000	0.000	0.000*
SA 25923	0.602	0.301	0.000*	0.000	0.000	0.000*	0.000	0.000	0.000*

Gram-negative bacteria: CS=*Citrobacter* spp.; CY=*Citrobacter youngae*; EC=*Escherichia coli*; ES=*Enterobacter* spp.; PS=*Proteus* spp.; PM=*Proteus mirabilis*; PSS=*Pseudomonas* spp.; PA=*Pseudomonas aeruginosa*; IS: Identification of Strains Isolated or ATCC (29935; 25922; 12453; 27853). CFO: Cefoxitin. Log reduction Factor: 0.301CFU/ml; \*Bactericidal Activity < 0.301 cfu/ml; <sup>+</sup>Bacteriostatic Activity > 0.301 CFU/ml. Gram-positive bacteria: STP=*Streptococcus pneumoniae*; STA=*Streptococcus agalatae*; SP=*Streptococcus pyogenes*; SE=*Staphylococcus epidermidis*; SS=*Staphylococcus saprophyticus*; SA=*Staphylococcus aureus*. IS: Identification of Strains Isolated or ATCC (0015; 25923) ACA=Amoxicillin/Clavulanic Acid. Log reduction Factor=0.368 cfu/ml.\*Bactericidal Activity < 0.368 cfu/ml; <sup>+</sup> Bacteriostatic Activity > 0.368 cfu/ml.



**Table 5.** In vitro time kill assessment of the extract from leaf *Anacardium humile* (St.) Hill against Gram-negative and Gram-positive bacteria.

Gram negative IS	Log <sub>10</sub> Kill 0.5XMIC			Log <sub>10</sub> Kill 1XMIC			Log <sub>10</sub> Kill 2XMIC		
	6h	12h	24h	6h	12h	24h	6h	12h	24h
CS 26B	0.602	0.602	0.301*	0.000	0.000	0.000*	0.000	0.000	0.000*
CY 29935	1.079	1.041	0.954 <sup>+</sup>	0.699	0.477	0.000*	0.000	0.000	0.000*
EC 20B	1.041	0.954	0.845 <sup>+</sup>	0.602	0.602	0.301*	0.000	0.000	0.000*
EC 25922	0.699	0.699	0.301*	0.301	0.000	0.000*	0.000	0.000	0.000*
ES 02B	0.845	0.845	0.477 <sup>+</sup>	0.000	0.000	0.000*	0.000	0.000	0.000*
ES 08B	0.778	0.477	0.477 <sup>+</sup>	0.477	0.000	0.000*	0.000	0.000	0.000*
ES 08D	1.176	0.954	0.903 <sup>+</sup>	0.699	0.699	0.477 <sup>+</sup>	0.000	0.000	0.000*
ES 10E	0.903	0.699	0.699 <sup>+</sup>	0.301	0.000	0.000*	0.000	0.000	0.000*
ES 11B	0.954	0.699	0.477 <sup>+</sup>	0.477	0.301	0.301*	0.301	0.000	0.000*
ES 13B	0.602	0.301	0.000*	0.000	0.000	0.000*	0.000	0.000	0.000*
ES 18B	0.903	0.845	0.845 <sup>+</sup>	0.778	0.778	0.477 <sup>+</sup>	0.000	0.000	0.000*
PS 04A	0.903	0.699	0.477 <sup>+</sup>	0.301	0.000	0.000*	0.000	0.000	0.000*
PS 21D	1.041	1.041	1.000 <sup>+</sup>	0.778	0.477	0.477 <sup>+</sup>	0.000	0.000	0.000*
PS 25C	1.000	0.845	0.845 <sup>+</sup>	0.845	6.000	0.477 <sup>+</sup>	0.477	0.301	0.000*
PS 39B	0.477	0.602	0.477 <sup>+</sup>	0.301	0.000	0.000*	0.000	0.000	0.000*
PS 40B	0.699	0.699	0.477 <sup>+</sup>	0.477	0.301	0.301*	0.301	0.301	0.000*
PM 12453	0.903	0.903	0.699 <sup>+</sup>	0.602	0.699	0.602 <sup>+</sup>	0.602	0.301	0.000*
PSS 23A	1.176	1.113	0.778 <sup>+</sup>	0.845	0.778	0.778 <sup>+</sup>	0.778	0.301	0.000*
PSS 38A	0.845	0.903	0.845 <sup>+</sup>	0.699	0.477	0.477 <sup>+</sup>	0.301	0.000	0.000*
PA 27853	1.146	1.079	1.041 <sup>+</sup>	1.000	0.699	0.301*	0.000	0.000	0.000*

