



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

ANA ELISA BELOTTO MORGUETTE

**COLONIZAÇÃO POR *STREPTOCOCCUS AGALACTIAE* EM
GESTANTES E FORMULAÇÃO DE HIDROGEL PARA
CONTROLE DE INFECÇÃO NEONATAL**

Londrina
2018

ANA ELISA BELOTTO MORGUETTE

**COLONIZAÇÃO POR *STREPTOCOCCUS AGALACTIAE* EM
GESTANTES E FORMULAÇÃO DE HIDROGEL PARA
CONTROLE DE INFECÇÃO NEONATAL**

Dissertação de Mestrado apresentado ao Departamento de Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Microbiologia.

Orientador: Prof. Dra. Sueli Fumie Yamada Ogatta

Londrina
2018

ANA ELISA BELOTTO MORGUETTE

**COLONIZAÇÃO POR *STREPTOCOCCUS AGALACTIAE* EM
GESTANTES E FORMULAÇÃO DE HIDROGEL PARA CONTROLE
DE INFECÇÃO NEONATAL**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Departamento de Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Microbiologia.

BANCA EXAMINADORA



Orientador: Prof. Dra. Sueli Fumie Yamada Ogatta
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dra. Audrey Alesandra Stingen Garcia Lonni
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Eliandro Reis Tavares
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 23 de março de 2018.

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Morguette, Ana Elisa Belotto.

Colonização por *Streptococcus agalactiae* em gestantes e formulação de hidrogel para controle de infecção neonatal / Ana Elisa Belotto Morguette. - Londrina, 2018.
78 f. : il.

Orientador: Sueli Fumie Yamada-Ogatta.

Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, 2018.
Inclui bibliografia.

1. EGB - Tese. 2. prevalência - Tese. 3. óleo de copaiba - Tese. 4. hidrogel - Tese. I. Yamada-Ogatta, Sueli Fumie . II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia. III. Título.

Dedico este trabalho à minha família, pelo exemplo de vida e por me transmitir a melhor herança, a educação.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha orientadora, Profa. Dra. Sueli Fumie Yamada Ogatta, por todos os ensinamentos, oportunidades e compreensão que me concedeu desde o início da minha graduação, que foram imprescindíveis para minha formação profissional e pessoal.

Aos professores da banca, Profa. Dra. Audrey Alesandra Stingen Garcia Lonni e Prof. Dr. Eliandro Reis Tavares pela disponibilidade e colaboração em meu trabalho.

À Profa. Dra. Lucy Megumi Yamauchi Lioni, por todas as sugestões, aulas de redação científica e conselhos que acrescentaram ao meu trabalho e a minha formação.

Aos funcionários do Departamento de Microbiologia, pelo suporte técnico.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa e a Fundação Araucária, pelo apoio financeiro ao projeto.

Aos colegas do Laboratório de Biologia Molecular de Microrganismos, pelo companheirismo e toda colaboração na execução do trabalho.

À Briani Gisele Bigotto e Renata Lima Varella, por toda paciência, amizade e dedicação aos nossos trabalhos.

Aos amigos de Londrina, em especial Amanda, Ana Paula, Lorena, Mariana, Marina e Stephanie pela amizade e por se tornarem minha nova família.

Às minhas amigas Fernanda e Mariana, provas de que a distância e o tempo não destroem amizades verdadeiras.

À minha querida família, por todo apoio em minhas escolhas. Em especial, aos meus pais e meu namorado pelo suporte incondicional em todos os momentos mesmo à distância, meu eterno agradecimento.

Por fim, agradeço à Deus pelo dom da vida, por todas as oportunidades que me proporcionou e por nunca me deixar esmorecer.

MORGUETTE, Ana Elisa Belotto. **Colonização por *Streptococcus agalactiae* em gestantes e formulação de hidrogel para controle de infecção neonatal**. 2017. 76f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina (2018).

RESUMO

Streptococcus agalactiae (Estreptococo do Grupo B - EGB), é uma bactéria Gram-positiva e β -hemolítica que pode estar presente na microbiota do trato gastrointestinal e genital dos seres humanos. A colonização da mucosa vaginal de gestantes é um fator de risco importante para o desenvolvimento de infecções neonatais por EGB. A implantação da antibioticoterapia intraparto (API) para mulheres colonizadas contribuiu para a redução dessas infecções. Entretanto, houve aumento de isolados resistentes aos antimicrobianos de escolha para API. Assim, o monitoramento da colonização de gestantes por EGB, bem como estudos de novas substâncias antimicrobianas com potencial para prevenção da transmissão da bactéria são medidas importantes para o controle das infecções por EGB. O objetivo deste estudo foi avaliar a prevalência e perfil de sensibilidade aos antimicrobianos de EGB isolados de gestantes atendidas no Hospital Universitário de Londrina (HUL) e desenvolver um hidrogel enriquecido com óleo extraído da planta *Copaifera officinalis* (óleo de copaíba) com atividade antimicrobiana contra EGB. Foi realizado um estudo retrospectivo com 2901 gestantes atendidas no HUL para determinar a prevalência de colonização vaginal-retal e o perfil de sensibilidade de EGB aos antimicrobianos utilizados na API. A prevalência de colonização por EGB foi de 18,2%, e 0,4%, 10,2% e 10% dos isolados foram resistentes à penicilina, eritromicina e clindamicina, respectivamente. Estes resultados destacam a importância de vigilância contínua da colonização por EGB em gestantes para a prevenção de infecções em neonatos. Para avaliar a atividade antimicrobiana do óleo de copaíba sobre EGB, a Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi determinada pelo método de microdiluição em caldo de acordo com as recomendações do CLSI e a Concentração Bactericida Mínima (CBM) foi considerada aquela que apresentou 99,9% de inibição na contagem de unidades formadoras de colônia (UFC), comparado com um controle de crescimento não tratado. Foram desenvolvidas seis formulações de hidrogel com três diferentes polímeros, contendo 0,5% (p/p) e 1,0% (p/p) de óleo de copaíba, e todas foram testadas sobre as células planctônicas de EGB sensíveis e resistentes à eritromicina e/ou clindamicina. Testes físico-químicos para determinação do pH, densidade e viscosidade também foram realizados. A cinética do tempo de morte foi avaliada durante o tratamento das células planctônicas com as concentrações CIM e CBM; na presença da formulação base; e na presença da formulação acrescida de óleo de copaíba durante 24 horas. Após o tratamento com óleo de copaíba e com o hidrogel, alterações morfológicas de células planctônicas de EGB foram analisadas por microscopia eletrônica de varredura. A toxicidade da formulação foi avaliada em mucosa cervicovaginal de camundongos BALB/c fêmeas após 24 horas de tratamento com a formulação base e com o hidrogel de óleo de copaíba. Os valores da CIM e CBM para o óleo de copaíba variaram de 0,03 a 0,06 mg/mL e 0,06 a 0,12 mg/mL, respectivamente; e apenas o hidrogel contendo carbômero 940[®] com 1,0% (p/p) de óleo de copaíba foi capaz de inibir o crescimento de todos os isolados. Após 12 e 8 horas de incubação, nenhuma UFC foi detectada na presença da CBM do óleo de copaíba e do hidrogel, respectivamente. Ambos os tratamentos promoveram alterações morfológicas, como lise da parede celular e liberação de conteúdo citoplasmático, comparado com controle não tratado e tratado com a formulação base. Nenhum dano à estrutura ou infiltrado inflamatório na mucosa cervicovaginal dos animais foram observados após tratamento com o hidrogel e com a formulação base. Os

resultados mostram a atividade antimicrobiana do óleo de *C. officinalis* contra EGB e essa atividade é mantida em formulação a base de carbômero, indicando seu potencial para a utilização na prevenção da transmissão de EGB aos recém-nascidos.

Palavras-chave: EGB. Prevalência. Perfil de sensibilidade. Óleo de copaiba. Hidrogel.

MORGUETTE, Ana Elisa Belotto. **Colonization by *Streptococcus agalactiae* in pregnant women and hydrogel formulation for control of neonatal infection.** 2018. 76p. Dissertation (Master's Degree in Microbiology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina (2018).

