

**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO E CULTURA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DAS PLANTAS *COPAIFERA DUCKEI* DWYER E
PSEUDOBOMBAX MARGINATUM E SUA INTERAÇÃO COM A SUPERFÍCIE
CELULAR BACTERIANA**

ELIZABETH CRISTINA GOMES DOS SANTOS

**Natal-RN
2013**

ELIZABETH CRISTINA GOMES DOS SANTOS

**ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DAS PLANTAS *COPAIFERA DUCKEI* DWYER E
PSEUDOBOMBAX MARGINATUM E SUA INTERAÇÃO COM A SUPERFÍCIE
CELULAR BACTERIANA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da UFRN, como requisito para obtenção do Título de Doutor em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof^{fa} Dr^a Maria das Graças Almeida

Colaboradores: Prof^{fa}. Dr^a. Adriana Augusto de Rezende- UFRN

Prof. Dr. Claudio Luis Donnici- UFMG

Prof. Dr^a. Elizabeth Ribeiro da Silva- UFMG

Prof. Dr. Luiz Alberto Lira Soares- UFPE

Prof. Dr. Luiz de Macêdo Farias- UFMG

Prof^{fa}. Msc. Maria Auxiliadora Roque de Carvalho- UFMG

Natal-RN

2013

S237a

Santos, Elizabeth Cristina Gomes dos.

Atividade antibacteriana das plantas *copaifera duckei* dwyer e *pseudobombax marginatum* e sua interação com a superfície celular bacteriana / Elizabeth Cristina Gomes dos Santos. – Natal, 2013.

65f.. : il.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Maria das Graças Almeida.

Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. Centro de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

1. Resistência microbiana a medicamentos – Tese.
2. Atividade antibacteriana – Tese.
3. *Copaifera duckei* – Tese.
4. *Pseudobombax marginatum* – Tese. I. Almeida, Maria das Graças.. II. Título.

RN-UF/BS- CCS

CDU: 615.33(043.2)

**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO E CULTURA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**Coordenadora do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde:
Prof^a. Dr^a. Ivonete Batista de Araújo**

ELIZABETH CRISTINA GOMES DOS SANTOS

**ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DAS PLANTAS *COPAIFERA DUCKEI* DWYER E
PSEUDOBOMBAX MARGINATUM E SUA INTERAÇÃO COM A SUPERFÍCIE
CELULAR BACTERIANA**

Aprovada em: 26 de junho de 2013

Banca Examinadora:

Prof^a. Dr^a. Maria das Graças Almeida – UFRN (Presidente)

Prof. Dr. Guilherme Maranhão Chaves – UFRN (Membro interno)

Prof^a. Dr^a. Raquel Brandt Giordani – UFRN (Membro interno)

Prof^a. Dr^a. Simone Gonçalves dos Santos – UFMG (Membro externo)

Prof. Dr. Claudio Galuppo Diniz – UFJF (Membro externo)

Resumo

A resistência microbiana a antimicrobianos tem favorecido a busca por substâncias bioativas provenientes de plantas usadas na medicina popular, com o intuito de se obter novos fármacos com atividade antimicrobiana. Neste estudo, foi proposta a investigação da atividade antibacteriana do óleo-resina de *Copaifera duckei* e de diferentes extratos da casca de *Pseudobombax marginatum*, e seus possíveis mecanismos de ação. O potencial inibitório antibacteriano foi avaliado utilizando-se os métodos de difusão e diluição em ágar, e a bioautografia. O mecanismo de ação foi analisado por microscopia eletrônica, no qual se observou alterações na ultraestrutura bacteriana, e por eletroforese em SDS-PAGE, que determinou ação sobre as proteínas das superfícies celulares. A análise química foi realizada pelas técnicas de Espectrometria de massas acoplada ao Cromatógrafo a gás- EM/CG (*C. duckei*) e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência- CLAE (*P. marginatum*). Entre as bactérias estudadas, *B. cereus* foi a mais suscetível às plantas em estudo, com concentrações inibitórias mínimas (CIMs) correspondentes a 0,3125 mg/mL para o óleo-resina de copaíba, e 0,5 mg/mL para extrato hidroalcoólico (1:1) e 0,512 mg/mL para a fração butanólica da casca *P. marginatum*, nos quais pôde-se observar alterações na parede celular do *B. cereus*, com remoção da camada S, espessamento da parede celular e formação de diversos septos nos centros de divisão celular. A análise química por EM/CG mostrou compostos terpênicos no óleo-resina de *C. duckei*, tendo como composto majoritário o β -bisaboleno, e a análise por CLAE mostrou a presença de compostos derivados da catequina na casca do *P. marginatum*. Desta forma, as plantas em estudo mostram um potencial antibacteriano considerável, podendo contribuir tanto na terapia antimicrobiana como na área de alimentos, tendo como um de seus prováveis sítios de ação a parede celular bacteriana.

Descritores: Atividade antibacteriana. *Copaifera duckei*. Leguminosae. *Pseudobombax marginatum*. Malvaceae. Mecanismo de ação.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Caule da planta <i>P. marginatum</i>	11
------------------------------------------------------	----

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	08
2.	JUSTIFICATIVA.....	12
3.	OBJETIVOS.....	13
3.1	Objetivo geral.....	13
3.2	Objetivos específicos.....	13
4.	MÉTODO.....	14
4.1	Micro-organismo.....	14
4.2	Material vegetal.....	14
4.3	Preparo dos extratos vegetais.....	14
4.4	Determinação do potencial inibitório dos extratos de <i>P. marginatum</i> e o óleo-resina de <i>C. duckei</i>	15
4.5	Bioautografia indireta.....	16
4.6	Curva de morte.....	16
4.7	Investigação da atividade antibacteriana das plantas em estudo sobre as superfícies celulares.....	17
4.8	Análise química dos extratos de <i>P. marginatum</i> e do óleo-resina de <i>C. duckei</i>	18
4.9	Contéudo de fenólicos totais.....	20
5.	ARTIGOS PRODUZIDOS.....	21
6.	COMENTÁRIOS, CRÍTICAS E SUGESTÕES.....	52
7.	REFERÊNCIAS.....	55
8.	APÊNDICES.....	62

1. INTRODUÇÃO

A resistência microbiana às drogas tem se tornado um problema no que concerne ao cuidado com a saúde, tanto em âmbito hospitalar quanto na comunidade. O surgimento dessa resistência e sua disseminação são resultados do uso inadequado dessa classe de medicamentos, que dificultam o tratamento de infecções graves ocasionadas por patógenos multirresistentes, e geram aumento da mortalidade, morbidade, permanência hospitalar e custos à saúde (1, 2).

O uso abusivo de antibióticos tem favorecido a obtenção de cepas patogênicas multirresistentes responsáveis, principalmente, pelas infecções hospitalares, sendo os principais micro-organismos envolvidos nesse processo, as bactérias *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, e outras espécies pertencentes à família Enterobacteriaceae (3, 4).

O conhecimento sobre determinadas espécies vegetais com propriedades antimicrobianas tem sido revisto e ampliado, devido aos crescentes problemas associados ao uso de diversos antibióticos (5). Havendo não somente a necessidade da pesquisa para desenvolver novas substâncias com atividade antimicrobiana, mas também, novas abordagens para o tratamento de infecções bacterianas (6).

As plantas possuem numerosos compostos biologicamente ativos, dos quais muitos demonstram propriedades antimicrobianas. Muitas plantas produzem metabólitos secundários antimicrobianos durante o seu crescimento e desenvolvimento normal, ou em resposta ao ataque de patógenos, ou em condições de estresse (7). Em alguns casos, essas substâncias servem como mecanismo de defesa da planta contra predadores, como micro-organismos e herbívoros. Estes compostos fitoquímicos podem ser agrupados em diversas categorias, incluindo os flavonoides, alcaloides, terpenos, quinonas, taninos, óleos essenciais, dentre outros (8).

Pesquisas têm sido realizadas com a finalidade de estabelecer o sítio específico de interação desses compostos fitoquímicos antimicrobianos. Um dos aspectos que dificulta esses estudos está relacionado às modificações que ocorrem no micro-organismo quando exposto à substância-teste, por dificultar o

reconhecimento do sítio em que ocorreu a primeira lesão celular. Os avanços nas áreas da etnofarmacologia, da fitoquímica, da biologia clássica, da biologia molecular e dos recursos estratégicos de modificação molecular racional favoreceram a compreensão e o esclarecimento dos mecanismos de ação de princípios ativos obtidos de plantas. Neste contexto se inclui o entendimento e a identificação dos sítios receptores existentes nas células do hospedeiro (9).

O modo de ação dos antimicrobianos convencionais pode envolver lesões na parede celular, alterações na permeabilidade celular, alterações das moléculas de proteínas, inativação de enzimas essenciais e inibição da síntese de ácidos nucléicos. No entanto, estudos realizados com produtos derivados de plantas mostram como principal alvo, a membrana citoplasmática (9-13).

As pesquisas relacionadas aos mecanismos de ação de antimicrobianos provenientes de plantas referem-se, geralmente, aos óleos essenciais e seus constituintes, tais como: eugenol, timol, carvacrol, dentre outros. Os possíveis mecanismos atribuídos a essas substâncias são: a degradação da parede celular, danos na membrana citoplasmática, danos às proteínas da membrana, liberação de conteúdos celulares, coagulação do citoplasma e perda da força próton-motriz (14,15).

Alguns produtos naturais já tiveram o seu mecanismo de ação antimicrobiano investigado, tais como, os flavonoides, que atuam sobre proteínas extracelulares e na membrana bacteriana; os alcaloides, que se acumulam na célula bacteriana, interferindo na RNA polimerase, DNA girase, topoisomerase IV e no ácido nucleico; as quinonas, que formam complexos irreversíveis com as proteínas bacterianas; e os taninos, que se complexam as proteínas essenciais ao micro-organismo, inativando-as (8).

Deve-se salientar que, além dos estudos fitoquímicos preliminares, é necessário que sejam isolados os princípios ativos, que sejam realizados estudos sobre as possíveis interações positivas ou negativas com outros medicamentos, a toxicidade em seres humanos e outros animais, bem como, os mecanismos de ação antimicrobianos (16).

Dessa forma, pretendeu-se estudar plantas utilizadas na medicina popular brasileira com o intuito de se obter novas alternativas terapêuticas perante a resistência aos antimicrobianos convencionais, avaliando o potencial

antibacteriano do óleo-resina da *Copaifera duckei* e do extrato da casca do *Pseudobombax marginatum* contra bactérias de interesse clínico.

Plantas estudadas

***Copaifera* sp.**

O gênero *Copaifera* pertence à família Leguminosae, sub-família Caesalpinoideae, possuindo 72 espécies, sendo que 16 destas são encontradas apenas no Brasil. São árvores de crescimento lento, atingindo de 25 a 40 m de altura, podendo viver até 400 anos. Possui tronco áspero, de coloração escura, com diâmetro medindo de 0,4 a 4 metros. As folhas são alternadas, pecioladas e penuladas. Os frutos contêm uma semente ovoide envolvida por um arilo abundante e colorido. As flores são pequenas, apétalas, hermafroditas e arranjas em panículos axilares. As copaíbas florescem e frutificam a partir de cinco anos de idade. A floração ocorre entre os meses de outubro e julho, enquanto a frutificação, entre julho e outubro. Pode ocorrer variações, dependendo da região e do clima, com ausência de florescimento anual em algumas regiões. Estas são árvores nativas da região tropical da América Latina (se estendendo do México até ao norte da Argentina) e da África Ocidental (17).

O óleo-resina extraído de espécies do gênero *Copaifera*, conhecidas, popularmente como copaibeiras ou pau d'óleo, teve o seu uso difundido entre os índios latino-americanos no século XVI, aplicado como cicatrizante e anti-inflamatório (17), propriedades estas confirmadas cientificamente (18-23). É, também, relatado o seu emprego contra infecções de garganta, urinárias e pulmonares, na cicatrização de úlceras cutâneas (24) e como antisséptico (25).

O óleo-resina de *Copaifera duckei* possui suas atividades antiproliferativa, anti-inflamatória e analgésica comprovadas, além da ação antimutagênica e embriotóxica (26). Outras espécies pertencentes ao gênero *Copaifera* apresentam além das atividades anti-inflamatória e cicatrizante, outras propriedades farmacológicas, dentre elas, gastroprotetora (27), antitumoral (28,29), citotóxica (24), antinoceptiva (30), antioxidante (21), larvicida (31,32) e antimicrobiana (33,34).

O óleo-resina de copaíba é um dos mais usados na medicina amazonense, devido ao difícil acesso aos produtos farmacêuticos

industrializados e aos serviços de saúde convencionais (25), sendo o seu uso difundido em todo território brasileiro, por suas diversas propriedades terapêuticas.

Pseudobombax marginatum

Pseudobombax marginatum é uma árvore pertencente à família Malvaceae, medindo aproximadamente 6-14 metros, com tronco de 30-40 cm de diâmetro. Possui casca característica, lisa com listras verdes longitudinais, ou rugosas, com rugas verdes, podendo ficar cinza. As suas folhas são compostas com pecíolo comum, com 5-9 folíolos sésseis, pubescentes em ambas as faces quando novas e glabras na fase superior quando velhas. As suas folhas são grandes, medindo em torno de 13-15 cm, brancas, solitárias ou em duas ou três, geralmente, nas extremidades. É conhecida, popularmente, como embiratanha, embiraçu, emburuçu (35).



Figura 1 - Caule da planta *P. marginatum*.

Fonte: Elizabeth Santos e Henry Lima (Vale do Açu).

Apresenta distribuição exclusiva na América do Sul, especialmente na Bolívia, Paraguai, Brasil e Peru. No Brasil ocorrem nas regiões Sudeste (MG), Centro-Oeste (GO e MT) e Nordeste (PE, CE e PB), ocorrendo exclusivamente na região semiárida, na caatinga. *P. marginatum* caracteriza-se por ser pouco ramificada pelo tamanho das flores 13-15 cm, estames totalmente brancos e cápsulas obovóides. Floresce de maio a setembro e frutifica de julho a setembro (36).

Algumas espécies da família Malvaceae possuem suas propriedades farmacológicas comprovadas, sendo elas, hipoglicemiante, tripanocida e antifúngica – *Ceiba pentandra* – antioxidante, analgésica, antibacteriana e antihipertensiva – *Bombax ceiba* (37-42).

Poucos estudos têm sido realizados com a planta *P. marginatum*, sendo relatado o uso de sua casca na medicina popular, no tratamento de inflamações das vias urinárias e da coluna vertebral, e como analgésico para dor de coluna (35,43,44).

2. JUSTIFICATIVA

A busca por novas substâncias com atividade antimicrobiana tem aumentado consideravelmente nos últimos anos, devido à problemática da resistência aos antimicrobianos convencionais, além do surgimento de novas doenças infecciosas e ressurgimento de infecções que já pareciam controladas. Um dos caminhos promissores é, certamente, recorrer aos conhecimentos populares, investigando na natureza novas fontes para obtenção de fármacos. As plantas têm sido o alvo principal dessa busca, principalmente, pela presença de princípios ativos, muitos deles com atividades biológicas importantes, dentre as quais se destaca a antimicrobiana.

No Brasil, há carência de dados científicos referentes aos mecanismos de ação de antimicrobianos provenientes de plantas usadas para fins medicinais, encontrando-se somente trabalhos enfocando a atividade antibacteriana, antifúngica e antiviral, não estudando o modo pelo qual as plantas agem, o que dificulta o surgimento de novas estratégias terapêuticas para o tratamento de diversas doenças infecciosas. Portanto, é de grande importância o desenvolvimento de projetos direcionados à obtenção de novos antimicrobianos, buscando na flora brasileira subsídio para o desenvolvimento de fitofármacos e descoberta de novas moléculas com utilidade terapêutica.

