

Universidade Evangélica de Goiás – UniEVANGÉLICA

Curso de Medicina

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBIÓTICA DO EXTRATO ETANÓLICO DA
FOLHA DE MAMA-CADELA *Brosimum gaudichaudii* Trécul**

Ana Beatriz Souza Machado

Amanda Fonseca Alves

Jhenifer Ferreira Barros

Hállefvy Ribeiro Araujo

Luana Sertão Felipe Teixeira

Anápolis, Goiás

2023

Universidade Evangélica de Goiás – UniEVANGÉLICA

Curso de Medicina

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBIÓTICA DO EXTRATO ETANÓLICO DA
FOLHA DE MAMA-CADELA *Brosimum gaudichaudii* Trécul**

Trabalho de Curso apresentado a Iniciação Científica do curso de medicina da Universidade Evangélica de Goiás UniEVANGÉLICA, sob a orientação do Profº Drº Rodrigo Scaliante de Moura.

Anápolis, Goiás

2023

ENTREGA DA VERSÃO FINAL

DO TRABALHO DE CURSO

PARECER FAVORÁVEL DO ORIENTADOR

À

Coordenação de Iniciação Científica

Universidade Evangélica de Goiás - UniEVANGÉLICA

Eu, Professor Orientador _____,
venho respeitosamente, informar a essa Coordenação que os acadêmicos

_____,
estão com a versão final do trabalho intitulado

_____ pronta
para ser entregue a esta coordenação. Declara-se ciência quanto a publicação do referido
trabalho, no Repositório Institucional da UniEVANGÉLICA.

Observações:

Anápolis, _____ de _____ de _____

Professor Orientador

RESUMO

Os antibióticos demonstram grande êxito no desenvolvimento científico por contribuírem positivamente no prognóstico do paciente reduzindo eventos adversos e diminuindo o tempo de internação hospitalar. Entretanto, ao longo dos anos o crescimento dos casos de resistência bacteriana, frente ao uso indiscriminado desses fármacos, fez com que a fitoterapia se apresentasse como alternativa vantajosa, já que, além de seus mecanismos antimicrobianos, há grande adesão popular devido ao histórico ligado às práticas culturais ancestrais. O objetivo deste trabalho é avaliar o potencial terapêutico do extrato etanólico da folha de Mama-Cadela (*Brosimum gaudichaudii* Trécul) em um modelo experimental com larvas de *Tenebrio molitor*. Isso foi realizado por meio da infecção de larvas de *Tenebrio molitor* com quatro espécies de bactérias gram-positivas após verificação *in vitro*. O grupo não infectado com bactérias recebeu uma injeção de solução salina tamponada de fosfato (PBS) e foi usado como controle para determinar a sobrevivência em comparação ao grupo infectado. A partir disso, determinou-se as concentrações ideais para cada espécie de bactéria. Um grupo recebeu apenas a infecção com a bactéria e soro fisiológico esterilizado (controle), já o outro grupo foi inoculado tanto com a bactéria, quanto com o extrato da planta, tendo 15 larvas em cada grupo para cada espécie bacteriana. Quanto aos resultados, com relação ao objetivo de desenvolver um protocolo de infecção de larvas, foi observado que a taxa de mortalidade dos invertebrados é diretamente proporcional a concentração de bactérias, sendo maior sobrevivência nos grupos inoculados com PBS. Já com o tratamento, as larvas apresentaram maior mortalidade ao receberem o extrato, tendo sido comprovado o potencial tóxico da planta. Portanto, este trabalho é imprescindível para a comunidade científica, visto que ainda existem poucos estudos, especialmente com uma vasta variabilidade de espécies bacterianas.

Palavras-chave: Fitoterapia. *Brosimum Gaudichaudii*. Farmacorresistência Bacteriana. Antibacterianos.

ABSTRACT

Antibiotics are highly successful in scientific development because they contribute positively to the patient's prognosis by reducing adverse events and shortening hospital stays. However, over the years, the growth of cases of bacterial resistance, given the indiscriminate use of these drugs, has made phytotherapy an advantageous alternative, since, in addition to its antimicrobial mechanisms, there is great popular adherence due to the history linked to the ancestral cultural practices. The objective of this study is to evaluate the therapeutic potential of ethanolic extract of the Mama-Cadela (*Brosimum gaudichaudii Trécul*) leaf in an experimental model with *Tenebrio molitor* larvae. This was done by infecting *Tenebrio molitor* larvae with four species of gram-positive bacteria after in vitro verification. The group not infected with bacteria received a PBS injection and was used as a control to determine survival compared to the infected group. From this, the ideal concentrations for each species of bacteria were determined. One group received only the infection with the bacteria and sterilized saline solution (control), while the other group was inoculated with both the bacteria and the plant extract, with 15 larvae in each group, for each bacterial species. As for the results, regarding the objective of developing a larval infection protocol, it was observed that the mortality rate of invertebrates is directly proportional to the concentration of bacteria, with the highest survival in the groups inoculated with PBS. With the treatment, the larvae showed higher mortality when receiving the extract, having proven the toxic potential of the plant. Therefore, this work is essential for the scientific community, since there are still few studies, especially with a wide variability of bacterial species.

Keywords: Phytotherapy. Drug Resistance, Bacterial. Anti-Bacterial Agents.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	7
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	10
2.1. Características fitoterápicas da Mama-cadela.....	10
2.2. <i>Tenebrio molitor</i> : definição e fisiologia	11
2.3. As espécies de bactérias utilizadas nos estudos.....	12
3. OBJETIVOS.....	15
3.1. Objetivo geral	15
3.2. Objetivos específicos	15
4. METODOLOGIA	16
4.1. Tipo de estudo.....	16
4.2. Amostra	16
4.2.1. Local de realização e preparação do ambiente	16
4.2.2. População de estudo	16
4.2.3. Cultura das larvas:	16
4.2.4. Culturas bacterianas.....	17
4.2.5. Avaliação da sobrevivência das larvas após infecção	17
4.2.6. Preparação do extrato.....	18
4.2.7. Avaliação da atividade antibiótica de cada extrato.....	18
4.3. Mecanismos de análise de dados	18
5. RESULTADOS.....	20
5.1. Avaliação da sobrevivência das larvas após infecção	20
5.3. Análise da toxicidade do extrato.....	24
6. DISCUSSÃO.....	25
7. CONCLUSÃO	27
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	28

1. INTRODUÇÃO

Os antibióticos, substâncias utilizadas para inibir o desenvolvimento ou destruir microrganismos, podem ser componentes naturais ou sintéticos. Esses medicamentos demonstram grande êxito no desenvolvimento científico por contribuírem positivamente no prognóstico do paciente, além da redução de eventos adversos e limitação do capital público necessário, devido à diminuição do tempo de internação hospitalar (FURTADO *et al.*, 2019).

A partir de 26 de outubro de 2010, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) estabeleceu, no artigo 2º da resolução RDC 44, que os antibióticos, no Brasil, somente poderiam ser vendidos em farmácias e drogarias com a apresentação, por parte do paciente/comprador, da receita médica de controle especial em duas vias – uma que ficará com a farmácia e a outra será devolvida ao cliente (BRASIL, 2010). Essa decisão foi tomada devido ao crescimento dos casos de resistência bacteriana – que se tornou um problema de relevância mundial, consoante a Organização Mundial da Saúde (OMS) –, frente ao uso indiscriminado desses fármacos (MONTEIRO *et al.*, 2020).

Essa aquisição de mecanismos de resistência pode culminar na formação de superbactérias, organismos que possuem defesa a mais de uma classe de antimicrobianos e são divididas em três denominações, sendo elas: MDR (multidrug-resistant), XDR (extensively drug-resistant) e PDR (pandrug-resistant). As MDR são bactérias não suscetíveis a ao menos um antibiótico em no mínimo três classes, enquanto as XDR não são suscetíveis a pelo menos um agente em todas as classes, com exceção de uma ou duas. Por fim, o PDR é resistente a todos os antimicrobianos em todas as classes (SWEENEY *et al.*, 2018).

