



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ACRE
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
DA SAÚDE NA AMAZÔNIA OCIDENTAL



**USO DO EXTRATO DA COPAÍBA (*Copaifera multifera*) Heyne EM BACTÉRIA
PATOGÊNICAS**

Aluno: Anne Caroline Medeiros Vasconcelos

Orientador: Prof. Dr. Fernando Sergio Escocio Drummond Viana de Faria

Coorientador: Prof. Dr. Anselmo Ruiz Rodriguez Fortunato

RIO BRANCO – ACRE
2018



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ACRE
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
DA SAÚDE NA AMAZÔNIA OCIDENTAL



**USO DO EXTRATO DA COPAÍBA (*Copaifera multifera*) Heyne EM BACTÉRIA
PATOGENICAS**

Aluno: Anne Caroline Medeiros Vasconcelos

Orientador: Prof. Dr. Fernando Sergio Escocio Drummond Viana de Faria

Coorientador: Prof. Dr. Anselmo Ruiz Rodriguez Fortunato

Defesa de Qualificação apresentada à Universidade Federal de Acre como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde na Amazônia Ocidental.

RIO BRANCO – ACRE
2018



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ACRE
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
DA SAÚDE NA AMAZÔNIA OCIDENTAL



**USO DO EXTRATO DA COPAÍBA (*Copaifera multifera* Heyne) EM BACTÉRIA
PATOGENICAS**

Aluno: Anne Caroline Medeiros Vasconcelos

COMISSÃO EXAMINADORA

Presidente: Prof.Dr. Fernando Sergio Escocio Drumond Viana de Faria
(Orientador)
Universidade Federal do Acre – UFAC

Examinadores:

Prof. Dr. Diego Castro Musial
Membro Externo

Prof. Dra. Mariane Arnoldi da Silva
Membro externo

Dedico esta, bem como todas as minhas demais conquistas, a minha amada filha Geovana Luiza Vasconcelos Salmazo, aos meus queridos pais Maximo Damasceno Vasconcelos Filho e Maria do Socorro Medeiros Vasconcelos, minhas irmãs Janaína Medeiros Vasconcelos e Jaiane Medeiros Vasconcelos e por último, mas não menos importante, meu esposo Guilherme Salmazo.

RESUMO

Há muitos anos usam-se plantas como terapia de processos infecciosos. O uso de substâncias naturais tem se tornado de grande importância na medicina como controle de infecções, visto que apesar de os antimicrobianos derivados de plantas serem menos potentes, os vegetais combatem infecções com sucesso. No Brasil a abundância de plantas medicinais proporciona a preparação de chás, óleos e extratos utilizados no tratamento de doenças e grande parte da população faz uso de terapia. Dentre as plantas medicinais mais estudadas do mundo encontram-se as pertencentes ao gênero *Copaifera*, e as principais características terapêuticas associadas a copaíba são: ação anti-inflamatória, cicatrizante, anti-séptica, antibacteriana, germicida, antitumoral, analgésica, diurético e expectorante. Nesse contexto, o presente trabalho tem por objetivo geral avaliar o potencial antimicrobiano do extrato bruto hidroalcoólico da folha da copaíba em algumas bactérias patogênicas. No presente estudo, foi testado o extrato hidroalcoólico a 10% da folha da copaíba nas concentrações de 50, 100 e 150 mg/mL nas bactérias de estipes de *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Klebsiella*, *Enterococcus* e *Escherichia* e o resultado foi obtido a partir da medição de crescimento de halo. As bactérias de estipes de *Staphylococcus*, *Klebsiella* e *Enterococcus* apresentaram-se sensíveis nas concentrações testadas, em contra partida as *Streptococcus* e *Escherichia* testadas, apresentaram-se resistentes. Com os presentes resultados e mais estudos, conclui-se que o extrato da folha da copaíba pode ser apresentado como um futuro fármaco antimicrobiano.

PALAVRAS CHAVES: Patógenos humanos. Extratos antibacteriano. Copaíba. Extratos brasileiros. Atividade antibacteriana.

ABSTRACT

For many years plants have been used as therapy for infectious processes. The use of natural substances has become of great importance in medicine as infection control, since despite the fact that antimicrobials derived from plants are less potent, vegetables fight infections successfully. In Brazil the abundance of medicinal plants provides the preparation of teas, oils and extracts used in the treatment of diseases and a large part of the population makes use of therapy. Among the most studied medicinal plants in the world are those belonging to the *Copaifera* genus, and the main therapeutic characteristics associated with copaiba are: anti-inflammatory, healing, antiseptic, antibacterial, germicidal, antitumor, analgesic, diuretic and expectorant action. In this context, the present work has the general objective to evaluate the antimicrobial potential of the crude hydroalcoholic extract of the copaiba leaf in some pathogenic bacteria. In the present study, the 10% hydroalcoholic extract of the copaiba leaf was tested at concentrations of 50, 100 and 150 mg / mL in *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Klebsiella*, *Enterococcus* and *Escherichia* strains, and the result was obtained from the measurement of halo growth. *Staphylococcus*, *Klebsiella* *Enterococcus* *staphylococci* bacteria were sensitive at the concentrations tested, whereas *Streptococcus* and *Escherichia* tested were resistant. With the present results and further studies, it was concluded that the copaiba leaf extract can be presented as a future antimicrobial drug.

KEYWORDS: Human pathogens. Antibacterial extracts. Copaiba.
Brazilian extracts. Antibacterial activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Representação da árvore <i>Coáífera multifuga</i> Heyne	11
Figura 2	Representa o fruto da copaibeira	11
Figura 3	Espectroscopia de Absorção na Região do Ultravioleta visível	20
Figura 4	Espectroscopia de Absorção na Região do Ultravioleta visível	21
Figura 5	Estufa bacteriológica utilizada na incubação das bactérias testadas	22
Figura 6	Agar Muller Hinton	23
Figura 7	Bactérias testadas	27

LISTA DE ABREVEATURAS

ITU	-	Infecção do trato urinário
<i>E.coli</i>	-	<i>Escherichia coli</i>
EPEC	-	<i>Escherichia coli</i> enteropatogênica
EHEC	-	<i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica
EIEC	-	<i>Escherichia coli</i> enteroinvasiva
ETEC	-	<i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica
EaggEC	-	<i>Escherichia coli</i> enteroagregativa
STEC	-	<i>Escherichia coli</i> shigatoxigênica
HUS	-	Síndrome uremica hemorrágica
UV-VIS	-	Ultravioleta visível
UFAC	_	Universidade Federal do Acre
LB	_	Luria Bertani

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	11
1.1	A Copaíba.....	11
1.2	Breve histórico do uso da Copaíba.....	13
1.3	Uso medicinal da Copaíba.....	14
1.4	Bactéria causadoras de infecções.....	14
1.4.1	Principais bactérias causadoras de infecções de tecido cutâneo e subcutâneo.....	15
1.4.2	Principais bactérias associadas a infecções nas vias aéreas.....	15
1.4.3	Principais bactérias causadoras de infecções no trato urinário.....	16
1.4.4	Bactérias causadoras de infecções gastrointestinais.....	17
1.5	Resistência bacteriana	18
2.	OBJETIVOS	20
2.1	Objetivo geral.....	20
3	MATERIAL E METODOS.....	21
3.1	Extração e preparação do extrato da copaíba.....	21
3.1.1	Coleta das folhas.....	21
3.1.2	Seleção do material botânico.....	21
3.1.3	Preparação das folhas de <i>Copaifera multijuga</i> Hayne.....	21
3.2.	Caracterização química do extrato de <i>Copaifera multijuga</i> Hayne	21
3.2.1	Medição do pH.....	22
3.2.2	Caracterização espectroscópica.....	22
3.3	Microrganismos.....	23
3.4	Preparo e padronização da suspensão bacteriana.....	25
3.5	Atividade Antibacteriana <i>in vitro</i>.....	25
3.5.1	Método de difusão em agar.....	25
3.5.2	Concentração inibitória mínima.....	26
3.6	Análise estatística.....	26
4	RESULTADO E DISCUSSÃO.....	27
	REFERENCIAS.....	28