Gram positive IS	Log <sub>10</sub> Kill 0.5XMIC			Log <sub>10</sub> Kill 1XMIC			Log <sub>10</sub> Kill 2XMIC		
	6h	12h	24h	6h	12h	24h	6h	12h	24h
STP 12C	0.477	0.301	0.301*	0.301	0.000	0.000*	0.000	0.000	0.000*
STP 13C	0.845	0.845	0.903 <sup>+</sup>	0.778	0.477	0.000*	0.000	0.000	0.000*
STA 10C	0.954	0.845	0.699 <sup>+</sup>	0.699	0.699	0.301*	0.301	0.301	0.000*
STA 14B	0.954	0.845	0.602 <sup>+</sup>	0.477	0.000	0.000*	0.000	0.000	0.000*
SP 0015	1.000	1.000	0.845 <sup>+</sup>	0.602	0.602	0.301*	0.000	0.000	0.000*
SE 09A	1.041	0.699	0.602 <sup>+</sup>	0.602	0.301	0.000*	0.000	0.000	0.000*
SE 40A	0.845	0.699	0.699 <sup>+</sup>	0.602	0.602	0.477 <sup>+</sup>	0.477	0.301	0.000*
SS 01C	0.699	0.477	0.477 <sup>+</sup>	0.301	0.000	0.000*	0.301	0.301	0.000*
SS 08C	1.146	1.079	1.000 <sup>+</sup>	0.954	0.845	0.845 <sup>+</sup>	0.477	0.301	0.301*
SS 13A	0.954	0.954	0.845 <sup>+</sup>	0.845	0.699	0.699 <sup>+</sup>	0.699	0.477	0.000*
SS 23B	0.699	0.699	0.699 <sup>+</sup>	0.477	0.477	0.301*	0.000	0.000	0.000*
SS 25D	0.954	0.903	0.845 <sup>+</sup>	0.699	0.301	0.301*	0.301	0.000	0.000*
SS 26C	0.845	0.778	0.778 <sup>+</sup>	0.699	0.477	0.477 <sup>+</sup>	0.301	0.301	0.000*
SS 34C	0.954	0.699	0.699 <sup>+</sup>	0.699	0.602	0.602 <sup>+</sup>	0.477	0.000	0.000*
SS 35B	0.301	0.301	0.000*	0.000	0.000	0.000*	0.000	0.000	0.000*
SS 38B	0.602	0.301	0.301*	0.000	0.000	0.000*	0.000	0.000	0.000*
SS 39 D	0.903	0.845	0.845 <sup>+</sup>	0.845	6.000	0.477 <sup>+</sup>	0.301	0.301	0.000*
SS 40C	0.954	1.000	0.954 <sup>+</sup>	0.845	0.699	0.301*	0.000	0.000	0.000*
SS 41A	0.602	0.477	0.477 <sup>+</sup>	0.301	0.000	0.000*	0.000	0.000	0.000*
SA 02C	0.699	0.602	0.602 <sup>+</sup>	0.477	0.477	0.301*	0.000	0.000	0.000*
SA 05A	1.041	1.000	0.954 <sup>+</sup>	0.845	0.699	0.477 <sup>+</sup>	0.000	0.000	0.000*
SA 05C	0.602	0.301	0.000*	0.000	0.000	0.000*	0.000	0.000	0.000*
SA 05D	0.903	0.845	0.845 <sup>+</sup>	0.778	0.778	0.477 <sup>+</sup>	0.000	0.000	0.000*
SA 10A	0.903	0.699	0.477 <sup>+</sup>	0.301	0.000	0.000*	0.000	0.000	0.000*
SA 10B	1.041	1.041	1.000 <sup>+</sup>	0.778	0.477	0.477 <sup>+</sup>	0.000	0.000	0.000*
SA 11C	1.000	0.845	0.845 <sup>+</sup>	0.845	0.778	0.477 <sup>+</sup>	0.477	0.301	0.000*
SA 11D	0.477	0.301	0.301*	0.301	0.000	0.000*	0.000	0.000	0.000*
SA 12A	0.699	0.699	0.477 <sup>+</sup>	0.477	0.301	0.301*	0.301	0.301	0.000*
SA 14A	0.903	0.903	0.699 <sup>+</sup>	0.602	0.699	0.602 <sup>+</sup>	0.602	0.301	0.000*
SA 18A	1.176	1.113	0.778 <sup>+</sup>	0.845	0.778	0.778 <sup>+</sup>	0.778	0.301	0.000*
SA 18D	0.602	0.602	0.301*	0.000	0.000	0.000*	0.000	0.000	0.000*
SA 21A	1.079	1.041	0.954 <sup>+</sup>	0.699	0.477	0.000*	0.000	0.000	0.000*
SA 21F	1.041	0.954	0.845 <sup>+</sup>	0.602	0.602	0.301*	0.000	0.000	0.000*
SA 24A	0.699	0.699	0.301*	0.301	0.000	0.000*	0.000	0.000	0.000*
SA 24B	0.845	0.845	0.477 <sup>+</sup>	0.000	0.000	0.000*	0.000	0.000	0.000*
SA 26A	0.778	0.477	0.477 <sup>+</sup>	0.477	0.000	0.000*	0.000	0.000	0.000*
SA 29A	1.176	0.954	0.903 <sup>+</sup>	0.699	0.699	0.477 <sup>+</sup>	0.000	0.000	0.000*
SA 33B	0.903	0.699	0.699 <sup>+</sup>	0.301	0.000	0.000*	0.000	0.000	0.000*
SA 36B	0.954	0.699	0.477 <sup>+</sup>	0.477	0.301	0.301*	0.301	0.000	0.000*
SA 25923	0.903	0.845	0.699 <sup>+</sup>	0.602	0.301	0.301*	0.000	0.000	0.000*