As bactérias podem apresentar uma resistência natural do próprio gênero ou espécie, chamada de intrínseca (inerente) ou ainda, são capazes de adquirir a partir de mutações nos genes ou até por incorporação de plasmídeos de outras bactérias por conjugação, transdução e transformação, culminando para a expansão do processo de resistência antimicrobiana (ANDRADE; DARINI, 2018; LIMA; BENJAMIM; SANTOS, 2017).

Os fitoterápicos – plantas medicinais que passam por um processo de industrialização, conforme o Ministério da Saúde – são alternativas bastantes vantajosas quando cientificamente comprovadas como eficazes, já que, além de seus mecanismos antimicrobianos, são de grande adesão popular, devido ao histórico ligado às práticas culturais ancestrais (RIBEIRO, 2019). Consoante a ANVISA (2020), o processo de industrialização pelo qual os fitoterápicos passam são de suma importância para minimizar as contaminações por microrganismos e elementos

excêntricos, bem como a uniformização da quantidade e forma adequada de uso, o que gera maior segurança para administração.

As plantas medicinais são fundamentais para a farmacologia, não somente pelo princípio ativo direto, mas como matéria-prima para síntese e composição de fármacos. Portanto, segundo a OMS, as plantas medicinais são indispensáveis para a ciência farmacêutica, fato que é evidenciado pela existência de resoluções e políticas, como a Política Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos (PNPMF). Contudo, mesmo diante da importância e implementação de medidas que favorecem a incorporação dos fitoterápicos em território brasileiro, ainda existe entraves para isso, já que o conhecimento profissional acerca do assunto ainda é precário, há dificuldade para obtenção do fitoterápico, dúvidas sobre o êxito e seguridade da terapêutica e a convenção existente em torno do uso preferencial de substâncias sintéticas (BRASIL, 2012; BRASIL, 2016; SÁ, 2018).

Para além da sua função como alternativa terapêutica para combate a microrganismos multirresistentes, os fitoterápicos também auxiliam para a evolução da qualidade de vida, com acesso facilitado, decorrente do preço, sendo capaz de permitir e incentivar o uso sustentável da biodiversidade nacional (SILVA; NOGUEIRA, 2021; GOÉS; SILVA; CASTRO, 2019).

Verificou-se a necessidade do desenvolvimento de um estudo que analise a eficácia de novos tratamentos que possam substituir os antibióticos, a fim de evitar o desenvolvimento da mencionada resistência bacteriana. Para isso, esse estudo busca verificar a aplicação da Mama-cadela (*Brosimum gaudichaudii Trécul*) da família *Moraceae* como alternativa terapêutica a infecções bacterianas.

É evidente a relevância desse tipo de desenvolvimento científico, tanto para ampliar o espectro terapêutico e evitar a expansão de cepas de alta resistência potencialmente comprometedoras da espécie humana, quanto para expandir a gama de estudos disponíveis sobre essa espécie de planta com potencial fitoterápico.

O desenvolvimento do presente trabalho justifica-se por conta da necessidade de avaliação da eficácia de novos tratamentos terapêuticos contra bactérias, as quais possuem grande patogenicidade em seres humanos, principalmente devido ao processo de resistência bacteriana a antibióticos, fator que determinaria a evolução clínica perante uma infecção. Ademais, a escolha e utilização da Mama-cadela favorece uma das mais antigas práticas humanas, o tratamento fitoterápico, além dos resultados promissores já obtidos em experimentos *in vitro*, mas que não são muitos. A adoção dessa conduta contribui para o controle do uso abusivo de medicamentos, já que na infecção aguda, majoritariamente, é comum que haja automedicação. Outrossim, propicia o estreitamento do vínculo entre a equipe

de saúde, paciente e cultura popular, devido construção milenar da associação de doenças e terapias naturais.

O presente estudo evidencia que a relação entre ciência e saberes populares são responsáveis pela diminuição do risco de intoxicações e melhora de adesão - ainda mais expressiva caso o paciente demonstre íntima conexão com o uso de plantas nos cuidados com a saúde, podendo despertar interesse de jovens a respeito desse conhecimento cultural.

Portanto, frente ao exposto, o objetivo do presente trabalho é avaliar o potencial terapêutico do extrato etanólico da folha de Mama-cadela (*Brosimum gaudichaudii* Trécul) em modelo experimental *in vivo* em larvas de *Tenebrio molitor*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Características fitoterápicas da Mama-cadela

A Mama-cadela (*Brosimum gaudichaudii* Trécul.), também conhecida como mamica-cadela, conduru e inharé é uma planta típica do Cerrado brasileiro, mas que pode ser encontrada nas regiões Amazônica, Caatinga e Mata Atlântica. Faz parte da família *Moraceae* que contém 50 gêneros e 1.500 espécies, sendo que no Brasil há 27 gêneros e 250 espécies (SOUZA & LORENZI, 2005; CARNEIRO *et al.*, 2019).

Essa planta possui substâncias como furocumarinas, psoraleno e bergapteno com capacidade fotossensibilizante, por isso é utilizada no tratamento do Vitiligo, Psoríase, Hanseníase, Micose, Dermatites e Eczemas pelo efeito de repigmentação da pele (LEÃO *et al.*, 2005; DIAWARA; TRUMBLE, 1997). Ademais, o infuso da planta pode ser utilizado no tratamento de gripes, resfriados e bronquites, além de ter ação depurativa e melhoria da circulação sanguínea (BORGES, 2016).

O extrato hidroalcoólico com 80% de etanol é ideal para a extração dos compostos de psoraleno e o bergapteno, embora outras cumarinas como (+) 2' S, 3' R-3-hidroxiarmesina, xantiletina, luvangetina também foram isoladas dessa espécie (BORGES, 2016). No trabalho de Ponce, Moura e Dias (2022) foram identificados heterosídeos antraquinônicos, flavonoides, taninos e cumarinas no extrato hidroalcoólico da planta.

No estudo de Menezes Filho, Oliveira e Castro (2021) foram encontrados glicosídeos cardíacos, ácidos orgânicos, açúcares redutores, fenóis, flavonoides, taninos condensados, esteroides e triterpenóides. Esses compostos químicos concentram-se em grande parte no córtex da raiz.

O extrato da Mama-cadela foi utilizado para a inibição de crescimento de cepas de diferentes espécies de *Candida*, sendo que sobre a *Candida albicans* o resultado foi o mais promissor, sendo até mesmo superior ao Cetoconazol (MENEZES FILHO; OLIVEIRA; CASTRO, 2021). Outra pesquisa foi o de Barbosa *et al.*, (2014) em que demonstram o teor proteico do látex tendo fragmentos de uma lectina semelhante a jacalina e a um inibidor de tripsina de soja, as quais tem atividade antimicrobiana.

No mesmo viés, Borges (2016) sugeriu a presença de um princípio ativo antibacteriano promissor nessa planta, já que resultados significativos foram encontrados em cepas de *S.aureus* e *P.aeruginosa* ao se utilizar extrato etanólico a 99,5% para a extração dos componentes ativos. Isso é corroborado pelo trabalho de Ponce, Moura, Dias (2022) que demonstrou potencial

terapêutico no uso da Mama-cadela em inibir o crescimento bacteriano sobre bactérias gram-positivas em experimentos *in vitro*.

Além disso, Ferreira (2008) demonstrou que o extrato hidroalcolólico bruto das folhas de *Brosimum gaudichaudii* Trécul também inibe e retarda o desenvolvimento de infecção pelo *Trypanosoma cruzi* no tratamento e pré-tratamento em camundongos chagásicos.

2.2. *Tenebrio molitor*: definição e fisiologia

O *Tenebrio molitor* é um inseto, sendo mais conhecido como larva ou verme de farinha, isso porque a alimentação da sua forma larval é baseada em cereais ou grãos. Esse inseto, que é pertencente à família *Tenebrionidae* e à ordem *Coleoptera*, constitui uma ótima fonte de proteínas e pode ser utilizado como base para alimentação de animais e até mesmo do ser humano (SOUZA *et al.*, 2018).

Esses besouros são holometábolos, passando por quatro fases distintas: ovo, larva, pupa e adulto, sendo sua fase larval conhecida por ser uma fonte de proteínas e matéria fosfatada, desta forma proporciona uma forma prática e econômica e nutritiva na alimentação para criadouros de diversas espécies como: peixes tropicais, répteis, pássaros e pequenos mamíferos insetívoros. Em sua forma adulta, variam de pequenos a grandes e são bem resistentes e compactos (MORAIS, 2015, GULLAN; CRANSTON, 2017).