1. INTRODUÇÃO

Há muitos anos usam-se plantas como terapia de processos infecciosos (MENEZES; SOUZA; BOTELHO, 2004). Devido ao aumento da resistência bacteriana a diversos antibióticos, o uso de substâncias naturais tem se tornado de grande importância na medicina como controle de infecções, visto que, substâncias naturais, tais como extratos e óleos de folhas e caule de árvores, mostram efeitos antimicrobianos (PASCHOAL et al., 2014). Apesar de os antimicrobianos derivados de plantas serem menos potentes, os vegetais combatem infecções com sucesso (CARVALHO, 2014).

No mundo, estima-se que exista aproximadamente 250.000 espécies de plantas e apenas 10% destas foram testadas em ensaios biológicos. No Brasil a abundância de plantas medicinais proporciona a preparação de chás, óleos e extratos utilizados no tratamento de doenças (CAVALCANTE, CAVALCANTE e BIESKI, 2017) e grande parte da população faz uso de terapia com produtos de origem natural como fonte alternativa de medicação, sendo que sua aplicação abrange desde o combate ao câncer até o tratamento de infecções bacterianas (FURTADO, et.al, 2015), e a razão para tal uso ocorre principalmente pelo baixo custo e pela cultura de utilizar produtos naturais para se tratar doenças (CAVALCANTE, CAVALCANTE, BIESKI, 2017).

Dentre as plantas medicinais mais estudadas do mundo encontram-se as pertencentes ao gênero *Copaifera* (SANTANA et al., 2014), e as principais características terapêuticas associadas a copaíba são: ação anti-inflamatória, cicatrizante, anti-séptica, antibacteriana, germicida, antitumoral, analgésica, diurético e expectorante (CARVALHO e MILKE, 2014).

1.1 A Copaíba

As copaibeiras são árvores que atingem entre 10 a 40 metros de altura, diâmetro de 0,4 e 4 metros, possuem casca aromática, folhagem densa, flores pequenas (SANTANA, et al., 2014). Essas árvores chegam a viver 400 anos e são encontradas na África Ocidental, América Latina e América do Sul, onde no Brasil, está presente nas regiões Sudeste, Centro-Oeste e Amazônica (PIERI, MUSSI, MOREIRA, 2009). A figura 1 apresenta a árvore copaibeira:

FIGURA 1. A figura representa a *Copaifera multijuga* Hayne

FONTE: MOREIRA, 2015.



A) Caule da copaibeira e B) representa as folhas da copaibeira)

Os frutos das copaibeiras são secos, do tipo legume bivalvo e sementes pretas envoltas por arilo amarelo (SANTANA, et.al, 2014). A figura 2 abaixo, é uma imagem que mostra com detalhes a característica do fruto da copaibeira.

FIGURA 2. Fruto da copaibeira

FONTE: SANTANA, et al., 2009



A árvore de copaíba pertence à família *Leguminosae*, subfamília *Caesalpinoideae* e ao gênero *Copaífera*. Seu gênero compreende 72 espécies, em que existem mais de 20 no Brasil; dessas, 17 são endêmicas, dentre as quais as principais encontradas no país são: *Copaífera officinalis* L., *Copaífera reticulata* Ducke, *Copaífera multijuga* Hayne, *Copaífera confertiflora*, *Copaífera langsdorffii*, *Copaífera cariacea* e *Copaífera cearensis* Huber ex Ducke (GARCIA, YAMAGUCHI, 2012). Na Amazônia brasileira a espécie de copaíba mais conhecida é a conhecida *Copaífera multijuga* Hayne, sendo muito utilizada na medicina popular da região (LUCCA, 2017).

a. Breve histórico do uso da Copaíba

A origem do nome copaíba vem do tupi, a origem do nome copaíba vem do tupi, Kupa'iwa e kupa'u, que significa a árvore de depósito, em alusão ao óleo que guarda em seu interior (SALVADOR, 1975). As propriedades medicinais da copaíba eram muito conhecidas pelos índios latino-americanos, tal conhecimento vem da observação do comportamento de alguns animais feridos, que se atriavam no tronco das árvores de copaíba, na busca da cicatrização de suas feridas (VEIGA JUNIOR e PINTO, 2002).

A copaíba foi citada pela primeira vez em uma carta publicada em Estrasburgo no ano de 1534, em que uma droga utilizada pelos índios nativos possuía um excelente efeito curativo de feridas e outras enfermidades, então desde os primeiros anos de descobrimento do Brasil, a copaíba vem sendo indicada para diversos fins farmacológicos (PIERI; MUSSI e MOREIRA, 2009).

Há algumas espécies de copaíbeira são de interesse madeireiro, devido apresentarem superfície lisa, lustrosa, durável, de alta resistência e baixa permeabilidade. Essa árvore também tem sido utilizada para a fabricação de carvão pelas indústrias de construção civil e naval. Dessa árvore é extraído um óleo resina que é muito utilizado na medicina tradicional popular (PIERI, MUSSI, MOREIRA, 2009).

1.3 Uso medicinal da Copaíba

O óleo resina de copaíba é obtido a partir da casca do caule sobre o etanol e é utilizado com finalidade de cicatrização (MONTES et al., 2009). Os óleos de copaíba são amplamente utilizados, sendo administrados oralmente ou por aplicação tópica do óleo em pomadas. Nos estados do Norte é comum a prática do uso do óleo de copaíba para tratar infecções na garganta (VEIGA JR, PATITUCCI, PINTO, 1997).

O extrato bruto da copaíba, também vem sendo apontado por alguns autores como um potente antimicrobiano (VAHABI, NAJAFI, ALIZADEH,2011). Argenta et al., 2012, em uma pesquisa de testar o efeito antimicrobiano de extratos de plantas em bactéria cariogênicas, mostrou que o extrato bruto da folha da copaíba apresentou efeitos antibacteriano.

O emprego do extrato aquoso de folhas apresenta certas vantagens em relação ao óleo, pois, o processo para a extração do óleo precisa de procedimentos especiais, dificultando a sua utilização (PIERI, 2010). O uso de folhas no preparo do extrato tem as vantagens de uma produção abundante e do extrato ser de fácil preparo (VIANA, PRATES, RIBEIRO, 2006). A partir dos extratos e óleos das plantas, são obtidos compostos que têm demonstrado eficiência no controle do crescimento de microrganismos (CARVALHO, et al., 2014).

A busca de antimicrobianos de origem natural em alternativa aos antibióticos convencionais vem despertando interesse na classe científica pelo fato dos microrganismos responsáveis por infecções, adquirirem resistência aos medicamentos administrado (PATZER, 2015).

Organismos como fungos, protozoários e bactérias, são geralmente associados a patologias graves em uma ampla variedade de infecções. Podem se multiplicar e sobreviver em vários reservatórios e, a partir destes, serem transmitidos provocando infecções em um novo hospedeiro (RODRIGUES et al., 2006).