Gram-negative bacteria. CS= *Citrobacter* spp. CY=*Citrobacter youngae*; EC=*Escherichia coli*; ES=*Enterobacter* spp.; PS=*Proteus* spp.; PM=*Proteus mirabilis*; PSS=*Pseudomonas* spp.; PA=*Pseudomonas aeruginosa*; IS: Identification of Strains Isolated or ATCC (29935; 25922; 12453; 27853). CFO: Cefoxitin. Log reduction Factor: 0.301CFU/ml; \*Bactericidal Activity < 0.301 CFU/ml; <sup>+</sup>Bacteriostatic Activity > 0.301 CFU/ml. Gram-positive bacteria (STP=*Streptococcus pneumoniae*; STA=*Streptococcus agalatae*; SP=*Streptococcus pyogenes*; SE=*Staphylococcus epidermidis*; SS=*Staphylococcus saprophyticus*; SA=*Staphylococcus aureus*). IS: Identification of Strains Isolated or ATCC (0015; 25923) ACA=Amoxicillin/Clavulanic Acid. Log reduction Factor=0.352 CFU/ml.\*Bactericidal Activity < 0.352 CFU/ml; <sup>+</sup> Bacteriostatic Activity. > 0.352 CFU/ml.

## **5. Conclusões**

### 5.1 *Davilla nitida* (Vahl) Kubitski

Em nosso estudo as atividades antibacterianas encontradas no extrato das cascas de *Davilla nitida* (Vahl) Kubitski contra as bactérias multirresistentes, isoladas das lesões de pés de pacientes diabéticos, sugerem que essa planta possui um potencial para a pesquisa de compostos bioativos que pode ser útil para o desenvolvimento de novas drogas antibacterianas para o tratamento e profilaxia desse tipo de infecção.

### 5.2 *Kalanchoe pinnata* (Lam.)Pers

Nossos resultados sugerem que a planta *Kalanchoe pinnata* (Lam.) Pers possui atividade antibacteriana eficaz e fornece evidências da sua eficácia como fonte de pesquisa para o isolamento e caracterização de compostos bioativos contra bactérias resistentes a multidrogas.

### 5.3 *Anacardium humile* (St.) Hil

Nossos resultados demonstraram uma expressiva atividade antibacteriana dos extratos das cascas e das folhas contra as bactérias Gram-negativas e Gram-positivas resistentes a multidrogas e que a associação desses extratos com o antibiótico CFO ou ACA podem potencializar o efeito antibacteriano e diminuir o tempo de morte desses patógenos. Nossos dados sugerem que os extratos de *Anacardium humile* (St.) Hil podem ser usados como uma fonte alternativa de pesquisa para agentes antibacterianos com ação em bactérias Gram-positiva e Gram-negativa multidroga resistentes.

