



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
CAMPUS I – CAMPINA GRANDE
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
CURSO DE GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA**

RENÉ MONTEIRO ARAÚJO

**ATIVIDADE MODULADORA DO EXTRATO DE *Spondias mombin* L. SOBRE A
RESISTÊNCIA DE CEPAS DE *Escherichia coli* A ANTIBIÓTICOS**

CAMPINA GRANDE – PB

2014

RENÉ MONTEIRO ARAÚJO

**ATIVIDADE MODULADORA DO EXTRATO DE *Spondias mombin* L. SOBRE A
RESISTÊNCIA DE CEPAS DE *Escherichia coli* A ANTIBIÓTICOS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação Farmácia da Universidade Estadual da Paraíba, em cumprimento à exigência para obtenção do grau de Bacharel em Farmácia.

Orientador (a): Prof^ª. Dr^ª. Ana Cláudia Dantas de Medeiros

CAMPINA GRANDE – PB

2014

É expressamente proibida a comercialização deste documento, tanto na forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano da dissertação.

A659a Araújo, René Monteiro.

Atividade moduladora do extrato de *Spondias mombin* L. sobre a resistência de cepas de *Escherichia coli* a antibióticos [manuscrito] / René Monteiro Araújo. - 2014.
18 p.

Digitado.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2014.

"Orientação: Profa. Dra. Ana Cláudia Dantas de Medeiros, Departamento de Farmácia".

1. *Spondias mombin* L. 2. Resistência bacteriana. 3. Antibióticos. I. Título.

21. ed. CDD 579

RENÉ MONTEIRO ARAÚJO

**ATIVIDADE MODULADORA DO EXTRATO DE *Spondias mombin* L. SOBRE A
RESISTÊNCIA DE CEPAS DE *Escherichia coli* A ANTIBIÓTICOS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao Curso de Graduação Farmácia da
Universidade Estadual da Paraíba, em
cumprimento à exigência para obtenção do
grau de Bacharel em Farmácia.

Aprovado em 07/11/2014.

Ana Cláudia D. de Medeiros

Profª Drª Ana Cláudia Dantas de Medeiros / UEPB

Orientadora

Francinalva D. de Medeiros

Profª. Drª. Francinalva Dantas de Medeiros / UEPB

Examinadora

Deysiane Oliveira Brandão

Profª Msc. Deysiane Oliveira Brandão/ Faculdade Maurício de Nassau

Examinadora

AGRADECIMENTOS

À Deus, pelo dom da vida, por minha saúde e pela saúde dos meus. Agradeço ainda por ter me concedido força e discernimento nos momentos de cansaço e dificuldade.

Aos meus pais e irmãos por todo apoio e paciência durante toda a minha vida e, em especial, durante a minha graduação, a realização do meu sonho.

Aos meus amigos, que estiveram sempre ao meu lado nos bons e maus momentos.

Ao EJC – Santíssimo Salvador, por ter me proporcionado alguns dos melhores momentos da minha vida, momentos estes, que tiveram papel fundamental em minha formação.

À todos os professores do Departamento de Farmácia da UEPB, por todo o conhecimento e, acima de tudo, exemplo de profissionalismo transmitidos.

À professora Dra. Ana Cláudia Dantas de Medeiros, meu exemplo como profissional, por ter me acolhido e aceitado me orientar na elaboração deste trabalho.

À todos que fazem o LABDEM (Laboratório de Desenvolvimento e Ensaio Medicamentosos), em especial Alinne e Fernanda, um dia de trabalho sem vocês não era a mesma coisa.

À Kamila Karoliny, mais que uma colega de turma, uma amiga. Nossa amizade é a prova de que é possível sim construir uma amizade sólida e verdadeira na universidade.

Aos meus colegas de turma, pela convivência, amizade e companheirismo durante todo esse tempo. Aproveito para desejar-lhes todo o sucesso do mundo em suas carreiras, na certeza de que serão excelentes profissionais. Deus não fará em vão nossos esforços, noites de sono perdidas, saudade de casa e tantas dificuldades impostas. Somos vencedores!