O *T. molitor* não possui um sistema imunológico adaptativo, mas sim um inato com componentes séricos e celulares (KIM *et al.*, 2017) semelhantes à de vertebrados e por isso estão sendo utilizados em experimentos em detrimento de animais vertebrados pela dor, estresse e sacrifício dos animais durante os experimentos (SOUZA *et al.*, 2018; KESHAVARZ *et al.*, 2020).

Os componentes séricos do sistema imune dos insetos incluem peptídeos antimicrobianos, proteínas da cascata da profenoloxidase - uma forma modificada da resposta do complemento que controla a melanização de patógenos e tecidos danificados - e espécies reativas de oxigênio. Estas vias se utilizam principalmente dos receptores IMD (*immune deficiency*) e aqueles da família Toll que reconhecem PAMP's (Padrões Moleculares Associados a Patógeno) em resposta contra bactérias gram-negativas (via IMD) ou gram-positivas (via Toll). Outros receptores de reconhecimento de padrão (PRR) participam no reconhecimento de microrganismos, como *pgrp-lc*, que ativam cascatas de sinalização intracelular e ativam o fatores de transcrição da família do NF- κ B (ALVARADO-DELGADO *et al.*, 2022).

Os componentes celulares do sistema imune do inseto abrangem fagócitos, coagulação e a encapsulação. Entre os receptores que medeiam a fagocitose, os receptores *scavenger* são um dos principais, que reconhecem muitos padrões moleculares associados a patógenos, como lipopolissacarídeo, ácido lipoteicóico, DNA CpG bacteriano e zimosan/ β -glucana (KIM *et al.*, 2017).

O receptor *scavenger* tipo C nos insetos funciona de forma semelhante aos *scavenger* tipo A dos mamíferos e sua função está muito relacionada ao reconhecimento bacteriano, já tendo sido relatado sua função na fagocitose de bactérias e fungos, como *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans*. São expressos em todos os tecidos, em maior quantidade nos hemócitos – células do sistema imune dos insetos responsáveis pela fagocitose (KIM *et al.*, 2017; SEONG *et al.*, 2018).

2.3. As espécies de bactérias utilizadas nos estudos

Staphylococcus aureus

Staphylococcus aureus é uma bactéria da família *Staphylococcaceae*, aeróbia ou anaeróbia facultativa e que possui formato de cocos, lembrando cachos de uva. Elas são dotadas de uma cápsula de camada única e lipídica – circundada por uma camada espessa de peptidoglicano e ácido lipoteicóico ancorado por diacilglicerol (OLIVEIRA; BORGES; SIMÕES, 2018).

Sabe-se que a *Staphylococcus aureus* tem amplo espectro de acometimento no ser humano, variando de casos mais simples, como espinhas, até os mais complexos, como pneumonia (FREITAS *et al.*, 2021). Ao adentrar seu hospedeiro produz fatores de virulência responsáveis por modular os padrões das respostas imunes, isso dá início ao processo de resistência bacteriana (TAM; TORRES, 2019). Sendo assim, os mecanismos de sensibilidade a antibióticos tornam-se fatores determinantes no curso das infecções por esse organismo da família *Staphylococcaceae*, portanto, Freitas *et al.* (2021) aborda que o uso de certos antibióticos, a exemplo da vancomicina, é mais eficaz, principalmente devido ao processo de resistência das bactérias. Entretanto, esse fármaco é comumente associado a esse desenvolvimento de cepas resistentes (OLIVEIRA; BORGES; SIMÕES, 2018).

A primeira opção para o tratamento ainda é a dicloxacilina ou cefalexina, sendo possível utilizar sulfametoxacol-trimetropina, clindamicina ou doxicilina quando se suspeita de resistência (TONG *et al.*, 2015).

Staphylococcus epidermidis

A espécie *Staphylococcus epidermidis* corresponde a bactérias anaeróbias facultativas, de formato esférico e que formam agrupamentos em cacho. São pertencentes a família *Staphylococcaceae*, porém são coagulase-negativas e colonizam pele e mucosas no homem e nos animais, tendo preferência por axilas, dedos do pé e narinas anteriores. Já foi considerada um microrganismo comensal e atualmente é um dos principais patógenos oportunistas relacionado a infecções nosocomiais associadas a dispositivos médicos de longa permanência (TRABULSI; ALTERTHUM, 2015).

Apesar de não serem patogênicas como *Staphylococcus aureus*, e não possuírem fatores de virulência agressivos como tal, a *S. epidermidis* possui um mecanismo de virulência primário responsável por formar comunidades microbianas, conhecidas como biofilmes – que atuam protegendo a espécie dos fatores de terapia antimicrobiana. Além disso, verifica-se a existência de uma “cápsula” carregada positivamente ao redor da *S. epidermidis*, levando a proteção do reconhecimento imunológico (LE; PARK; OTTO, 2018).

Por suas características, essa espécie possui resistência a múltiplos antimicrobianos, especialmente aos β -lactâmicos pela produção de β -lactamase. Algumas cepas têm apresentado resistência a outros antibióticos, como gentamicina, fluoroquinolonas, tetraciclina, cloranfenicol, eritromicina, clindamicina e estreptograminas. Portanto, o tratamento preconizado é com vancomicina ou linezolida (TRABULSI; ALTERTHUM, 2015).

Streptococcus agalactiae

A *Streptococcus agalactiae* é um coco gram-positivo, também conhecido como Estreptococo do grupo B (GBS), conforme a classificação de Lancefield. Atualmente, essa espécie é dividida em 10 sorotipos com base no polissacarídeo capsular, que é um importante fator de virulência. Existem 5 sorotipos mais comuns (Ia, Ib, II, III e V) que estão muito relacionados a colonização materna e a doença neonatal. No ser humano, essa espécie vive em uma relação de comensalismo nos tratos gastrointestinal e geniturinário (FURFARO; CHANG; PAYNE, 2018).

Entretanto, parece ter uma natureza oportunista em alguns momentos, podendo provocar infecções graves que acometem imunocomprometidos, idosos, grávidas e, sobretudo, neonatos. O espectro da doença varia de pneumonia, infecções do trato urinário a osteomielite, meningite e endocardite (FURFARO; CHANG; PAYNE, 2018; RAABE; SHANE, 2019).

O tratamento de primeira linha em adultos é o uso de Penicilina G. Já em recém-nascidos com suspeita de doença de início precoce, a terapia padrão preconizada é a combinação de ampicilina com aminoglicosídeo (RAABE; SHANE, 2019).

Enterococcus faecalis

São bactérias gram-positivas anaeróbicas facultativas e é um grupo rico em espécies de bactérias de ácido láctico. Estão presentes principalmente no microbioma intestinal humano como comensais, estimulando o sistema imunológico e manter a homeostase intestinal. Contudo, também podem atuar como patógenos, provocando, por exemplo, infecções no trato urinário (BOCELLA *et al.*, 2021; KRAWCZYK *et al.*, 2021)

Com o intuito de resistir as respostas imunes do hospedeiro, as *Enterococcus* promoveram algumas estratégias, como a capacidade de fugir do sistema imunológico, evitando a vigilância imunológica ou com mecanismos que facilitam e promovem a colonização de superfícies bióticas e abióticas (KAO; KLINE, 2019).

Atualmente, essas bactérias possuem resistência a várias classes medicamentosas, como à vancomicina, à tretaciclina e à linezolida. A partir disso, introduziram alguns novos medicamentos para o tratamento, como dalbavancina, a oritavancina e a telavancina e a tedizolida, entretanto a atividade e disponibilidade deles varia, sendo, portanto, um problema epidemiológico e terapêutico (WANDRO *et al.*, 2022).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Avaliar o potencial terapêutico do extrato etanólico da folha de Mama-cadela (*Brosimum gaudichaudii Trécul*) como antibiótico contra bactérias em modelo experimental *in vivo* em larvas de *Tenebrio molitor*.