ABSTRACT

Streptococcus agalactiae (Group B *Streptococcus* - GBS), is a Gram-positive and β -hemolytic bacterium that can be present in the microbiota of the gastrointestinal and genital tract of humans. Colonization of the vaginal mucosa of pregnant women is an important risk factor for the development of GBS neonatal infections. The implantation of intrapartum antibiotic prophylaxis (IAP) for colonized women contributed to the reduction of these infections. However, there was an increase in isolates exhibiting resistance to antimicrobials used for IAP. Thus, the surveillance of the colonization of pregnant women by GBS, as well as studies of new antimicrobial substances with potential for the prevention of bacterial transmission are important measures for the control of GBS infections. The aim of this study was to evaluate the prevalence and antimicrobial susceptibility profile of GBS isolated from pregnant women seen at the Hospital Universitário de Londrina (HUL) and to develop a hydrogel enriched with oilresin extracted from *Copaifera officinalis* (copaiba oil) with antimicrobial activity against GBS. A retrospective study was conducted with 2901 pregnant women seen at HUL to determine the prevalence of vaginal-rectal colonization and the susceptibility profile of GBS to antimicrobials used in the IAP. The prevalence of colonization by GBS was 18.2%, and 0.4%, 10.2% and 10% of the isolates were resistant to penicillin, erythromycin and clindamycin, respectively. These results highlight the importance of continuous surveillance of GBS colonization in pregnant women for the prevention of infections in neonates. In order to evaluate the antimicrobial activity of copaiba oil on GBS, the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) was determined by the broth microdilution method according to the CLSI recommendations and the Minimal Bactericidal Concentration (MBC) was considered to be the one that presented 99.9 % inhibition in colony forming units (CFU) counts, compared to an untreated growth control. Six hydrogel formulations were developed with three different polymers, containing 0.5% (w/w) and 1.0% (w/w) copaiba oil, and all were tested against planktonic cells of erythromycin and/or clindamycin sensitive and resistant GBSs. Physical-chemical tests for determination of pH, density and viscosity were also performed. The time-kill kinetics of planktonic cells were evaluated in presence of MIC and MBC concentrations of copaiba oil; the base formulation; and copaiba oil formulation during 24 hours. After the treatment with copaiba oil and with the hydrogel, morphological alterations of planktonic cells of GBS were analyzed by scanning electron microscopy. The toxicity of the formulation was evaluated in the cervicovaginal mucosa of female BALB/c mice after 24 hours of treatment with the base formulation and the copaiba oil hydrogel. The MIC and MBC values for copaiba oil ranged from 0.03 to 0.06 mg/mL and 0.06 to 0.12 mg/mL, respectively; and only the hydrogel containing 940® carbomer with 1.0% (w/w) copaiba oil was able to inhibit the growth of all isolates. After 12 and 8 hours of incubation, no CFU was detected in the presence of MBC of copaiba oil and hydrogel, respectively. Both treatments provoked morphological alterations in planktonic cells, such as cell wall lysis and release of cytoplasmic content, compared to untreated control and treated with the base formulation. No damage to the structure or inflammatory infiltrate in the cervicovaginal mucosa of the animals was observed after treatment with the hydrogel and the base formulation. The results show the antimicrobial activity of oilresin from *C. officinalis* against

GBS and this activity is maintained in a carbomer-based formulation, indicating its potential for use in preventing the transmission of GBS to newborns.

Key words: GBS. Prevalence. Susceptibility profile. Copaiba oil. Hydrogel.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** – Time-kill curve of GBS in presence of copaiba oil at MIC and MBC. *S. agalactiae* ATCC 13813 (A), erythromycin and clindamycin-resistant GBS 66 (B) and erythromycin-resistant GBS 121 (C) were incubated with copaiba oil at MIC (0.03 or 0.06 mg/mL) and MBC (0.06 mg/mL) for 24 h at 37 °C and the CFU counts were determined at specified time points. 61
- Figura 2** – Antibacterial activity of copaiba oil formulation against GBS. *S. agalactiae* ATCC 13813 (A, D, and G), erythromycin and clindamycin-resistant GBS 66 (B, E, and H) and erythromycin-resistant GBS 121 (C, F, and I) were incubated with BF1 (D - F) and COF1 1.0% (w/w) (G - I). Planktonic cells without treatment were used as growth control (A - C). 62
- Figura 3** – Time-kill curve of GBS in presence of BF1 and COF 1 1.0%. *S. agalactiae* ATCC 13813 (A), erythromycin and clindamycin-resistant GBS 66 (B) and erythromycin-resistant GBS 121 (C) were incubated with BF1 and COF1 1.0% for 24 h at 37 °C and the CFU counts were determined at specified time points 63
- Figura 4** – Effect of copaiba oil and COF1 1.0% on planktonic cells of *Streptococcus agalactiae* ATCC 13813 after 24 hours of treatment observed by scanning electron microscopy. (A) Untreated cells and (B) BF1 treated cells presented regular characteristics. (C) Copaiba oil and (D) COF1 1.0% treated cells appeared to be lysed with amorphous material on cell surface (white arrow). Bar: 10 µm 64
- Figura 5** – Rheological analysis of COF1 1.0%. (A) Viscosity versus shear rate of COF1 1.0%. (B) COF1 1.0% rheogram 65
- Figura 6** – Histological analysis of mice cervicovaginal mucosa treated with copaiba oil formulation. Eight-week-old BALB/c mice treated with PBS (A), FB1 (B), and COF 1.0% (C) showed epithelial integrity and intact lamina propria (black arrow). 400x magnification. 65

LISTA DE TABELAS

Table 1 –	Antimicrobial susceptibility profile of GBS isolated from pregnant women seen at UHL from January 2014 to December 2016.....	45
Table 2 –	Age groups of pregnant women positive for vaginal-rectal GBS colonization seen at UHL from January 2014 to December 2016.....	45
Table 3 –	Prevalence of GBS colonization among pregnant women previously reported in Brazilian studies	46
Table 1 –	Chemical composition of formulations enriched with copaiba oil	57
Table 2 –	<i>Streptococcus agalactiae</i> susceptibility profile and antibacterial and activity of copaiba oil.....	60

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

API	Antibioticoterapia Profilática Intraparto
BF1	Base Formulation 1
BF2	Base Formulation 2
BF3	Base Formulation 3
CAMP	Acronym for Christie, Atkins, Munch-Petersen
CBM	Concentração Bactericida Mínima
CDC	Center of Disease Control and Prevention
CFU	Colony Forming Unity
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	Clinical Laboratory Standards Institute
COF1 0.5%	Copaiba Oil Formulation 1 0.5%
COF1 1.0%	Copaiba Oil Formulation 1 1.0%
COF2 0.5%	Copaiba Oil Formulation 2 0.5%
COF2 1.0%	Copaiba Oil Formulation 2 1.0%
COF3 0.5%	Copaiba Oil Formulation 3 0.5%
COF3 1.0%	Copaiba Oil Formulation 3 1.0%
DMSO	Dimethylsulfoxide
EGB	Estreptococo do Grupo B
EOD	Early Onset Disease
GBS	Group B Streptococcus
IAP	Intrapartum Antibiotic Prophylaxis
LOD	Late Onset Disease
MBC	Minimum Bactericidal Concentration
MIC	Minimum Inhibitory Concentration
PBP	Penicillin Binding Protein
PBS	Phosphate Buffered Saline
SEM	Scanning Electron Microscopy
TSA	Trypticase Soy Agar
TSB	Trypticase Soy Broth
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UHL	University Hospital of Londrina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	REVISÃO DA LITERATURA	13
2.1	<i>STREPTOCOCCUS AGALACTIAE</i>	13
2.2	FATORES DE VIRULÊNCIA DE EGB	14
2.2	ANTIBIOTICOTERAPIA PROFILÁTICA INTRAPARTO (API)	16
2.3	CONSEQUÊNCIAS DA QUIMIOPROFILAXIA	17
2.4	SUBSTÂNCIAS COM POTENCIAL ANTIBACTERIANO SOBRE EGB	19
2.5	ÓLEO-RESINA DE <i>COPAIFERA OFFICINALIS</i> L. E SUAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS	22
2.6	HIDROGÉIS: CARACTERÍSTICAS E APLICAÇÕES ANTIMICROBIANAS	25
3	OBJETIVOS	28
3.1	OBJETIVO GERAL	28
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
4	REFERÊNCIAS	29
5	APÊNDICES	40
5.1	APÊNDICE A	41
5.2	APÊNDICE B	53
6	CONCLUSÃO	73
	ANEXOS	74
	ANEXO A	75
	ANEXO B	76

1 INTRODUÇÃO

Streptococcus agalactiae, ou Estreptococo do Grupo B (EGB), é uma bactéria Gram-positiva e β -hemolítica capaz de causar infecções em neonatos, adultos imunocomprometidos e idosos. Atualmente, é descrito como a principal causa de infecções neonatais e estão relacionadas à taxas de mortalidade preocupantes para essa população. As manifestações clínicas causadas por EGB mais comuns em recém-nascidos são pneumonia, meningite e sepse (SCHRAG; VERANI, 2013).

A recomendação de detecção da colonização vaginal em gestantes entre a 35^a e 37^a semana de gestação e a implantação da antibioticoterapia intraparto (API) para mulheres colonizadas contribuiu para redução significativa da infecção neonatal de início precoce em vários países (HAKANSSON et al., 2017). Essas infecções se desenvolvem até o 7º dia de vida e a transmissão ao recém-nascido pode ocorrer por infecção ascendente ao útero ou durante o parto a partir da mãe colonizada. Porém, estudos relatam que a implantação da API não reduziu a ocorrência das infecções de início tardio, que em geral ocorrem após o 7º dia até o terceiro mês de vida (CHO et al., 2017; SCHRAG; VERANI, 2013).