ATIVIDADE MODULADORA DO EXTRATO DE *Spondias mombin* L. SOBRE A RESISTÊNCIA DE CEPAS DE *Escherichia coli* A ANTIBIÓTICOS

ARAÚJO, René Monteiro¹

RESUMO

Algumas plantas possuem atividade antimicrobiana e, portanto, são capazes de modular a ação de antibióticos. Essa atividade deve-se à presença de compostos fitoquímicos sintetizados pelo vegetal. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antimicrobiana do extrato de *Spondias mombin* L. sobre a resistência de cepas de *Escherichia coli* ATCC e resistente a quatro diferentes antibióticos, amoxicilina, levofloxacina, cefalotina e gentamicina. A concentração inibitória mínima bem como a capacidade de modular a resistência das cepas de *E. coli* aos antibióticos foram avaliadas por microdiluição em caldo. Verificou-se que a associação do extrato de *Spondias mombin* L. com levofloxacina e gentamicina apresentou efeito sinérgico quando testado com a cepa ATCC de *E. coli*. Já com a cepa resistente, o sinergismo foi observado com os antibióticos amoxicilina e levofloxacina.

PALAVRAS-CHAVE: *Spondias mombin* L. Resistência. Atividade Moduladora. Antibióticos.

¹Departamento de Farmácia. Centro de Ciências Biológicas e da Saúde. Universidade Estadual da Paraíba.renemonteiro.pb@gmail.com

1 INTRODUÇÃO

Spondias mombin L., conhecida popularmente como Cajazeira, é uma árvore frutífera pertencente à família Anacardiaceae. Pode ultrapassar 20 metros de altura e 60 a 75 centímetros de diâmetro no tronco, o qual apresenta uma casca grossa e com incisões profundas. As folhas são compostas (20-45 cm de comprimento) pinadas, alternas, que caem, em sua maioria na época de floração. O fruto é uma drupa amarela, ovoide, ou oblongo aromático com 3-4 cm de comprimento e até 2,5 cm de largura e sabor exótico (Ayoka et al., 2008; Morton, 1987).

Esta planta pode ser encontrada em diversos países das Américas Central e do Sul e na África (Assis et al., 2006; Okwu and Okwu, 2004). Todas as partes dessa árvore são medicinalmente importantes nos sistemas de medicina tradicional (Ayoka et al., 2006). Entre os principais usos, pode-se destacar o diurético, antipirético, antianêmico, emético, antidiarreico, para gonorreia, conjuntivite, leucorreia e para aliviar hemorroidas e dores de estômago (Ayoka et al., 2005, 2006; Albuquerque et al., 2007; Cartaxo et al., 2010).

Em virtude dessas propriedades medicinais, diversos pesquisadores tem buscado determinar as propriedades fitoquímicas e medicinais de *S. mombin* L. Triagens fitoquímicas demonstraram a presença de substâncias como fenóis, taninos, proantocianinas, saponinas, antraquinonas, berberina, naftoquinonas, sesquiterpenos, alcaloides indólicos e quinolínicos e flavonoides na planta (Ayoka et al, 2005, 2006; Caraballo et al, 2004; Corthout et al, 1994). SB-202742, um derivado de ácido anacárdico inibidor de beta-lactamase foi isolado por Coates et al., (1994), enquanto Corthout et al (1992), isolaram dois elagitânicos (geraniin and galloylgeraniin), e dois ésteres cafeoil (2-0-cafeoil-(+)-ácido alo-hidroxicítrico e ácido clorogénico éster butílico) com atividade antiviral, respectivamente. Quanto às atividades biológicas, foram determinadas as propriedades antiepiléptica, antipsicótica (Ayoka et al, 2006), antiviral (Corthout et al, 1992, 1994), antifertilidade (Raji et al, 2006), anti-helmíntica (Ademola et al, 2005), anti-malária (Carabolla et al, 2004), ansiolítica (Ayoka et al, 2005), inibidora de beta-lactamase (Coates et al, 1994), hipnótica e sedativa (Ayoka et al, 2006).