Os perigos das infecções microbianas decorrem de enfermidades transmissíveis através do contato com a pele, contato com mucosas, pelas vias aéreas e pela ingestão e toxinfecções alimentar, em que os principais causadores de doenças, estão em destaque as bactérias (PIRES, 2011).

b. Bactérias causadoras de infecções

1.4.1 PRINCIPAIS BACTÉRIAS CAUSADORAS DE INFECÇÕES DE TECIDO CUTÂNEO E SUBCUTÂNEO

As infecções cutâneas e de tecidos moles estão entre as mais comuns, principalmente em pacientes que se apresentam aos departamentos de emergência. Estas infecções por muitas vezes são severas o suficiente para induzir choque séptico e justificar entrada de unidade de terapia intensiva (MALHEIRO, et.al.,2017).

Em destaque nas infecções de pele tem-se o *Staphylococcus*, causando impetigo, foliculite, furunculose, carbunculose e celulite. Dentro destas as mais frequentes são as *Staphylococcus aureus*, comum na microbiota transitória, e *Staphylococcus epidermidis* encontrada normalmente na pele, onde uma ruptura na barreira natural, torna propício o surgimento de infecções oportunistas pela mesma (GALLINA, 2015).

Um outro grupo de bactérias que podem causar infecções de pele, tais como impetigo, são as *Streptococcus* que predomina em regiões subtropicais e a transmissão ocorre via contato com a pele (BESSEN, 2017); a erisipela e a celulite são outros exemplos de infecções de pele decorrente da infecção por este microorganismo (BERNARDI, 2012).

A *Pseudomonas aeruginosa* é comumente encontrada em ambientes nosocômiais, sendo responsável por infecções de pele, como foliculite em unidade de queimados e de terapia intensiva tendo como fator de risco a idade avançada e a imunossupressão do paciente (JUNIOR, 2014).

A resistência da *Pseudomonas aeruginosa* a vários antibióticos vem crescendo consideravelmente (LIMA, 2015), e tal resistência deve-se ao resultado da combinação de uma baixa permeabilidade da membrana externa, aumento expressão intrínseca e desrepressão de enzimas beta lactamases do tipo AmpC (NEVES, 2011).

1.4.2 PRINCIPAIS BACTÉRIAS ASSOCIADAS A INFECÇÕES NAS VIAS AÉREAS

De acordo com Yanhong, 2016, as bactérias que se destacam como causadoras de infecções do trato respiratório superior são: *Staphylococcus* e *Moraxela*, colonizando frequentemente a cavidade oral e nasofaringe, associando-se a infecções em pacientes imunodeprimidos. O *Pneumococo*, *Moraxela* e *Streptococcus*, serão patógenos comuns de infecções dos seios paranasais e orelha média.

As infecções do trato respiratório inferior, podem ocorrer na comunidade ou em ambiente nosocômial. Em adultos saudáveis, tem a predominância de *Streptococcus viridans*, porém em pacientes com estado de saúde crítico, destacam-se *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa* (AMARAL, 2009). A principal colonização dessas bactérias ocorre no biofilme dental, e a forma de entrada no trato respiratório inferior se dá pela aspiração de secreções da orofaringe, inalação de aerossóis contaminados e materiais hospitalares utilizados no trato respiratório. A infecção por esses patógenos, podem ocorrer em 45% em pessoas saudáveis e 70% em imunodebilitados (POPOV, et al., 2014).

Uma bactéria em destaque, como causadora de pneumonias, principalmente em ambientes hospitalares, será a *Klebsiella pneumoniae*, sendo um microrganismo responsável por infecções oportunistas em pacientes imunocomprometidos, causando quadros graves, de grande mortalidade (TUMBARELLO et al., 2015) e de difícil tratamento nesses indivíduos, devido à grande resistência aos antimicrobianos dessa bactéria quando adquirida em ambiente nosocômial (HUMPHRIES, et al., 2010).

Um outro microrganismo de grande relevância para saúde, encontra-se a *Mycobacterium tuberculosis*. Estima-se que a maioria das pessoas do mundo estão infectada por este bacilo mas não possuem sinais, sintomas e nem transmissão, porém 15% dessa população está susceptível ao desenvolvimento da forma clínica da tuberculose ativa nos primeiros cinco anos após a infecção inicial (GETAHUN et al., 2015).

1.4.3 PRINCIPAIS BACTÉRIAS CAUSADORAS DE INFECÇÕES NO TRATO URINÁRIO (ITU)

No âmbito da infecção da ITU, destacam-se bactérias Gram-negativas, como espécies de *Escherichia coli* (*E.coli*), *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Proteus* e bactérias Gram-positivas, como *Enterococcus* e *Staphylococcus saprophyticus*. A *E. coli* é o organismo mais comum (NIRAJAN, MALINI, 2014), encontrada em cerca de 80% a 90% dos casos de infecções das vias urinária não complicadas (DOUMITH et al., 2015), seguida por *Staphylococcus saprophyticus* como segundo maior das ITUs em mulheres adultas jovens e crianças (MONTAMEDIFA, et al., 2016).

Entre as mulheres, as taxas de ITU são maiores devido a cavidade vaginal e a abertura retal estarem próximas. As mulheres também possuem têm mais áreas úmidas onde as bactérias crescem e são mais propensas a ascender à bexiga feminina do que a bexiga masculina por causa do comprimento mais curto da uretra. A prevalência geral de bacteriúria assintomática em mulheres é de 3,5% podendo aumentar com a idade (FOXMAN, 2014) . Em crianças os principais microrganismos causadores de ITU são a *Enterobacteria*, *Klebsiella* e principalmente *E.coli* (FAN.et al.,2013).

Acinetobacter baumannii é considerada também uma das principais causas de infecções do trato urinário em ambiente nosocomial, podendo causar pneumonia grave, meningite e bacteremia, sendo resistente a uma gama de antimicrobiano (ZHANG, et al., 2017)

1.4.4 BACTÉRIAS CAUSADORAS DE INFECÇÕES GASTROINTESTINAIS

A diarreia infecciosa é geralmente causada por bactérias e está relacionada, principalmente, à idade, estado imunológico e alimentação inadequada. É considerada a segunda doença mais importante de causa de morte infantil (SADKA, et al., 2015).

A *E. coli* é a principal causadora de doenças gastrintestinais, sendo dividida em cinco principais grupos: enteropatogênicas (EPEC), enterohemorrágicas (EHEC), enteroinvasivas (EIEC), enterotoxigênicas (ETEC) e enteroagregativas (EaggEC), onde a EPEC é frequentemente isolada em surtos esporádicos doenças entéricas especialmente em lactentes, com altos índices de mortalidade. A presença de *E. coli* nos alimentos, em quantidades elevadas, é um grande indicador para possibilidade de contaminação fecal (FRANCO, 2010).

Dentro da espécie da EHEC, está o grupo de *E.coli shigatoxigênicas* (STEC), sendo este um tipo de bactéria quem possui a toxina shiga como principal fator de virulência e está associada a diarreia, colites hemorrágicas (HUS) (BROOKS, et al., 2005), que podem evoluir para síndrome urêmica hemolítica associada à diarreia e púrpura trombocitopênica trombótica (TARR, et al., 2005), 40% dos pacientes com HUS desenvolvem a longo prazo disfunção renal e cerca de 3-5% dos pacientes morrem durante a fase aguda da doença não havendo tratamento específico (ARDISSINO,2014).

A STEC possui mais de 100 genótipos e o mais popular deles é a *E.coli O157: H7* conhecida pela primeira vez em 1982, porém sua popularidade ocorre em 1993 em um surto de colite hemorrágica associada a HUS ligada a ingestão de carne de hambúrgueres mal cozida em um fast food. É considerada uma causa importante de insuficiência renal aguda em crianças (RANGEL et al., 2005).