A crescente utilização da API em diversos países despertou a preocupação em relação a seleção de isolados resistentes aos antimicrobianos de escolha e aumento de infecções neonatais por outros patógenos. A penicilina é o fármaco de primeira escolha para o tratamento e profilaxia de infecções causadas por EGB e a maioria dos isolados permanecem sensíveis a este antimicrobiano. Entretanto, isolados de EGB com sensibilidade reduzida ou resistentes à penicilina já são reportados na literatura. Além disso, os inúmeros relatos de resistência aos fármacos de segunda escolha, eritromicina e clindamicina, em diversos países dificultam as opções empíricas para gestantes alérgicas à penicilina (HAYS et al., 2016; NAGANO et al., 2014; OTAGUIRI et al., 2013; SEKI et al., 2015).

Atualmente, nenhuma vacina está disponível para prevenção da infecção por EGB, fazendo necessária a descoberta de novas substâncias com atividade antimicrobiana sobre essas bactérias. Nesse contexto, os produtos naturais destacam-se pela grande diversidade de moléculas disponíveis que vêm sendo estudadas por suas atividades antimicrobianas (BORGES et al., 2016; ROSSITER; FLETCHER; WUEST, 2017; TOBOUTI et al., 2017). Entre estes, o óleo de copaíba teve sua atividade descrita para diferentes espécies bacterianas (LIMA DE OLIVEIRA et al., 2016; SANTOS et al., 2008a). Porém, apenas o óleo-resina extraído de *Copaifera multijuga* foi estudado sobre EGB, mostrando ação bactericida através de dano à parede celular (OTAGUIRI et al., 2017).

Os hidrógeis são compostos por uma matriz polimérica que forma uma rede

tridimensional capaz de reter água em sua estrutura. Devido duas propriedades físicas como grande conteúdo de água, biocompatibilidade e sensorial agradável, os hidrogéis têm sido utilizados no desenvolvimento de novas formulações farmacêuticas. Estes produtos são de uso tópico e têm sido aplicados como lubrificantes vaginais, veículos para fármacos contraceptivos, indutores de trabalho de parto e antimicrobianos (CALÓ; KHUTORYANSKIY, 2015; NEVES; BAHIA, 2006; PAL; BANTHIA; MAJUMDAR, 2009). Alguns estudos já descrevem a incorporação de compostos antivirais e antifúngicos em hidrogéis (BERRETTA et al., 2013; MAZIA et al., 2016), despertando o interesse para o desenvolvimento de formulações antibacterianas. Além disso, a utilização de um produto tópico favorece o tempo de ação do fármaco, fornece contato direto entre o local de ação e o fármaco e também dispensa o metabolismo de primeira passagem (BODDUPALLI et al., 2010).

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 STREPTOCOCCUS AGALACTIAE

Streptococcus agalactiae é um coco Gram positivo, β -hemolítico, pertencente ao Grupo B de Lancefield (Estreptococo do Grupo B - EGB) e foi descrito primeiramente como causa de mastite bovina (NOCARD; MOLLEREAU, 1887) e, posteriormente, sepsse materna (LANCEFIELD; HARE, 1935). Entretanto, a associação entre as infecções de gestante e neonatos só foi observada na década de 60 (HOOD; JANNEY; DAMERON, 1961). Nos anos 70, esta bactéria foi considerada a principal causa de infecção em recém-nascidos nos Estados Unidos, acarretando em sua maioria pneumonia e meningite, com alta taxa de mortalidade (SCHRAG; VERANI, 2013) e, atualmente, é a principal causa de sepsse nos três primeiros dias de vida (SCHRAG et al., 2016).

EGB pode ser classificado em dez diferentes tipos capsulares, Ia, Ib e II - IX, baseado na composição de sua cápsula, rica em ácido siálico (SLOTVED et al., 2007). Entre isolados de diferentes regiões brasileiras, os sorotipos predominantes são Ia, II, Ib e V (DUTRA et al., 2014), sendo Ia e V na cidade de Londrina, Paraná (OTAGUIRI et al., 2013). Em outros continentes foi relatada a prevalência de diferentes sorotipos. Em Portugal e na China, os sorotipos mais prevalentes são III, Ia e V (FLORINDO et al., 2014; LU et al., 2014). Já no Irã, foi relatada a prevalência do sorotipo III (SADEH et al., 2016).

EGB pode colonizar o trato gastrointestinal e geniturinário de indivíduos saudáveis de modo assintomático. Durante a gravidez ou no período pós-parto, a colonização da mucosa vaginal por EGB em mulheres é geralmente assintomática, porém pode aumentar o risco de parto prematuro e transmissão perinatal do microrganismo aos recém-nascidos (SCHUCHAT, 1995). A colonização vaginal por EGB também é fator de risco para infecção ascendente, na qual a bactéria atinge o útero e penetra as membranas placentárias (VORNHAGEN; WALDORF; RAJAGOPAL, 2017). Ao atingir a cavidade amniótica, EGB pode causar inflamação das membranas placentárias ou corioamnionite que são condições normalmente associadas com parto prematuro e morte fetal (ROMERO; DEY; FISHER, 2014).

A transmissão vertical por mães colonizadas, tanto pelo canal do parto, ou superfície contaminada em caso de cesárea de emergência, predominantemente leva a doença neonatal de início precoce (*early onset disease*, EOD), ocasionada na primeira semana de vida, podendo levar a sepse generalizada, meningite e pneumonia (MARIÓ et al., 2013; SEALE et al., 2016). As infecções de início precoce são as mais prevalentes, porém infecções que ocorrem entre sete a noventa dias de vida são chamadas de doença neonatal de início tardio (*late onset disease*, LOD), resultado da transmissão no período pós-parto, sendo a fonte de transmissão hospitalar ou comunitária (CHO et al., 2017; SCHRAG; VERANI, 2013). Nesse caso, as manifestações clínicas são bacteremia, infecção localizada, como artrite séptica, osteomielite, pneumonia, e meningite (MARIÓ et al., 2013). Esta é uma manifestação clínica séria relacionada a sequelas neurológicas para os neonatos sobreviventes (LIBSTER et al., 2012).

2.2 FATORES DE VIRULÊNCIA DE EGB

A colonização do cólon, ou algumas vezes o intestino delgado, translocação através do epitélio intestinal e evasão do sistema imune são etapas requeridas para a disseminação de EGB a partir do intestino. O primeiro passo para a colonização é a adesão, sendo um processo essencial, que é promovido por fatores que são expressos na superfície celular e permitem a ligação às proteínas da matriz extracelular e às células epiteliais do cólon e do trato geniturinário, resultando na formação de biofilme. Dois fatores auxiliam a adesão à matriz extracelular: proteínas de ligação ao fibrinogênio e proteínas de ligação à laminina. A proteína de ligação ao fibrinogênio A promove adesão, enquanto a proteína de ligação ao fibrinogênio B promove invasão das células do hospedeiro, sendo que ambas se ligam ao fibrinogênio solúvel. Já a ligação à laminina parece ser importante para a translocação pelo

epitélio intestinal (LANDWEHR-KENZEL; HENNEKE, 2014). *Pili* são outras estruturas envolvidas no processo de adesão que promovem colonização das células epiteliais, fornecem suporte à formação de biofilme e facilitam a passagem pela barreira hematoencefálica (LAUER et al., 2005). A alfa-C proteína, presente na superfície bacteriana, interage com a glicosaminoglicana da célula hospedeira, colaborando com a translocação de EGB através das barreiras epiteliais (BARON et al., 2004).

Para ajudar a disseminação de EGB pelos tecidos do hospedeiro, a enzima hialuronidase é expressa e cliva as ligações glicosídicas das cadeias de ácido hialurônico da matriz extracelular do hospedeiro entre a N-acetil- β -D-glicosamina e os resíduos de ácido D-glucurônico. Esta enzima tem especificidade limitada para o sulfato de condroitina e cliva a cadeia em locais não sulfatados. Esta ação pode facilitar a penetração tecidual profunda durante a infecção (BAKER; PRITCHARD, 2000; LI; JEDRZEJAS, 2001). A produção do fator de virulência β -hemolisina/citolisina (β -H/C) colabora com a passagem pela barreira hematoencefálica. Esse fator leva a destruição de células epiteliais e endoteliais, incluindo células da barreira hematoencefálica. O dano e inflamação induzidos por essa toxina resultam em parto prematuro e até morte fetal e contribuem para a ocorrência de corioamnionite e infecção do recém-nascido, sendo processos iniciados com a ascensão das bactérias que colonizam a mucosa vaginal. Porém, o mecanismo pelo qual EGB, que não apresenta flagelo, atinge o útero não está completamente elucidado (RANDIS et al., 2014).