Devido ao aumento da resistência dos microrganismos aos antimicrobianos, tem-se aumentado a busca por plantas que apresentam atividade antimicrobiana e sejam

capazes de modular a ação de antibióticos (Gurib-Fakim, 2006). A utilização de medicamentos advindos de recursos naturais possui diversos componentes fitoquímicos, apresentando baixo risco de resistência microbiana e uma melhor alternativa para potencializar o efeito dos antimicrobianos. (Daferera et al; 2003).

Assim, este estudo objetivou analisar a atividade antimicrobiana de *Spondias mombin* L. bem como, sua capacidade de modular a ação de antibióticos frente à cepas de *Escherichia coli*.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

Sabe-se que, desde os tempos mais remotos, as plantas medicinais são utilizadas pelos mais diversos povos, que, através de seus conhecimentos, buscavam a cura para suas enfermidades. Nos dias de hoje, essa prática ainda é bastante difundida, principalmente entre a população mais carente, que, sendo desprovida financeiramente, acaba por fazer uso das plantas para o tratamento de suas enfermidades (Mengue et al., 2001). Nos países desenvolvidos, o uso de plantas medicinais também é bastante considerável, porém, sob a forma de medicamentos fitoterápicos (Veiga Jr et al., 2005).

Tanto nos países em desenvolvimento como nos desenvolvidos o consumo elevado de produtos à base de fontes naturais se deve, em parte, ao apelo feito pelos meios de comunicação que prometem saúde e vida longa, baseando-se no argumento de que plantas usadas há milênios não trarão qualquer mal ao paciente. Contudo, na Europa e em países como os Estados Unidos, existem normas para comercialização, bem como controle de qualidade rígido para essas preparações (Júnior e Pinto, 2005).

É importante ressaltar que a toxicidade de plantas medicinais e fitoterápicos não é algo a ser desconsiderado, caracterizando-se como um problema de saúde pública (Júnior e Pinto, 2005).

3 REFERENCIAL METODOLÓGICO

3.1 Material vegetal e extração etanólica

As cascas de *Spondias mombin* L. foram coletadas na região semiárida do Estado da Paraíba, com a exsicata preparada e identificada no herbário Professor Jayme Coelho de Moraes, da Universidade Federal da Paraíba, sob o número EAN-100493. O

material vegetal foi seco em estufa de circulação de ar a 40 ± 1 °C e moído em moinho de facas com um tamanho de partículas de 10 mesh. Após, o pó (100 g) foi extraído com 1000 mL de etanol 96% por percolação, durante cinco dias e, em seguida, foi realizada a concentração num evaporador rotativo, a 40 °C. O extrato em bruto (EEXa) foi armazenado num refrigerador para uso posterior.

3.2 Testes fitoquímicos

3.2.1 Determinação de polifenóis totais

O conteúdo total de polifenóis do extrato da planta foi medido por espectrofotometria na região do espectro visível pelo método de Folin-Ciocalteu descrito por Chandra e Mejia (2004), com pequenas modificações. O extrato foi dissolvido em água destilada para se obter uma concentração final de $200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. A partir de cada solução, uma alíquota de 1 mL foi adicionado em 1 mL de reagente $1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ de Folin-Ciocalteu. Esta mistura permaneceu em repouso durante 2 minutos antes da adição de 2 mL de 20% (p/v) de solução de Na_2CO_3 e deixado em repouso durante 10 minutos. Depois disso, a leitura foi realizada espectrofotômetro Shimadzu modelo UV-mini-1240, a 757 nm. A curva de calibração foi obtida com uma solução de estoque de ácido gálico ($1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), a partir da qual foram feitas diluições a concentrações entre 1 e $40 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. O conteúdo total de polifenóis foi expresso em microgramas equivalentes da norma utilizada.