Um outro tipo de bactéria enteropatogênica é a *Shigella*, responsável por doenças diarreicas em crianças com idade inferior a cinco anos, sendo estabelecido como um dos quatro principais patógenos causadores de doenças desentéricas (LIVIO, et al., 2014). Essa bactéria é capaz de invadir o epitélio do cólon e causar gastroenterites e diarreias, além de ser a terceira principal causadora de intoxicação alimentar (PARSAEI et.al,2016). A *Shigella* que é um agente etiológico da disenteria, com uma incidência estimada de cerca de 160 milhões de pessoas por ano, sendo que a contaminação ocorre por via oral fecal (ZUMSTEG, et al., 2014).

Outros microorganismos importante como causadores de infecção gastrintestinal serão: *Salmonella enteritidis* é uma das principais causas de salmonelose invasiva, com altas taxas de letalidade em países subdesenvolvidos (FEASEY, et. Al, 2016).

1.5 Resistencia bacteriana

A evolução da resistência microbiana é um fenômeno natural e crescente onde os microrganismos desenvolvem formas de resistência a maioria dos antimicrobianos e a indústria farmacêutica não consegue acompanhar tal evolução para a criação de novas drogas (PATZER, 2015). O Centro para Controle e Prevenção de Doenças – CDC/EUA avalia que, por ano, aproximadamente dois milhões de doenças e 23.000 mortes são provocadas por bactérias que apresentam resistência antibiótica nos Estados Unidos (WASHINGTON, 2014) e nas últimas décadas ocorreu o aumento de microrganismos mais resistentes a um número mais significativo de antibióticos utilizados (LIMA, 2018). O Brasil vem enfrentando um grande desafio para saúde pública, com o surgimento de novos mecanismos de resistência bacteriana (PATZER, 2015).

A gama de patógenos resistentes aos antimicrobianos é considerado um sério problema, pois por mais que as indústrias farmacêuticas tenham produzidos novos antibióticos e modificado alguns fármacos já existentes, o consumo excessivo de antibacterianos tem mostrado um aumento de resistência bacteriana, causando sério problema de saúde. Nesse contexto os medicamentos fitoterápicos estão sendo empregados como alternativas no tratamento contra diferentes patógenos, principalmente bactéria (CARVALHO, et.al, 2014).

O óleo de copaíba a muito tempo vem sendo utilizado como agente cicatrizante e antimicrobiano, porém sua extração possui dificuldades e pouco rendimento (VIANA, PRATES e RIBEIRO, 2006). Sendo o extrato da folha da copaíba mais fácil de extração e possuindo um maior rendimento, tornou-se relevante pesquisar seus efeitos antibacteriano.

2. OBJETIVOS

a. OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial antimicrobiano do extrato bruto hidroalcoólico da folha da copaíba em algumas bactérias patogênicas

b. OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Observar a eficácia do extrato bruto hidroalcoólico da copaíba em bactérias patogênicas gram positivas e gram negativas
- Relatar quais bactérias o extrato obteve melhor inibição de crescimento
- Determinar a concentração mínima inibitória do extrato nas bactérias onde o crescimento foi inibido

3. MATERIAIS E METODOS

3.1 Extração e preparação do extrato da copaíba

3.1.1 COLETA DAS FOLHAS:

As folhas da espécie *Copaifera multijuga* Hayne (CMH) foram coletadas na rodovia AC – 010, Est. de Porto Acre no km 18. As coordenadas de correspondência são: 9° 45' 16,7" S latitude e 67° 39' 48,5" W longitude, Rio Branco, Acre. A coleta das folhas foi realizada no período do mês de janeiro. A amostra coletada foi depositada no herbário da UFAC, e sua exsicata realizada pelo laboratório de Botânica da UFAC, cujo número do tomo da CMH é de 6572. O clima da região de cultivo é quente e úmido, caracterizado por pluviosidade em torno de 2.937 mm anuais, umidade relativa média de 89 % e temperatura média anual de 27.8 °C.

3.1.2 SELEÇÃO DO MATERIAL BOTÂNICO

As folhas de *Copaifera multijuga* Hayne foram selecionadas e lavadas com água destilada, de modo que, foram retiradas as folhas adultas, as partes danificadas e a poeira, após esse processo, realiza-se a coleta apenas das folhas jovens, e, em seguida foi colocada na estufa a temperatura de 50 °C até a secagem uniforme (MOREIRA, 2015).

3.1.3 PREPARAÇÃO DAS FOLHAS DE *Copaifera multifuga* Hayne

As folhas foram fragmentadas e maceradas em 20 ml de solução hidroalcoólica a 70%, obtendo-se extrato. A solução foi destilada à pressão reduzida em evaporador obtendo-se o extrato bruto seco a 10%. Após 72 horas, retiraram-se alíquotas que foram utilizadas no teste.

3.2 Caracterização química do extrato de *Copaifera Multijuga* Hayne

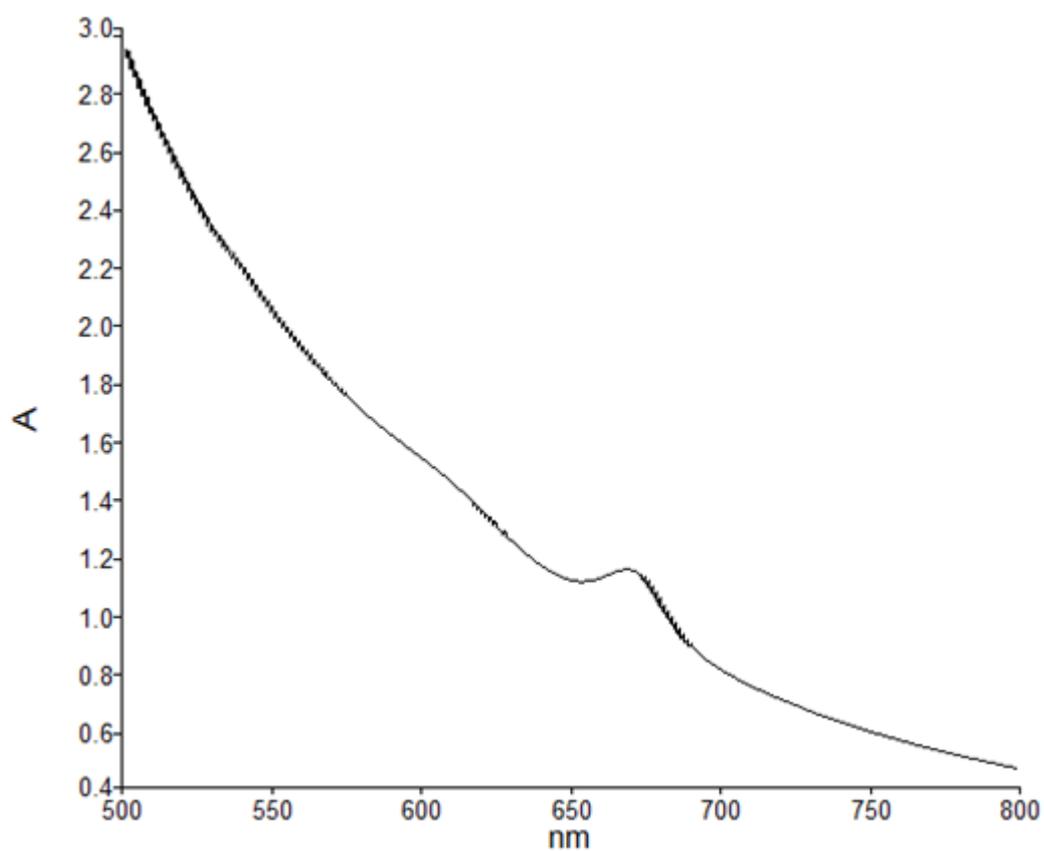
3.2.1 MEDIÇÃO DO pH

Para a obtenção do pH exato da CMH, utilizou-se o equipamento pH metro Microprocessado de Bancada 110V / 220V 10W, modelo Q 400 MT, da marca Quimis.