Além dos fatores que colaboram com a adesão e invasão as células hospedeiras, EGB expressa mecanismos que colaboram com a evasão do sistema imune. A β -proteína localizada na superfície celular é capaz de ligar-se à região constante da imunoglobulina A (IgA), comprometendo sua função efetora. Essa proteína também se liga ao fator H humano, uma glicoproteína plasmática reguladora da ativação do sistema complemento, diminuindo sua atividade na regulação desse sistema e resultando em inibição da fagocitose pela destruição da proteína C3b depositada sobre a superfície bacteriana (ARESCOUG et al., 2002). Outro modo de interferir sobre a ação do sistema complemento é pela produção da enzima C5a peptidase. Essa enzima cliva a proteína C5a do sistema complemento, o principal quimiotáxico para neutrófilos, diminuindo o recrutamento dessas células fagocíticas para o local da infecção (CHENG et al., 2002). A presença da cápsula, rica em ácido siálico que apresenta ligação $\alpha(2-3)$ em suas moléculas também colabora com a evasão do sistema imune, pois mimetiza os epítomos do hospedeiro (LANDWEHR-KENZEL; HENNEKE, 2014).

EGB também tem sido descrito como patógeno de infecções em adultos, principalmente imunossuprimidos e idosos, associado a uma taxa de mortalidade crescente (CRESPO-ORTIZ et al., 2014; LAMAGNI et al., 2013; PHARES et al., 2008). Nesses indivíduos, as manifestações clínicas mais comuns são infecções de pele e tecidos moles, pneumonia, infecção do trato urinário, osteomielite e bacteremia sem foco (RUPPEN et al., 2017). Síndromes mais graves, como meningite e endocardite, podem ocorrer e são associadas a altas taxas de mortalidade de 27 a 34% e até 50%, respectivamente (FARLEY, 2001; KERNÉIS et al., 2017).

2.2 ANTIBIOTICOTERAPIA PROFILÁTICA INTRAPARTO (API)

A eficácia do uso de antibióticos durante o período pré-parto foi comprovada por ensaios clínicos no final da década de 80. Esses estudos mostraram que a administração de beta-lactâmicos por via intravenosa em mulheres colonizadas durante o trabalho de parto foi efetiva na prevenção da transmissão de EGB para os recém-nascidos (BOYER; GOTOFF, 1986; GARLAND; FLIEGNER, 1991). Porém, apenas em 1996 o *Center for Disease Control and Prevention* (CDC) publicou recomendações para a API.

Dois protocolos para identificação de gestantes candidatas à API foram recomendados pelo CDC. A abordagem baseada na triagem recomenda que entre a 35^a e 37^a semana de gestação, um *swab* vaginal-retal seja coletado para detecção de EGB pelo método de cultura e, em caso de positividade, a aplicação de API. Enquanto a abordagem baseada em fatores de risco estabelece que a API deva ser utilizada em mulheres com pelo menos um dos seguintes fatores: histórico de neonato acometido por infecção por EGB, bacteriúria por EGB sintomática ou assintomática durante a gravidez, trabalho de parto antes da 37^a semana de gestação, duração da ruptura de membranas maior ou igual à 18 horas ou ainda temperatura intraparto igual ou superior a 38 °C (CDC, 1996).

Em 2002, as recomendações foram atualizadas e a estratégia baseada na triagem foi recomendada para todas as gestantes entre a 35^a e 37^a semana de gestação, uma vez que oferece melhor desempenho que a abordagem baseada em fatores de risco (CDC, 2002). Posteriormente, em 2010, nova atualização foi realizada em busca do uso racional dos antimicrobianos, na qual recomendou-se que a penicilina G, com dose inicial de 5 milhões de unidades via intravenosa (IV), seguida de 2,5 a 3,0 milhões de unidades a cada 4 horas, como o fármaco de primeira escolha indicado para API. Em caso de pacientes alérgicas à penicilina G, 900 mg IV de clindamicina a cada 8 horas deve ser utilizada. Caso o isolado de EGB não

seja sensível a este antimicrobiano, 1 g de vancomicina a cada 12 horas é empregado (CDC, 2010).

A API contribuiu para uma diminuição significativa das infecções por EGB em recém-nascidos mundialmente (HAKANSSON et al., 2017; RUSSELL et al., 2017). Porém é uma estratégia que aumenta o risco de seleção de isolados resistentes aos antimicrobianos, principalmente clindamicina e eritromicina, restringindo as opções para mulheres alérgicas à penicilina. Além disso, não promove resultados tão significativos para LOD (SCHRAG; VERANI, 2013). Um estudo retrospectivo de 14 anos realizado na França mostrou essa baixa eficiência na prevenção de LOD pela API, no qual os autores observaram uma diminuição na incidência de meningite de início precoce por EGB com a utilização da API, porém houve aumento de meninge de início tardio (ROMAIN et al., 2017). Contudo, a maioria dos estudos refletem dados de países mais desenvolvidos, como Estados Unidos e Inglaterra, evidenciando a carência de informação em países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento, nos quais a doença pode estar sendo subestimada (RUSSELL et al., 2017). Dados mais abrangentes sobre as doenças causadas por EGB permitiriam o desenvolvimento de estratégias de prevenção mais efetivas, como a vacina contra essa bactéria, que teria o potencial de prevenção tanto para EOD, quanto para LOD, e a diminuição da utilização de antimicrobianos para quimioprofilaxia (DOARE; HEATH, 2013).

2.3 CONSEQUÊNCIAS DA QUIMIOPROFILAXIA

O aumento do uso de antimicrobianos para profilaxia intraparto ampliou a preocupação com a emergência de resistência entre isolados de EGB. De fato, estudos relatando a emergência de isolados de EGB com sensibilidade reduzida à penicilina já são descritos na literatura (KIMURA et al., 2008; NAGANO et al., 2014; SEKI et al., 2015), e estes podem também estar associados à resistência a eritromicina e clindamicina (BANNO et al., 2014; KIMURA et al., 2013; NAGANO et al., 2012). Para estes dois últimos antimicrobianos, a resistência foi descrita em vários países, inclusive no Brasil (BERG et al., 2014; CAPANNA et al., 2013; CHURCH; CARSON; GREGSON, 2012; HAYS et al., 2016; HRAOUI et al., 2012; LAMBIASE et al., 2012; LU et al., 2014; OTAGUIRI et al., 2013).

A diminuição da sensibilidade aos β -lactâmicos está relacionada com alterações na proteína de ligação à penicilina (*penicilin-binding protein* – PBP). Substituições nos aminoácidos da PBP2X, Q557E (na posição 557, o aminoácido glutamina é substituído

por ácido glutâmico) e/ou V405A (na posição, 405 o aminoácido valina é substituído por alanina), próximas ao domínio transpeptidase prejudicam a estabilidade da estrutura terciária da molécula (KIMURA et al., 2008).

Os principais mecanismos de resistência de EGB aos macrolídeos e lincosamidas são codificados pelos genes *erm* e *mef*. O primeiro codifica uma enzima metilase responsável pela modificação ribossomal que confere resistência cruzada aos macrolídeos, lincosamidas e estreptogramina B (fenótipo MLS_B), que pode ser constitutiva (cMLS_B) ou indutiva (iMLS_B). A resistência indutiva é detectada no teste de difusão em ágar com a formação da zona D, que corresponde ao achatamento da zona de inibição de clindamicina adjacente ao disco de eritromicina colocado a aproximadamente 12 mm de distância (CLSI, 2012). O gene *mef* origina uma bomba de efluxo ancorada à membrana e confere resistência somente aos macrolídeos (fenótipo M) (AZAVEDO et al., 2001).

Recentemente, uma revisão sistemática relacionou o uso de antimicrobianos em neonatos e os impactos na microbiota intestinal. Esse estudo concluiu que o uso prolongado de antimicrobianos está associado com a diminuição da diversidade da microbiota intestinal e de bactérias anaeróbias comensais, como bifidobactérias, lactobacilos e bacterioides. Além disso, o uso de antimicrobianos para o tratamento neonatal é relacionado ao aumento de resistência a esses fármacos, principalmente entre as bactérias Gram-negativas (FJALSTAD et al., 2017).

Outra questão pertinente ao uso intraparto dos antimicrobianos está associada aos efeitos adversos que podem afetar tanto a mãe, quanto o neonato, como anafilaxia materna, seleção de isolados resistentes e aumento das infecções neonatais por bactérias Gram-negativas (MELIN, 2011). Entre as reações de hipersensibilidade a medicamentos, a alergia à penicilina é a mais comum e é relatada por 10% dos pacientes (HAR; SOLENSKY, 2017). Entretanto, o teste de alergia à penicilina não é frequentemente realizado, inclusive para as gestantes. A confirmação desse diagnóstico em pacientes com histórico de reação de hipersensibilidade contribuiria com a diminuição de morbidades e tempo de hospitalização prolongado associados com alergia à penicilina (DESAI et al., 2017).