3.2.2 Determinação de flavonóides totais

Os flavonóides totais foram determinados pelo método descrito por Meda et al. (2005). Os extratos foram diluídos com metanol a $1000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Para os 5 mL de cada solução teste foi adicionado o mesmo volume de AlCl_3 2% (p/v) em metanol. Esta mistura permaneceu em repouso durante 10 minutos antes da leitura espectrofotométrica no UV a 415 nm. Os flavonóides totais foram determinados pela curva de calibração utilizando quercetina (Sigma-Aldrich), como padrão em concentrações entre 2 e $30 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ e, expressos em mg de equivalente quercetina.

3.3 Atividade Moduladora e Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Os extratos foram testados contra isolados clínicos de *Escherichia coli* (EC2), bem como cepa ATCC da mesma (25922). Os microrganismos foram cultivados em

ágar Mueller-Hinton a 37 °C, durante 24 horas, e mantidas em tubos de ensaio contendo ágar Nutriente. A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada pelo método de microdiluição em caldo. O ensaio foi realizado em microplacas de 96 cavidades. Os inóculos foram normalizados em tubos contendo 5 mL de solução salina estéril a 0,9%. A suspensão foi ajustada espectrofotometricamente a 625 nm, que é equivalente a 106 UFC.mL⁻¹. 100 µL de extrato (concentração inicial de 10 mg.mL⁻¹ em DMSO a 10%) foram diluídas em série no caldo estéril de Mueller Hinton numa microplaca de 96 poços, para cada estirpe de microrganismo estudado. 10 µL de cada cultura de microrganismos foram adicionados a cada poço. DMSO a 10% foi incluído como controle negativo. As microplacas foram incubadas a 37 °C ± 1 °C durante 24 horas. O crescimento bacteriano foi indicado pela adição de 20 µL de solução aquosa de resazurina (Sigma-Aldrich) a 0,01%, com uma incubação adicional a 37 °C ± 1 °C durante 2 horas. Bactérias viáveis foram responsáveis pela mudança de cor do corante, de azul para cor-de-rosa. O mesmo procedimento foi adotado para a determinação da CIM dos antibióticos amoxicilina, levofloxacina, cefalotina e gentamicina.

Para o ensaio de modulação da resistência, a CIM combinada foi definida na presença dos antibióticos e da concentração subinibitória do extrato (CIM/8). O cálculo da concentração inibidora fracionada (FIC) foi realizado para obter um coeficiente que indica se a associação do extrato com o antibiótico produzirá efeito sinérgico (FIC ≤ 0,5), indiferente (4,0 > CIF > 0,5) ou antagonista (CIF ≥ 4,0) de acordo com a fórmula descrita por Mackay et al. (2000). Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

$$CIF = \frac{\text{CIM em concentração subinibitória}}{\text{CIM do antibiótico isolado}}$$

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Testes fitoquímicos

Os testes fitoquímicos realizados com o extrato vegetal de *Spondias mombin* L. evidenciaram a presença dos dois fitocompostos pesquisados, sendo 6,47 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de flavonóides totais e 41,44 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de polifenóis totais.

4.2 Atividade moduladora

Avaliou-se a atividade moduladora do extrato de *Spondias mombin* L., associado a antibióticos, frente às cepas de *E.coli* ATCC e resistente, a fim de determinar se houveram efeitos sinérgicos.

A cepa de *E. coli* ATCC mostrou-se sensível à atividade moduladora do extrato, quando avaliada com os antibióticos levofloxacina e gentamicina, com CIF 0,25 e 0,5 respectivamente. Já na cepa *E. coli* resistente, a atividade moduladora foi evidenciada com os antibióticos amoxicilina e levofloxacina.

Tabela 01: Atividade moduladora do extrato de *Spondias mombin* L., frente a cepas de *E. coli* resistentes.