3.2. Objetivos específicos

- Desenvolver um protocolo de infecção em larvas *Tenebrio molitor*.
- Avaliar a eficácia terapêutica do extrato etanólico da folha de Mama-cadela (*Brosimum gaudichaudii Trécul*) sobre espécies bacterianas em modelo *in vivo* em larvas de *T. molitor*.
- Avaliar o potencial de toxicidade dos extratos da folha de Mama-cadela em larvas de *T.molitor*.

4. METODOLOGIA

4.1. Tipo de estudo

O presente estudo trata-se de uma pesquisa quantitativa, analítica e de metodologia experimental. Foi realizada na Universidade Evangélica de Goiás – Anápolis (Goiás).

4.2. Amostra

4.2.1. Local de realização e preparação do ambiente

A pesquisa foi realizada no laboratório de Microbiologia da Universidade Evangélica de Goiás – Anápolis (Goiás), sob responsabilidade de dois técnicos do local. O experimento foi realizado de agosto de 2021 a fevereiro de 2023.

4.2.2. População de estudo

A inclusão de larvas em cada experimento levou em consideração as características dos insetos (cor, tamanho, idade/ciclo de vida). Foram incluídas as larvas com coloração marrom claro e excluídas as com coloração escurecida, já que significa processo inflamatório, o que inviabiliza a pesquisa. Por outro lado, o tamanho está diretamente relacionado com o ciclo de vida das larvas, é necessário que elas não sejam tão novas para não morrerem no processo de inoculação, tampouco não devem estar perto do momento de se tornarem pupas para a análise da sobrevivência após a infecção, portanto larvas com tamanho intermediário entre esses dois fatores foram selecionadas para os experimentos.

As espécies de bactérias foram estabelecidas a partir da importância clínica que apresentam, no que se refere a prevalência de infecções causadas, processos de resistência bacteriana, grau de patogenicidade e busca por tratamentos alternativos. Além disso, foram selecionadas aquelas bactérias que já apresentaram alguma suscetibilidade ao extrato observada nos experimentos *in vitro* realizados anteriormente pelo nosso grupo de pesquisa (PONCE; MOURA; DIAS, 2022).

4.2.3. Cultura das larvas:

As larvas foram obtidas comercialmente e cultivadas em recipientes dedicados conforme o protocolo de alimentação desenvolvido. As larvas foram mantidas em um substrato

de grãos de milho triturados ou farelo de milho. A cada semana uma fonte de umidade (casca de frutas ou algodão embebido em água) foi colocada nas caixas de cultivo. Os recipientes foram mantidos em temperatura ambiente e protegidas da luz e calor.

4.2.4. Culturas bacterianas:

Utilizou-se quatro bactérias gram-positivas, a saber: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus agalactiae* e *Enterococcus faecalis*. Bactérias gram-negativas, a saber: *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Proteus vulgaris* e *Klebsiella pneumoniae carbapenemase* foram avaliadas anteriormente *in vitro*, mas apresentaram resistência ao extrato, não se justificando, portanto, a avaliação *in vivo* (PONCE; MOURA; DIAS, 2022). As bactérias utilizadas nos experimentos foram mantidas em meio de cultura nutritivo, como o caldo *Brain and Heart Infusion* (BHI) ou o Caldo Triptona de Soja (TSB) a 37° C por no máximo 48 horas até o uso nos experimentos ou repique para novo meio de cultivo.

4.2.5. Avaliação da sobrevivência das larvas após infecção

Para a avaliação da sobrevivência das larvas após infecção com as diferentes espécies bacterianas, as larvas foram selecionadas de acordo com critérios descritos acima, divididas em grupos de 15 indivíduos para cada concentração da solução bacteriana (1, ½, ¼ e controle) sendo 1 uma solução bacteriana com turvação comparável ao padrão 0.5 da escala nefelométrica de McFarland, e as demais concentrações foram obtidas por diluição seriada desta. Antes de serem inoculados, os microrganismos de interesse dentre as bactérias passaram por um processo de lavagem para remover toxinas extracelulares com solução salina tamponada com fosfato (PBS) por centrifugação.

Após obter a concentração desejada, o processo de infecção foi feito por meio de uma injeção de 5µl da suspensão bacteriana utilizando seringa de Hamilton com capacidade de 25µl diretamente na hemolinfa do *Tenebrio molitor* entre os esternitos abdominais. A inoculação dos microrganismos foi realizada pelos discentes sob orientação e treinamento do docente responsável pelo projeto.

O grupo controle não foi infectado com bactérias e recebeu uma injeção PBS para manter o pH e a função osmótica o mais próximo das situações fisiológicas e foi usado para determinar a sobrevivência em comparação ao grupo infectado. A mortalidade foi monitorada por 7 dias e expressa através da curva de sobrevivência de *Kaplan-Meier*.

4.2.6. Preparação do extrato

As folhas do material vegetal (Mama-cadela) foram coletadas na área rural da cidade de Anápolis – Goiás (16° 19' 36" S 48° 57' 10" W) no mês de janeiro de 2023.

Foram separados os materiais utilizados para a preparação do extrato: frasco schott 200 ml, buretas de 250 ml, funil, papel filtro qualitativo, cadinho e pistilo, etanol 99,5% e as folhas de Mama-cadela que foram secadas por 4 dias em temperatura ambiente.

Posteriormente, as folhas de Mama-cadela foram trituradas em cadinho e pistilo até pó e 30 g foram separadas e acondicionadas no frasco schott com auxílio de funil, tendo sido retirado a tara do frasco (238,45 g) antes da pesagem. Logo depois, utilizando uma bureta de 250 ml foi acrescentado 200 ml de etanol 99,5% (lote 002422A) com o objetivo de extração da parte polar da planta, a qual contém os compostos fitoterápicos. O frasco schott foi coberto com papel alumínio para evitar a fotodegradação das moléculas e colocado na centrífuga a 240 rotações por minuto por 24 horas.

No dia seguinte, utilizando papel filtro qualitativo (diâmetro de 18,5 cm) e um funil foi realizada a filtração do material e ao produto filtrado foi adicionado 190 ml de etanol 99,5% (lote 002422A). O processo de centrifugação a 240 rotações por minuto por 24 horas foi repetido e uma nova filtração foi feita. Após um dia, o rotoevaporador foi configurado para retirada de todo solvente a 100rpm e 40° C. O extrato pronto foi armazenado em geladeira a temperatura ambiente até a utilização, tendo sido obtido 4,71 g.

4.2.7. Avaliação da atividade antibiótica de cada extrato.

Para o experimento de avaliação da atividade antimicrobiana de cada extrato, foi utilizada a Concentração Inibitória Mínima (CIM) definida em experimentos *in vitro* realizados anteriormente pelo nosso grupo. Uma concentração de 75mg/dl do extrato etanólico foi utilizada nos experimentos *in vivo* com *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* e *Streptococcus epidermidis* foi de 75mg/dl (duas vezes a CIM encontrada *in vitro* de 37,5 mg/dl), já para *Enterococcus* foi de 150mg/dl (duas vezes a CIM encontrada *in vitro* de 75 mg/dl).

4.3. Mecanismos de análise de dados

Os resultados foram expressos em números de dias de sobrevivência com seus respectivos intervalos de confiança. As curvas de sobrevivência foram construídas pelo método de *Kaplan-Meier* e o teste *log-rank* foi usado para calcular a diferença nas taxas de sobrevivências entre

as concentrações de bactérias tratadas e o grupo controle usando o *software* Statistical Package for the Social Sciences (*SPSS*) 28.0.1. Foi adotado $p < 0.05$ para significância estatística.

5. RESULTADOS

5.1. Avaliação da sobrevivência das larvas após infecção

O protocolo de infecção de larvas de *Tenebrio molitor* foi analisado por meio de dois parâmetros básicos: a espécie bacteriana e a taxa de sobrevivência em sete dias. Foram realizados quatro processos de infecções por bactérias gram-positivas, a partir de três concentrações distintas, além da solução salina tamponada com fosfato (PBS) que foi utilizada como controle.