3.2.2 CARACTERIZAÇÃO ESPECTROSCÓPICA

A) Espectroscopia de Absorção na Região do Ultravioleta visível, na figura 3.

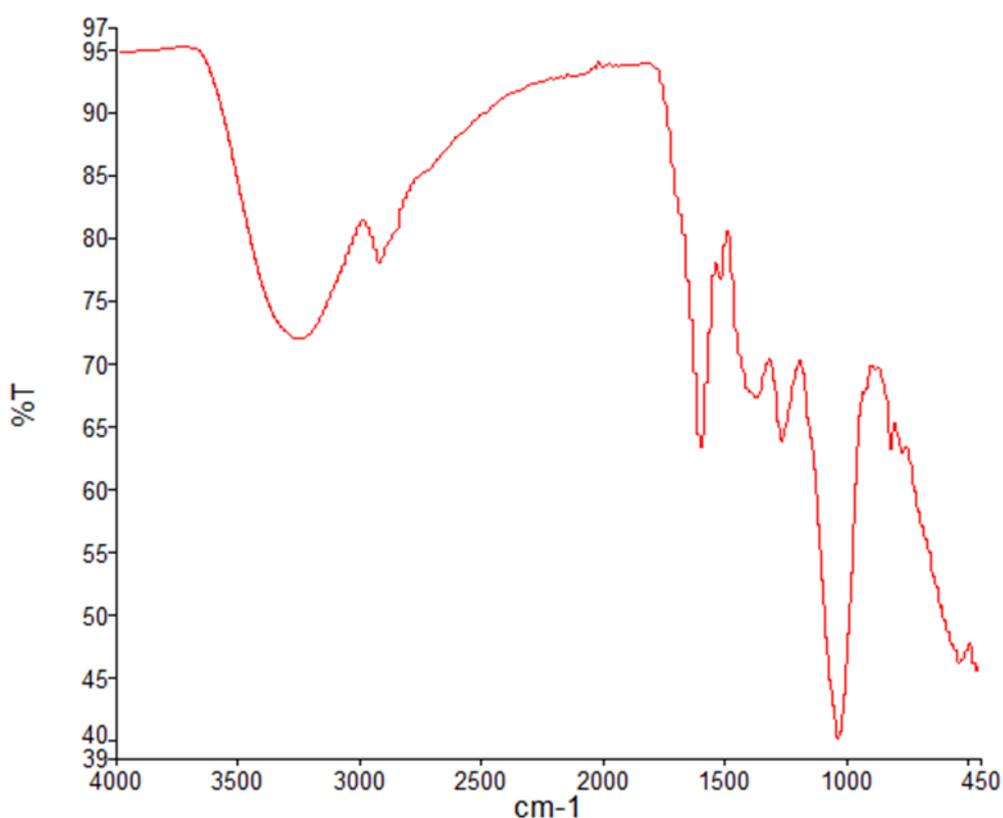
FIGURA 2. Espectroscopia de Absorção na Região do Ultravioleta visível



B) Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FT – IR)

A figura abaixo mostra a caracterização do extrato das folhas de *Copaifera multijuga* Hayne na espectroscopia infravermelho, figura 4.

FIGURA 3. Espectroscopia infravermelho



3.3 Microrganismos

Foram utilizadas estirpes de bactéria Gram positivas e Gram negativas catalogadas.

As cepas Gram positiva utilizadas foram de *Stafilococcus aureus* (ATCC 12598), *Streptococcus pneumoniae* (ATCC 11733) e *Enterococcus faecalis* (ATCC 4083). Dentre as cepas Gram negativas utilizadas foram: *Escherichia coli* (ATCC 10536) e *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 700603) Todas as estirpes sendo obtidas do laboratório de Microbiologia, da Rede de Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia Legal (Bionorte) na Universidade Federal do Acre.

Estas cepas foram mantidas sobre refrigeração, em meio ágar Muelle-Hinton, em placas de Petri e a uma temperatura de 8 a 10 °C.

A figura 3 apresenta a estufa bacteriológica a qual as cepas foram incubadas e a figura 4 mostra o meio utilizado para preparação das placas.

FIGURA 4. Estufa bacteriológica utilizada para o armazenamento dos meios de cultivo

FONTE: Imagem de Anne Vasconcelos



FIGURA 5. Agar *Mueller Hinton* utilizado para o cultivo das bactérias

FONTE: Imagem de Anne Vasconcelos



3.4 Preparo e padronização da suspensão bacteriana

Foram preparadas culturas das bactérias selecionadas, em ágar Mueller-Hinton (KASVI,). O cultivo foi autoclavado e incubado por 24 horas em estufa bacteriológica (QUIMIS, modelo ECB Digital) para teste de esterilidade. Em seguida foi transferida cada bactéria para frasco contendo 5ml de meio líquido LB (*Luria -Bertani*) (KASVI) e incubadas em estufa bacteriológica (QUIMIS, modelo ECB Digital) a 37°C, durante 6 horas, para atingir turbidez ótica de 0,5 na escala de Mc Farland, padronizada com solução salina estéril. As bactérias que passaram do padrão de turvação estabelecido por foram diluídas em solução salina a 0,9% até atingir o ideal.

3.5 Atividade Antibacteriana *in vitro*

3.5.1 METODO DE INFUSÃO EM AGAR

Seguiu-se a metodologia preconizada pelo NCCLSI (2003). O inóculo de cada microrganismo alvo foi padronizado na concentração de 10^8 UFC.mL⁻¹, e espalhado em superfície de placas de Petri contendo ágar *Mueller-Hinton* (KASVI). Após o preparo foram feitos poços no meio de cultivo e então inserido 20 µL de extrato das folhas de *Copaífera multifera Heyne*, seguindo o método de cup plate, preconizado pela NCCLS, 2003, e então, as placas foram para geladeira por 24 horas para uma melhor dispersão do extrato. Saindo da geladeira, as placas foram incubadas em estufa a 37 °C por 24 h. Pela produção de halos de inibição ≥ 11 mm indicava sensibilidade da bactéria; 12-14 mm sensibilidade intermediária; e ≤ 11 mm, resistência (JORGESEN, 2015). Como controle positivo foi utilizado o antibiótico amoxicilina de 500 mg (EMS) e, como controle negativo, água destilada.

3.5.2. Concentração inibitória mínima (CIM) e Concentração bactericida mínima (CBM)

Testou-se as concentrações de 50, 100 e 150 mg/mL de extrato de copaíba.

3.6 Análise estatística

Para obtenção dos resultados foi obtida em média e desvio padrão das três repetições.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O quadro a seguir mostra os resultados da leitura das placas com as bactérias, onde foi infundido o extrato.