Antibiótico	<i>E. coli</i> ATCC				<i>E. coli</i> 2			
	CIM	CIM c	CIF	Interpretação	CIM	CIM c	CIF	Interpretação
Amoxicilina	1,95	3,90	2,00	Indiferente	1000,00	500,00	0,50	Sinérgico
Levofloxacina	3,90	0,97	0,25	Sinérgico	31,25	7,8	0,25	Sinérgico
Cefalotina	1,95	1,95	1,00	Indiferente	62,50	62,50	1,00	Indiferente
Gentamicina	3,90	1,97	0,50	Sinérgico	31,25	31,25	1,00	Indiferente

CIM - Concentração inibitória mínima; CIM c - Concentração inibitória mínima combinada; CIF - Concentração inibitória fracionada.

A unidade de concentração para CIM e CIM combinada é $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

O uso de extratos de plantas que possuem propriedades antimicrobianas é de grande importância científica, principalmente se a associação deste com o antibiótico possuir uma melhor atividade terapêutica em caso de bactérias resistentes a antibióticos. A atividade moduladora do extrato de *Spondias mombin* L. pode estar relacionada com a presença de fitocompostos presentes no extrato, aumentando a atividade antibiótica.

Os extratos podem inibir o desenvolvimento de microrganismos por meio de diversos mecanismos. O caráter hidrofóbico de membros existentes na solução com

maior interação da bicamada lipídica da membrana celular pode levar ao aumento da fragilidade do microrganismo ao antibiótico. (Burt, 2004; Matias et al, 2013).

A junção dos antibióticos com extratos vegetais podem diminuir os efeitos secundários dos fármacos, visto que a atividade moduladora é uma forma de reduzir a CIM dos antibióticos. (Figueiredo et al, 2013).

5 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados apresentados, *Spondias mombin* L. apresenta uma boa capacidade de modificar a ação dos antibióticos levofloxacina, gentamicina e amoxicilina, quando testada com cepas de *E. coli*, sendo uma possível alternativa para o combate à resistência microbiana apresentada por esse microrganismo.

ABSTRACT

Due to the increase of bacterial resistance to antibiotics has been seen as a possible alternative to the study of the medicinal plants possess some antimicrobial activity and are capable of modulating the activity of existing antibiotics market. This activity is due to the presence of phytochemical compounds synthesized by the plant. Therefore, the aim of the study was to evaluate the antimicrobial activity of the extract of *Spondias mombin* L. on resistance to strains of *Escherichia coli* ATCC and resistant to four different antibiotics, amoxicillin, levofloxacin, gentamicin and cephalothin. The minimum inhibitory concentration as well as the ability to modulate the resistance of *E. coli* strains to antibiotics were assessed by broth microdilution. It has been found that the combination of the extract of *Spondias mombin* L. levofloxacin and gentamicin showed synergistic effect when tested with the strain of *E. coli* ATCC. However, with the resistant strain, synergism was observed with amoxicillin and levofloxacin.

Keywords: *Spondias mombin* L. Resistance. Modulatory Activity. Antibiotics.

6 REFERÊNCIAS

AYOKA, A.O.; AKOMOLAFE, R.O.; AKINSOMISOYE, O.S.; UKPONMWAN, O.E. Medicinal and Economic Value of *Spondias mombin*. **African Journal of Biomedical Research**. 11: 129–136; 2008.

MORTON, J. Yellow mombin. **Fruits of warm climates**. 1st edn., Miami, USA. 245-248; 1987.

ASSIS, M.M.M.; LANNES, S.C.S.; TADINI, C.C.; TELIS, V.R.N.; TELIS-ROMERO, J. Influence of temperature and concentration on thermophysical properties of yellow mombin (*Spondias mombin*, L.). **Eur Food Res Technol**. 223: 585–593; 2006.

OKWU, D.E.; OKWU, M.E. Chemical Composition of *Spondias Mombin* plants. **Journal of Sustainable Agriculture and the Environment**. 6: 140-147; 2004.

AYOKA, A.O.; AKOMOLAFE, R.O.; IWALEWA, E.O.; AKANMU, M.A.; UKPONMWAN, O.E. Sedative, antiepileptic and antipsychotic effects of *Spondias mombin* L. (Anacardiaceae) in mice and rats. **Journal of Ethnopharmacology**. 103: 166–175; 2006.