Desse modo, com esta proposta, pretendeu-se ampliar o estudo sobre atividade de plantas, dando continuidade ao projeto de pesquisa intitulado “Desenvolvimento de fitoterápicos da flora do nordeste brasileiro: padronização e caracterização farmacológica e toxicológica de extratos de *Pseudobombax marginatum* (Malvaceae) e do óleo-resina de *Copaifera duckei* (Leguminosae)”. É relevante implementar o estudo da atividade antibacteriana de plantas contra micro-organismos de interesse clínico e veterinário, buscando, também, determinar o possível mecanismo de ação, como contribuição ao suporte científico que deve nortear sua eventual utilização na prática clínica.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade antibacteriana do óleo-resina da *Copaifera duckei* e dos extratos de *P. marginatum* contra cepas bacterianas de relevância clínica e avaliar suas possíveis interações com a superfície bacteriana.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Avaliar, *in vitro*, o potencial inibitório, do óleo-resina da *C. duckei* e dos extratos de *P. marginatum*, pelo método de difusão em ágar.
2. Determinar as Concentrações Inibitórias Mínimas (CIMs), do óleo-resina da *C. duckei* e dos extratos de *P. marginatum*.
3. Analisar, quimicamente, os constituintes do óleo-resina da *C. duckei* e dos extratos de *P. marginatum*, e relacionar com a sua atividade inibitória.
4. Analisar a membrana celular das amostras bacterianas suscetíveis, antes e após o tratamento com o óleo-resina de *C. duckei* e o extrato de *P. marginatum* de melhor eficácia, com auxílio da microscopia eletrônica.
5. Avaliar, qualitativamente, as proteínas das superfícies celulares bacteriana antes e após o tratamento com as substâncias em estudo.

4. MÉTODO

4.1. Micro-organismos

Foram utilizadas as amostras de referência *Staphylococcus aureus* ATCC 25923/ 29213/ 33591, *Enterococcus faecalis* ATCC 19433, *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Listeria monocytogenes* ATCC 15313, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, e as amostras clínicas de *Staphylococcus epidermidis* e *Shigella sonnei*, pertencentes à coleção de culturas do Laboratório de Microbiologia Oral e Anaeróbios (MOA) do Departamento de Microbiologia do ICB/UFMG.

As amostras foram mantidas em ágar nutriente (Acumedia) a 4°C e em Caldo Brain Heart Infusion (Acumedia) suplementado com glicerol a 10%, em freezer -80°C.

4.2. Material Vegetal

A casca da planta *Pseudobombax marginatum* (A. St. –Hil., Juss. & Cambess.) A. Robyns foi coletada no Vale do Açu, nos municípios de Pendências e Alto do Rodrigues, estado do Rio Grande do Norte, em setembro de 2008. A sua identificação botânica foi realizada pela Dr^a Maria Iracema Bezerra Loiola, e sua exsicata depositada no Herbário do Departamento de Botânica, Ecologia e Zoologia do Centro de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), sob o número de referência 8204.

O óleo-resina de copaíba foi extraído do tronco da árvore *Copaifera duckei* Dwyer, no município de Moju, no estado do Pará, em outubro de 2004. O material foi identificado pela Dr^a Regina Célia Viana Martins da Silva, e depositado no Herbário do Instituto Agrônomo do Norte (IAN 178851), na Embrapa Amazônica Oriental - PA.

4.3. Preparo dos extratos vegetais

A casca do *P. marginatum* foi pesada e submetida à secagem em estufa de ar circulante, à temperatura de 40°C ± 2°C por sete dias. Após secagem, a casca foi triturada manualmente, obtendo-se, desta forma, a matéria-prima vegetal utilizada no preparo dos extratos aquoso, hidroalcoólico (70:30; 50:50 e

40:60, etanol:água) e etanólico. O extrato aquoso foi preparado por decocção (15 min) e os extratos hidroalcoólicos e etanólico, por maceração (5 dias).

O extrato hidroalcoólico na proporção de 50:50, por apresentar melhor atividade inibitória, foi concentrado por evaporação a uma temperatura de 40°C, e submetido ao fracionamento com os solventes clorofórmio, acetato de etila e *n*-butanol (3 x 300 mL de cada solvente), sendo esses concentrados na mesma condição do extrato.

O óleo-resina de copaíba foi extraído do tronco da árvore *C. duckei*, sendo utilizado nos experimentos em sua forma *in natura*. Utilizou-se o DMSO (VETEC) na concentração final de 2% para solubilizar o óleo no meio de cultura.

4.4. Determinação do potencial inibitório dos extratos de *P. marginatum* e o óleo-resina de *C. duckei*

A atividade antibacteriana dos extratos em estudo foi avaliada pelos métodos de difusão e diluição em ágar.

4.4.1. Difusão em ágar em poços

Esse método consistiu no semeio de inóculo homogêneo na superfície do ágar Mueller Hinton (MH) com auxílio de *swab*. Foram preparados inóculos bacterianos com a densidade celular equivalente a 0,5 da escala de MacFarland. Nas placas testes foram realizados pequenos orifícios no ágar (poços) aos quais foi adicionado o extrato em estudo. Após incubação a 37°C, por 24 h, a leitura foi efetuada pela presença ou ausência de halo de inibição ao redor dos poços. Para o controle dos experimentos foram utilizados discos padronizados com antimicrobianos, vancomicina (30 µg) e gentamicina (10 µg). Todos os testes foram efetuados em triplicata (45).

4.4.2. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) pelo método de diluição em ágar

Os extratos em estudo foram submetidos aos testes para a determinação das CIMs, pelo método da diluição em ágar (46). A técnica utilizada consistiu na adição de concentrações crescentes dos extratos em estudo, em frascos

contendo 30 mL de ágar MH fundido, seguindo-se plaqueamento, sempre em duplicata. Foram realizados dois controles em cada teste, com e sem a adição do solvente extrator.

O inóculo foi preparado em salina 0,9% estéril, considerando-se a turvação dos tubos com a padronização correspondente a 0,5 da escala de MacFarland. Seguiu-se a inoculação de, aproximadamente, 10^5 UFC/ponto, com a utilização do replicador de Steers (47) e posterior incubação em condições favoráveis de atmosfera, temperatura e tempo, de acordo com cada micro-organismo. A CIM de cada produto foi determinada pela menor concentração capaz de inibir o crescimento do micro-organismo.

4.5. Bioautografia indireta

Alíquotas das soluções metanólicas de óleo-resina (1:1, v/v), beta-cariofileno (1:1, v/v, Sigma; pureza \geq 80%), e mistura de isômeros de bisaboleno (1:1, v/v, Santa Cruz Biotechnology®) foram aplicadas em placas de alumínio contendo sílica gel G₆₀ F₂₅₄ (6,0 X 10,0 cm; Merck). Os compostos foram separados pelo sistema eluente clorofórmio/tolueno (75:25, v/v). Após a volatilização dos solventes, as cromatoplasmas foram transferidas para uma placa de Petri estéril, na qual foi adicionado o ágar Mueller Hinton contendo o inóculo de *B. cereus* padronizado de acordo com a escala 0,5 de MacFarland. As placas foram incubadas a 37°C por 24h. Para verificar a presença de zonas de inibição foi utilizado a solução aquosa de 2,3,5-cloreto de trifeniltetrazólio (Sigma) a 1%. O β -cariofileno e a mistura de isômeros de bisaboleno foram utilizados como padrão. A bioautografia foi realizada em duplicata. As placas que não foram submetidas ao teste de atividade antibacteriana, foram reveladas com o reagente vanilina sulfúrica, para verificar os grupos principais responsáveis pela zona de inibição, com observação das bandas após o aquecimento a 105°C por 10 min (48,49).

4.6. Curva de morte

O ensaio da cinética de morte contra *Bacillus cereus* foi realizado em triplicata e os valores obtidos foram plotados em gráfico, relacionando-se o log da UFC/mL em função do tempo (h). Os tubos contendo o óleo-resina de

copaíba nas concentrações finais de 0,015625, 0,03125, 0,0625 e 0,25 mg/mL (0,5, 1,0, 2,0 e 4,0 X CIM do óleo-resina de copaíba, respectivamente) foram inoculados com a bactéria em estudo, obtendo-se um inóculo bacteriano inicial de 5×10^5 UFC/mL, incubados a 37°C. Nos tempos de 0, 4, 8, 10, 12 e 24h foram retiradas alíquotas de 1,0 mL de cada suspensão, seguindo-se diluição seriada em salina estéril (10^{-1} to 10^{-5}), com posterior plaqueamento em placas contendo ágar MH (100 µL/ Himedia), incubadas a 37°C. Após o período de 24h foi determinada a contagem de colônias. A ação bactericida foi definida pela redução de 3-log_{10} UFC/mL ou 99,9% de morte do inóculo inicial. A vancomicina (4,0 µg/mL; Vancocin®) e a suspensão de *B. cereus* sem adição do óleo-resina de copaíba foram utilizadas como controle positivo e negativo, respectivamente. Também foi realizado um controle de viabilidade (50).

4.7. Investigação da atividade antibacteriana das plantas em estudo sobre as superfícies celulares

Nessa etapa foram avaliadas as bactérias que mostraram maior grau de sensibilidade aos extratos em estudo.

4.7.1. Avaliação da estrutura celular bacteriana antes e após o tratamento com o extrato de *P. marginatum* e o óleo-resina da *C. duckei*, por Microscopia Eletrônica de Transmissão

Após tratamento com a substância-teste, as bactérias *B. cereus* e *S. aureus* 29213 foram fixadas em glutaraldeído a 2,5% em tampão cacodilato de sódio a 0,1M, com pH de 7,2-7,4, a temperatura ambiente por 6h. Após lavagem, procedeu-se à segunda fixação com solução de tetróxido de ósmio a 1% em tampão cacodilato por 1h a temperatura ambiente, seguido de desidratação em soluções de etanol (Merck, PA; 30-100%, 15 min cada), com posterior imersão em acetona p.a (Merck, PA). Em seguida, o material foi infiltrado na mistura de resina Epon:acetona (1:1) e incluídas em resina Epon (EMS). As secções ultrafinas (60nm) foram obtidas em ultramicrotomo LEIC UC6, coradas com acetato de uranila e citrato de chumbo, sendo observadas em TEM Tecnai G2 FEI a 80 keV (51).

4.7.2. Análise das proteínas das superfícies celulares bacteriana antes e após o tratamento com os extratos de *P. marginatum* e de *C. duckei*

4.7.2.1. Produção de extratos da parede celular

Uma suspensão bacteriana, de crescimento de 18-24h, foi fracionada em alíquotas equivalentes a 10 mL e, posteriormente, submetida à centrifugação (16.000g/ 10min). Os sobrenadantes obtidos foram removidos, e a cada massa celular obtida foi adicionado 2 mL das substâncias em estudo e controles. Essas suspensões foram incubadas por 10, 30 e 90 minutos, e por 24h, em banho-maria, a 37°C, sob agitação. Após a incubação, 600 µL das suspensões foram transferidas para microtubos e centrifugadas a 16.000g/10minutos. Os sobrenadantes obtidos foram analisados em SDS-PAGE (52).

4.7.2.2. Eletroforese em gel de poliacrilamida-sulfato de dodecil sódico (SDS-PAGE) dos extratos da parede celular

Os sobrenadantes obtidos no item anterior foram tratados com o tampão da amostra (Tris/HCl pH 6,8 100mM, SDS 4,0%, azul de bromofenol 0,2%, glicerol 20,0%, 2-β-mercaptoetanol; 1:1, v/v) e desnaturado a 100°C/ 5min. Uma alíquota de 20µL da amostra foi adicionada ao gel de poliacrilamida a 12%. A eletroforese foi executada por 2h e 30 min, em aparelho de eletroforese Power supply-EPS 301 (Amersham Biosciences), em voltagem constante equivalente a 120V, a 80A. Todos os géis foram revelados pela prata (Silver staining kit-proteins/ Amersham Biosciences). Como marcador de massa molecular foi utilizado o BenchMark™ Protein Ladder (Invitrogen) (52).

4.8. Análise química dos extratos de *P. marginatum* e do óleo-resina de *C. duckei*

4.8.1. Análise química do extrato da casca de *P. marginatum* por HPLC

A análise de HPLC foi realizada de acordo com Brito *et al.* (53). A catequina foi usada como padrão e, diluída em metanol nas concentrações de 1,5 a 50 µg/mL para a obtenção de uma curva linear. Os cromatogramas foram obtidos em Cromatógrafo Varian® (mod. ProStar 240, detector de arranjo de fotodiodos ProStar® 335 UV/Vis, injetor automático ProStar® 410, programa

Star Chromatography®). Foi utilizada coluna de fase reversa (Phenomenex, 100 mm x 4,6 mm, 2,6 µm/ Torrance, CA, USA) e, eluição com a fase móvel binária constituída de ácido fórmico a 0,1% em água (solvente A) e acetonitrila (solvente B), em fluxo de 1,3 mL/min. Todas as amostras, os solventes e o padrão foram filtrados por membrana de 0,22 µm (Millipore, Billerica, MA, EUA), antes do uso. O sistema foi executado com um programa de gradiente: 0-3 min (ACN a 5%, faixa isocrática), 3-7 min (ACN a 5→20%, aumento linear), 7-9 min (ACN a 20%, faixa isocrática), 9-10 min (ACN a 20→23%, aumento linear), 10-15 min (ACN a 23%, faixa isocrática), 15-19 min (ACN a 23→50%, aumento linear), 19-20 min (ACN a 50→5%, retorno às condições iniciais). O volume de injeção foi correspondente a nove microlitros. Os picos obtidos foram monitorados em 280 nm pelo detector DAP. A identificação e quantificação foram efetuadas por calibração externa. Os resultados foram expressos em mg de catequina/g do extrato.

4.8.2. Análise química do óleo-resina de copaíba por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massa (CG-EM)

O óleo-resina foi analisado por cromatografia, em fase gasosa acoplado a um espectrômetro de massas (CG-EM) Thermo, modelo DSQII equipado com coluna capilar de sílica fundida (30m x 0,25mm d.i.) com fase estacionária DB5-ms (0,25 µm de espessura do filme); gás de arraste hélio, ajustado para fornecer uma velocidade linear de 32 cm/s, (medidos a 100°C); temperatura do injetor 240°C; temperatura da fonte de íons e outras partes a 200°C; tipo de injeção: sem divisão de fluxo, 0,1 µL da solução (2,0 µL de óleo: 1mL *n*-hexano); temperatura programada para 60-240 °C (3° C/min). O filtro do quadrupolo varreu a faixa de 39 a 450 daltons a cada segundo. A ionização foi obtida pela técnica de impacto eletrônico, com energia de 70 eV.

Cada constituinte químico foi identificado pela comparação de seu espectro de massas (massa molecular e o padrão de fragmentação) com espectros existentes na literatura (54), com espectros avaliados pelo banco de dados (Willey, NIST) do equipamento e, também pela comparação do índice de retenção com aqueles da literatura. Os índices de retenção foram determinados pela equação que relaciona o tempo de retenção dos compostos ao tempo de

retenção de uma série de hidrocarbonetos homólogos, (C_8 - C_{24}), injetados nas mesmas condições cromatográficas das amostras.

4.9. Conteúdo de fenólicos totais

O conteúdo de fenólicos totais do EHAPM foi analisado pelo método colorimétrico de Folin-Ciocalteu, descrito por Chu et al. (55) e Dewanto et al. (56). Os fenólicos totais foram mensurados a 760 nm (Shimadzu 1650-PC UV-vísivel, Tóquio, Japão) e seus resultados expressos como μg de ácido gálico/mg de equivalente de EHAPM. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

5. ARTIGOS PRODUZIDOS

ARTIGO 1

Título: Effects of *Copaifera duckei* Dwyer oleoresin on cell wall and cell division of *Bacillus cereus*

Periódico: Journal of Medical Microbiology

ISSN: 0022-2615

Qualis: Internacional B (Medicina II – CAPES)

Fator de Impacto: 2.502

Status: publicado

Effects of *Copaifera duckei* Dwyer oleoresin on cell wall and cell division of *Bacillus cereus*

Elizabeth Cristina Gomes dos Santos¹, Claudio Luis Donnici², Elizabeth Ribeiro da Silva Camargos³, Adriana Augusto de Rezende⁴, Eloisa Helena de Aguiar Andrade⁵, Luiz Alberto Lira Soares⁶, Luiz de Macêdo Farias⁷, Maria Auxiliadora Roque de Carvalho⁷ and Maria das Graças Almeida⁴

Author affiliation

¹Postgraduate program in Health Sciences, Federal University of Rio Grande do Norte, Natal-RN, Brazil.

²Department of Chemistry, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil.

³Department of Morphology and Microscopy Center, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil.

⁴Department of Clinical and Toxicological Analysis, Federal University of Rio Grande do Norte, Natal-RN, Brazil.

⁵Department of Chemistry and Food, Federal University of Pará, Belém, Brazil.