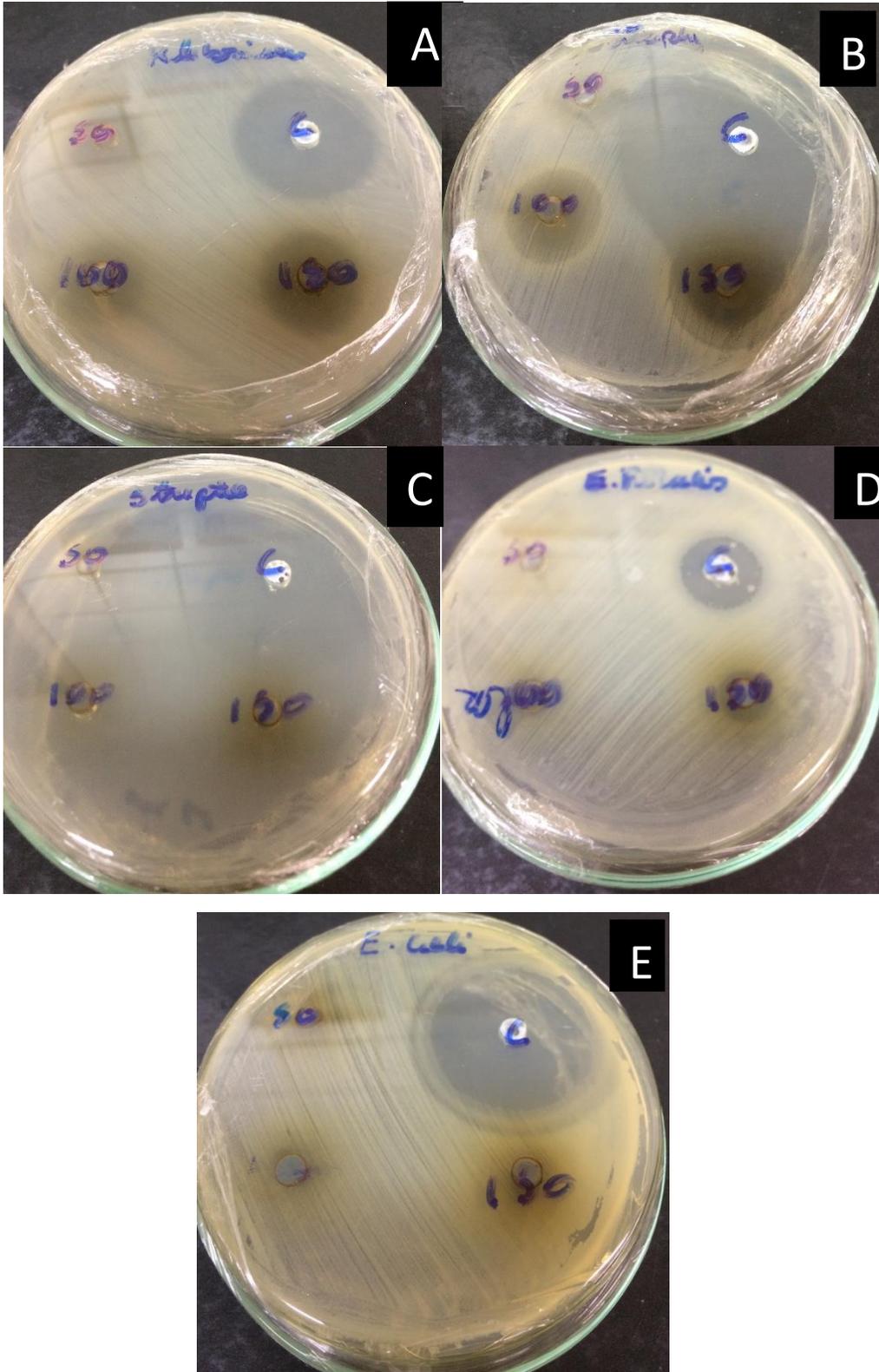
TABELA 1. Avaliação do crescimento bacteriano, baseado em análise do tamanho do halo (mm).

Microrganismos Avaliados	Concentração do extrato			Controle positivo
	50mg /mL	100mg /mL	150mg /mL	
<i>S. aureus</i>	12	14	18	50
<i>Streptococcus sp</i>	-	-	-	50
<i>Klebsiella sp</i>	12	14	18	30
<i>E. faecalis</i>	-	-	12	20
<i>E. coli</i>	-	-	-	42

De acordo com a medição de crescimento de halo, o extrato de copaíba inibiu o crescimento de algumas bactérias Gram positiva e Gram negativa. Esses resultados concordam com Souza (2015), quando utilizou uma emulsão à base de óleo de copaíba a 10% na odontologia, onde a copaíba mostrou os mesmos resultados.

Abaixo as imagens representam o halo de inibição de crescimento bacteriano, nas concentrações do extrato 50, 100 e 150 mg/mL e controle. Figura A para *Klebsiella*, figura B para *Staphylococcus*, figura C *Streptococcus*, figura D *Enterococcus* e figura E para *E. coli*.

FONTE: Imagem de Anne Vasconcelos



Das bactérias sensíveis ao extrato tem-se a *Staphylococcus aureus*, em que o extrato apresentou uma concentração mínima inibitória com concentração de 50 mg/mL com halo de inibição de 12mm. Faria et. al, 2017, ao avaliar o efeito antimicrobiano do óleo resina de copaíba em quatro espécies de *Staphylococcus* causadores de mastite bovina, aponta que a copaíba tem uma boa atividade antimicrobiana em *Staphylococcus*. Esses resultados são retificados por Bulgacov et.al, 2015, quando o mesmo autor avaliou a atividade do óleo de copaíba em 08 cepas de *Staphylococcus* causadoras de mastite bovina.

Os resultados obtidos em testes de atividade antimicrobiana *in vitro* demonstraram que houve ação inibitória do óleo resina de *Copaíba* sobre vinte e seis isolados de *Staphylococcus* coagulase positiva em otites de cães (ZIECH, et.al, 2013). Esses resultados afirmam que a copaíba possui atividade antibacteriana em *Staphylococcus*.

Quando avaliada a *Klebsiella*, a avaliação qualitativa *in vitro* da atividade antibacteriana do extrato da copaíba, pelo método de infusão em ágar, mostrou sensibilidade com halos de inibição ≥ 12 mm, em uma concentração de 50 mg/mL. De acordo com Masson, et. al, 2013, em um experimento com o óleo de copaíba, a atividade na mesma bactéria mostrou inibição do crescimento com um halo de inibição de 11 mm a 13mm.

A *E. faecalis* mostrou halo de inibição de crescimento em 12mm com extrato em concentração de 150 mg/mL. Não foram encontrados trabalhos que tivessem realizado experimento do extrato com tal bactéria.

As outras bactérias testadas se mostraram resistente ao extrato nas concentrações ensaiadas.

A copaíba apresenta atividade terapêutica de amplo espectro, sendo utilizada como agente anti-inflamatório e antimicrobiano (MALVEZZI, 2010). Alencar, 2016 relatou que a copaíba apresentou um efeito inibitório em células cancerígenas, através da promoção de um efeito anti-proliferativo em cultura celular e na diminuição da massa tumoral em ratos.

5. CONCLUSÃO

Com a realização desse trabalho podemos concluir que, apesar das variáveis, o extrato da folha de copaíba pode ser utilizado como fonte de tratamento alternativo ou adjuvante em infecções bacterianas.

Os resultados foram evidentemente positivos para o efeito antimicrobiano nas bactérias de estipes de *Klebsiella*, *Staphylococcus* e *Enterococcus*, onde as concentrações mínimas inibitória do extrato foram 50 mg/mL, 100 mg/ML e 150 mg/mL respectivamente.

Porém, mais estudos na área são necessários para se chegar a uma conclusão mais concreta.

Levando em conta que existem mais de 20 espécies de Copaíba no Brasil e todas as informações e estudos anteriormente citados, podemos concluir que os componentes diferem significativamente nas composições física e química e, conseqüentemente, no efeito antimicrobiano desejado.