A partir dos gráficos de Kaplan-Meier (figura 1), observa-se que as larvas apresentaram a maior taxa de sobrevivência com a injeção de PBS, sugerindo que a patogenicidade bacteriana é necessária para a letalidade. Pequenas variações entre os experimentos podem ser explicadas pela inoculação realizada no dia (é dependente da técnica) e as características das larvas (tamanho e coloração), apesar de haver uma padronização dessas variáveis. Outrossim, as mortes que ocorreram podem ser justificadas pelo próprio estresse gerado na inoculação, sendo que a resposta à essa agressão externa também está sujeita às características intrínsecas das larvas (tamanho e coloração).

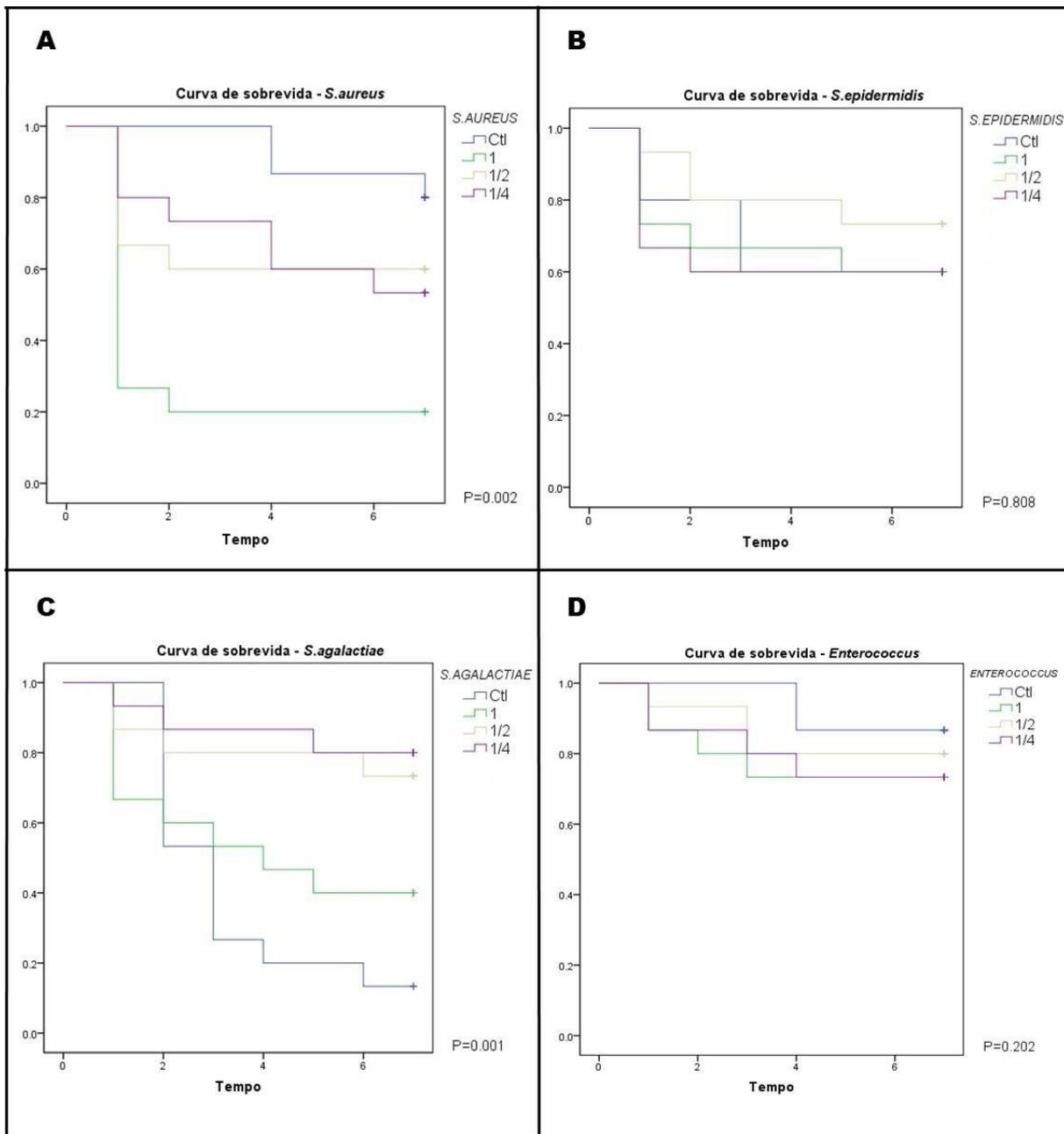
No que se refere aos grupos infectados com diferentes bactérias (*Staphylococcus aureus*, *Enterococcus*, *Streptococcus epidermidis* e *Streptococcus agalactiae*) observou-se um padrão dose-dependente, isto é, a mortalidade das larvas foi proporcional a concentração da solução bacteriana inoculada.

Na infecção por *Enterococcus* a maior taxa de sobrevivência foi no grupo de maior concentração, a qual foi equivalente a do grupo controle (60%). Porém, a taxa de sobrevivência dos grupos desta infecção foi a menor, 43,3%, não tendo tido significância estatística entre os grupos ($p=0.202$). Já na infecção por *S.agalactiae*, apesar de ter sido mantida a relação entre maior sobrevivência e menor concentração, o grupo controle teve a maior taxa de mortalidade com 86,7%.

Na maior concentração, a espécie bacteriana que gerou maior mortalidade foi a *Staphylococcus aureus* (figura 1A) com 80%. Em contrapartida, a taxa de sobrevivência por *Streptococcus epidermidis* (figura 1B) manteve um padrão muito semelhante em todas as concentrações, sendo de 60% para PBS, concentração 1 e ¼ e de 73,3% para a concentração ½, logo não houve diferença estatística entre os quatro grupos ($p=0.808$).

A média de sobrevivência dos grupos entre as espécies bacterianas foi variável, sendo de 6 dias para *S.agalactiae*, 5 dias para *S.epidermidis* e 4 dias para *Enterococcus* e *S.aureus*.

Figura 1: Gráficos de Kaplan-Meier das bactérias gram-positivas



Fonte: os autores, 2023.

5.2. Tratamento

O tratamento foi realizado apenas para as bactérias gram-positivas, já que em nosso outro estudo foi descoberto que nenhuma concentração testada foi capaz de impedir o desenvolvimento das bactérias gram-negativas (PONCE; MOURA; DIAS, 2022). Nesse mesmo trabalho foi verificado que a concentração de extrato capaz de inibir a atividade das

bactérias *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* e *Streptococcus epidermidis* era de 37,5 mg/dl, já para *Enterococcus* foi de 75 mg/dl. Nos estudos *in vivo* foi utilizado o dobro da CIM encontrada *in vitro*.