Em conjunto, esses fatos reforçam a necessidade da continuidade da atenção global em relação às diretrizes de prevenção das infecções por EGB, que continua sendo o principal agente etiológico de infecções neonatais, resultando em mortalidade, sequelas neurológicas e tempo prolongado de hospitalização. Somado ao aumento de relatos de isolados resistentes, faz-se necessária a elaboração de estratégias que não dependam apenas da

administração de antimicrobianos no período pré-parto e tenham também impacto sobre a doença neonatal de início tardio (BAKER, 2013).

2.4 SUBSTÂNCIAS COM POTENCIAL ANTIBACTERIANO SOBRE EGB

Por milhões de anos, as plantas resistem aos seus inimigos naturais, com mecanismos de defesa que evoluíram ao longo do tempo. Embora não possuam um sistema com células de defesa e seu estilo de vida seja sésil, esses organismos produzem enzimas, metabólitos secundários e reforçam suas estruturas celulares em resposta a um ambiente desfavorável e para defesa contra predadores (DANGL; JONES, 2001). Compreender como essas espécies utilizam sua rica composição química para se defender, forneceria uma enorme gama de compostos com diferentes atividades farmacológicas (BORGES et al., 2016).

Por sua grande diversidade e uso recorrente na medicina popular, os produtos naturais são alvos de interesse de pesquisadores e da indústria farmacêutica e fontes promissoras para o isolamento de novas moléculas antimicrobianas. Diversos estudos descrevem a atividade antibacteriana de produtos naturais sobre EGB, proporcionando alternativas para o desenvolvimento de novos fármacos e produtos e, dessa forma, combater a resistência microbiana. A atividade e mecanismo de ação desses compostos ainda precisam ser investigados sobre diferentes espécies de microrganismos, incluindo EGB (SALEEM et al., 2010). Entretanto, os maiores desafios são: buscar produto natural que apresente baixa concentração inibitória mínima (CIM), com pouca toxicidade e alta biodisponibilidade, garantindo a segurança do seu uso (UPADHYAY et al., 2014). A Tabela 1 reporta os estudos realizados com diversas substâncias extraídas de plantas sobre EGB. Alguns deles avaliaram a atividade antibacteriana de compostos e outros de moléculas isoladas.

Tabela 1 – Derivados de plantas com atividade antibacteriana contra *Streptococcus agalactiae*

Substância	CIM	Halo de inibição (mm)	Referência
Óleos			
<i>Eucalyptus globulus</i>	50 µL/mL	-	CERMELLI et al., 2008
<i>Bupleurum marginatum</i>	250 µg/mL	14	ASHOUR et al., 2009
<i>Kadsura longipedunculata</i>	60 µg/mL	9	MULYANINGSIH et al., 2010

<i>Pinus peuce</i>	15,62 a 25 µL/mL	-	KARAPANDZOVA et al., 2011
<i>Eucalyptus. odorata</i>	10400 µg/mL	19,4 ± 5,6	ELAISSI et al., 2012
Eugenol	0,125 a 0,5%	-	BIASI-GARBIN et al., 2015
Óleo-resina de <i>Copaifera multijuga</i>	120 a 1000 µg/mL	-	OTAGUIRI et al., 2017
Extratos			
Extrato aquoso de alicina	35000 a 95000 µg/L	-	CUTLER et al., 2009
Extrato aquoso de <i>Phyllanthus niruri</i>	1000 µg/mL	12	AMIN et al., 2012
Extrato etanólico do fruto de <i>Asparagus albus</i> L	390 µg/mL	19	HAMDI et al., 2017
Moléculas			
Heineanol A	4 µg/mL	-	PENG et al., 2008
Epicatequina	2673 µg/mL	-	CUEVA et al., 2012
Ácido gálico	804 µg/mL	-	CUEVA et al., 2012
Berberina	0,78 µg/mL	-	PENG et al., 2015
(9S,13S) -2-acetoxi-12-oxo-(10Z,15Z)-fitodienoato de metila	32 a 128 µg/mL	-	BISIO et al., 2015

Entre os compostos, destacam-se os óleos essenciais e os extratos. Diferentes óleos essenciais tiveram sua atividade descrita sobre EGB. O óleo de *Kadsura longipedunculata*, planta encontrada no sul da China, mostrou-se eficaz sobre *S. agalactiae* ATCC 27956 tanto no método de disco difusão, com halo de inibição de 9 mm, quanto na técnica de microdiluição em caldo com CIM de 60 µg/mL (MULYANINGSIH et al., 2010). Óleos essenciais de diferentes espécies de *Eucalyptus* também exibiram atividade antibacteriana sobre isolados clínicos de EGB. O óleo de *E. globulus* exibiu CIM de 50 µl/mL (CERMELLI et al., 2008), enquanto o óleo essencial de *E. odorata* revelou-se mais eficaz entre oito espécies de *Eucalyptus*, que foram extraídos por hidrodestilação, com CIM de 10417 µg/mL e halo de inibição de 19,4 ± 5,6 mm (ELAISSI et al., 2012). O óleo essencial de *Pinus peuce* coletado em locais quatro locais diferentes da Macedônia e extraído por hidrodestilação foi testado em um isolado de EGB e destes dois apresentaram CIM de 15,62 µL/mL e 31,25 µL/mL (KARAPANDZOVA et al., 2011). O óleo de cravo, conhecido como eugenol, também teve sua ação em EGB caracterizada, mostrando-se bactericida com CIM

variando de 0,125% a 0,5%. Além disso, sua associação com nanopartículas biológicas de prata (AgNPBio) foi sinérgica em células planctônicas em concentrações que variaram de 0,03% a 0,06% e 0,49 μM a 31,25 μM para o eugenol e AgNPBio, respectivamente. Sua ação parece estar relacionada com a lise da parede celular e liberação de conteúdo citoplasmático (BIASI-GARBIN et al., 2015).

Apenas três extratos tiveram sua atividade sobre EGB estabelecida. Foi observada a atividade antimicrobiana do extrato aquoso de *Phyllanthus nirurii*, que possui altos níveis de compostos fenólicos, o qual apresentou CIM de 1000 $\mu\text{g/mL}$ e gerou uma zona de inibição de 12 mm \pm 0.6 mm pelo teste de disco difusão contra EGB (AMIN et al., 2012). Da mesma maneira, o efeito bactericida do óleo essencial e do extrato de *Bupleurum marginatum* foi observado em EGB. Entre as cepas bacterianas testadas, *S. agalactiae* ATCC 27956 apresentou maior sensibilidade tanto ao extrato quanto ao óleo essencial, apresentando as maiores zonas de inibição (14 mm e 16 mm, respectivamente) e os menores valores de CIM (500 $\mu\text{g/mL}$ e 250 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente) (ASHOUR et al., 2009). Os autores sugerem que as atividades antibacterianas de *P. niruri* e de *B. marginatum* ocorrem devido a presença de diversos compostos fenólicos nestes produtos. Foi também descrita a atividade de extratos etanólicos das folhas, frutos e rizomas de *Asparagus albus* L. contra um isolado clínico de EGB resistente à eritromicina, sendo que o extrato do fruto apresentou melhor desempenho com MIC de 390 $\mu\text{g/mL}$ e halo de inibição igual a 19 mm (HAMDI et al., 2017).

O heineanol A, extraído de raiz de *Vitis thunbergii* var. *taiwaniana* de Taiwan, uma espécie de uva selvagem de Taiwan, apresentou CIM de 4 $\mu\text{g/mL}$ para EGB (PENG et al., 2008). Já a epicatequina e o ácido gálico, dois compostos fenólicos do vinho, mostraram atividade sobre isolado clínico de EGB com CIM₅₀ de 2673 $\mu\text{g/mL}$ e 804 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente (CUEVA et al., 2012). Alicina, a principal molécula antimicrobiana isolada a partir do extrato aquoso do alho, apresentou CIM de 35 a 95 $\mu\text{g/L}$ em EGB isolados a partir de *swabs* vaginais, e a zona de inibição gerada por uma formulação tópica contendo 500 mg/L desse extrato foi de 23 \pm 6 mm (CUTLER et al., 2009). A berberina, derivado alcaloide isolado a partir de *Cortex phellodendri* e *Rhizoma coptidis*, exibiu CIM de 0,78 $\mu\text{g/mL}$ sobre a cepa de referência *S. agalactiae* CVCC 1886, e provocou alterações ultraestruturais, como dano de membrana, inibição da síntese proteica e de DNA, resultando em perda da integridade celular e liberação de conteúdo citoplasmático (PENG et al., 2015). Dentre os compostos derivados de *Salvia aedonora* Fernald (Lamiaceae), um derivado do ácido 12-oxo-fitodienoico ((9S,13S)-2-acetoxi-12-oxo-(10Z,15Z)-fitodienoato de metila) mostrou-se

efetivo sobre três isolados clínicos de *S. agalactiae* nas concentrações de 32 µg/mL, 64 µg/mL e 128 µg/mL (BISIO et al., 2015).