Será necessária uma realização da cromatografia do extrato, para se saber quais as substancias do extrato que possui tal efeito antimicrobiano, para um melhor resultado.

REFERÊNCIAS

ALENCAR, Phillipe Nogueira Barbosa et al. Efeito do óleo de copaíba associado à radiação no tratamento de carcinossarcoma induzido em ratos. 2016.

AMARAL, Simone Macedo; DE QUEIRÓZ CORTÊS, Antonieta; PIRES, Fábio Ramôa. Pneumonia nosocomial: importância do microambiente oral. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 35, n. 11, p. 1116-1124, 2009.

APARECIDA DAMASCENO SOUZA, Geziella Aurea et al. Microbiological profile of skin and soft tissue infections in hospitalized patients from a university hospital. **REVISTA DE EPIDEMIOLOGIA E CONTROLE DE INFECÇÃO**, v. 6, n. 1, p. 33-36, 2016.

ARDISSINO, Gianluigi et al. Co-infection in children with bloody diarrhea caused by shiga toxin-producing *Escherichia coli*: data of the North Italian HUS network. **Journal of pediatric gastroenterology and nutrition**, v. 59, n. 2, p. 218-220, 2014.

BESSEN, Debra E. Tissue tropisms in group A *Streptococcus*: what virulence factors distinguish pharyngitis from impetigo strains. **Current opinion in infectious diseases**, v. 29, n. 3, p. 295, 2016.

BROOKS, John T. et al. Non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in the United States, 1983–2002. **The Journal of infectious diseases**, v. 192, n. 8, p. 1422-1429, 2005.

BULGACOV, A. et al. Susceptibilidade de *Staphylococcus* spp. ao óleo de copaíba, cloranfenicol ou enrofloxacinam cepas isolados de casos de mastite subclínica em vacas de leite. **Revista Investigação Medicina Veterina**, v. 14, n. 2, p. 90-95, 2015.

CARVALHO, Leonardo Olivieri; MILKE, Leidy Teresinha. IMPORTÂNCIA TERAPÊUTICA DO ÓLEO-RESINA DE COPAÍBA: ENFOQUE PARA AÇÃO ANTIINFLAMATÓRIA E CICATRIZANTE. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 11, n. 2, p. 12, 2014.

CARVALHO, A. F. et al. Avaliação da atividade antibacteriana de extratos etanólico e de ciclohexano a partir das flores de camomila (*Matricaria chamomilla* L.). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 16, n. 3, p. 521-26, 2014.

CAVALCANTE, José Wagner; CAVALCANTE, Vivian; BIESKI, Isanete. CONHECIMENTO TRADICIONAL E ETNOFARMACOLÓGICO DA PLANTA MEDICINAL COPAIBA (*Copaifera langsdorffii* Desf.). **Biodiversidade**, v. 16, n. 2, 2017.

CLSI. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically 6.ed. Wayne, PA, USA: National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2003a.

CORTÊS, Guadalupe et al. Role of lung epithelial cells in defense against *Klebsiella pneumoniae* pneumonia. **Infection and immunity**, v. 70, n. 3, p. 1075-1080, 2002.

DE OLIVEIRA BERNARDI, Natália; MEURER, Marisa; ARANTES, Vinícius Pereira. ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE EXTRATOS VEGETAIS DE *Azadirachta indica* “Neem” FRENTE A CEPA PADRÃO DE *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615. **Arquivos de Ciências da Saúde da UNIPAR**, v. 16, n. 3, 2015.

DOUMITH, M. et al. Rapid identification of major *Escherichia coli* sequence types causing urinary tract and bloodstream infections. **Journal of clinical microbiology**, v. 53, n. 1, p. 160-166, 2015.

FAN, Nai-Chia et al. Rise of community-onset urinary tract infection caused by extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* in children. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v. 47, n. 5, p. 399-405, 2014.

FARIA, Maria Juíva Marques de et al. ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF COPAIFERA SPP. AGAINST BACTERIA ISOLATED FROM MILK OF COWS WITH MASTITIS. **Ciência Animal Brasileira**, v. 18, 2017.

FEASEY, Nicholas A. et al. Distinct *Salmonella* Enteritidis lineages associated with enterocolitis in high-income settings and invasive disease in low-income settings. **Nature genetics**, v. 48, n. 10, p. 1211-1217, 2016.

FRANCO, R. M. et al. Checking the viability of *Escherichia coli* pathogens in fresh pork sausage. **Revista Acadêmica Ciências Agrárias e Ambientais**, v. 8, n. 3, p. 319-325, 2010.

FOXMAN, Betsy. Urinary tract infection syndromes: occurrence, recurrence, bacteriology, risk factors, and disease burden. **Infectious disease clinics of North America**, v. 28, n. 1, p. 1-13, 2014.

FURTADO, Jéssika Medeiros et al. Atividade Antimicrobiana do Extrato Aquoso de *Eucalyptus globulus*, *Justicia pectoralis* e *Cymbopogon citratus* Frente a Bactérias de Interesse. **Journal of Health Sciences**, v. 17, n. 4, 2015.

GALLINA, Darlila Aparecida et al. Caracterização de leites fermentados com e sem adição de probióticos e prebióticos e avaliação da viabilidade de bactérias lácticas e probióticas durante a vida-de-prateleira. **Journal of health sciences**, v. 13, n. 4, 2015.

GARCIA, Rosângela Fernandes; YAMAGUCHI, Miriam Harumi. Óleo de copaíba e suas propriedades medicinais: revisão bibliográfica. **Saúde e Pesquisa**, v. 5, n. 1, 2012.

GETAHUN, Haileyesus et al. Management of latent *Mycobacterium tuberculosis* infection: WHO guidelines for low tuberculosis burden countries. **European Respiratory Journal**, p. ERJ-01245-2015, 2015.

HU, Yanhong et al. Interventions to reduce childhood antibiotic prescribing for upper respiratory infections: systematic review and meta-analysis. **J Epidemiol Community Health**, v. 70, n. 12, p. 1162-1170, 2016.

HUMPHRIES, Romney M. et al. Successful treatment of pan-resistant *Klebsiella pneumoniae* pneumonia and bacteraemia with a combination of high-dose tigecycline and colistin. **Journal of medical microbiology**, v. 59, n. 11, p. 1383-1386, 2010.

JOÃO ANTÔNIO, Argenta et al. Efeito do extrato de romã (*Punica granatum*) sobre bactérias cariogênicas: estudo in vitro e in vivo. **Arquivos em Odontologia**, v. 48, n. 4, p. 218-226, 2012.

JONG, Gou-Mou et al. Rapidly fatal outcome of bacteremic *Klebsiella pneumoniae* pneumonia in alcoholics. **Chest**, v. 107, n. 1, p. 214-217, 1995.

JORGENSEN, James H.; TURNIDGE, John D. Susceptibility test methods: dilution and disk diffusion methods. In: **Manual of Clinical Microbiology, Eleventh Edition**. American Society of Microbiology, 2015. p. 1253-1273.

JUNIOR, VF Veiga; PINTO, Angelo C. O GÊNERO *Copaifera* L. **Quim. Nova**, v. 25, n. 2, p. 273-286, 2002.

KARMALI, Mohamed A. Infection by Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. **Molecular biotechnology**, v. 26, n. 2, p. 117-122, 2004.

LIMA, Lionete N. et al. Immobilization of *Pseudomonas fluorescens* lipase on hydrophobic supports and application in biodiesel synthesis by transesterification of vegetable oils in solvent-free systems. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, v. 42, n. 4, p. 523-535, 2015.