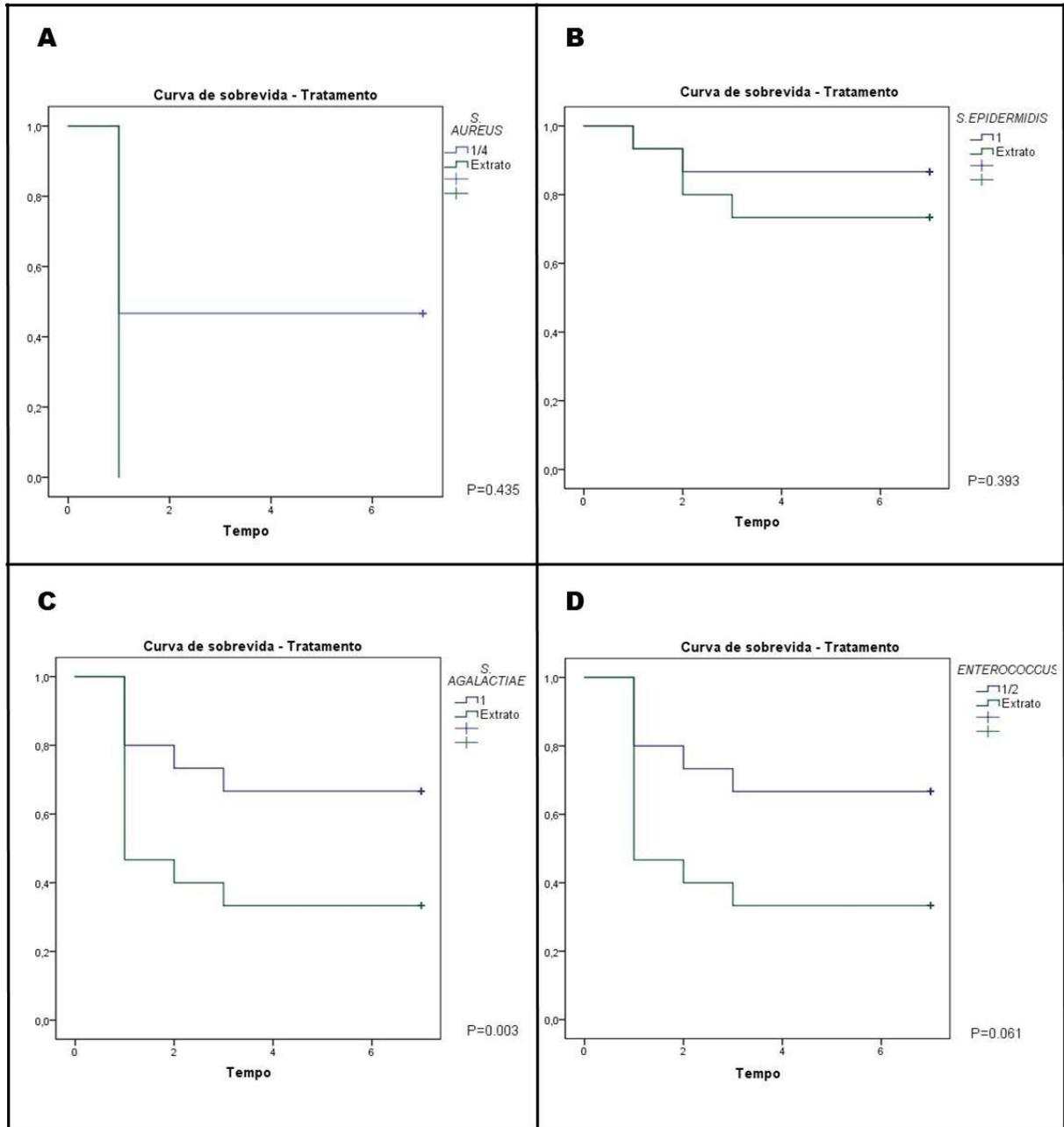
A partir da avaliação da sobrevivência das larvas após a infecção das larvas foram escolhidas as seguintes concentrações para cada solução bacteriana: *S.agalactiae* 1, *Enterococcus* 1/2, *S.aureus* 1/4 e *S.epidermidis* 1, pois essas foram as concentrações em que certa letalidade provocada pela infecção pôde ser observada. Para cada espécie bacteriana, foram selecionadas 15 larvas para serem infectadas apenas pelas bactérias e 15 larvas que foram infectadas e receberam o extrato para potencial tratamento. Todos experimentos foram realizados em duplicata e o resultado expresso como a média entre as duplicatas.

Foi verificado que independente da espécie bacteriana e concentração, a taxa de mortalidade foi maior nos grupos que receberam o extrato, sendo possível o levantamento de duas hipóteses: o extrato da planta de Mama-cadela é tóxico para as larvas e/ou o estresse de duas inoculações seguidas contribui para a menor sobrevivência.

A infecção por *S.aureus* provocou a queda mais abrupta na sobrevivência nos primeiros dias, entretanto a média de sobrevivência nos dois grupos foi de 66,7%, ficando atrás apenas da *S.epidermidis* que foi de 80%. Nessas duas espécies não houve diferença estatística entre o grupo que recebeu o tratamento e o que foi inoculado apenas com a bactéria (figura 2). A média de sobrevivência em dias foi de 5 para a primeira espécie e de 6 dias para a segunda.

Por outro lado, a *S.agalactiae* teve a maior mortalidade, sendo de 100% para o grupo que recebeu o extrato e de 53,3% para o grupo que recebeu apenas a infecção na concentração 1.

Figura 2: Gráficos de Kaplan-Meier de tratamento das bactérias



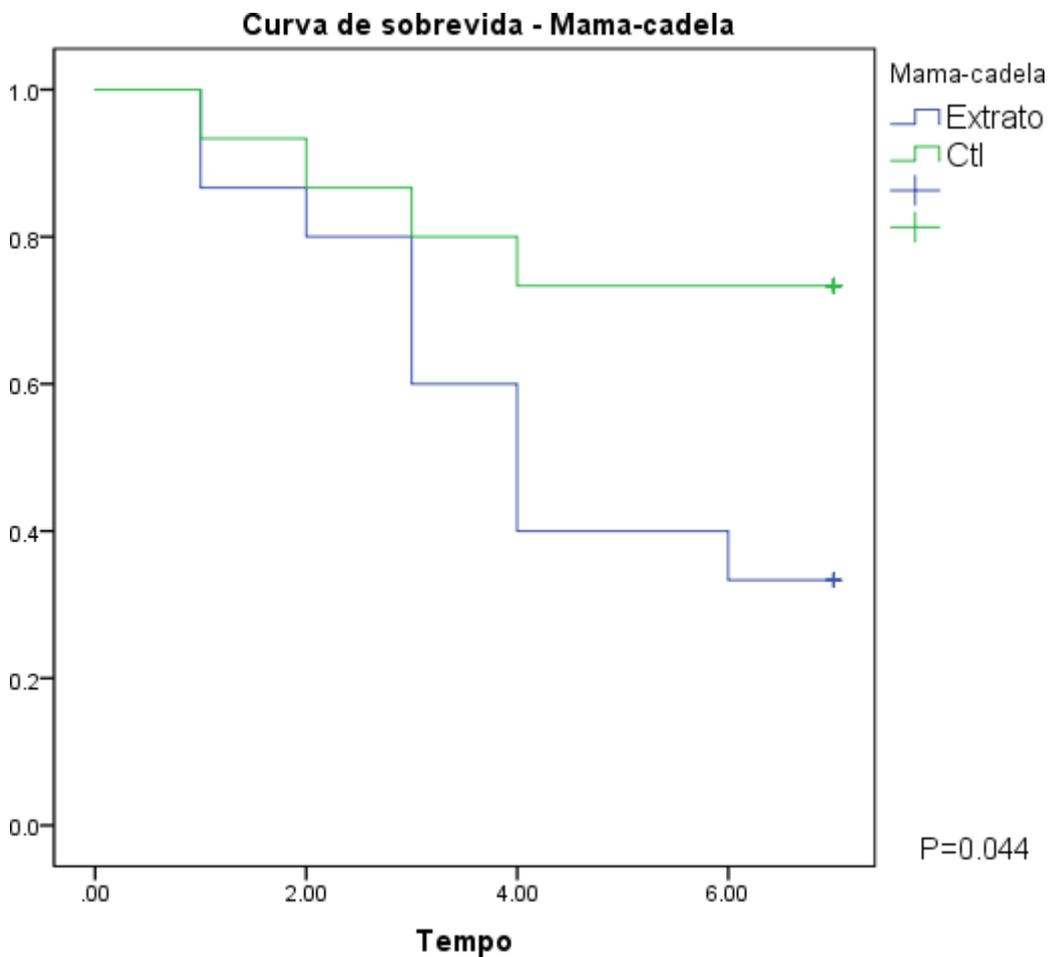
Fonte: os autores, 2023.

5.3. Análise da toxicidade do extrato

Utilizaram-se 15 larvas que receberam apenas o extrato da Mama-cadela para a avaliação do seu potencial tóxico, em comparação com 15 larvas inoculadas com solução salina constituindo o grupo controle.

Foi observado que a sobrevivência foi maior no grupo controle (figura 2), sendo que 73.3% sobreviveu por todo o experimento, já no grupo inoculado com o extrato o valor foi de 33.3%, sugerindo, desta forma, o possível potencial tóxico da planta para as larvas de *Tenebrio molitor*. Ademais, houve significância estatística entre os dois grupos ($p = 0.044$).

Figura 3: Gráfico de Kaplan-Meier da avaliação da toxicidade do extrato



Fonte: os autores, 2023.

6. DISCUSSÃO

Este estudo desenvolveu um protocolo de infecção de larvas *Tenebrio molitor* com quatro espécies de bactérias gram-positivas. Foi observado que o aumento da concentração da inoculação das bactérias foi diretamente proporcional a taxa de mortalidade das larvas, assim como nos estudos de Souza *et al.* (2015) e Lozoya-Pérez *et al.* (2021), em que realizaram protocolos de infecção de larvas *Tenebrio molitor* com diferentes espécies de fungos.