⁶Department of Pharmacy, Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil.

⁷Department of Microbiology Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil.

Correspondence

Elizabeth C. G. dos Santos, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Av. Gen. Gustavo Cordeiro de Farias, s/n, Petrópolis, 59012-570, Natal, Rio Grande do Norte, Brazil. E-mail: elizabethcristina@ig.com.br Phone: +55 84 33429807 Fax: +55 84 33429776

Abbreviations:

GC/MS-Gas chromatography-mass spectrometry; VS- vanillin-sulphuric acid.

Abstract

The aim of this work was to evaluate the antibacterial activity of *Copaifera duckei* oleoresin and to determine its possible mechanism of action against bacteria of clinical and food interest. The antibacterial activity was determined by agar diffusion and dilution methods; the mechanism of action by transmission electron microscopy and by polyacrylamide gel electrophoresis SDS-PAGE; the bioactive compounds by bioautography; and the chemical analysis by GC/MS. Oleoresin showed activity against seven of the 11 strains of bacteria tested. *Bacillus cereus* was the most sensitive, with a MIC corresponding to 0.03125 mg ml⁻¹ and with a bactericidal action. Oleoresin acted on the bacterial cell wall, removing proteins and the S-layer, and interfering with the cell division process. This activity probably can be attributed to the action of terpenic compounds, among them the bisabolene compound. Gram-negative bacteria tested were not inhibited. *Copaifera duckei* oleoresin is a potential antibacterial, suggesting that this oil could be used as a therapeutic alternative, mainly against *Bacillus cereus*.

Introduction

Bacterial resistance to antimicrobials is a problem that still persists worldwide, representing a threat to public health (Zhang *et al.*, 2011). Thus, the search for new substances able to inhibit species of resistant microorganisms has favored research to obtain more effective antibacterial agents of natural origin, either semisynthetic or synthetic (Silveira *et al.*, 2006).

Plants have been the main target of these studies, as they represent a great source of substances, many of which may have pharmacological potential. *In vitro* studies have described the activity of plants and their products for the treatment of microbial diseases, among them the species of the genus *Copaifera*, which have shown antibacterial and antifungal activities in their oil (Santos *et al.*, 2008; Pieri *et al.*, 2011).

Copaiba oil is an oleoresin extracted from the trunk of the species from the genus *Copaifera* (Leguminosae, Caesalpinioidea), popularly known as “copaibeiras” or “pau d’óleo,” which has been reported to be used in popular

medicine to treat throat, urinary, and pulmonary infections; to heal cutaneous ulcers; and serve as an antiseptic (Santos *et al.*, 2008). In addition to these activities, other pharmacological properties have been attributed to oil extracted from this genus, such as its gastroprotective, antitumor and cytotoxic, antinociceptive, antioxidant, leishmanicidal, and larvicidal properties (Veiga Junior *et al.*, 2007; Gomes *et al.*, 2007; Paiva *et al.*, 2004; Geris *et al.*, 2008).

Copaiba oleoresin, from different species, is used in popular medicine and compounding and homeopathic pharmacies, due to its pharmacological properties, including its antimicrobial activity. However, there are no reports on this activity for *Copaifera duckei* Dwyer. Other than the research conducted in Brazil, few other studies have presented scientific data (Santos *et al.*, 2008) referring to the mechanisms of action of antimicrobial derived from plants. Thus, this study had the purpose to value the antibacterial activity of *Copaifera duckei* oleoresin against bacteria of clinical and food interest and determine its possible mechanism of action.

Methods

Microorganisms

Nine reference strains were used as test organisms: *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213; 25923; 33591), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Listeria monocytogenes* (ATCC 15313), *Bacillus cereus* (ATCC 11778), *Salmonella* Typhimurium (ATCC 14028), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853). There were also included two clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis* and *Shigella sonnei* maintained at the Oral Microbiology and Anaerobes Laboratory of the Department of Microbiology at ICB/UFG. Stock cultures were kept at 4°C on nutrient agar and in -80°C freezer in Brain Heart Infusion (BHI) broth supplemented with 10% glycerol.

Plant material

Copaiba oleoresin was extracted from the trunk of *Copaifera duckei* Dwyer and collected in October 2004, in the town of Moju, Pará, and a voucher specimen

was deposited at the Herbarium of the Embrapa Amazonia Oriental, under registration number 178851. Botanical identification was made by Regina Célia Viana Martins da Silva, Embrapa Amazonia Oriental, Belém, Pará.

Antibacterial activity assays

Antibacterial activity assays were performed by the agar-well diffusion method on Mueller Hinton agar (MHA; Himedia) medium. Each strain was grown for 24h on MHA, and cells were suspended in 0.9% sterile saline to obtain a final concentration of about 1×10^8 c.f.u. ml⁻¹. Assay plates with MHA medium were then inoculated with a sterile swab. Wells were made in the MHA agar with sterile glass tubes. Each well was filled with 20 µl of copaiba oleoresin. Bacterial cultures were incubated at 37 ° C for 24 h, and then inhibition zones were measured in diameters (mm) around the well. Tests were performed in triplicate. The antimicrobial discs vancomycin and gentamicin were used as control (CLSI, 2003).

Determination of Minimum Inhibition Concentration (MIC)

MIC values were determined using the agar dilution method. Serial two-fold dilutions (from 0.015625 mg ml⁻¹ to 4.0 mg ml⁻¹, v/v) of the test oleoresin were prepared in molten MHA/ DMSO (2% final concentration) medium at 45°C. Each bacterial suspension obtained as described above was then inoculated on the surface of the MHA plates using a Steer's replicator (Steers *et al.*, 1959), with a final concentration of about 10⁵ c.f.u. per spot. Cultures were incubated at 37°C for 24 h. MIC was defined as the lowest concentration of compounds which inhibits bacterial growth. This test was performed in duplicate. The 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (Sigma) was used to indicate bacterial growth. The antimicrobials vancomycin (Sensidisc) and gentamicin (Sensidisc) were used as control method (NCCLS, 2003).

Time-kill curves

Time-kill assays against *Bacillus cereus* were performed in triplicate and average values were used to plot the graphs. Tubes containing copaiba oleoresin at final concentrations of 0.015625, 0.03125, 0.0625, and 0.125 mg ml⁻¹ (0.5, 1.0, 2.0 and 4.0 times, respectively, the MIC of *B.cereus* oleoresin) were inoculated with the *B. cereus*, resulting in a starting bacterial density of 5×10^5 c.f.u. ml⁻¹, followed by incubation at 37°C. At predetermined time points (0, 4, 8, 10, 12, and 24h), a 1ml sample was removed from each test suspension, serially diluted in sterile saline (10^{-1} to 10^{-5}), and plated on MHA plates (100 µl) for colony count determination, incubated at 37°C and counted after 24h. A bactericidal effect was defined by a = 3-log_{10} c.f.u. ml⁻¹ killing (99.9%) of the final inoculum. Time-kill curves were constructed by plotting the log c.f.u. ml⁻¹ versus time (h). Control of viability was performed. The vancomycin (4 µg ml⁻¹; Vancocin ®) and a suspension of *B. cereus* without added oleoresin were used as positive and negative controls, respectively (NCCLS, 1999).

Transmission electron microscopy (TEM)

Bacillus cereus was treated with copaiba oleoresin in the subinhibitory concentration, corresponding to 0.015625 mg ml⁻¹. Then, the sample was processed for transmission electron microscopy. Samples were fixed in 2.5% glutaraldehyde (Sigma) in 0.1M sodium cacodylate buffer, pH 7.2-7.4, at room temperature for 6h, post-fixed in a solution containing 1% tetroxide osmium (Sigma) in cacodylate buffer for 1h at room temperature, dehydrated in an increasing ethanol gradient (Merck, PA; 30-100%, 15 min each), immersed in pure acetone (Merck, PA), and embedded in Epon resin mixture: acetone (1:1) and resin Epon (EMS). Ultrathin sections (60nm) were obtained in LEIC UC6 ultramicrotome, stained with uranyl acetate and lead citrate, and images were obtained in a Tecnai G2 FEI TEM at 80 keV.

Copaiba oleoresin activity on cell wall proteins by SDS PAGE electrophoresis

The assay of copaiba oleoresin activity on cell wall proteins of *B. cereus* was based on Rundegren *et al.* (1995). The extract of the cellular wall was prepared starting from a bacterial suspension equivalent to 0.5 on the McFarland scale. Aliquots of 10 ml of this suspension were added to sterile tubes and submitted to the centrifugation (16.000 g/10 min). Supernatants were removed, and the pellets washed twice with phosphate buffer (0.1 M, pH 7.4). After washing, 2 ml aliquots of 6.4 mM sodium dodecyl sulfate (SDS), copaiba oleoresin (2 X MIC and 4 X MIC), 4 µg vancomycin ml⁻¹ (Vancocin ®), and 2% DMSO aqueous solution were added to each pellet. Proteins were removed at 200 r.p.m./ 37 °C in a Shaking Water Bath (Dubnoff), at 10, 30, and 90 min. After incubation, 600 µl of each suspension was transferred to microtubes and centrifuged (16.000g /10 min).

The test was also performed in time of 24h, and analyzed, in addition to other substances, copaiba oleoresin at a concentration of 1 X MIC and pure oleoresin, without test bacterium as the negative control. The SDS, DMSO and vancomycin were used as control.

Supernatants were treated with a sample buffer (1:1) and denatured at 100°C/5 min. An aliquot of 20 µl of sample was added to the polyacrylamide gel at 12%. Protein marker (Benchmark TM Protein Ladder) was not submitted to the same treatment as the sample, adding 0.8 µl to the gel. Electrophoresis was performed for 2h and 30 min, in the electrophoresis device power supply-EPS 301 (Amersham Biosciences) in a constant voltage of 120V, at 80A. All gels were silver stained (Silver staining kit-protein; Amersham Biosciences).

Chemical analysis

C. duckei oleoresin was analyzed using a THERMO DSQII GC-MS instrument (Thermo Fisher Scientific, Austin, TX, USA), equipped with a DB-5ms fused capillary column (30 m X 0.25 mm; 0.25 µm film thickness). Helium (32 cm s⁻¹; 100°C) was used as carrier gas, the oven temperature program was 60–240 °C at 3 °C min⁻¹, and 2 µl of the oil solution in hexane was injected. Injector and

detector temperatures were 240 °C. All mass spectra were acquired in electron impact (EI) mode with an ionization voltage of 70 eV. The temperature of the ion source and connection parts was 200 °C. The filter quadrupole swept the range of 39 to 450 daltons every second. Individual components were identified by comparison of both mass spectrum and GC retention data with authentic compounds previously analyzed and stored in the data system. Other identifications were made by comparison of mass spectra with those existing in the data system libraries and cited in the literature (Adams, 2007). The retention index was calculated using an n-alkanes homologous series.

Bioautography agar-overlay assay

Aliquots of *C. duckei* oleoresin (1:1, v/v), beta-caryophyllene (1:1, v/v, Sigma; purity ≥80%), and bisabolene – mixture of isomers (1:1, v/v, Santa Cruz Biotechnology ®) solutions in methanol were applied in aluminum plates containing silica gel G₆₀ F₂₅₄ (6.0 X 10.0 cm; Merck). Compounds were separated by the eluent system chloroform/toluene (75:25 v/v). After drying, chromatoplates were transferred to sterile Petri dishes, in which MHA medium was transferred containing previously standardized *B. cereus* inoculum. Plates were incubated at 37°C for 24h. After detection using 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (Sigma), in order to verify the presence of zones of inhibition, vancomycin was used as positive control of growth inhibition, whereas β-caryophyllene and bisabolene isomers were used as standard. Bioautography was used in duplicate. Plates, which were not submitted to the antibacterial activity test, were detected with vanillin-sulphuric acid (VS) reagent in order to verify the main chemical groups responsible for the zone of inhibition, with bands seen after heating at 105°C for 10 min (Rakotoniriana *et al.*, 2003; Wagner & Bladt, 2001).

Statistical analysis

Results were analyzed using ANOVA followed by Tukey's Multiple Comparison Test using the GraphPad InStat® software (version 5.0). Results with $p < 0.05$ were considered statistically significant.

Results and discussion

C. duckei oleoresin showed inhibitory activity against all Gram-positive bacteria tested, particularly *L. monocytogenes* 15313, *S. aureus* 25923, and *B. cereus* 11778. The susceptibility of these bacteria treated with the oleoresin under study differed significantly from that of the other bacteria, except for *E. faecalis* 29212, which presented a susceptibility profile similar to that of *B. cereus*. Gram-negative bacteria tested were not inhibited (data not shown). Our results were similar to those of Santos *et al.* (2008), who observed the antibacterial action of the species *C. reticulata*, *C. martii*, *C. cearensis*, *C. paupera*, *C. langsdorffii*, *C. officinalis*, *C. multijuga*, and *C. lucens* against the bacteria *S. aureus*, *S. aureus* MRSA, *S. epidermidis*, and *E. faecalis*. Pacheco *et al.* (2006) have also verified activity of different species of *Copaifera* spp. against *S. aureus* and *B. subtilis*, but not against Gram-negative (*E. coli* and *P. aeruginosa*) bacteria. However, studies with *C. langsdorffii* and *C. officinalis* oleoresins have shown inhibitory action against *E. coli* strains recovered from mastitic milk (Pieri *et al.*, 2011), *P. aeruginosa*, and *Shigella flexneri* (Pieri *et al.*, 2012). Also, Mendonça & Onofre (2009) observed action of *C. multijuga* oleoresin against Gram-positive (*S. aureus*) and Gram-negative (*E. coli* and *P. aeruginosa*) bacteria.

These inter- and intraspecific differences of copaiba oleoresin, with regard to its spectrum of antimicrobial action, may be related to the variation of its chemical constitution, influenced by environmental factors such as time of year, dry and rainy seasons, and age of the plant, among others (Cascon & Gilbert, 2000; Lameira *et al.*, 2009).

In Table 1, with the use of agar dilution, *B. cereus* 11778 is shown to be more susceptible to *C. duckei* oleoresin, with MIC corresponding to 0.03125 mg ml⁻¹, considered a strong antibacterial activity. The other bacteria which were susceptible to the oleoresin tested had MICs from 2.0 to > 16.0 mg ml⁻¹, showing a weak inhibitory action. One study suggests that an inhibitory action for plant extracts with MIC of up to 500 µg ml⁻¹ is classified as strong; from 600 to 1500 µg ml⁻¹, moderate; and over 1600 µg ml⁻¹, weak (Duarte *et al.*, 2007).

Activity of oleoresins from different species (*C. martii*, *C. reticulata*, and *C. officinalis*) has been observed against *B. subtilis*, which belongs to the same

genus of *B. cereus*, with a MIC ranging from 15.62 to 31.25 $\mu\text{g ml}^{-1}$ (Pieri *et al.*, 2011).

B. cereus is a pathogen of great importance in the food area, responsible for toxin production, which causes a diarrheal and emetic syndrome. The interest in *B. cereus* has increased recently due to the onset of opportunistic infections (skin and soft tissues) in immunocompromised individuals, in addition to bacteremia, pneumonia, meningitis, endophthalmitis, salpingitis, and endocarditis (Budzik *et al.*, 2007).

Fig. 1 graphically represents the death curve of *B. cereus* (inoculum of about 105 c.f.u. ml^{-1}) treated with *C. duckei* oleoresin, in which it presented a bactericidal effect against *B. cereus*, in less than 4h, at concentrations ranging from 0.03125 to 0.125 mg ml^{-1} (1.0 X MIC to 4.0 X MIC). Copaiba oleoresin presented a profile similar to that of 4 $\mu\text{g vancomycin ml}^{-1}$, inhibiting bacterial growth before 4h of exposure. DMSO did not affect the results.

Analysis of *B. cereus* ultrastructure shows the bacterial cell with its preserved layer S and cell wall (Fig. 2a). After exposure to *C. duckei* oleoresin at a subinhibitory concentration of 0.015625 mg ml^{-1} , alterations were seen in its cell structure, such as material loss from the S layer and thickening of cell wall (Fig. 2b and 2c), as well as an increased number of centers of septum formation (Fig. 2c). This finding corroborates the ideas of Santos *et al.* (2008), who suggested that *C. martii* oleoresin acts on the *S. aureus* cell wall, causing disruption to the bacteria cell and leading to its death. Morphological changes and a decrease in the number of cells of *B. cereus* were also observed in previous experiments in our group, after exposure to copaiba oleoresin, close to the inhibitory halo (Fig. S10).