2.5 ÓLEO-RESINA DE *COPAIFERA OFFICINALIS* L. E SUAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS

O gênero *Copaifera* é composto por 72 espécies, sendo 16 encontradas apenas no Brasil, entre elas, *Copaifera officinalis* que é distribuída principalmente no norte da Amazônia e Roraima. Também pode ser detectada na Venezuela, Colômbia e San Salvador. As árvores desse gênero são conhecidas como copaibeiras ou pau d'óleo e possuem canais esquizógenos, formados por intercomunicações de espaços intercelulares, nos quais o óleo-resina, conhecido como óleo de copaíba, é encontrado e tem sido utilizado popularmente há muitos anos como cicatrizante e anti-inflamatório. O modo de coleta menos invasivo é promovido através de incisão com trado diretamente no tronco da árvore e, após sua realização, o orifício é fechado com argila para preservar a árvore, possibilitando coletas posteriores (VEIGA JR; PINTO, 2002).

Em geral, os óleos de copaíba são constituídos principalmente por misturas de sesquiterpenos e diterpenos (VEIGA JR; PINTO, 2002). Os sesquiterpenos são moléculas formadas por três unidades de isopreno, resultando em estruturas de 15 carbonos, utilizadas pela planta como proteção contra peste e patógenos (CHEN et al., 2009). Várias atividades farmacológicas são atribuídas a essas moléculas devido sua abundância. Porém, as atividades biológicas dos óleos-resinas podem depender de apenas um componente, ou da interação sinérgica entre os vários constituintes (LEANDRO et al., 2012).

Apesar da grande variação nas composições do óleo de copaíba entre as diferentes espécies, os principais sesquiterpenos encontrados são β-cariofileno, óxido de cariofileno, α-humuleno, δ-cadineno, α-cadinol, α-cubebeno, α e β-selineno, β-elemeno, α-copaeno, trans-α-bergamoteno e β-bisaboleno. O β-cariofileno ((1R,4E,9S) -4,11,11-trimetil-8-metilidenobicyclo [7.2.0] undec-4-eno) é geralmente o principal constituinte e considerado um marcador químico desses óleo-resinas. Na classe dos diterpenos, os principais relatados no óleo de copaíba são os ácidos copálico, poliáltico, hardwickiic, caurenico e *ent*-caurenico, juntamente com seus derivados 3-hidroxi-copálico, 3-acetoxicálico e *ent*-agático. Entre estes, o ácido copálico (ácido (E)-5-[(1R,4aR,8aR)-5,5,8a-trimeti-1-2-metilideno-3,4,4a,6,7,8-hexahidro-1H-naftalen-1-il]-3-metilpent-2-enóico) é considerado um marcador do gênero *Copaifera* (LEANDRO et al., 2012).

Galúcio et al. (2016) relataram a presença de 63,63% de sesquiterpenos e 36,38% de diterpenos no óleo-resina de *C. officinalis* (Ferquima, SP – Brasil) após destilação molecular, sendo o β -cariofileno (26,32%) e o ácido poliáltico (11,69%) os principais sesquiterpenos e diterpenos, respectivamente. Além disso, os sesquiterpenos podem ser encontrados em outros constituintes da planta, como folhas, raízes e caule, porém ainda não está claro em qual órgão essas moléculas são sintetizadas. A rápida acumulação nas folhas e caule de árvores jovens sugerem que a maquinaria de biossíntese seja mais ativa nesses órgãos, sendo a produção atribuída a sesquiterpeno sintetases. Germacrene D ((1Z,6Z) -1-metil-5-metilideno-8-propan-2-ilciclodeca-1,6-dieno) foi descrito como o sesquiterpeno mais abundante nos tecidos e foi encontrado em outras espécies do gênero, porém não como principal constituinte. Esse fato sugere que a mesma via biossintética é utilizada na produção dos sesquiterpenos e diferenças moleculares e genéticas entre as enzimas de cada espécie conduzem às diferentes proporções de sesquiterpenos produzidos (CHEN et al., 2009).

A composição do óleo de copaíba pode ser influenciada por vários fatores, tais como características genéticas da árvore, variação sazonal e do ambiente (BARBOSA et al., 2013). A sazonalidade é a principal dificuldade para incluir o óleo de copaíba como matéria-prima para a indústria farmacêutica e a padronização da coleta em uma época do ano pode minimizar as variações influenciadas por esse fator (BIAVATTI et al., 2006).

A atividade anti-inflamatória do óleo de *C. officinalis* foi reportada *in vitro* pela inibição da enzima 5-lipoxigenase que converte ácido araquidônico em leucotrienos (BAYLAC; RACINE, 2003) e pela não inibição de proteases de neutrófilos, responsáveis pela degradação de proteínas da matriz extracelular (BAYLAC; RACINE, 2004). Foi descrita moderada atividade antilipoperoxidativa e intensa atividade antioxidante para o ácido caurenico extraído do óleo de copaíba, pela diminuição da expressão de TNF- α e IL-1 β e da atividade da mieloperoxidase (DE LIMA SILVA et al., 2015). Ratos tratados profilaticamente com injeções subcutâneas de óleo de *C. officinalis* (0,63 ml/kg/dia) e submetidos a sepse por ligação cecal e punção apresentaram maior sobrevida e menor nível de estresse oxidativo (LOPES et al., 2015).

O efeito leishmanicida do óleo de copaíba também foi descrito em alguns estudos. Óleos extraídos de várias espécies de copaibeiras foram testados em *Leishmania amazonensis*. O óleo de *C. reticulata* foi o mais eficaz com IC₅₀ (concentração capaz de inibir o crescimento de 50% dos protozoários presentes no ensaio) igual a 5,0 μ g/mL para forma promastigota e 15,0 μ g/mL para forma amastigota do parasito. Já o óleo de *C. officinalis* apresentou IC₅₀ de 20 μ g/mL para formas promastigotas (SANTOS et al., 2008b). Outro

estudo relatou a atividade de ácidos diterpênicos isolados de óleo-resinas de *Copaifera* sobre o mesmo parasito, sendo o ácido hidroxicopálico (IC₅₀ 2,5 µg/mL) e metilcopalato (IC₅₀ 6,0 µg/mL) os mais efetivos. O primeiro composto ocasionou alterações morfológicas e ultraestruturais em promastigotas de *L. amazonensis* evidenciadas por células arredondadas, perda de conteúdo por ruptura da membrana citoplasmática, mitocôndria com aumento de volume e membranas concêntricas, aumento da condensação da cromatina e da atividade de exocitose na região da bolsa flagelar (SANTOS et al., 2013a). Terpenos que compõem o óleo-resina também apresentam atividade sobre *Trypanosoma cruzi*, sendo a forma tripomastigota (não proliferativa) a mais resistente e a forma amastigota (proliferativa) a mais sensível, com baixa e moderada toxicidade a hemácias humanas e células LLCMK₂, respectivamente (IZUMI et al., 2012).

A atividade antibacteriana do óleo de copaíba extraído de *C. officinalis* já foi relatada por alguns estudos, porém a concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração bactericida mínima (CBM) variam entre a mesma espécie bacteriana. Este óleo-resina apresentou atividade bactericida contra *Staphylococcus aureus* (CIM e CBM = 62,5 µg/mL), *S. aureus* resistente à meticilina (CIM = 125 µg/mL e CBM = 250 µg/mL), *Staphylococcus epidermidis* (CIM e CBM = 31,25 µg/mL), *Enterococcus faecalis* (CIM = 31,25 µg/mL e CBM = 62,5 µg/mL) e *Bacillus subtilis* (CIM e CBM = 31,25 µg/mL) (SANTOS et al., 2008a). Recentemente, outro estudo relatou a atividade sobre *S. aureus*, porém a CIM e CBM foram de 31,25 µg/mL (GUIMARÃES et al., 2016). A CIM do óleo-resina de *C. officinalis* para nove espécies de *Paenibacillus*, patógenos de abelhas, variou de 1,56% a 25% e, após 48 horas de tratamento, nenhuma célula viável da cepa de referência *P. larvae* ATCC 9545 foi observada (SANTOS et al., 2012). Pieri et al. (2011) descrevem a atividade antimicrobiana de uma solução de óleo de copaíba de *C. officinalis* (10%) sobre sete isolados de *Escherichia coli* obtidos de leite de vacas acometidas por mastite, detectando halos de inibição de até 30 mm.

O óleo extraído de *C. officinalis* apresentou atividade bacteriostática sobre a cepa de referência *Streptococcus mutans* ATCC 25175 com CIM de 0,78 µL/mL. (PIERI et al., 2012). Outro estudo relatou CIM de 30.000 µg/mL para cepa de referência de *S. mutans* ATCC 25715 e CIM de 15.000 µg/mL para a cepa de referência de *S. aureus* ATCC 25923 (LIMA DE OLIVEIRA et al., 2016). Em ambos os estudos, a atividade do óleo-resina foi bacteriostática.