Outro trabalho que corrobora com a relação entre concentração do patógeno e taxa de mortalidade das larvas é o de Guerrieri *et al.* (2019), que não utilizou *T.molitor*, mas sim um inseto que também apresenta fase larval e compartilha de características imunes muito parecidas, como resposta imune humoral com peptídeos antimicrobianos e mecanismos de opsonização, a *Galleria mellonella*. Entretanto, assim como neste trabalho, Souza *et al.* (2015) acredita que as larvas de *Tenebrio molitor* são mais fáceis de cultivar e oferecem os mesmos benefícios.

Além disso, este estudo vai de encontro com o trabalho de Souza *et al.* (2015) ao verificar que a inoculação com solução salina tamponada com fosfato (PBS) foi eficaz em revelar que a patogenicidade do microorganismo é necessária para levar a mortalidade, o que também foi verificado por Manohar *et al.* (2019). Isso foi possível por meio da análise da taxa de sobrevivência das larvas inoculadas com PBS, sendo que foi verificado que a menor taxa de mortalidade foi nesse grupo e os outros dois trabalhos demonstraram um valor de 100% de sobrevivência.

A inoculação das larvas foi feita por manipulação mecânica utilizando a seringa de *Hamilton* para administração nos esternitos abdominais das larvas. Gonzáles-Acosta *et al.* (2022) perceberam que a infecção por via oral, além de imitar uma infecção natural, evita o estresse gerado pela injeção, como foi utilizado nesse estudo. Logo, é retirado um fator que pode confundir a análise de mortalidade.

Não foi possível observar o mesmo potencial antimicrobiano do extrato etanólico que nosso grupo encontrou nos experimentos *in vitro* (PONCE; MOURA; DIAS, 2022), já que as larvas de *T. molitor* apresentaram uma menor sobrevivência nos grupos tratados em comparação aos grupos não tratados, sugerindo uma potencial toxicidade do extrato.

Diante deste cenário, foi investigado o potencial de toxicidade da Mama-cadela para larvas de *T.molitor*, tendo sido comprovado uma maior taxa de mortalidade no grupo que recebeu o extrato hidroetanólico da planta. Esse resultado é validado no estudo de Engelbrecht

et al. (2021), em que verificaram que os componentes do extrato da planta promovem uma citotoxicidade em células ovarianas de ratos.

Assim como neste estudo, o de Varanda *et al.* (2002) utilizou o extrato alcóolico, mas da raiz e não das folhas, e verificou que cepas de *Salmonella typhimurium* apresentaram aberrações cromossômicas pela atividade genotóxica. Corroborando com esse cenário, o de Cunha *et al.* (2008) avaliou a toxicidade do extrato da raiz em camundongos que exibiram diarreia, olhos secos, emagrecimento e epistaxe.

Os pontos fortes deste estudo são relacionados a contribuição para a literatura, especialmente por não haver uma vasta gama de trabalhos em relação a este assunto, principalmente com uma grande quantidade de espécies bacterianas. Além disso, a descrição da metodologia possibilita a replicação de novos experimentos com possíveis adequações e houve uma ampliação do acervo teórico-prático no âmbito universitário da graduação.

Por outro lado, houve limitações quanto à escassez de trabalhos recentes no mesmo viés, o processo de inoculação depender de características intrínsecas das larvas e extrínsecas (operador-dependente) e a possível toxicidade da planta para a larva. Houve dificuldades também na obtenção dos materiais, visto que dependia do fornecimento da Universidade.

7. CONCLUSÃO

Este presente estudo avaliou o potencial terapêutico dos extratos de Mama-cadela em modelo experimental e *in vivo* em larvas de *Tenebrio molitor*.

Foi estabelecido um protocolo de infecção de larvas de *Tenebrio molitor* para a investigação da patogenicidade bacteriana com bactérias gram-positivas. A partir disso, verificou-se que a concentração bacteriana, estabelecida pela escala de McFarland, é diretamente proporcional a mortalidade das larvas, sendo que a patogenicidade bacteriana é necessária para a mortalidade, o que é verificado pela maior taxa de sobrevivência nos grupos que receberam solução salina tamponada com fosfato (PBS).

Em relação a avaliação da eficácia terapêutica dos extratos da folha de Mama-cadela, não foi obtido resultados positivos, visto que o extrato é possivelmente tóxico para as larvas, sendo que os grupos submetidos ao tratamento tiveram taxas de mortalidade maiores e com significância estatística ($p < 0.05$) em relação aos que foram apenas infectados com as bactérias.

Os resultados encontrados podem ter sofrido influência de algumas variáveis: larvas escolhidas, o processo de inoculação que é operador-dependente e o estresse gerado na inoculação. Além disso, o tratamento foi realizado com o extrato da folha, mas não foi possível realizar com o da raiz para estabelecer comparações, especialmente em relação a possível toxicidade.

Portanto, este trabalho é de suma importância para a comunidade científica, já que ainda são poucos estudos, especialmente com uma vasta variabilidade de espécies bacterianas. Sugere-se que novos estudos sejam realizados para que haja contribuição entre os profissionais da área da saúde.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVARADO-DELGADO, A., et al. The IMD and Toll canonical immune pathways of *Triatoma pallidipennis* are preferentially activated by gram-negative and gram-positive bacteria, respectively, but cross-activation also occurs. **Parasites & Vectors**, v. 15, n. 256, p. 1-13, 2022.

ANDRADE, L.N.; DARINI, A.L.C. Resistência bacteriana – Parte 1: Mecanismos de Resistência aos antibióticos - Resistência bacteriana – Parte 2: Conceitos e Definições. **Journal of Infection Control**, v. 7, n. 3, p. 1-11, 2018.

ANVISA- Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Medicamentos fitoterápicos e plantas medicinais**. 2020. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/medicamentos/fi_toterapicos>. Acesso em: 25 de abril de 2023.

BARBOSA, E.F., et al. Protein characterisation of *Brosimum gaudichaudii* Trécul latex and study of nanostructured latex film formation. **The Institution of Engineering and Technology**, v. 8, n. 4, p. 222- 229, 2014.

BOCELLA, M., et al. Prevalence and antimicrobial resistance of Enterococcus species: a retrospective cohort study in Italy. **Antibiotics**, v. 10, n. 12, p. 1-9, 2021.

BORGES, J.C. **Atividade antimicrobiana de extrato de *Brosimum gaudichaudii* Trécul. contra bactérias isoladas de lesões de pés diabéticos**. 2016. 90 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde). Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde Universidade Federal do Tocantins, Palmas, 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução-RDC nº 44, de 26 de outubro de 2010. **Dispõe sobre o controle de medicamentos à base de substâncias classificadas como antimicrobianos, de uso sob prescrição médica, isoladas ou em associação e dá outras providências**. Diário Oficial da União, Poder Executivo, Brasília, DF, 2010. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2010/res0044_26_10_2010.html. Acesso em: 25 de abril de 2023.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Cadernos de Atenção Básica Nº 31. **Práticas Integrativas e Complementares. Plantas Medicinais e Fitoterapia na Atenção Básica**. Brasília: Ministério da Saúde, 2012. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/praticas_integrativas_complementares_plantas_medicinais_cab31.pdf. Acesso em: 25 de abril de 2023.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumo Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. **Política e Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos**. Brasília: Ministério da Saúde, 2016. Disponível em: https://bvsmis.saude.gov.br/bvsmis/publicacoes/politica_programa_nacional_plantas_medicinais_fitoterapicos.pdf. Acesso em: 25 de abril de 2023.

CARNEIRO, M.F., et al. Multiplicação da planta medicinal *Brosimum gaudichaudii* Trécul (Moraceae) em meio de cultura. **Revista Fitos**, v. 13, n. 1, p. 61-73, 2019.

CUNHA, L.C., et al. Acute toxicity of *Brosimum gaudichaudii* Trécul. Root extract in mice: determination of both approximate and median lethal doses. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 4, p. 1-7, 2008.