C. duckei oleoresin was able to extract proteins from the *B. cereus* cell wall in a concentration of 2.0 X MIC and 4.0 X MIC, in 10, 30, and 90 min (Fig. 3a), except for the oleoresin in 10 min (line 1). Fig. 3b shows the extraction capacity of the cell wall proteins by SDS, the substance used as a control. We could observe that the treatment with oleoresin showed an electrophoretic profile similar to that of vancomycin, in 10 to 90 min (Fig. 3c). In the test of exposure for 24h, removal of the protein was observed in all concentrations of oleoresin, with extraction of more protein in the concentration of 4 X MIC (Fig. 3d, line 15),

evidenced by multiple bands in the gel, also observed with vancomycin (Fig. 3d, line 16). Thus, we can conclude that one of the sites of action of *C. duckei* oleoresin is the cell wall of *B. cereus*.

These results confirm data observed in electron microscopy, in which changes are seen in the cell wall of *B. cereus*, with the formation of filaments in the S layer, suggesting material release. It is believed that the antibacterial activity is due to presence of the terpenic compounds found in copaiba oleoresin. Table 2 shows the sesquiterpenic compounds of *C. duckei* oleoresin, listed in sequence according to their retention time. The oleoresin is composed mainly of β -bisabolene (40.94 %), *trans*- α -bergamotene (20.47 %), and β -caryophyllene (9.16 %). In their studies with oleoresin from trees of the species *C. duckei* in different periods of the year, Cascon & Gilbert (2000) and Lameira *et al.* (2009) observed the presence of the compounds mentioned, in addition to β -selinene, α -selinene, and α -bisabolene.

Maistro *et al.* (2005) performed a phytochemical analysis of *C. duckei* oleoresin and verified the presence of sesquiterpene hydrocarbons, neutral diterpene, and diterpene acids. The sesquiterpene β -caryophyllene was attributed to insecticidal, anesthetic, anticarcinogenic, anti-inflammatory, and antimicrobial activities (Leandro *et al.*, 2012). The inhibitory activity of diterpene copalic acid was observed against bacteria responsible for periodontal diseases (Souza *et al.*, 2011).

Data obtained by bioautography (Fig. 4) show the inhibitory action of terpenic compounds present in *C. duckei* oleoresin against *B. cereus*, and evidenced an inhibition zone of 35 mm (Fig. 4b, line 1). As shown in Fig. 4b, the bisabolene isomers (compound 2) showed inhibitory activity, with an inhibitory halo corresponding to 18 mm (Rf 0.29), presenting bands similar to oleoresin. In the region of the spot corresponding to β -caryophyllene (Fig. 4a, line 3), inhibitory activity was not observed, this data is not in agreement with previous work published in the literature which report an antimicrobial activity for this compound (Leandro *et al.*, 2012; Huang *et al.*, 2012). Thus, it is believed that several compounds are involved in this inhibitory activity, among them the bisabolene.

Studies with species of the genus *Psidium* showed activity against certain bacteria, among them *B. cereus*, and this activity was attributed to sesquiterpenic compounds, mainly the β -bisabolene (Govinden-Soulange *et al.*, 2004). Nascimento *et al.* (2007) observed the inhibitory activity of β -bisabolene against resistant strains of *S. aureus*, as well as its ability to restore the effectiveness of ampicillin on these bacteria.

C. duckei oleoresin showed considerable antibacterial activity against *B. cereus*, with a fast bactericidal action in which its active compounds act on the bacterial cell wall, removing proteins from the S layer and interfering with the cell division process. These data suggest the possibility of using this oleoresin in the food industry, and even as an alternative therapy in infectious diseases. However, further studies are required to better understand its antibacterial mechanism of action, as well as to identify bioactive substances.

Acknowledgements

We would like to thank professors Osmar Lameira and Eliseth Oliveira for providing us with *Copaifera duckei* oleoresin, and also researcher Leonardo Rodrigues for reviewing the manuscript. The authors would like to acknowledge the Center of Microscopy at the Federal University of Minas Gerais (<http://www.microscopia.ufmg.br>) for providing the equipment and technical support for experiments involving electron microscopy.

References

- ADAMS, R.P. (2007).** *Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry*. Allured Publishing Corporation, IL: Carol Stream.
- Budzik, J.M., Marraffini, L.A. & Schneewind, O. (2007).** Assembly of pili on the surface of *Bacillus cereus* vegetative cells. *Mol Microbiol* **66**, 495-510.
- Cascon, V. & Gilbert, B. (2000).** Characterization of the chemical composition of oleoresins of *Copaifera guianensis* Desf., *Copaifera duckei* Dwyer and *Copaifera multijuga* Hayne. *Phytochemistry* **55**, 773-778.

CLSI (2003). Padronização dos testes de sensibilidade a antimicrobianos por disco-difusão, vol.23. Norma aprovada. Documento CLSI M2-A8, Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.

Duarte, M.C.T., Leme, E.E., Delarmelina, C., Soares, A.A., Figueira, G.M. & Sartoratto, A. (2007). Activity of essential oils from Brazilian medicinal plants on *Escherichia coli*. *J Ethnopharmacol* **111**, 197–201.

Geris, R., Silva, I.G., Silva, H.H.G., Barison, A., Rodrigues-Filho, E. & Ferreira, A.G. (2008). Diterpenoids from *Copaifera reticulata* Ducke with larvicidal activity against *Aedes aegypti* (L.) (Diptera, Culicidae). *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* **50**, 25-28.

Gomes, N.M., Rezende, C.M. & Fontes, S.P. (2007). Antinociceptive activity of amazonian copaiba oils. *J Ethnopharmacol* **109**, 486-492.

Govinden-Soulange, J., Gurib-Fakin, A., Gauvin, A., Smadja, J. & Kodja, H. (2004). Chemical composition and *in vitro* antimicrobial activities of the essential oils from endemic *Psidium* species growing in Mauritius. *Biol Pharm Bull* **27**, 1814-1818.

Huang, M., Sanchez-Moreiras, A.M., Abel, C., Sohrabi, R., Lee, S., Gershenzon, J. & Tholl, D. (2012). The major volatile organic compound emitted from *Arabidopsis thaliana* flowers, the sesquiterpene (E)- β -caryophyllene, is a defense against a bacterial pathogen. *New Phytol* **193**, 997-1008.

Lameira, O.A., Martins-da-Silva, R.C.V., Zoghbi, M.G.B. & Oliveira, E.C.P. (2009). Seasonal variation in the volatiles of *Copaifera duckei* Dwyer growing wild in the state of Pará-Brazil. *JEOR* **21**, 105-107.

Leandro, L.M., Vargas, F.S., Barbosa, P.C.S., Neves, J.K.O., Silva, J.A. & Veiga-Junior, V.F. (2012). Chemistry and biological activities of terpenoids from copaiba (*Copaifera* spp.) oleoresins. *Molecules* **17**, 3866-3889.

Maistro, E.L., Carvalho, J.C.T., Cascon, V. & Kaplan, M.A.C. (2005). *In vivo* evaluation of the mutagenic potential and phytochemical characterization of oleoresin from *Copaifera duckei* Dwyer. *Genet Mol Biol* **28**, 833-838.

Mendonça, D.E. & Onofre, S.B. (2009). Atividade antimicrobiana do óleo-resina produzido pela copaíba-*Copaifera multijuga* Hayne (Leguminosae). *Rev Bras Farmacogn* **19**, 577-581.

Nascimento, A.M.A., Brandão, M.G.L., Oliveira, G.B., Fortes, I.C.P. & Chartone-Souza, E. (2007). Synergistic bactericidal activity of *Eremanthus erythropappus* oil or β -bisabolene with ampicillin against *Staphylococcus aureus*. *Anton Leeuw* **92**, 95-100.

NCCLS (1999). Methods for Determining Bactericidal Activity of Antimicrobial Agents; Approved Guideline. Approved Standard. NCCLS document M26-A. Wayne, PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards.

NCCLS (2003). Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically, 6th edn. Approved Standard. NCCLS document M7-A6. Wayne, PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards.

Pacheco, T.A.R.C., Barata, L.E.S. & Duarte, M.C.T. (2006). Antimicrobial activity of copaiba (*Copaifera* spp) balsams. *Rev Bras Pl Med* **8**, 123-124.

Paiva, L.A.P., Gurgel, L.A., De Sousa, E.T., Silveira, E.R., Silva, R.M., Santos, F.A. & Rao, V.S.N. (2004). Protective effect of *Copaifera langsdorfii* oleo-resin against acetic acid induced colitis in rats. *J Ethnopharmacol* **93**, 51

Pieri, F.A., Silva, V.O., Souza, C.F., Costa, J.C.M., Santos, L.F. & Moreira, M.A.S. (2012). Antimicrobial profile screening of two oils of *Copaifera* genus. *Arq Bras Med Vet Zootec* **64**, 241-244.

Pieri, F.A., Souza, C.F., Costa, J.C.M., Barrero, M.A.O., Espescht, I.F., Silva, V.O. & Moreira, M.A.S. (2011). Inhibition of *Escherichia coli* from mastitic milk by copaiba oil. *Semina* **32**, 1929-1934.

Rakotoniriana, E.F., Rajaonarison, J.F., Raelison, E.G., Rajaonarivelo, J.P., Manga, N., Solofoniaina, M., Rakotonirina, B., Randriamampionona, D., Rabemanantsoa, C., Cheuk, K. & other authors (2010). Antimicrobial activity of 23 endemic plants in Madagascar. *Trop J Pharm Res* **9**, 165-171.

Rundegren, J., Sjödin, T., Petersson, L., Hansson, E. & Jonsson, I. (1995). Delmopinol interactions with cell walls of gram-negative and gram-positive oral bacteria. *Oral Microbiol Immunol* **10**, 102-109.

Santos, A.O., Ueda-Nakamura, T., Dias Filho, B.P., Veiga Junior, V.F., Pinto, A.C. & Nakamura, C.V. (2008). Effect of Brazilian copaiba oils on *Leishmania amazonensis*. *J Ethnopharmacol* **120**, 204-208.

Santos, A.O., Ueda-Nakamura, T., Dias Filho, B.P., Veiga Junior, V.F., Pinto, A.C. & Nakamura, C.V. (2008). Antimicrobial activity of brazilian copaiba oils obtained from different species of the *Copaifera* genus. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **103**, 277-281.

Santos, R.C.V., Alves, C.F.S., Schneider, T., Lopes, L.Q.S., Aurich, C., Giongo, J.L., Brandelli, A. & Vaucher, R.A. (2012). Antimicrobial activity of amazonian oils against *Paenibacillus species*. *J Invertebr Patho* **109**, 265–268.

Silveira, G.P., Nome, F., Gesser, J.C., Terenzi, H. & Sá, M.M. (2006). Estratégias utilizadas no combate a resistência bacteriana. *Quim Nova* **29**, 844

Souza, A.B., Souza, M.G.M., Moreira, M.A., Moreira, M.R., Furtado, N.A.J.C., Martins, C.H.G., Bastos, J.K., Santos, R.A., Heleno, V.C.G., Ambrosio, S.R. & other authors. (2011). Antimicrobial evaluation of diterpenes from *Copaifera langsdorffii* oleoresin against periodontal anaerobic bacteria. *Molecules* **16**, 9611-9619.

Steers, E., Foltz, E.L. & Graves, B.S. (1959). An inocula replicating apparatus for routine testing of bacterial susceptibility to antibiotics. *Antibiot Chemother* **9**, 307-311.

Veiga-Junior, V., Rosas, E.C., Carvalho, M.V., Henriques, M.G.M.O. & Pinto, A.C. (2007). Chemical composition and anti-inflammatory activity of copaiba oils from *Copaifera cearensis* Huber ex Ducke, *Copaifera reticulata* Ducke and *Copaifera multijuga* Hayne – A comparative study. *J Ethnopharmacol* **112**, 248-254.

Wagner, H. & Bladt, S. (2001). Appendix A: spray reagents. In: *Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas*, pp. 364. Edited by H. Wagner & S. Bladt. Berlin: Springer.

Zhang, Q., Lambert, G., Liao, D., Kim, H., Robin, K., Tung, C-K., Pourmand, N. & Austin, R.H. (2011). Acceleration of emergence of bacterial antibiotic resistance in connected microenvironments. *Science* **333**, 1764-1767.

Table 1. Minimum Inhibitory Concentration of *C. duckei* oleoresin against susceptible bacteria, by agar dilution method

Strains	Copaiba oleoresin (mg ml ⁻¹)
<i>S. aureus</i> 29213	4.0
<i>S. aureus</i> 33591	4.0
<i>S. aureus</i> 25923	>16.0
<i>S. epidermidis</i>	16.0
<i>E. faecalis</i> 29212	2.0
<i>L. monocytogenes</i> 15313	2.0
<i>B. cereus</i> 11778	0.03125

Table 2. Major constituents of *C. duckei* oleoresin identified by GC/MS

RT* (min)	Component	Composition (%)
24.37	<i>β</i> -caryophyllene	9.16
25.08	<i>trans-α</i> -bergamotene	20.47
25.78	<i>α</i> -humulene	3.47
26.98	sesquisabinene	2.33
27.76	(<i>Z</i>)- <i>α</i> -bisabolene	2.38
28.26	<i>β</i> -bisabolene	40.94
28.65	<i>β</i> -sesquiphellandrene	2.04
29.30	<i>cis-α</i> -bisabolene	3.39

*Retention time

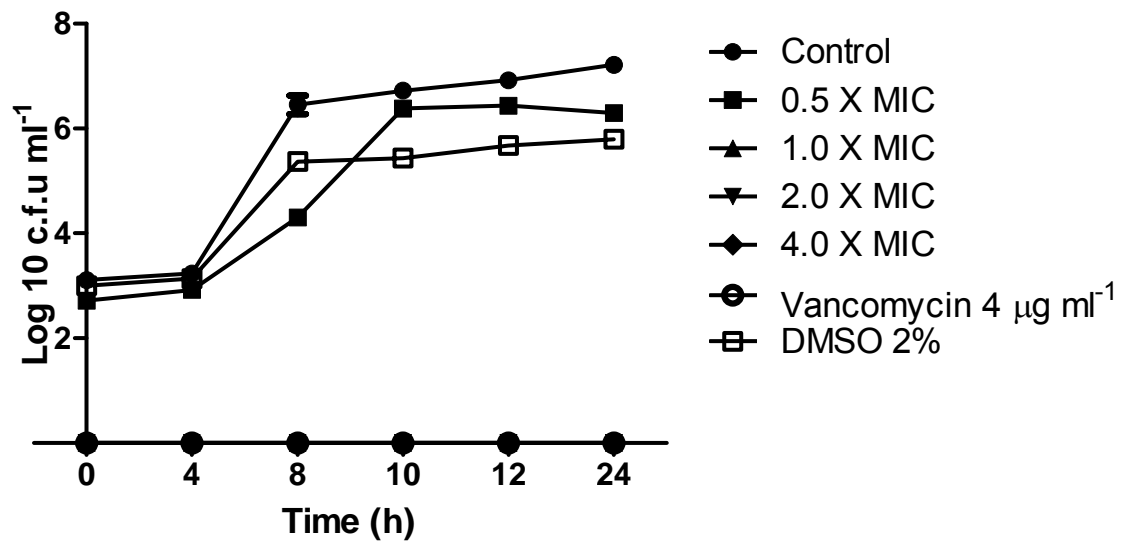


Fig. 1. Time-kill curves of copaiba oleoresin against *B. cereus*. Results are from experiments in triplicate.