Em todas as plantas analisadas, o isolamento dos compostos bioativos e estudos adicionais devem ser realizados para entender os mecanismos de ação bactericida, para definir a real eficácia e os efeitos tóxicos.

## **6. Considerações Finais**



Dentre as plantas testadas neste trabalho a que melhor apresentou atividade antibacteriana nos testes propostos foi *Anacardium humile* (St.) Hil, seguido de *Davilla nitida* (Vahl) Kubitski e *Kalanchoe pinnata* (Lam.)Pers.

Considerando que todos os extratos de plantas apresentaram potencial para a pesquisa de compostos bioativos, como perspectivas futuras, estudos adicionais sobre as ações farmacológicas e sua potencial toxicidade serão necessários para determinar sua adequada segurança.

Adicionalmente foi escrito um capítulo de livro enviado a editora CRV, que já foi aceito por pareceristas *ad hoc* e está aguardando editoração, intitulado “O uso de plantas medicinais e a resistência bacteriana”. Este livro “Tópicos especiais em Biodiversidade e Biotecnologia – Volume 2” faz parte de uma coletânea de 4 livros organizados por doutorandos do Programa Rede Bionorte/Tocantins. Neste capítulo foi relatado sobre o uso de plantas medicinais como uma alternativa na investigação da atividade antibacteriana contra bactérias multirresistentes.



## 7.1 - Parecer Consubstanciado Do Comitê De Ética UFT

	<b>CEP - COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS</b>
<b>PARECER CONSUBSTANCIADO</b>	
<b>PROJETO DE PESQUISA OU TIPO DE TRABALHO: PIBIC</b>	<b>PROCESSO Nº</b> <b>020/2011</b>
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.	
<b>1 - Identificação da Proposta de Projeto de Pesquisa/Trabalho de Conclusão de Curso</b>	
<b>Título:</b> Análise Bacteriológica dos pés Diabéticos de pacientes do Hospital Geral de Palmas e Hospital Oswaldo Cruz da cidade de Pailas - TO	
<b>Coordenador do Projeto ou Professor Orientador do TCC:</b>	
<b>Maria Cristina da Silva Pranchevicius</b>	
<b>Pesquisadores: Rafael Rocha Mendes, Gabriela Oliveira Mendes e Maria Cristina da Silva Pranchevicius</b>	
<b>Curso/ Departamento/Faculdade:</b>	
<b>Medicina/ Universidade Federal do Tocantins</b>	
<b>2 - Análise do Projeto de Pesquisa/Trabalho de Conclusão de Curso</b>	
<b>Relevante, informativo e gerador de conhecimento</b>	
<b>2.1 - Objetivos e Adequação metodológica</b> Verificar a viabilidade do projeto, isto é, se existe relação com o objeto, compatibilidade entre os objetivos, a fundamentação teórica e a metodologia ou plano de ação, estabelecendo correspondência entre objetivos, procedimentos, métodos de trabalho da pesquisa e abordagem do problema científico e layout de outros trabalhos similares.	
<b>Seqüencial, lógico e exequível.</b>	
<b>2.2 - Avaliação da Questionário a ser aplicado e do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido</b>	
<b>TCLE simples; é mais uma autorização.</b>	
<b>2.3 - Revisão Bibliográfica</b>	
<b>Dentro do escopo do projeto.</b>	
<b>3 - Qualificação do Pesquisador/Orientador</b> Indicar os trabalhos de Pesquisa/Orientador, salientando a atuação e experiência competitiva do(a) em função da orientação, qualidade e quantidade de produção científica/publicações relevantes compatíveis com o projeto de pesquisa apresentado (Condição de Curso)	
<b>O pesquisador é Doutor, varias Publicações.</b>	
	
Parecer consubstanciado CEP - UFT - Pág. 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 - Pendências: (Enumerar sucintamente as pendências a serem sanadas pelo Coordenador do Projeto de Pesquisa/Trabalho de Conclusão do Curso)

Não se aplica

6 - Parecer Consubstanciado

Aprovado:

Aprovado com ressalvas:

Pendências:

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:

Prof. Dr. Aparecido D. Borralho  
Presidente do Comitê de  
Ética em Pesquisa  
CEP-UFT



## 7.2 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 avelanadae* 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 avelanadae* 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 FRANCHEVICIUS / CPF 103.549.478-77

THIAGO ANTONIO DE SOUSA ARAUJO / CPF 007.614.904-85

ERIKA FERNANDA DE FARIA / CPF 036.288.301-76

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 [apq@cnpq.br](mailto:apq@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/BRMA.