PONCE, B.H.F.; DIAS, L.E.K.; MOURA, R.S. Prospecção fitoquímica e avaliação da capacidade antibiótica do extrato hidroalcoólico da folha de *Brosimum gaudichaudii* Trécul (MORACEAE). In: CONGRESSO INTERNACIONAL DE PESQUISA, ENSINO E EXTENSÃO - CIPEEX, 4., 2022, Anápolis. **Anais**, Anápolis: UniEVANGÉLICA, 2022, v. 3, p. 1-2.

DIWARA, M.M.; TRUMBLE, J.T. Linear Furanocoumarins. In: D'MELLO, J.P.F. Handbook of Plant Fungal Toxicants. **New York: CRC Press**, 1997. cap. 12, p.175-189.

ENGELBRECHT, L.M.W., et al. Chemical characterization, antioxidant and cytotoxic activities of the edible fruits of *Brosimum gaudichaudii* Trécul, a native plant of the cerrado biome. **Chemistry & Biodiversity**, v. 18, n. 7, p. 1-17, 2021

FERREIRA, P.C. **Toxicidade e atividade tripanocida do extrato bruto de *Brosimum gaudichaudii* trécul (Moraceae) (Mama-cadela) no pré-tratamento e tratamento de camundongos infectados por *Trypanosoma cruzi***. 2008. 40 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2008.

FREITAS, G.D., et al. Uso de diferentes métodos no controle do desenvolvimento do *Staphylococcus aureus*: uma revisão da literatura. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 2, p.1-8, 2021.

FURFARO, L.L.; CHANG, B.J.; PAYNE, M.S. Perinatal *Streptococcus agalactiae* epidemiology and surveillance targets. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 31, n. 4, p. 1-18, 2018.

FURTADO, D.M.F., et al. Consumo de antimicrobianos e o impacto na resistência bacteriana em um hospital público do estado do Pará, Brasil, de 2012 a 2016. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 10, p. 1-8, 2019.

GOÉS, A.C.C.; SILVA, L.S.L.S.; CASTRO, N.J.C. Uso de plantas medicinais e fitoterápicos: saberes e atos na atenção primária à saúde. **Revista de Atenção à Saúde**, v. 17, n. 59, p. 53-61, 2019.

GONZÁLEZ-ACOSTA, S., et al. Efficient oral priming of *Tenebrio molitor* larvae using heat-inactivated microorganisms. **Vaccines**, v. 10, n. 8, p. 1-11, 2022.

GUERRIERI, C.G., et al. Typical and atypical Enteroaggregative *Escherichia coli* are both virulent in the *Galleria mellonella* model. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 1-12, 2019.

GULLAN, P.J.; CRANSTON, P.S. **Insetos: Fundamentos da Entomologia**. 5.ed. Roca, 2017.

KAO, P.H.N.; KLINE, K.A. Dr. Jekyll and Mr. Hide: How *Enterococcus faecalis* subverts the host immune response to cause infection. **Journal of Molecular Biology**, v. 431, n. 16, p. 2932-2945, 2019.

KESHAVARZ, M., et al. *TmRelish* is required for regulating the antimicrobial responses to *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* in *Tenebrio molitor*. **Scientific Reports**, v. 10, p. 1-18, 2020.

KIM, S.G., et al. *Tm SR-C*, receptor eliminador de classe C, desempenha um papel fundamental na imunidade antifúngica e antibacteriana no inseto coleóptero *Tenebrio molitor*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 89, p. 31-42, 2017.

KRAWCZYK, B., et al. The many faces of *Enterococcus* spp.-Commensal, probiotic and opportunistic pathogen. **Microorganisms**, v. 9, n. 9, p. 1-20, 2021

LE, K.Y.; PARK, M.D.; OTTO, M. Immune evasion mechanisms of *Staphylococcus epidermidis* biofilm infection. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 1-8, 2018.

LEÃO, A.R., et al. Avaliação clínica toxicológica preliminar do viticromin® em pacientes com vitiligo. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 2, n. 1, p.15-23, 2005.

LIMA, C.C.; BENJAMIN, S.C.C.; SANTOS, R.F.S. Mecanismo de resistência bacteriana frente aos fármacos: uma revisão. **CuidArte. Enfermagem**, v. 11, n. 1, p. 105-113, 2017.

LOZOYA-PÉREZ, N.E., et al. *Tenebrio molitor* as an alternative model to analyze the sporothrix species virulence. **Infection and Drug Resistance**, v. 14, p. 2059-2072, 2021.

MANOHAR, P., et al. Therapeutic Characterization and Efficacy of Bacteriophage Cocktails Infecting *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Enterobacter* Species. **Frontiers in Microbiology**, v.10, p.1-12, 2019.

MENEZES FILHO, A.C.P.; OLIVEIRA FILHO, J.G.; CASTRO, C.F.S. Estudo físico-químico, fitoquímico e atividades biológicas do extrato do fruto maduro de *Brosimum gaudichaudii* Tréc. (Moraceae). **Scientific Electronic Archives**, v. 14, n. 7, p. 74-83, 2021.

MONTEIRO, R.F.S., et al. O uso indiscriminado de antimicrobianos para o desenvolvimento de micro-organismos resistentes. **Revista Eletrônica Acervo Saúde**, n. 53, p. 1-10, 2020.

MORAIS, M.C. **Desenvolvimento e caracterização físico-química de farinha a base de tenébrio (*Tenebrio molitor* L.)**. 2015. 24 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Engenharia de Alimentos) - Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Mato Grosso, Campus Cuiabá, Bela Vista, 2015.

OLIVEIRA, D.; BORGES, A.; SIMÕES, M. *Staphylococcus aureus* toxins and their molecular activity in infectious diseases. **Toxins**, v. 10, n. 6 p.1-19, 2018.

RAABE, V.N.; SHANE, A.L. Group B Streptococcus (*Streptococcus agalactiae*). **Microbiology Spectrum**, v. 7, n. 2, p. 1-13, 2019.

RIBEIRO, L.H.L. Análise dos programas de plantas medicinais e fitoterápicos no Sistema Único de Saúde (SUS) sob a perspectiva territorial. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 24, n. 5, p. 1733-1742, 2019.

SÁ, K.M., et al. Avaliando o impacto da política brasileira de plantas medicinais e fitoterápicos na formação superior da área de saúde. **Revista Ibero-Americana de Estudos em Educação**, v. 13, n. 3, p. 1106-1131, 2018.

SEONG, J.H., et al. Molecular cloning and effects of Tm14-3-3ζ-silencing on larval survivability against *E.coli* and *C.albicans* in *Tenebrio molitor*. **Genes**, v. 9, n. 7, p. 1-15, 2018.

SILVA, L.O.P.; NOGUEIRA, J.M.R. Resistência bacteriana: potencial de plantas medicinais como alternativa para antimicrobianos. **Revista Brasileira de Análises Clínicas- RBAC**, v. 53, n. 1, 2021.

- SOUZA, P.C., et al. An invertebrate host to study fungal infections, mycotoxins and antifungal drugs: *Tenebrio Molitor*. **Journal of Fungi**, v. 4, n. 4, p. 1-12, 2018.
- SOUZA, P.C., et al. *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) as an alternative host to study fungal infections. **Journal of Microbiological Methods**, v. 118, p. 182-186, 2015.
- SOUZA, V.C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II**. 4.ed. São Paulo, Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2005.
- SWEENEY, M.T., et al. Applying definitions for multidrug resistance, extensive drug resistance and pandrug resistance to clinically significant livestock and companion animal bacterial pathogens. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 73, n. 6, p. 1460-1463, 2018.
- TAM, K.; TORRES, V.J. *Staphylococcus aureus* secreted toxins & extracellular enzymes. **Microbiology Spectrum**, v. 7, n. 2, p. 1-59, 2019.
- TONG, S.Y.C., et al. *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 28, n. 3, p. 603-61, 2015.
- TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 6.ed. São Paulo, Atheneu, 2015.
- VARANDA, E.A. et al. Genotoxicity of *Brosimum gaudichaudii* measured by the Salmonella/microsome assay and chromosomal aberrations in CHO cells. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 81, n. 2, p. 257-264, 2002.
- WANDRO, S., et al. Phage cocjtails constrain the growth of *Enterococcus*. **American Society for Microbiology**, v. 7, v. 4, p. 1-13, 2022.