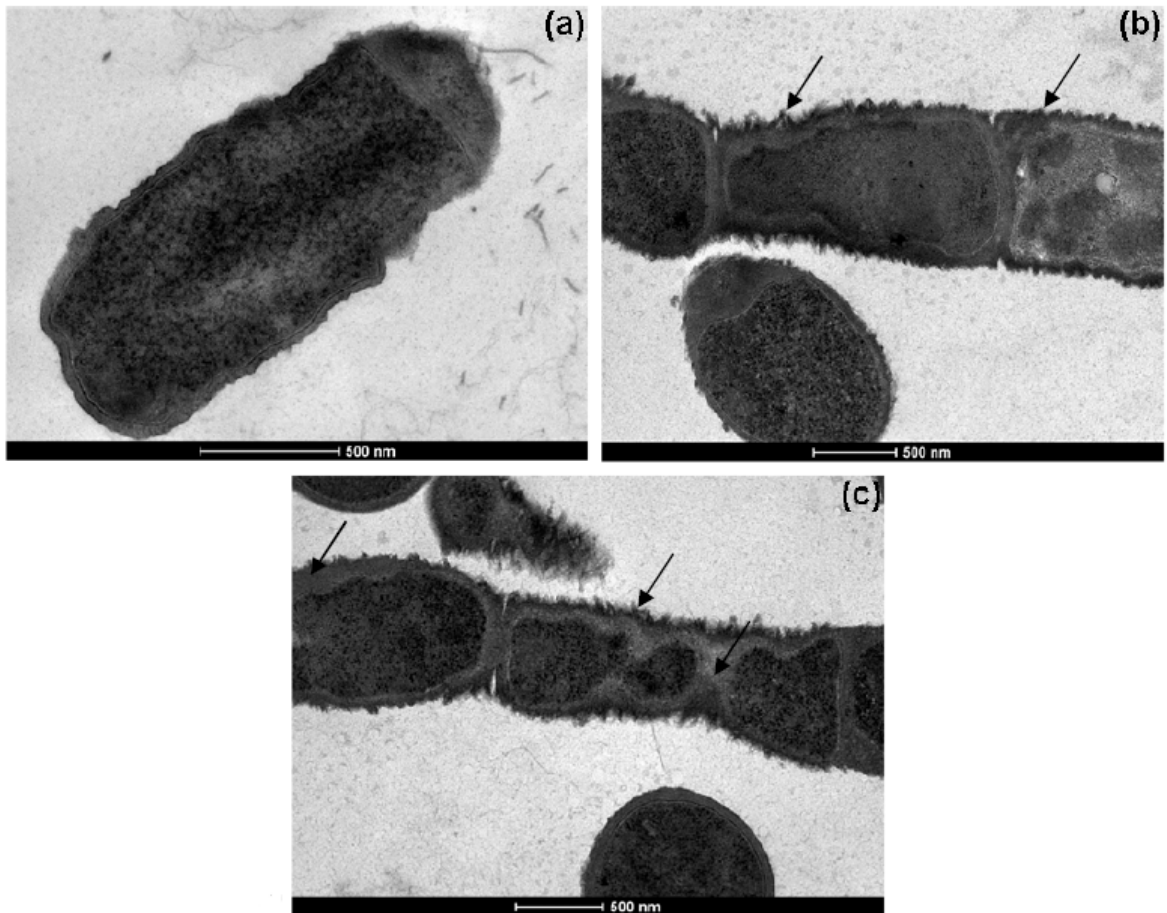


Fig. 2. Ultrastructural effect of copaiba oleoresin after incubation of *B. cereus* for 24h, observed by TEM. (a) untreated; (b)-(c) *B. cereus* treated with $0.015625 \text{ mg ml}^{-1}$ of copaiba oleoresin. Bars= 500 nm. Arrows indicate changes on the cell wall.

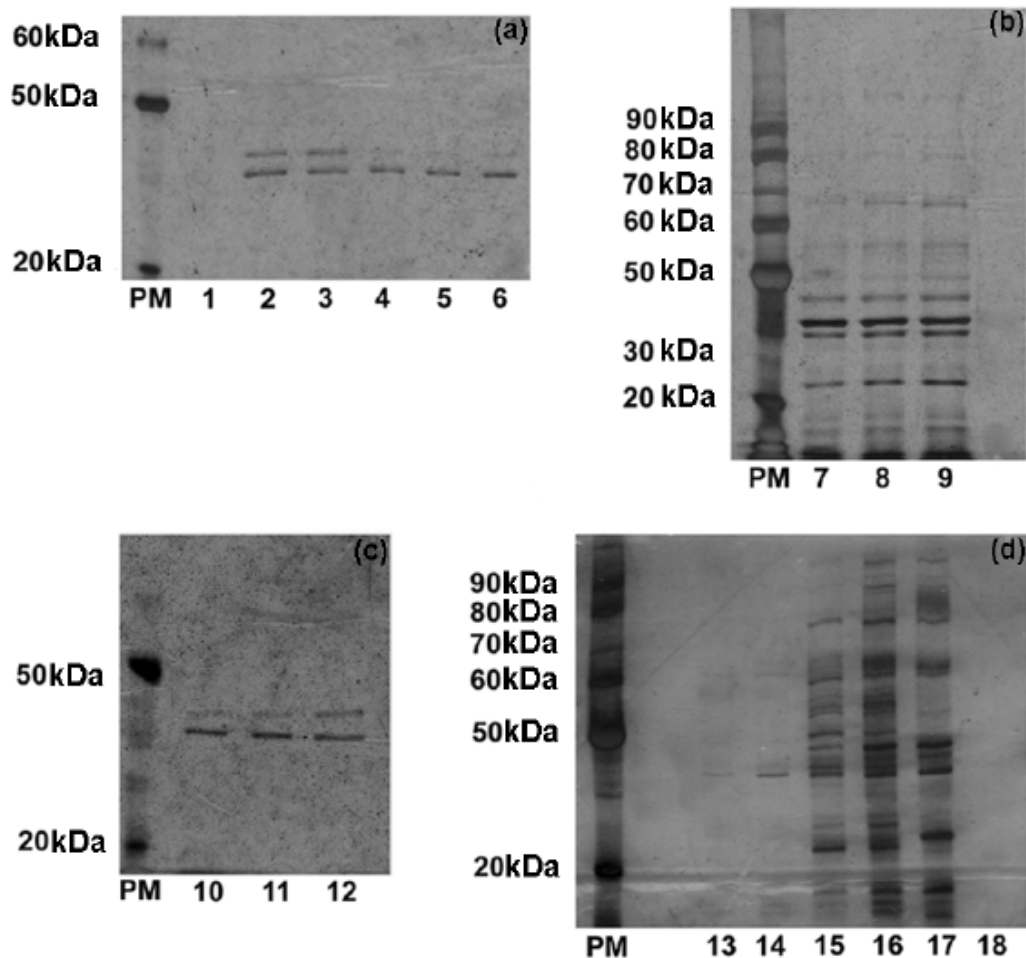


Fig. 3. Electrophoretic profile of proteins extracted from *B. cereus*, for 10, 30, and 90 min (a), (b)–(c), and 24h (d). (a) *C. duckei* oleoresin: 2.0 X MIC (line 1-3); 4.0 X MIC (line 4-6); (b) 6.4 mM SDS (line 7-9); (c) 4.0 $\mu\text{g ml}^{-1}$ vancomycin (line 10-12); (d) line 13: 1 X MIC; line 14: 2 X MIC; line 15: 4 X MIC; line 16: 4.0 $\mu\text{g ml}^{-1}$ vancomycin; line 17: 6.4 mM SDS; line 18: copaiba oleoresin; PM-protein marker.

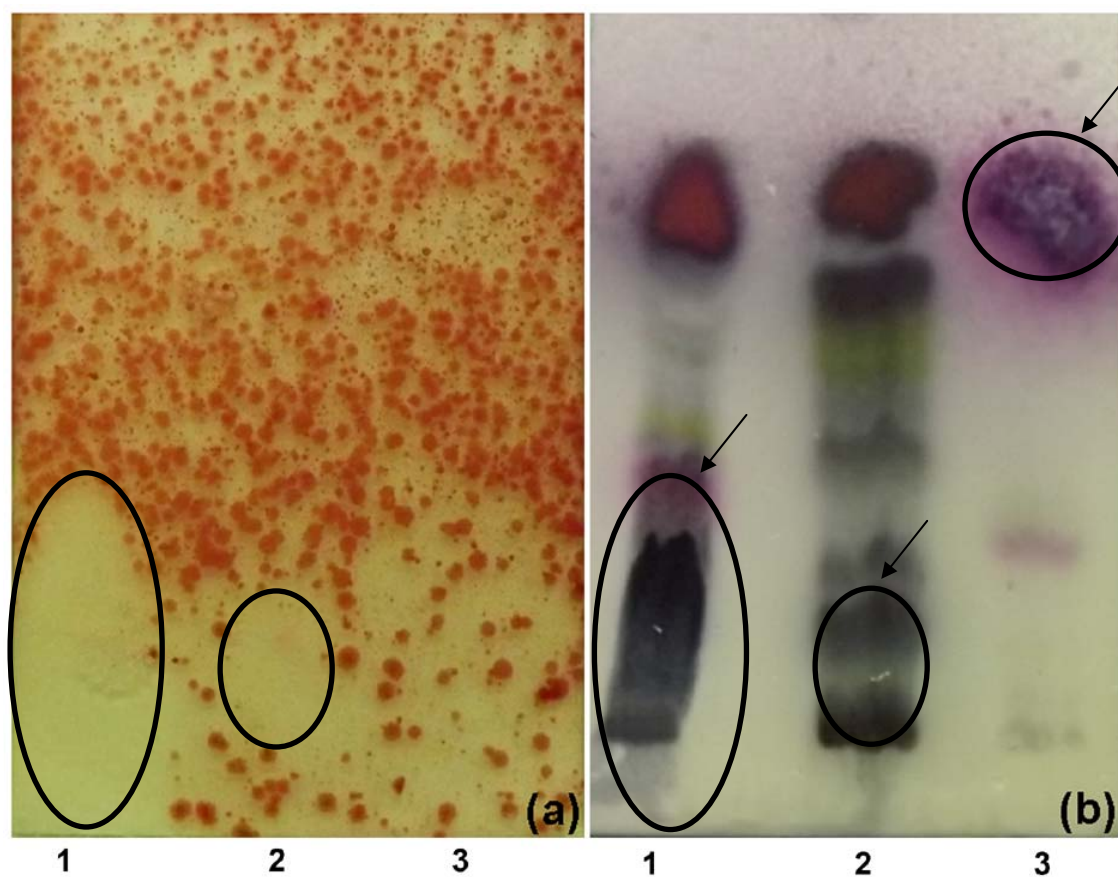


Fig. 4. Detection of the antibacterial activity of *C. duckei* oleoresin by bioautography assay against *B. cereus*. (a) formation of an inhibition halo by copaiba oleoresin (line 1- 35 mm), bisabolene isomers (line 2- 18 mm), and β -caryophyllene standard (line 3); (b) compounds detected by sulfuric vanillin reagent. Adsorbent silica gel G₆₀F₂₅₄; solvent chloroform-toluene 75:25 (v/v).

Supplementary material

Action of *Copaifera duckei* Dwyer oleoresin on the cell wall and cell division of *Bacillus cereus*

Elizabeth Cristina Gomes dos Santos¹, Claudio Luis Donnici², Elizabeth Ribeiro da Silva Camargos³, Adriana Augusto de Rezende⁴, Eloisa Helena de Aguiar Andrade⁵, Luiz Alberto Lira Soares⁶, Luiz de Macêdo Farias⁷, Maria Auxiliadora Roque de Carvalho⁷ and Maria das Graças Almeida^{4*}

Author affiliation

¹Postgraduate program in Health Sciences, Federal University of Rio Grande do Norte, Natal-RN, Brazil.

²Department of Chemistry, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil.

³Department of Morphology and Microscopy Center, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil.

⁴Department of Clinical and Toxicological Analysis, Federal University of Rio Grande do Norte, Natal-RN, Brazil.

⁵Department of Chemistry and Food, Federal University of Para, Belém, Brazil.

⁶Department of Pharmacy, Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil.

⁷Department of Microbiology Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil.

Correspondence

Elizabeth C. G. dos Santos, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Av. Gen. Gustavo Cordeiro de Farias, s/n, Petrópolis, 59012-570, Natal, Rio Grande do Norte, Brazil. E-mail: elizabethcristina@ig.com.br Phone: +55 84 33429807 Fax: +55 84 33429776

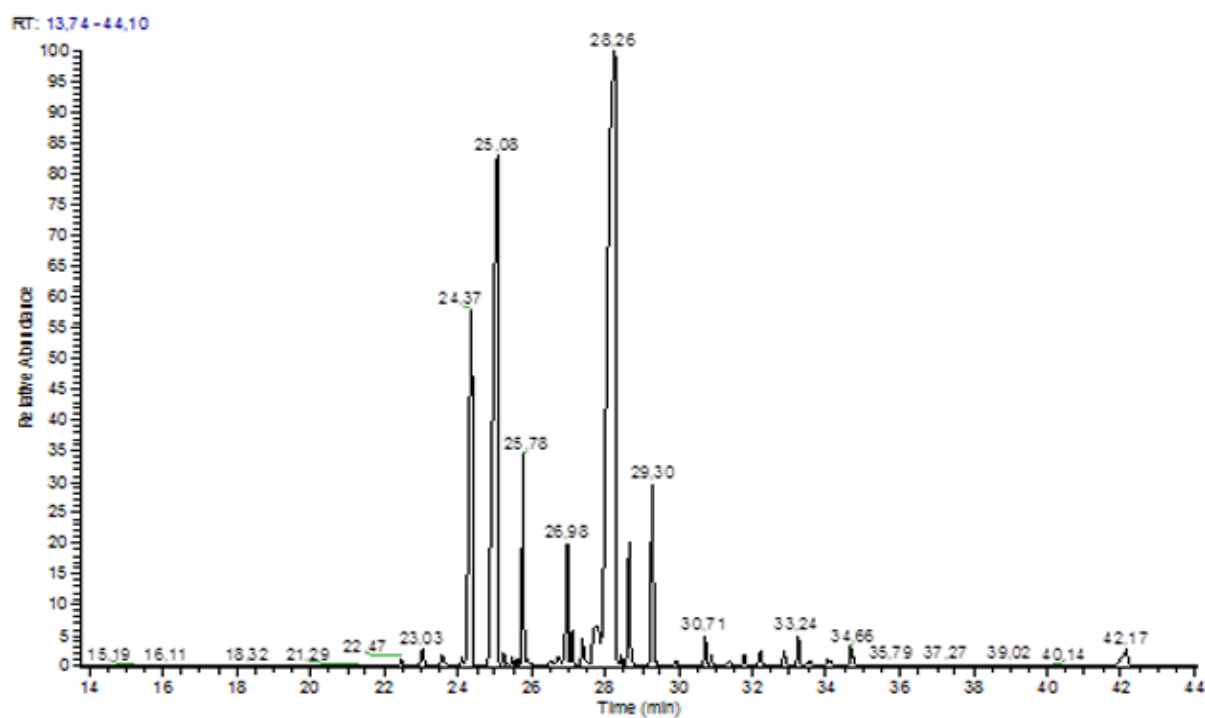


Fig. S1 Chromatogram of the *C. duckei* oleoresin.

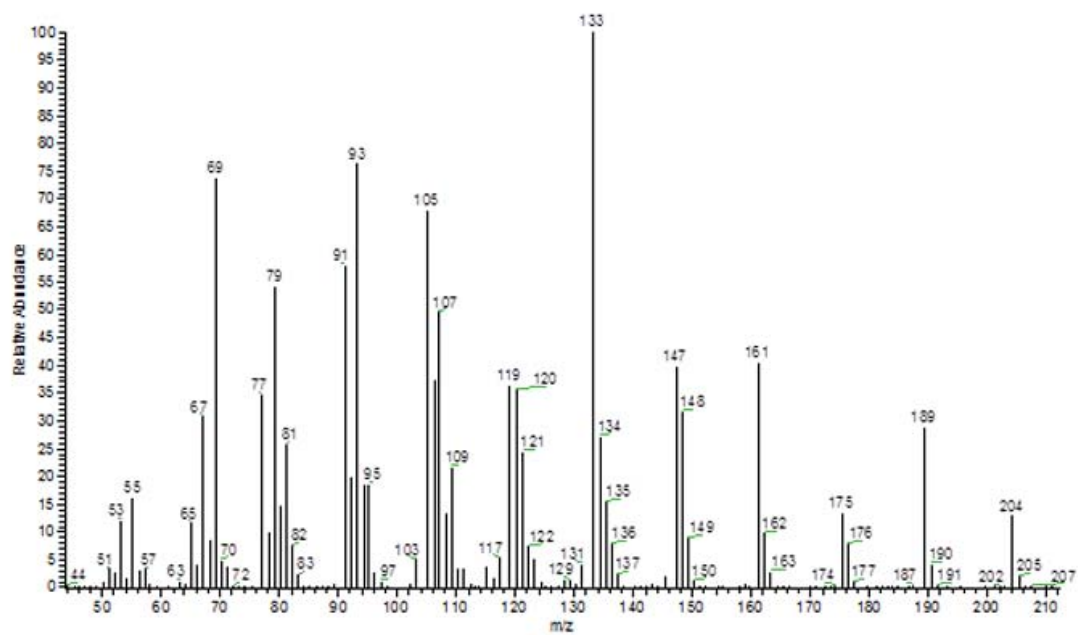


Fig. S2 Mass spectrum of β -caryophyllene.