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 [appg@cnpq.br](mailto:appg@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 4774244397764160 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.

## 7.3 Lista RENISUS

<b>RENISUS – Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS</b>	
<b>Espécies vegetais</b>	
1	<i>Achillea millefolium</i>
2	<i>Allium sativum</i>
3	<i>Aloe</i> spp* ( <i>A. vera</i> ou <i>A. barbadensis</i> )
4	<i>Alpinia</i> spp* ( <i>A. zerumbet</i> ou <i>A. speciosa</i> )
5	<i>Anacardium occidentale</i>
6	<i>Ananas comosus</i>
7	<i>Apuleia ferrea</i> = <i>Caesalpinia ferrea</i> *
8	<i>Arrabidaea chica</i>
9	<i>Artemisia absinthium</i>
10	<i>Baccharis trimera</i>
11	<i>Bauhinia</i> spp* ( <i>B. affinis</i> , <i>B. forficata</i> ou <i>B. variegata</i> )
12	<i>Bidens pilosa</i>
13	<i>Calendula officinalis</i>
14	<i>Carapa guianensis</i>
15	<i>Casearia sylvestris</i>
16	<i>Chamomilla recutita</i> = <i>Matricaria chamomilla</i> = <i>Matricaria recutita</i>
17	<i>Chenopodium ambrosioides</i>
18	<i>Copaifera</i> spp*
19	<i>Cordia</i> spp* ( <i>C. curassavica</i> ou <i>C. verbenacea</i> )*
20	<i>Costus</i> spp* ( <i>C. scaber</i> ou <i>C. spicatus</i> )
21	<i>Croton</i> spp ( <i>C. cajucara</i> ou <i>C. zehntneri</i> )
22	<i>Curcuma longa</i>
23	<i>Cynara scolymus</i>
24	<i>Dalbergia subcymosa</i>
37	<i>Lippia sidoides</i>
38	<i>Malva sylvestris</i>
39	<i>Maytenus</i> spp* ( <i>M. aquifolium</i> ou <i>M. ilicifolia</i> )
40	<i>Mentha pulegium</i>
41	<i>Mentha</i> spp* ( <i>M. crispata</i> , <i>M. piperita</i> ou <i>M. villosa</i> )
42	<i>Mikania</i> spp* ( <i>M. glomerata</i> ou <i>M. laevigata</i> )
43	<i>Momordica charantia</i>
44	<i>Morus</i> sp*
45	<i>Ocimum gratissimum</i>
46	<i>Orbignya speciosa</i>
47	<i>Passiflora</i> spp* ( <i>P. alata</i> , <i>P. edulis</i> ou <i>P. incarnata</i> )
48	<i>Persea</i> spp* ( <i>P. gratissima</i> ou <i>P. americana</i> )
49	<i>Petroselinum sativum</i>
50	<i>Phyllanthus</i> spp* ( <i>P. amarus</i> , <i>P. niruri</i> , <i>P. tenellus</i> e <i>P. urinaria</i> )
51	<i>Plantago major</i>
52	<i>Plectranthus barbatus</i> = <i>Coleus barbatus</i>
53	<i>Polygonum</i> spp* ( <i>P. acre</i> ou <i>P. hydropiperoides</i> )
54	<i>Portulaca pilosa</i>
55	<i>Psidium guajava</i>
56	<i>Punica granatum</i>
57	<i>Rhamnus purshiana</i>
58	<i>Ruta graveolens</i>
59	<i>Salix alba</i>
60	<i>Schinus terebinthifolius</i> = <i>Schinus molle</i>