LIVIO, Sofie et al. *Shigella* isolates from the global enteric multicenter study inform vaccine development. **Clinical Infectious Diseases**, v. 59, n. 7, p. 933-941, 2014.

LUCCA, Letícia G. et al. Anti-inflammatory Effect from a Hydrogel Containing Nanoemulsified *Copaiba* oil (*Copaifera multijuga* Hayne). **AAPS PharmSciTech**, p. 1-9, 2017.

MALHEIRO, Luís Filipe et al. Infecções da pele e de tecidos moles na unidade de terapia intensiva: estudo retrospectivo em um centro terciário. **Rev Bras Ter Intensiva**, v. 29, n. 2, p. 195-205, 2017.

MASSON, D. S. et al. Atividade antimicrobiana do óleo-resina de copaíba (*Copaifera langsdorffii*) em bactérias de significância clínica em úlceras cutâneas. **Rev. Bras. PI. Med**, v. 15, n. 4 supl I, p. 664-669, 2013.

MENEZES, M. C.; SOUZA, M. M. S.; BOTELHO, ROSANA PINHEIRO. avaliação in vitro da atividade antimicrobiana de extratos de plantas brasileiras sobre bactérias isoladas da cavidade oral de cães. **Revista Univiversidade Rural, Rio de Janeiro**, v. 24, n. 2, p. 141-144, 2004.

MONTES, Livia V. et al. Evidências para o uso da óleo-resina de copaíba na cicatrização de ferida—uma revisão sistemática. **CEP**, v. 29102, p. 770, 2009.

MOREIRA, Thiago C. Caracterização físico-química, espectroscópica, cromatográfica, microbiológica e nanoemulsão do óleo essencial de *Copaifera multijuga* Hayne, p. 1-79, 2015.

MOTAMEDIFAR, Mohammad et al. Bacterial Etiologies and Antibiotic Susceptibility Pattern of Urinary Tract Infections at the Pediatric Ward of Dastgheib Hospital, Shiraz, Iran: A Three-Year Study (2009-2011). **Archives of Clinical Infectious Diseases**, v. 11, n. 2, 2016.

NCCLS. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard. Sixth Edition. NCCLS document M7-A6 (ISBN 1-56238 486-4), v.23, n.2, 2003. Disponível em: <http://www.sbac.org.br/pt/pdfs/biblioteca/clsi_OPASM7_A6.pdf>. Acesso em: 04 abril. 2017.

NEVES, Patrícia R. et al. *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente: um problema endêmico no Brasil. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 47, n. 4, p. 409-420, 2011.

NIRANJAN, V.; MALINI, A. Antimicrobial resistance pattern in *Escherichia coli* causing urinary tract infection among inpatients. **The Indian journal of medical research**, v. 139, n. 6, p. 945, 2014.

OLIVEIRA, Luiz Cláudio Borges Silva de et al. Presence of respiratory pathogens in the oral biofilm of patients with nosocomial pneumonia. **Revista Brasileira de terapia intensiva**, v. 19, n. 4, p. 428-433, 2007.

PARSAEI, Pouya et al. Shigellosis phytotherapy: A review of the most important native medicinal plants in Iran effective on *Shigella*. **Der Pharmacia Lettre**, v. 8, n. 2, p. 249-255, 2016.

PASCHOAL, Sara Gonçalves et al. Avaliação da Ação Antibacteriana de Extrato de *Trichilia Catigua* Contra As Bactérias Patogênicas de Origem Alimentar. **Blucher Food Science Proceedings**, v. 1, n. 1, p. 95-96, 2014.

PATZER, Caroline et al. Georreferenciamento de bactérias multirresistentes do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. **Journal of Infection Control**, v. 4, n. 3, 2015.

PIERI, F. A. et al. Óleo de copaíba (*Copaifera* sp.): histórico, extração, aplicações industriais e propriedades medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 11, n. 4, p. 465-472, 2009.

PIERI, F. A. et al. Efeitos clínicos e microbiológicos do óleo de copaíba (*Copaifera officinalis*) sobre bactérias formadoras de placa dental em cães. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 62, n. 3, p. 578-585, 2010.

PIRES, Carlos Eduardo de Toledo. Principais bactérias presentes em doenças transmitidas por alimentos (DTAs). 2011.

POPOV, Lauren et al. Three-dimensional human skin models to understand *Staphylococcus aureus* skin colonization and infection. **Frontiers in immunology**, v. 5, 2014.

RANGEL, Josefa M; et al. Epidemiology of *Escherichia coli* O157:H7 Outbreaks, United States, 1982–2002. **Emerging Infectious Diseases**, Georgia, v. 11, n. 4, p. 603-609, abril. 2005.

RAVEH-SADKA, Tali et al. Gut bacteria are rarely shared by co-hospitalized premature infants, regardless of necrotizing enterocolitis development. **Elife**, v. 4, p. e05477, 2015.

RODRIGUES, A. P. C.; NISHI, C. Y. M.; GUIMARÃES, A. T. B. Levantamento de bactérias, fungos e formas de resistência de parasitos em duas rotas de ônibus do transporte coletivo de Curitiba, Paraná. **RUBS, Curitiba**, v. 2, n. 2, p. 24-31, 2006.

SALVADOR, V. História do Brasil: 1500-1627. 6.ed. São Paulo: Melhoramentos, 1975. 63p.

SANTANA, Santana Rodrigues et al. Uso medicinal do óleo de copaíba (*Copaifera* sp.) por pessoas da melhor idade no município de Presidente Médici, Rondônia, Brasil. **Acta Agronômica**, v. 63, n. 4, p. 361-366, 2014.

SATO, Andréa de Fátima et al. Urinary nitrite and urinary-tract infection by gram-positive cocci. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 41, n. 6, p. 397-404, 2005.

SILVA JÚNIOR, Aldo Aprígio da. Epidemiologia das infecções hospitalares causadas por *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii* em um hospital de Salvador-BA. 2014.

TARR, Phillip I.; GORDON, Carrie A.; CHANDLER, Wayne L. Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* and haemolytic uraemic syndrome. **The Lancet**, v. 365, n. 9464, p. 1073-1086, 2005.

TUMBARELLO, Mario et al. Infections caused by KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*: differences in therapy and mortality in a multicentre study. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 70, n. 7, p. 2133-2143, 2015.

VAHABI, S.; NAJAFI, E.; ALIZADEH, S. In vitro antimicrobial effects of some herbal essences against oral pathogens. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 5, n. 19, p. 4870-4878, 2011.

VIANA, P. A.; PRATES, H. T.; RIBEIRO, PE de A. Uso do extrato aquoso de folhas de nim para o controle de *Spodoptera frugiperda* na cultura do milho. **Embrapa Milho e Sorgo. Circular técnica**, 2006.

ZHANG, Wenli et al. The role of LpxA/C/D and pmrA/B gene systems in colistin-resistant clinical strains of *Acinetobacter baumannii*. **Frontiers in Laboratory Medicine**, v. 1, n. 2, p. 86-91, 2017.

ZIECH, Rosangela E. et al. Atividade antimicrobiana do oleorresina de copaíba (*Copaifera reticulata*) frente a *Staphylococcus coagulase positiva* isolados de casos de otite em cães. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, n. 7, p. 909-913, 2013.

ZUMSTEG, Anna Brotcke et al. IcsA is a *Shigella flexneri* adhesin regulated by the type III secretion system and required for pathogenesis. **Cell host & microbe**, v. 15, n. 4, p. 435-445, 2014.