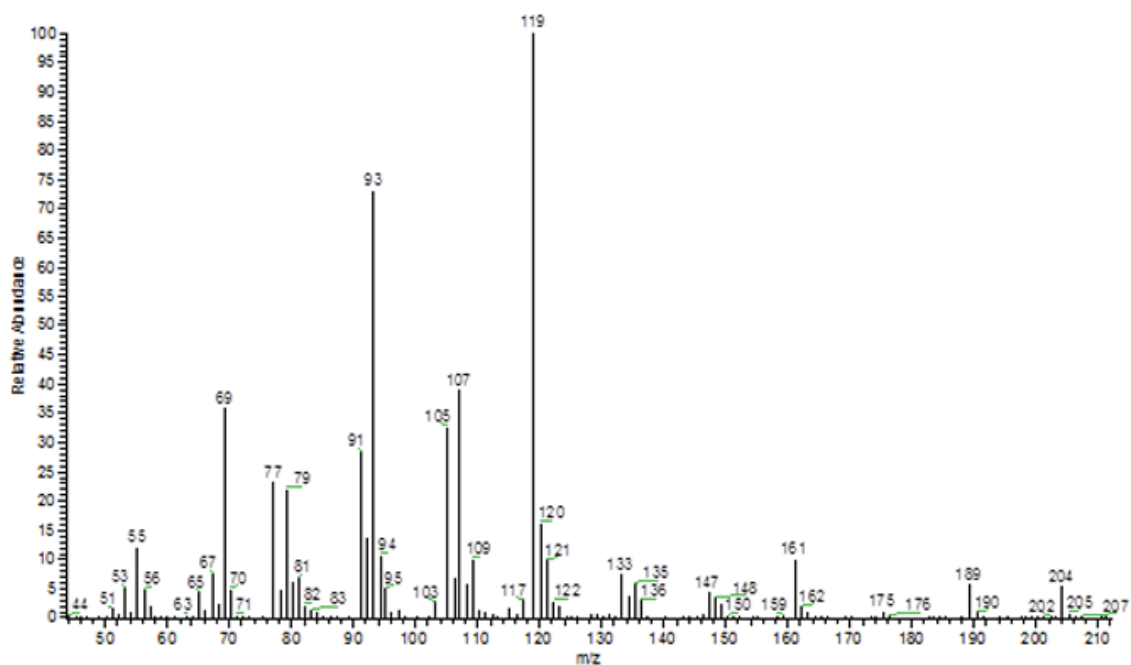


Fig. S3 Mass spectrum of *trans*- α -bergamotene.

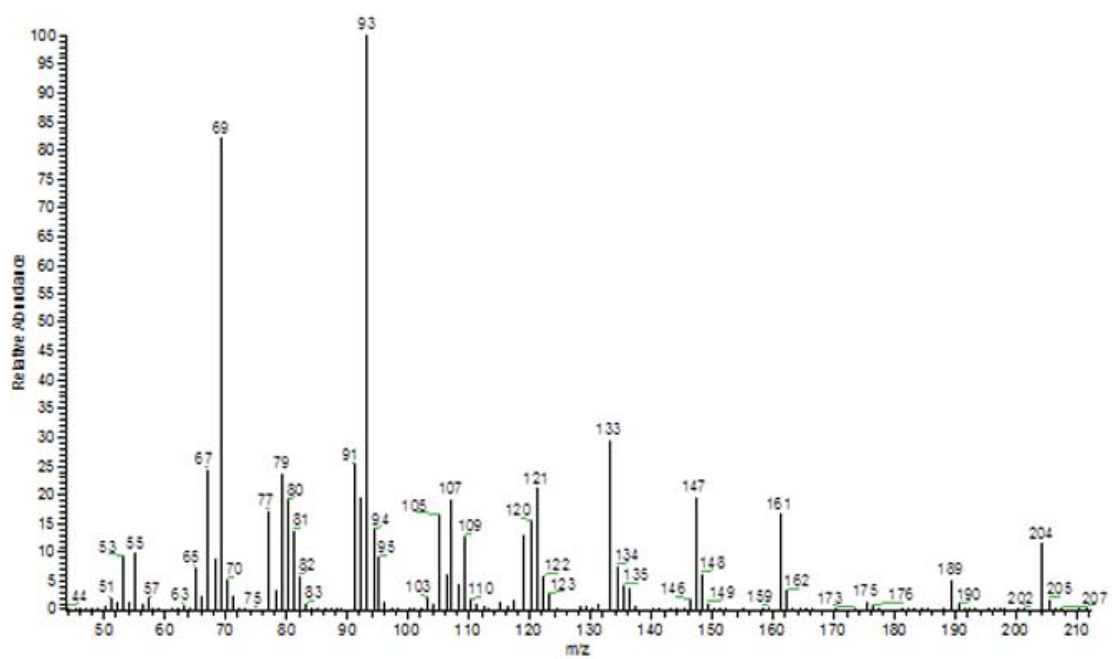


Fig. S4 Mass spectrum of α -humulene.

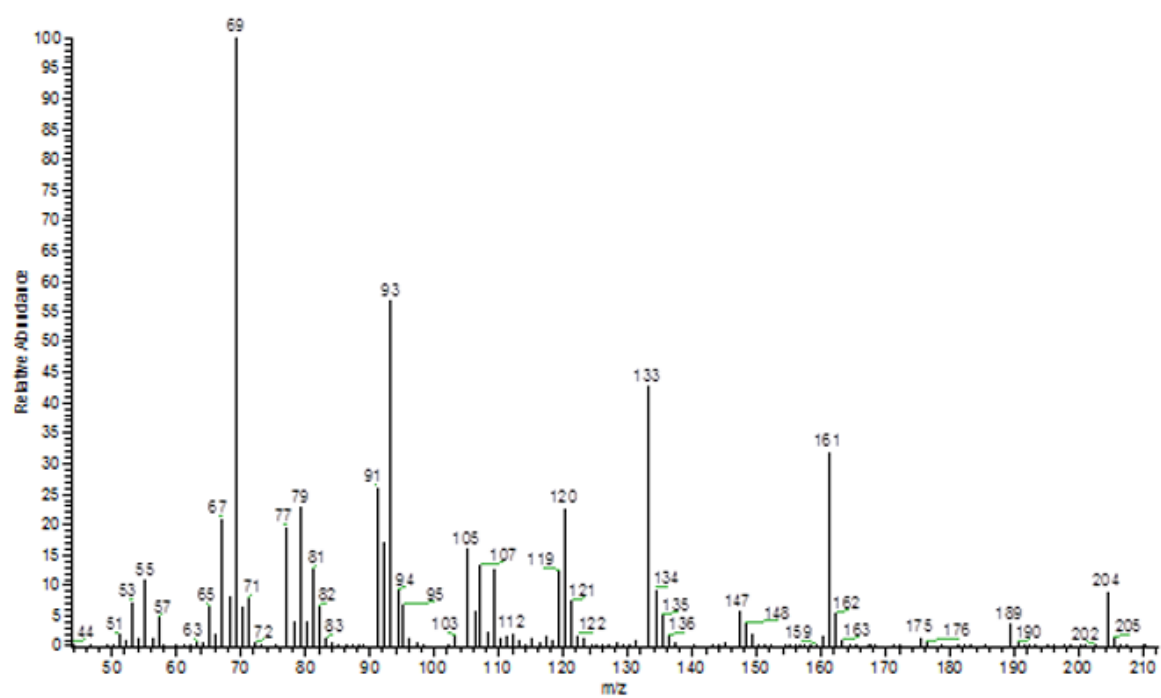


Fig. S5 Mass spectrum of sesquisabinene.

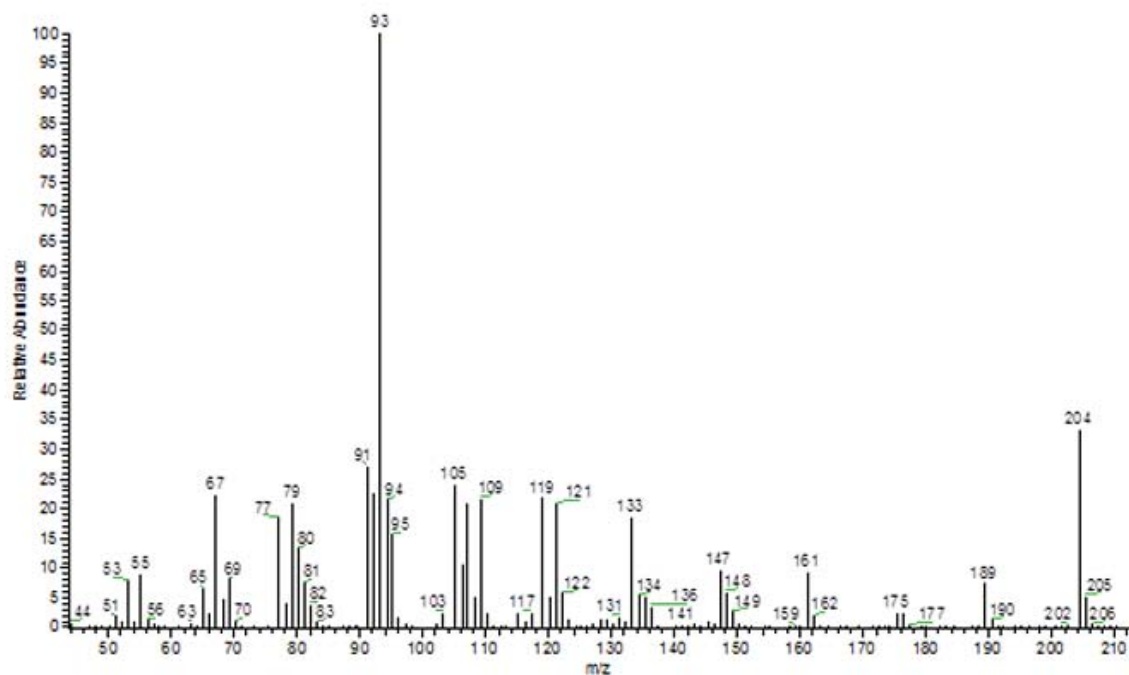


Fig. S6 Mass spectrum of (Z)- α -bisabolene.

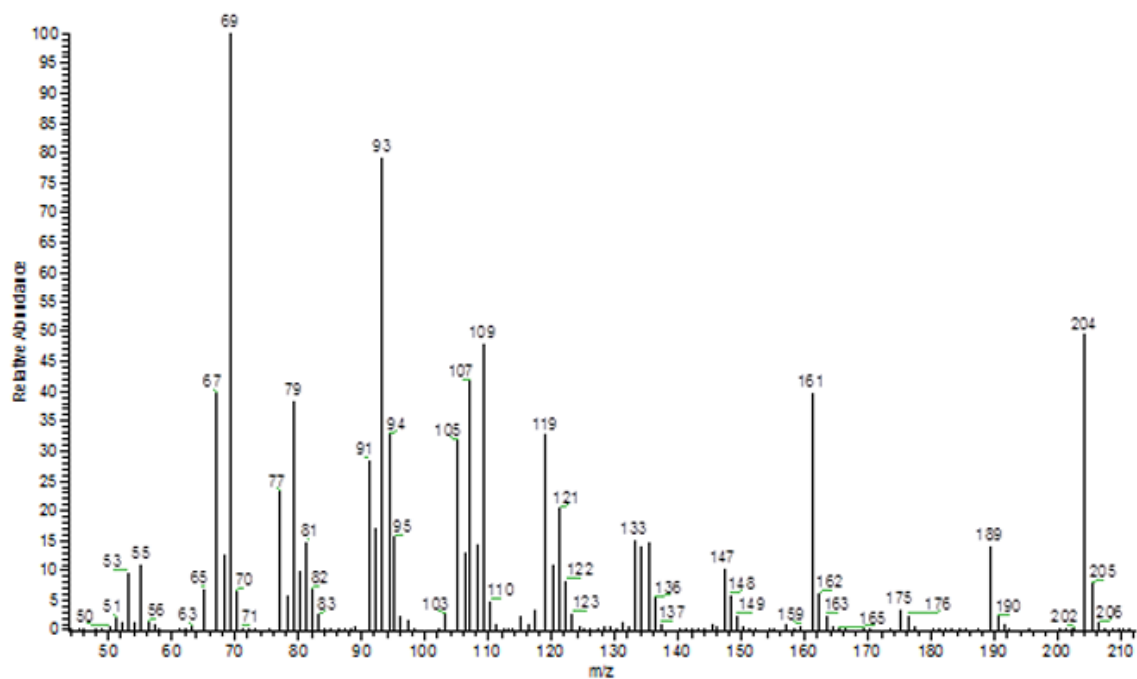


Fig. S7 Mass spectrum of β -bisabolene.

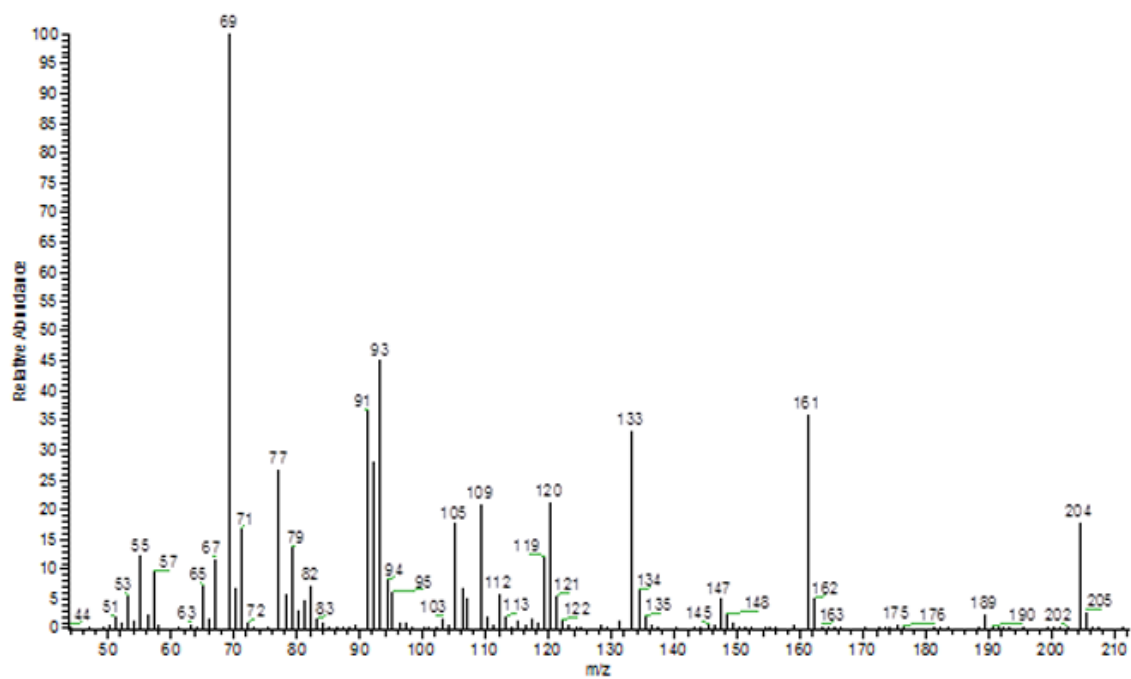


Fig. S8 Mass spectrum of β -sesquiphellandrene.