25	<i>Eleutherine plicata</i>	61	<i>Solanum paniculatum</i>
26	<i>Equisetum arvense</i>	62	<i>Solidago microglossa</i>
27	<i>Erythrina mulungu</i>	63	<i>Stryphnodendron adstringens</i> = <i>Stryphnodendron barbatimam</i>
28	<i>Eucalyptus globulus</i>	64	<i>Syzygium</i> spp* ( <i>S. jambolanum</i> ou <i>S. cumini</i> )
29	<i>Eugenia uniflora</i> ou <i>Myrtus brasilliana</i> *	65	<i>Tabebuia avellanedae</i>
30	<i>Foeniculum vulgare</i>	66	<i>Tagetes minuta</i>
31	<i>Glycine max</i>	67	<i>Trifolium pratense</i>
32	<i>Harpagophytum procumbens</i>	68	<i>Uncaria tomentosa</i>
33	<i>Jatropha gossypifolia</i>	69	<i>Vernonia condensata</i>
34	<i>Justicia pectoralis</i>	70	<i>Vernonia</i> spp* ( <i>V. ruficoma</i> ou <i>V. polyanthes</i> )
35	<i>Kalanchoe pinnata</i> = <i>Bryophyllum calycinum</i> *	71	<i>Zingiber officinale</i>
36	<i>Lamium album</i>		

\* definir a(s) espécie(s) com cultivo, estudos e indicação de uso

#### 7.4 Código de identificação das cepas bacterianas testadas neste estudo.

Bactérias Gram-negativas			
<i>Citrobacter</i> spp	26 B-	<i>Enterobacter</i> spp	18 B-
<i>Citrobacter youngae</i> ATCC 29935	C5	<i>Proteus</i> spp	04 A-
<i>Escherichia coli</i>	06 A-	<i>Proteus</i> spp	07 A-
<i>Escherichia coli</i>	20 B-	<i>Proteus</i> spp	21 D-
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	C2	<i>Proteus</i> spp	25 B-
<i>Enterobacter</i> spp	01 D-	<i>Proteus</i> spp	25 C-
<i>Enterobacter</i> spp	02 B-	<i>Proteus</i> spp	39 B-
<i>Enterobacter</i> spp	08 A-	<i>Proteus</i> spp	40 B-
<i>Enterobacter</i> spp	08 B-	<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 12453	C4
<i>Enterobacter</i> spp	08 D-	<i>Pseudomonas</i> spp	21 C-
<i>Enterobacter</i> spp	10 E-	<i>Pseudomonas</i> spp	23 A-
<i>Enterobacter</i> spp	11 B-	<i>Pseudomonas</i> spp	38 A-
<i>Enterobacter</i> spp	13 B-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	C3
Bactérias Gram-positivas			
<i>Streptococcus</i> alfa hemolítico grupo <i>pneumoniae</i>	12 C+	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	41 C+
<i>Streptococcus</i> alfa hemolítico grupo <i>pneumoniae</i>	13 C+	<i>Staphylococcus aureus</i>	02 C+
<i>Streptococcus</i> Beta hemolítico grupo <i>agalactiae</i>	01 E+	<i>Staphylococcus aureus</i>	05 A+
<i>Streptococcus</i> Beta hemolítico grupo <i>agalactiae</i>	10 C+	<i>Staphylococcus aureus</i>	05 C+
<i>Streptococcus</i> Beta hemolítico grupo <i>agalactiae</i>	14 B+	<i>Staphylococcus aureus</i>	05 D+
<i>Streptococcus</i> Beta hemolítico grupo <i>agalactiae</i>	18 C+	<i>Staphylococcus aureus</i>	10 A+
<i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC 0015	C1	<i>Staphylococcus aureus</i>	10 B+
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	05 B+	<i>Staphylococcus aureus</i>	11 A+
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	09 A+	<i>Staphylococcus aureus</i>	11 C+
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	09 B+	<i>Staphylococcus aureus</i>	11 D+
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	40 A+	<i>Staphylococcus aureus</i>	12 A+
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	01 C+	<i>Staphylococcus aureus</i>	14 A+
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	08 C+	<i>Staphylococcus aureus</i>	18 A+
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	13 A+	<i>Staphylococcus aureus</i>	18 D+
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	23 B+	<i>Staphylococcus aureus</i>	20 A+
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	25 D+	<i>Staphylococcus aureus</i>	21 A+
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	26 C+	<i>Staphylococcus aureus</i>	21 F+
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	34 C+	<i>Staphylococcus aureus</i>	24 A+
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	35 A+	<i>Staphylococcus aureus</i>	24 B+
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	35 B+	<i>Staphylococcus aureus</i>	26 A+
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	38 B+	<i>Staphylococcus aureus</i>	29 A+
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	39 D+	<i>Staphylococcus aureus</i>	33 B+
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	40 C+	<i>Staphylococcus aureus</i>	36 B+
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	41 A+	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	C6

Fonte: Perim (2015)