AYOKA, A.O.; AKOMOLAFE, R.O.; IWALEWA, E.O.; UKPONMWAN, O.E. Studies on the anxiolytic effect of *Spondias mombin* L. (Anacardiaceae) extracts. **African Journal of Traditional, Complementary and Alternative medicines**. 2(2): 15–165; 2005.

ALBUQUERQUE, U.P.; MEDEIROS, P.M.; ALMEIDA, A.L.S.; MONTEIRO, J.M.; LINS NETO, E.M.F.; MELO, J.G.; SANTOS, J.P. Medicinal plants of the caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: A quantitative approach. **Journal of Ethnopharmacology**. 114: 325–354; 2007.

CARTAXO, S.L.; SOUZA, M.M.A.; ALBUQUERQUE, U.P. Medicinal plants with bioprospecting potential used in semi-arid northeastern Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**. 131: 326–342; 2010.

CARABALLO, A.; CARABALLO, B.; RODRIGUEZ-ACOSTA, A. Preliminary assessment of medicinal plants used as antimalarials in the South-Eastern Venezuelan Amazon. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina-Tropical.** 37(2): 186–188; 2004.

CORTHOUT, J.; PIETERS, L.A.; CLAEYS, M.; VANDEN BERGHE, D.A.; VILETINCK, A.J. Antibacterial and molluscicidal phenolic acid from *Spondias mombin*. **Planta Medica.** 60: 460–463; 1994.

CORTHOUT, J.; PIETERS, L.A.; CLAEYS, M.; VANDEN BERGHE, D.A.; VILETINCK, A.J. Antiviral Caffeoylesters from *Spondias mombin*. **Phytochemistry.** 31: 79; 1992.

RAJI, Y.; GBADEGESIN, M.A.; OSONUGA, O.A.; ADISA, R.A.; AKINSOMISOYE, O.S.; AWOBAJO, F.O.; KUNLE-ALABI, O.T.; ESEGBUE PETERS, P.R.C.; OSONUGA, I.O.; LAMIDI, A.F. Reproductive, Haematologic and Biochemical profiles of male rats treated with aqueous extract of *Spondias mombin* bark, **International Journal of Pharmacology.** 2 (1): 126 – 130; 2006.

ADEMOLA, I.O.; FAGBEMI, B.O.; IDOWU, S.O. Anthelmintic activity of extracts of *Spondias mombin* against gastrointestinal nematodes of sheep: studies *in vitro* and *in vivo*. **Tropical Animal Health and Production.** 37(3):223-235; 2005.

GURIB-FAKIM, A. Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. **Molecular aspects of medicine.** 27: 91-93; 2006.

DAFERERA, D.J.; ZIOGAS, B.N.; POLISSIOU, M.G. The effectiveness of plant essential oils on the growth of *Botrytis cinerea*, *Fusarium* sp. and *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. **Crop Protection.** 22: 39-44; 2003.

MENGUE, S.S.; MENTZ, L.A.; SCHENKEL, E.P. Uso de plantas medicinais da gravidez. **Revista Brasileira de Farmacognosia.** 11(1): 21-35; 2001.

VEIGA JR., V.F. Estudo o consumo de plantas medicinais na região Centro-Norte o estão do Rio de Janeiro: aceitação pelos profissionais e saúde e modo de uso pela população. **Revista Brasileira de Farmacognosia.** 18(2): 308-303; 2008.

JÚNIOR, V.F.V.; PINTO, A.C. Plantas medicinais: cura segura?. **Química Nova**. 28(3): 519-528; 2005.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review. **International Journal Food Microbiology**. 2004.

MATIAS, E.F.F.; SANTOS, K.K.A.; FALCÃO-SILVA, V.S.; SIQUEIRA-JÚNIOR, J.P.; COSTA, J.G.M.; COUTINHO, H.D.M. Modulation of the norfloxacin resistance in *Sthaphylococcus aureus* by *Cordia verbenaceae* DC. **Indian Journal Medical**, 2013.