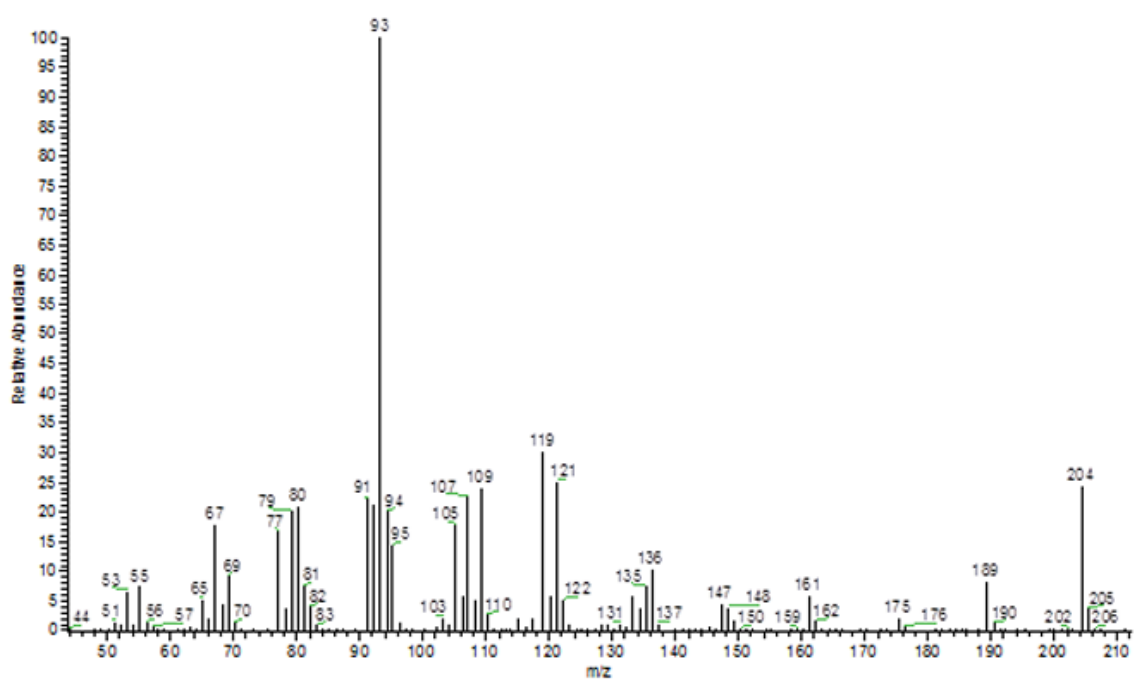


Fig. S9 Mass spectrum of *cis*- α -bisabolene.

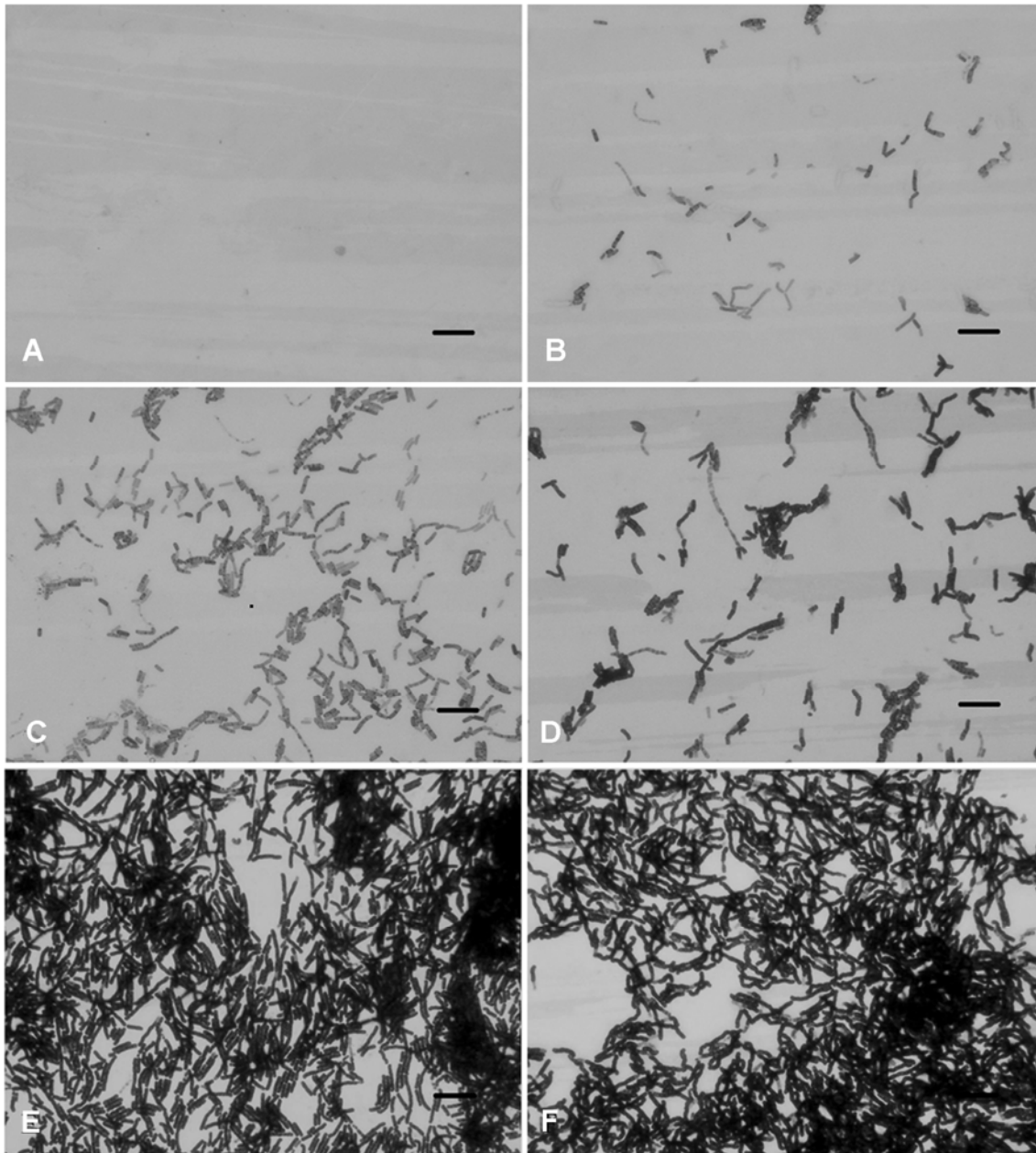


Fig. S10 Morphology of the *Bacillus cereus* treated with copaiba oleoresin, observed by optical microscopy using Gram stain. (a) inhibitory halo region;(b, c and d) border of the inhibitory halo; and (e and f) region outside the zone of the inhibition. Bars= 100X. Microscope (Olympus BX-41) with coupled digital camera (Olympus MAUSB 10).

Decision Letter

[\[Return to Queue\]](#)

To: Elizabeth CG Santos <elizabethcristina@ig.com.br>
From: Keith Miller <k.miller@shu.ac.uk>
Subject: JMM paper no. JMM/2013/060046 - Acceptance notification
Cc: submit.jmm@sgm.ac.uk

Dear Ms Elizabeth CG Santos

Journal of Medical Microbiology paper JMM/2013/060046: <I>Copaifera duckei</I> Dwyer:
its antibacterial activity and possible mechanism of action

I am pleased to tell you that your paper is now acceptable for publication. Further processing of the paper will now be dealt with by the JMM Editorial Office, who will check that they have all the files needed for publication, and contact you if anything else is required.

A signed copyright assignment form will be required before publication can proceed.

The corresponding author may sign on behalf of all authors.

Please download the copyright assignment form at

<http://jmm.sgmjournals.org/site/misc/cFORM.pdf> (or via the link in the Author area of the manuscript tracking system).

Please remember to include the paper number on the copyright assignment form and make sure that you tick a box in section 1 of the form.

The signed form should be returned to the JMM Editorial Office by mail or fax (contact details are on the form), or by e-mail to jmm@sgm.ac.uk, or as a file upload via the manuscript tracking system.

IMPORTANT:

(i) The journal has a Papers in Press feature where accepted manuscripts appear online in an unedited format before they are scheduled to appear in print. Unless you inform the Editorial Office otherwise (submit.jmm@sgm.ac.uk), they will assume that you agree to your

manuscript being used in this way.

The details you have entered into the Bench>Press site, such as the manuscript title, subject category and author details, and the PDF used for peer review will be used to generate the Papers in Press record.

(ii) JMM offers the choice of immediate open access on publication, with an

associated charge of GBP 1750 (plus VAT where applicable) that must be paid before publication. Papers for which the open access fee is paid will also be deposited in PubMed Central (and associated mirror sites such as UKPMC) and made available at the time of publication with no access controls. (See

http://jmm.sgmjournals.org/site/misc/open_option.xhtml for further details.) If you

indicated on the manuscript submission form that you wished to pay for open access for your paper then please return your completed open access form as soon as possible.

Thank you for submitting your paper to JMM. I hope that you will consider the journal for publication of future papers.

If you are working with prokaryotic strains, please could you take 2 minutes to fill out this survey about your preference for depositing novel strains in a culture collection: <https://www.surveymonkey.com/s/JournalofMedicalMicrobiology> . This is intended to inform a strategy to enhance post-publication deposition of prokaryotic strains; you will be in no way obliged to deposit any strains.

Yours sincerely

Dr Keith Miller

Journal of Medical Microbiology

JMM now has a group on LinkedIn. Join for journal news, updates and discussions:

<http://www.linkedin.com/groups?gid=4291354>

ARTIGO 2

Título: Antibacterial activity of the hydroalcoholic extract of *Pseudobombax marginatum* bark and its fractions

Status: a ser submetido

6. COMENTÁRIOS, CRÍTICAS E SUGESTÕES

A pesquisa da atividade farmacológica de plantas medicinais é um tema bastante abordado na literatura científica. No Brasil, devido a sua rica biodiversidade, e o hábito da população tratar as doenças com plantas, seja por fatores culturais ou pela dificuldade de acesso a redes públicas, tem despertado o interesse de pesquisadores nessa área de estudo.

Nesse contexto, com o surgimento da resistência aos antimicrobianos convencionais, pesquisas têm sido realizadas com o intuito de se obter novas substâncias com atividade antimicrobiana – evidenciando-se como uma dessas fontes, as plantas utilizadas na medicina popular.

Seguindo a linha de pesquisa de nosso grupo “Desenvolvimento de fitoterápicos da flora do nordeste”, estudamos inicialmente a atividade antibacteriana e o possível mecanismo de ação da *Turnera ulmifolia*, projeto esse modificado pelo baixo potencial antibacteriano dessa planta. As pesquisas continuam sendo realizadas com outras espécies, dentre elas, *Pseudobombax marginatum*, *Copaifera duckei*, *Licania rigida* Benth, *Licania tomentosa* (Benth) Fritsch e *Couepia impressa* Prance.

Desse modo, os experimentos foram retomados estudando-se somente as plantas, *Pseudobombax marginatum* e *Copaifera duckei*. *P. marginatum*, planta encontrada na caatinga, possui poucos relatos na literatura quanto as suas propriedades farmacológicas, na qual mencionam a sua ação na inflamação da coluna e trato urinário (23-25). No entanto, a *Copaifera duckei*, planta da região amazônica, possui alguns estudos desenvolvidos (26-29), porém quanto a sua atividade antibacteriana, ainda não foi realizada.

Apesar de diversas espécies do gênero *Copaifera* terem sido pesquisadas quanto a sua atividade antimicrobiana, na área da microbiologia é importante o estudo dessas diferentes espécies, para um melhor delineamento de seu perfil antibacteriano, na mesma espécie ou em espécies distintas.

Compreende-se que os dados obtidos nesse estudo são de grande relevância, pois as duas espécies apresentaram um amplo espectro de atividade antibacteriana, atuando contra bactérias Gram-positivas de interesse clínico e da área de alimentos. Foi também possível observar um dos sítios de ação dessas plantas, a parede celular bacteriana, na qual indicam alterações

nos centros de divisão celular, em que verificamos vários septos na célula bacteriana, além do espessamento da parede.

Durante o desenvolvimento desse estudo, muitas foram as dificuldades enfrentadas, desde falta de equipamentos a reagentes necessários para realizar uma análise melhor elaborada. Sendo imprescindível o envio de amostras da Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN para a Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG, para as análises de Microscopia Eletrônica de Transmissão e química, que devido à distância, não foi possível a repetição de alguns experimentos para obtenção de todos os dados. A dificuldade de se ausentar do Rio Grande do Norte, bem como a carência financeira para se deslocar ao Departamento de Química da UFMG, acarretou o não desenvolvimento de um estudo mais aprofundado dos compostos químicos presentes no *P. marginatum* e *C. duckei*.

Um dos objetivos de nosso trabalho, “determinação da concentração de potássio intra e extracelular, antes e após o tratamento com o óleo-resina de *C. duckei* e o extrato de *P. marginatum*”, não foi possível ser considerado, pela utilização de um aparelho menos sensível, o Fotômetro de chama, gerando resultados não reprodutíveis, e também, pelo fato do Espectrômetro de Absorção Atômica, equipamento ideal para essa análise, está danificado, e seu conserto agendado para o mês de maio, dificultando a análise desse microelemento.

Outra importante problemática evidenciada pelo estudo refere-se à falta de proteção das plantas da Caatinga, considerando-se como fator agravante. Para ilustrar esse processo, em um dos locais em que fizemos a primeira coleta do *P. marginatum*, devido à ocupação humana, a árvore mais antiga foi arrancada para ceder o local a um poste de rede elétrica. Assim, percebe-se a necessidade de trabalhos e/ou programas que possam contribuir para a proteção desse bioma, de modo que tanto o desenvolvimento local quanto o meio ambiente não sejam prejudicados perante as necessidades naturais de subsistência da população.

O desenvolvimento do trabalho foi enriquecedor para nosso grupo, tanto no ponto de vista intelectual quanto prático. A partir do estudo de atividade antimicrobiana de plantas ou de produtos obtidos de micro-organismos, tivemos a oportunidade de orientar quatro trabalhos de conclusão do curso de

Farmácia, além de trabalhos apresentados em eventos científicos e publicação de um artigo na Revista Facider (apêndice). Colaboramos também para o desenvolvimento de dissertações do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas pertencentes a outros grupos de pesquisa da Faculdade de Farmácia.

Acreditamos que este trabalho possa contribuir para o desenvolvimento de uma nova linha de pesquisa, avaliando atividade de substâncias bioativas obtidas de plantas, micro-organismos e outros animais, com a sua aplicação na área médica, de alimentos e biotecnológica. Com o apoio de pesquisadores da área de plantas, química, bioquímica, biologia molecular, dentre outros, formando uma equipe multidisciplinar.

7. REFERÊNCIAS

1. Paphitou NI. Antimicrobial resistance: action to combat the rising microbial challenges. *Int J Antimicrob Ag* 2013; 42S: S25-S28.
2. Giannakaki V, Miyakis S. Novel antimicrobial agents against multi-drug-resistant gram-positive bacteria: an overview. *Recent Pat Antiinfect Drug Discov* 2012; 7:182-8.
3. Zhong H-Q, Zhang S, Pan H, Cai T. Influence of induced ciprofloxacin resistance on efflux pump activity of *Klebsiella pneumoniae*. *Biomed & Biotechnol* 2013; 14:837-43.
4. Bassetti M, Merelli M, Temperoni C, Astilean A. New antibiotics for bad bugs: where are we?. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2013; 12:1-15.
5. Nepomuceno DC, Younes RN, Varella AD, Suffredini IB. Atividade antibacteriana e fracionamento direcionado do extrato orgânico obtido de *Tovomita* sp. *Rev Bras Farmacogn* 2003; 14 Suppl 1: 3-4.
6. Cunico MM, Carvalho JLS, Kerber VA, Higaskino CEK, Cruz Almeida SC, Miguel MD, Miguel OG. Atividade antimicrobiana do extrato bruto etanólico de raízes e partes aéreas de *Ottonia martiana* Miq. (Piperaceae). *Rev Bras Farmacogn* 2004; 14:97-103.
7. Morrissey JP, Osbourn AE. Fungal resistance to plant antibiotics as a mechanism of pathogenesis. *Microbiol Mol Biol Rev* 1999; 63:708-24.
8. Savoia D. Plant-derived antimicrobial compounds: alternatives to antibiotics. *Future Microbiol* 2012; 7:979-90.
9. Lima EO. Plantas e suas propriedades antimicrobianas: Uma breve análise histórica. In: Yunes RA, Calixto JB. *Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna*. 1ed. Chapecó: Argos, 2001.