Outra propriedade do óleo de *C. officinalis* é a inibição da adesão microbiana. Essa capacidade foi descrita para *Candida albicans* ATCC 10231 e SC5314 com redução de

70% na adesão após tratamento com óleo de copaíba (TOBOUTI et al., 2016). A atividade sobre a adesão também foi reportada sobre *S. mutans* em dentes de cães na concentração de 10% (v/v) (PIERI et al., 2010). β -cariofileno, frequentemente descrito como principal sesquiterpeno presente no óleo de copaíba, inibiu a formação de biofilme de isolados de *Haemophilus* sp., *Lactococcus* sp., *Enterococcus* sp., *Bacillus* sp., *Aerococcus* sp. e *Streptococcus* sp., nas concentrações de 1560, 3120 e 6250 $\mu\text{g/mL}$ (PIERI et al., 2016).

Em relação a EGB, Fonseca et al. (2013) analisaram a atividade antibacteriana de alguns componentes do óleo de copaíba na cepa de referência *S. agalactiae* ATCC 12836. As CIMs para manool, ácido caurenóico e ácido copálico foram 6,25 $\mu\text{g/mL}$, 3,12 $\mu\text{g/mL}$ e 1,56 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Entretanto, o efeito do óleo-resina de *C. officinalis* em células planctônicas e sésseis de EGB, bem como as alterações estruturais promovidas por esse produto ainda não foram descritas.

O óleo de copaíba extraído de *C. multijuga* teve sua atividade descrita sobre EGB, com CIMs e CBMs que variaram entre 120 a 1000 $\mu\text{g/mL}$ e 250 a >1000 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Após 24 horas de tratamento com o óleo de copaíba na CBM, nenhuma unidade formadora de colônia (UFC) foi detectada. Na análise das células tratadas por microscopia eletrônica de transmissão, observou-se dano na parede celular bacteriana e diminuição da elétron-densidade, indicando ser o possível alvo desse óleo. Além disso, o óleo apresentou interação antibacteriana sinérgica com AgNPBio sobre o crescimento desse microrganismo (OTAGUIRI et al., 2017).

Apenas três estudos investigaram o mecanismo de ação do óleo de copaíba. Os óleos extraídos de *C. martii* e *C. multijuga* causaram rompimento da parede celular, com consequente liberação de conteúdo citoplasmático e diminuição do volume celular, em células planctônicas de *S. aureus* e *S. agalactiae* (OTAGUIRI et al., 2017; SANTOS et al., 2008a). O óleo-resina de *C. duckei* afetou a mesma estrutura celular em *B. cereus*, com diminuição da espessura e formação de filamentos na camada S da parede celular, sugerindo liberação de conteúdo celular. Além disso, análises por SDS-PAGE mostraram que o óleo *C. duckei* foi capaz de extrair proteínas da parede celular, corroborando que essa estrutura celular é o alvo de ação desse óleo-resina (SANTOS et al., 2013).

2.6 HIDROGÉIS: CARACTERÍSTICAS E APLICAÇÕES ANTIMICROBIANAS

Em 1960, os géis hidrofílicos eram propostos para uso biológico por apresentarem conteúdo adequado de água, serem inertes aos processos biológicos e permitir a permeabilidade de metabólitos. Esses materiais surgiram como uma opção para dispositivos

que ficassem em contato permanente com os tecidos, como o desenvolvimento de órgãos e produção de lentes de contato, e começaram a ganhar destaque por não causar danos, ou irritação aos tecidos (WICHTERLE; LIM, 1960).

Atualmente, os hidrogéis são definidos como uma forma farmacêutica semi-sólida formada por uma rede tridimensional hidrofílica composta por polímeros e capaz de absorver grande quantidade de água. Essa capacidade é promovida pelos grupos funcionais ligados ao esqueleto polimérico, enquanto que sua resistência à dissolução é devida às ligações cruzadas entre as cadeias, formando as redes (AHMED, 2015). Este fato somado as características de suavidade, flexibilidade e biocompatibilidade, fazem dos hidrogéis um alvo de grande interesse para diferentes aplicações biomédicas. As principais áreas de aplicação dos hidrogéis são lentes de contato, curativos para feridas, sistemas de administração de medicamentos e produtos cosméticos e de higiene (CALÓ; KHUTORYANSKIY, 2015).

Essa forma farmacêutica pode ser classificada em relação à diferentes fatores, sendo classificados em naturais ou sintéticos, de acordo com a origem de seu monômero. Em relação a quantidade de monômeros empregados em sua produção, podem ser homopolimérico, copolimérico ou multipolimérico quando são utilizados um, dois ou mais monômeros, respectivamente. Baseado em sua conformação, podem ser amorfo (não cristalino), cristalino ou semi-cristalino (mistura complexa formada por fase amorfa e por fase cristalina). Suas ligações podem ser químicas, que são permanentes, ou físicas, transitórias e formadas por interações iônicas, ligações de hidrogênio ou interações hidrofóbicas. De acordo com sua carga elétrica, os hidrogéis podem ser não-iônicos (sem carga), iônicos (catiônico ou aniônico) ou anfotéricos (apresenta ambas as cargas) (AHMED, 2015).

A formulação de um hidrogel, caracterizado como medicamento, ou seja, contendo fármaco, precisa atender a requisitos farmacocinéticos, como: carreamento máximo do fármaco, retenção no local de ação e liberação sustentada durante o período terapêutico. Destaca-se que para utilizá-lo na região vaginal, aspectos fisiológicos característicos dessa região devem ser respeitados, como variação de pH, microbiota, muco cervical e alterações do ciclo menstrual (MIRZA et al., 2016).

Outro ponto importante que deve ser considerado sobre as formulações semi-sólidas são suas características reológicas, ou seja, como a formulação irá se dispersar e reter sobre o tecido. Para os géis de aplicação vaginal, essas informações são imprescindíveis, uma vez que devem espalhar-se facilmente sobre a mucosa e ter tempo de retenção adequado. Geralmente, os hidrogéis apresentam comportamento pseudoplástico não-Newtoniano, que permite a fácil distribuição do produto sobre a mucosa, sendo utilizado como polímeros os

diversos tipos de carbômeros, hidroxietilcelulose, copolímero de acrilato de sódio Lecitina, entre outros (NEVES et al., 2009).

A incorporação de polímeros em formulações para a região vaginal é fundamental, pois promove maior contato com a superfície vaginal, contribuindo com a mucoadesão e melhorando o tempo de retenção do fármaco (BODDUPALLI et al., 2010). Entre eles, o carbômero, comercialmente conhecido como Carbopol 940[®], é um polímero sintético de ácido acrílico que apresenta grupos hidroxil e carboxil que lhe conferem característica aniônica. Esse polímero apresenta propriedades mucoadesivas, pois é capaz de formar ligações de hidrogênio e penetrar na mucosa (GAFITANU et al., 2016). Estudos conduzidos por Berretta et al. (2013) mostraram que o carbômero apresentou melhor capacidade mucoadesiva quando comparado com os polímeros quitosana e hidroxietilcelulose. Sistemas mucoadesivos também apresentam as vantagens de administrar a dosagem específica diretamente no alvo e o contato direto com a mucosa promove alta concentração do fármaco nessa superfície de alta absorção, melhorando seu tempo de retenção e evitando o metabolismo de primeira passagem. Considera-se como mucosas, a cavidade oral, tecido conjuntivo ocular, mucosa vaginal, cavidade nasal e o trato gastrointestinal (BODDUPALLI et al., 2010).

Neste contexto, uma das aplicações estudadas é a preparação de hidrogéis antimicrobianos. Agentes antimicrobianos sozinhos, geralmente, têm sua atividade prejudicada, devido a instabilidade na molécula e degradação proteolítica que prejudicam o seu tempo de ação. A fim de melhorar sua eficácia, reduzir a toxicidade e prolongar a estabilidade, esses agentes antimicrobianos são incorporados em polímeros biocompatíveis, como os hidrogéis (GONZÁLEZ-HENRÍQUEZ; SARABIA-VALLEJOS; RODRIGUEZ-HERNANDEZ, 2017). Estes podem ser utilizados como veículos para os antimicrobianos de diferentes origens, como nanopartículas, antimicrobianos naturais ou sintéticos, ou a partir de substâncias que apresentem atividade antimicrobiana intrínseca, como peptídeos, quitosana ou polímeros com grupos funcionais (NG et al., 2014).