10. Joswick HL, Corner TR, Silvernale JN, Gerhardt P. Antimicrobial actions of hexachlorophene release of cytoplasmic materials. *J Bacteriol* 1971; 108:492-500.
11. Ultee A, Kets EPW, Smid EJ. Mechanisms of action of carvacrol on the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Appl Environ Microbiol* 1999; 65:4606-10.
12. Carson CF, Mee BJ, Riley TV. Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (Tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage, and salt tolerance assays and electron microscopy. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46:1914-20.
13. Fitzgerald DJ, Stratford M, Gasson MJ, Ueckert J, Bos A, Nrabad A. Mode of antimicrobial of vanillin against *Escherichia coli*, *Lactobacillus plantarum* and *Listeria innocua*. *J Appl Microbiol* 2004; 97:104-13.
14. Lambert RJW, Skandamis PN, Coote, PJ, Nychas G–J. E. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *J Appl Microbiol* 2001; 91:453-62.
15. Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *Int J Food Microbiol* 2004; 94:223-53.
16. Rios JL, Recio MC. Medicinal plants and antimicrobial activity. *J Ethnopharmacol* 2005; 100:80-4.
17. Veiga-Junior VF, Pinto AC. O gênero *Copaifera* L. *Quím Nova* 2002; 25: 273- 286.
18. Paiva LAP, De Alencar Cunha KM, Santos FA, Gramosa NV, Silveira ER, Rao VSN. Investigation on the wound healing activity of oleo-resin from *Copaifera langsdorfii* in rats. *Phytother Res* 2002; 16: 737-739.
19. Veiga-Junior VF, Zunino L, Calixto JB, Patitucci ML, Pinto AC. Phytochemical and antioedematogenic studies of commercial copaiba oils available in Brazil. *Phytother Res* 2001; 15: 476-80.

20. Paiva LAP, Gurgel LA, Silva RM, Tomé AR, Gramosa NV, Silveira ER, Santos FA, Rao VSN. Anti-inflammatory effect of kaurenoic acid, a diterpene from *Copaifera langsdorffii* on acetic acid-induced colitis in rats. *Vascul Pharmacol* 2003; 39: 303-307.
21. Paiva LAP, Gurgel LA, De Sousa ET, Silveira ER, Silva RM, Santos FA, Rao VSN. Protective effect of *Copaifera langsdorffii* oleo-resin against acetic acid induced colitis in rats. *J Ethnopharmacol* 2004; 93: 51-56.
22. Paiva LAP, Gurgel LA, Campos AR, Silveira ER, Rao VSN. Attenuation of ischemia/reperfusion-induced intestinal injury by oleo-resin from *Copaifera langsdorffii* in rats. *Life Sci* 2004, 75: 1979-1987.
23. Veiga-Junior V, Rosas EC, Carvalho MV, Henriques MGMO, Pinto AC. Chemical composition and anti-inflammatory activity of copaiba oils from *Copaifera cearensis* Huber ex Ducke, *Copaifera reticulata* Ducke and *Copaifera multijuga* Hayne – A comparative study. *J Ethnopharmacol* 2007; 112: 248-54.
24. Costa-Lotufo L V, Cunha GMA, Farias PAM, Viana GSB, Cunha KMA, Pessoa C, Moraes MO, Silveira ER, Gramosa NV, Rao VSN. The cytotoxic and embryotoxic effects of kaurenoic acid, a diterpene isolated from *Copaifera langsdorffii*. *Toxicon* 2002; 40(8): 1231–34.
25. Cascon V, Gilbert B. Characterization of the chemical composition of oleoresins of *Copaifera guianensis* Desf., *Copaifera duckei* Dwyer and *Copaifera multijuna* Hayne. *Phytochemistry* 2000; 55: 773–78.
26. Leandro LM, Vargas FS, Barbosa PCS, Neves JKO, Silva JA, Veiga-Junior VF. Chemistry and biological activities of terpenoids from copaiba (*Copaifera* spp.) oleoresins. *Molecules* 2012; 17: 3866-89.
27. Paiva LAP, Rao VSN, Gramosa NV, Silveira ER. Gastroprotective effect of *Copaifera langsdorffii* oil-resin on experimental gastric ulcer models in rats. *J Ethnopharmacol* 1998; 62: 73-78.

28. Ohsaki A, Yan LT, Ito S, Edatsugi H, Iwata D, Komoda Y. The isolation and *in vivo* potent antitumor activity of clerodane diterpenoid from the oleoresin of the brazilian medicinal plant, *Copaifera langsdorfii* Desfon. *Bioorg Med Chem Lett* 1994; 4: 2889-92.
29. Lima SR, Junior VF, Christo HB, Pinto AC, Fernandes PD. *In vivo* and *in vitro* studies on the anticancer activity of *Copaifera multijuga* Hayne and its fractions. *Phytother Res* 2003; 17: 1048-53.
30. Gomes NM, Rezende CM, Fontes SP. Antinociceptive activity of amazonian copaiba oils. *J Ethnopharmacol* 2007;109: 486-92.
31. Silva IG, Zanon VOM, Silva HHG. Larvicidal activity of *Copaifera reticulata* Ducke oil-resin against *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera, Culicidae). *Neotrop Entomol* 2003; 32: 729-731.
32. Geris R, Siva IG, Silva HHG, Barison A, Rodrigues-Filho E, Ferreira AG. Diterpenoids from *Copaifera reticulata* Ducke with larvicidal activity against *Aedes aegypti* (L.) (Diptera, Culicidae). *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2008; 50:25-8.
33. Tincusi BM, Jiménez IA, Bazzocchi IL, Moujir LM, Mamani ZA, Barroso JP, Ravelo AG, Hernández BV. Antimicrobial terpenoids from the oleoresin of the peruvian medicinal plant *Copaifera paupera*. *Planta Med* 2002; 68: 808-12.
34. Diniz SPSS, Bonzanini F, Bueno MAS, Rodrigues JD. Efeito do bálsamo de copaíba (*Copaifera reticulata* Ducke) sobre a germinação de esporos de *Fusarium*. *Rev Bras PI Med* 2002; 5: 60-2.
35. Maia GN. Caatinga: árvores e arbustos e suas utilidades. 1ª ed. São Paulo: Leitura & Arte, 2004.
36. Du Bocage AL, Sales MF. A família Bombacaceae Kunth no estado de Pernambuco, Brasil. *Acta Bot Bras* 2002; 16: 123-39.

37. Ladeji O, Omekarah I, Solomon M. Hypoglycemic properties of aqueous bark extract of *Ceiba pentandra* in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Ethnopharmacol* 2003; 84: 139-142.
38. Bizimana N, Tietjen U, Zessin K-H, Diallo D, Djibril C, Melzig MF, Clausen P-H. Evaluation of medicinal plants from Mali for their in vitro and in vivo trypanocidal activity. *J Ethnopharmacol* 2006; 103: 350-356.
39. Rao KV, Sreeramulu K, Gunasekar D. Two new sesquiterpene lactones from *Ceiba pentandra*. *J Nat Prod* 1993; 56: 2041-2045.
40. Dar A, Faizi S, Naqvi S, Roome T, Zikr-ur-Rehman S, Ali M, Firdous S, Moin ST. Analgesic and Antioxidant Activity of Mangiferin and Its Derivatives: the Structure Activity Relationship. *Biol Pharm Bull* 2005; 28: 596-600.
41. Wang Y-C, Huang T-L .Screening of anti-*Helicobacter pylori* herbs deriving from Taiwanese folk medicinal plants. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2005; 43: 295-300.
42. Saleem R, Ahmad SI , Ahmed M, Faizi Z, Zikr-ur-Rehman S, Ali M, Faizi S. Hypotensive Activity and Toxicology of Constituents from *Bombax ceiba* Stem Bark. *Biol Pharm Bull* **2003**; 26: 41-6.
43. Albuquerque UP, Muniz DPM, Almeida AL, Monteiro JM, Machado DFLNE, Gomes DMJ, Santos JP. Medicinal plants of the Caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: a quantitative approach. *J Ethnopharmacol* 2007; 114: 325-54.
44. Roque AA, rocha RM, Loiola MIB. Uso e diversidade de plantas medicinais da Caatinga na comunidade rural de Laginhas, município de Caicó, Rio Grande do Norte (nordeste do Brasil). *Rev Bras PI Med* 2010; 12: 31-42.
45. CLSI. Padronização dos testes de sensibilidade a antimicrobianos por disco-difusão: vol.23, norma aprovada documento CLSI M2-A8. Wayne, PA: CLSI, 2003.

46. NCCLS. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically: 6th approved standard NCCLS document M7-A6. Wayne, PA: NCCLS, 2003.
47. Steers E, Foltz EL, Graves BS. An inocula replicating apparatus for routine testing of bacterial susceptibility to antibiotics. *Antibiot Chemother* 1959; 9: 307-11.
48. Rakotoniriana EF, Rajaonarison JF, Raelison EG, Rajaonarivelo JP, Manga N, Solofoniaina M, Rakotonirina B, Randriamampionona D, Rabemanantsoa C, Cheuk K, Urveg-Ratsimamanga S, Leclercq JQ. Antimicrobial activity of 23 endemic plants in Madagascar. *Trop J Pharm Res* 2010; 9:165-71.
49. Wagner, H. & Blatt, S. Appendix A: spray reagents. In: *Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas*, pp. 364. Edited by H. Wagner & S. Blatt. Berlin: Springer, 2001.
50. NCCLS. Methods for Determining Bactericidal Activity of Antimicrobial Agents; Approved Guideline. Approved Standard. NCCLS document M26-A. Wayne, PA: NCCLS, 1999.
51. Moura SB, Mendes EN, Queiroz DMM, Camargo ERS, Fonseca MEF, Rocha GA, Nicoli JR. Ultrastructure of *Helicobacter trogontum* in culture and in the gastrointestinal tract of gnotobiotic mice. *J Med Microbiol* 1998; 47: 513-20.
52. Rundegren J, Sjödin T, Petersson L, Hansson E, Jonsson I. Delmopinol interactions with cell walls of gram-negative and gram-positive oral bacteria. *Oral Microbiol Immunol* 1995; 10:102-9.
53. Brito NJN, López JA, do Nascimento MA, Macêdo JBM, Silva GA, Oliveira, CN, de Rezende AA, Brandão-Neto J, Schwarz A, Almeida MG. Antioxidant activity and protective effect of *Turnera ulmifolia* Linn. Var. *elegans* against carbon tetrachloride-induced oxidative damage in rats. *Food Chem Toxicol* 2012; 50:4340-7.

54. ADAMS RP. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry. Illinois: Allured Publishing Corporation, Carol Stream, 2007.

55. Chu YF, Sun J, Wu X, Liu RH. Antioxidant and antiproliferative activities of common vegetables. *J Agric Food Chem* 2002; 50: 6910-16.

56. Dewanto V, Wu X, Adom KK, Liu RH. Thermal processing enhances the nutritional value of tomatoes by increasing total antioxidant activity. *J Agric Food Chem* 2002; 50:3010-14.

8. APÊNDICE

Trabalho de Conclusão do Curso de Farmácia-UFRN

1. Poliana Carlos Alves de Oliveira. Atividade antibacteriana *in vitro* do extrato seco por aspersão das folhas da *Psidium guajava* L. (Co-orientadora). 2008.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Alberto Lira Soares

2. Anna Jacinta Dantas de Medeiros. Avaliação do efeito sinérgico antibacteriano de plantas constituídas por compostos sulfurados (Co-orientadora). 2009.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria das Graças Almeida

3. Izabel Maria Tomaz. Avaliação do potencial antibacteriano de espécies da flora brasileira sobre a bactéria *Streptococcus mutans*. (Co-orientadora). 2011.

Orientador: Prof. Dr. Matheus de Freitas Fernandes Pedrosa

4. Marília Pinheiro Cavalcante. Investigação de substância tipo bacteriocinas em amostras não humanas e ambiental. (Co-orientadora). 2012.

Orientador: Prof. Msc. Ivanaldo Amâncio da Silveira

Trabalhos apresentados em eventos

OLIVEIRA, P.C.A.; SILVA, I.V.; SOARES, L.A.L.; **SANTOS, E.C.G.**; Wanderley, A.G.; CARVALHO, M.A.R.; FARIAS, L.M; SOUZA, T.P. Antibacterial activity *in vitro* of *Psidium guajava* leaves extract, dry by spraying. In: 20th International Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, 2008, Fortaleza.

XAVIER JÚNIOR, F.H.; ALENCAR, E.N.; MORAIS, A.R.V.; SILVA, K.G.H.; **SANTOS, E. C. G.**; EGITO, E.S.T. Avaliação da atividade antimicrobiana do óleo de copaíba. In: I Simpósio Nacional em Ciências Farmacêuticas Básicas e Aplicadas, 2009, Natal.

MEDEIROS, A.J.D.; **SANTOS, E.C.G.** Avaliação do efeito sinérgico antibacteriano de plantas constituídas por compostos sulfurados. In: Congresso Norte-Nordeste de Pesquisa e Inovação- V CONNEP, 2010, Maceió.

MEDEIROS, A.J.D.; APÔLONIO, A.C.M.; FARIAS, L. M.; CARVALHO, M. A. R.; **SANTOS, E.C.G.**; ALMEIDA, M.G. Avaliação do efeito sinérgico antibacteriano de plantas constituídas por compostos sulfurados. In: 62^a Reunião Anual da SBPC, 2010, Natal.

XAVIER JÚNIOR, F.H. ; SILVA, K.G.H. ; ALENCAR, E.N. ; MORAES, A. R. V. ; **SANTOS, E. C. G.** ; EGITO, E.S.T. . Controle de qualidade microbiológico e estudo da atividade antibacteriana de sistemas microemulsionados e do óleo de copaíba contra *Staphylococcus epidermidis*. In: 62^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência, 2010, Natal.

XAVIER JUNIOR, F.H. ; SILVA, K.G.H. ; MORAES, A. R. V. ; ALENCAR, E.N. ; **SANTOS, E.C.G.** ; EGITO, E.S.T. . Estudo da concentração inibitória mínima do óleo de copaíba em cepas bacterianas do gênero *Staphylococcus*. In: 62ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência, 2010, Natal.

XAVIER JUNIOR, F.H.; SILVA, K.G.H.; ALEXANDRINO-JÚNIOR, F.; ALENCAR, E.N.; MORAES, A. R. V.; **SANTOS, E.C.G.**; ARAÚJO, I. B.; EGITO, E.S.T. Evaluation of antibacterial activity of copaiba oil colloidal systems. In: 70th FIP World Congress of Pharmacy/Pharmaceutical Sciences, 2010, Lisboa.

XAVIER JUNIOR, F.H.; ALENCAR, E.N.; MORAES, A. R. V.; SILVA, K.G.H.; **SANTOS, E.C.G.**; ARAÚJO, I. B.; EGITO, E.S.T. Óleo de Copaíba como antifúngico natural: estudo pela técnica de difusão em ágar. In: XXI Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, 2010, João Pessoa.

MEDEIROS, A.J.D. ; **SANTOS, E.C.G.** . Avaliação do efeito sinérgico antibacteriano do *Allium sativum* e *Allium cepa*, 2012, Santos.

CAVALCANTE, M. P.; LOPES, H.F.S; BRAZ, M.R.S.; **SANTOS, E.C.G.**; SILVEIRA, I. A. Ação antibacteriana de substância tipo bacteriocina produzida pela *Pseudomonas aeruginosa* isolada de sabonete líquido. CIENTEC - UFRN, 2012, Natal.

Artigo aceito para publicação

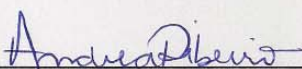
CAVALCANTE, M. P.; LOPES, H.F.S; SILVEIRA, I. A.; **SANTOS, E.C.G.** Investigação de bacteriocinas em amostras não humanas e ambientais. FACIDER Revista Científica, 2013.



TERMO DE ACEITAÇÃO DE ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO

A FACIDER Revista Científica, por meio do presente termo, declara que o artigo intitulado "INVESTIGAÇÃO DE SUBSTÂNCIA TIPO BACTERIOCINAS EM AMOSTRAS NÃO HUMANAS E AMBIENTAIS", de autoria de MARÍLIA PINHEIRO CAVALCANTE, HELENA DE FÁTIMA SILVA LOPES, IVANALDO AMÂNCIO DA SILVEIRA e ELIZABETH CRISTINA GOMES DOS SANTOS, foi aceito para publicação na 3ª edição do mencionado periódico eletrônico, disponível em www.revista.facider.com.br a partir de maio de 2013.

Data: 23/04/2013



FACIDER Revista Científica