Somado a essas propriedades, os produtos naturais com atividade antimicrobiana, despertam o interesse para o desenvolvimento de novas formulações tendo como base os hidrogéis, inclusive para aplicação vaginal. O óleo de anis incorporado em hidrogéis a base de hidroxipropilmetilcelulose, alginato de sódio e Carbopol 943 apresentaram atividade antibacteriana contra *S. aureus* e *Sarcina lutea*, sendo que a formulação a base de carbopol também possuiu atividade antifúngica em *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. parapsilosis*, mostrando que a estrutura e funcionalidade deste polímero

colaborou com a atividade do princípio ativo (GAFITANU et al., 2016). El-Kased et al. (2017) formularam géis de quitosana e Carbopol 934[®] suplementados com mel com atividade antimicrobiana sobre microrganismos causadores de infecções em feridas (*Pseudomonas aeruginosa*, *S. aureus*, *Klebsiella pneumoniae* e *Streptococcus pyogenes*), sendo a atividade mais pronunciada no gel de quitosana. As formulações também foram capazes de curar as feridas infectadas. Carbopol 940[®] e quitosana foram utilizados também para incorporação de extrato de própolis com atividade antifúngica sobre *C. albicans in vitro* e em modelo de candidíase vaginal, sem causar nenhum dano a arquitetura do tecido (BERRETTA et al., 2013). Esses estudos mostram a flexibilidade de utilização dessas formulações, inclusive para veicular produtos naturais como princípios ativos. Além disso, evidenciou-se em modelos *in vivo*, ausência ou baixa toxicidade, permitindo o desenvolvimento de formulações seguras com atividade antimicrobiana.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho foi avaliar a prevalência e perfil de sensibilidade de EGB isolados de gestantes atendidas no Hospital Universitário de Londrina (HUL), bem como desenvolver um hidrogel enriquecido com óleo de copaíba extraído de *Copaifera officinalis* com atividade antimicrobiana contra EGB.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar a prevalência de EGB isolados de gestantes atendidas no HUL no período de Janeiro de 2014 a Dezembro de 2016.

Determinar o perfil de sensibilidade dos isolados de EGB à penicilina G, eritromicina e clindamicina.

Avaliar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) do óleo de copaíba sobre células planctônicas de EGB.

Formular hidrogéis com óleo de copaíba tendo como base diferentes polímeros e analisar suas características físico-químicas.

Avaliar a atividade antimicrobiana dos hidrogéis sobre as células planctônicas de EGB.

Analisar a cinética do tempo de morte de células planctônicas e sésses de EGB tratadas com óleo de copaíba e com hidrogel de óleo de copaíba.

Analisar alterações morfológicas das células planctônicas de EGB após

tratamento com óleo de copaíba e com hidrogel de óleo de copaíba.

Verificar a citotoxicidade do hidrogel de óleo de copaíba em mucosa cervicovaginal de camundongos fêmeas.

4. REFERÊNCIAS

AHMED, E. M. Hydrogel: Preparation , characterization , and applications : A review. **Journal of Advanced Research**, v. 6, p. 105–121, 2015.

ARESCOUG, T.; STÅLHAMMAR-CARLEMALM, M.; KARLSSON, I.; LINDAHL, G. Streptococcal Beta Protein Has Separate Binding Sites for Human Factor H and IgA-Fc. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 15, p. 12642–12648, 2002.

ASHOUR, M. L.; EL-READI, M.; YOUNS, M.; MULYANINGSIH, S.; SPORER, F.; EFFERTH, T.; WINK, M. Chemical composition and biological activity of the essential oil obtained from *Bupleurum marginatum* (Apiaceae). **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 61, p. 1079–1087, 2009.

AZAVEDO, J. C. S. DE; MCGAVIN, M.; DUNCAN, C.; LOW, D. E.; MCGEER, A. Prevalence and Mechanisms of Macrolide Resistance in Invasive and Noninvasive Group B Streptococcus Isolates from Ontario, Canada. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, n. 12, p. 3504–3508, 2001.

BAKER, C. J. The spectrum of perinatal group B streptococcal disease. **Vaccine**, v. 31, n. S4, p. D3–D6, 2013.

BAKER, J. R.; PRITCHARD, D. G. Action pattern and substrate specificity of the hyaluronan lyase from group B streptococci. **Biochemical Journal**, v. 471, p. 465–471, 2000.

BANNO, H.; KIMURA, K.; TANAKA, Y.; KITANAKA, H.; JIN, W.; WACHINO, J. I.; YAMADA, K.; SHIBAYAMA, K.; ARAKAWAA, Y. Characterization of multidrug-resistant group b streptococci with reduced penicillin susceptibility forming small non-beta-hemolytic colonies on sheep blood agar plates. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 52, n. 6, p. 2169–2171, 2014.

BARBOSA, P. C. S.; MOREIRA WIEDEMANN, L. S.; DA SILVA MEDEIROS, R.; DE TARSO BARBOSA SAMPAIO, P.; VIEIRA, G.; FLORÊNCIO DA VEIGA-JUNIOR, V. Phytochemical fingerprints of copaiba oils (*Copaifera multijuga* Hayne) determined by multivariate analysis. **Chemistry and Biodiversity**, v. 10, n. 7, p. 1350–1360, 2013.

BARON, M. J.; BOLDUC, G. R.; GOLDBERG, M. B.; AUPE, T. C.; MADOFF, L. C. Alpha C Protein of Group B Streptococcus Binds Host Cell Surface Glycosaminoglycan and Enters Cells by an Actin-dependent Mechanism. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 23, p. 24714–24723, 2004.

BAYLAC, S.; RACINE, P. Inhibition of 5-lipoxygenase by essential oils and other natural fragment extracts. **International Journal of Aromatherapy**, v. 13, n. 2–3, p. 138–142, 2003.

- BAYLAC, S.; RACINE, P. Inhibition of human leukocyte elastase by natural fragrant extracts of aromatic plants. **International Journal of Aromatherapy**, v. 14, n. 4, p. 179–182, 2004.
- BERG, B. R.; HOUSEMAN, J. L.; TERSTEEG, Z. E.; LEBAR, W. D.; NEWTON, D. W. Antimicrobial Susceptibilities of Group B Streptococcus Isolates from Prenatal Screening Samples. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 52, n. 9, p. 3499–3500, 2014.
- BERRETTA, A. A.; CASTRO, P. A. DE; CAVALHEIRO, A. H.; FORTES, V. S.; BOM, V. P.; NASCIMENTO, A. P.; MARQUELE-OLIVEIRA, F.; PEDRAZZI, V.; NAIRA, L.; RAMALHO, Z.; GOLDMAN, G. H. Evaluation of Mucoadhesive Gels with Propolis (EPP-AF) in Preclinical Treatment of Candidiasis Vulvovaginal Infection. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, p. 1–18, 2013.
- BIASI-GARBIN, R. P.; OTAGUIRI, E. S.; MOREY, A. T.; FERNANDES, M.; ELISA, A.; MORGUETTE, B.; ARMANDO, C.; LANCHEROS, C.; KIAN, D.; REGINA, M.; PERUGINI, E.; NAKAZATO, G.; DURÁN, N.; NAKAMURA, C. V.; YAMAUCHI, L. M.; YAMADA-OGATTA, S. F. Effect of Eugenol against *Streptococcus agalactiae* and synergistic interaction with biologically produced silver nanoparticles. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2015, 2015.
- BIAVATTI, M. W.; DOSSIN, D.; DESCHAMPS, F. C.; LIMA, M. P. Análises de óleos-resinas de copaíba: contribuição par ao seu controle de qualidade. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 2, p. 230–235, 2006.
- BISIO, A.; SCHITO, A. M.; EBRAHIMI, S. N.; HAMBURGER, M.; MELE, G.; PIATTI, G.; ROMUSSI, G.; DAL PIAZ, F.; DE TOMMASI, N. Antibacterial compounds from *Salvia adenophora* Fernald (Lamiaceae). **Phytochemistry**, v. 110, p. 120–132, 2015.
- BODDUPALLI, B. M.; MOHAMMED, Z. N. K.; NATH, R.; BANJI, D. Mucoadhesive drug delivery system : An overview. **Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research**, v. 1, n. 4, p. 381–387, 2010.
- BORGES, A.; ABREU, A. C.; DIAS, C.; SAAVEDRA, M. J.; BORGES, F.; SIMÕES, M. New Perspectives on the Use of Phytochemicals as an Emergent Strategy to Control Bacterial Infections Including Biofilms. **Molecules**, v. 21, p. 1–41, 2016.
- BOYER, K. M.; GOTOFF, S. P. Prevention of early-onset neonatal group B streptococcal disease with selective intrapartum chemprophylaxis. **The New England Journal of Medicine**, v. 314, n. 26, p. 1665–1669, 1986.
- C. Assessment of In vitro antioxidant , antibacterial and immune activation potentials of aqueous and ethanol extracts of *Phyllanthus niruri*. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 92, n. 9, p. 1874–1877, 2012.
- CALÓ, E.; KHUTORYANSKIY, V. V. Biomedical applications of hydrogels : A review of patents and commercial products. **European Polymer Journal**, v. 65, p. 252–267, 2015.
- CAPANNA, F.; EMONET, S. P.; CHERKAOU, A.; IRION, O.; SCHRENZEL, J.; DE TEJADA, B. M. Antibiotic resistance patterns among group B Streptococcus isolates: Implications for antibiotic prophylaxis for early-onset neonatal sepsis. **Swiss Medical Weekly**, v. 143, n. March, p. 17–20, 2013.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Prevention of Perinatal Group B Streptococcal Disease : A Public Health. **MMWR. Recommendations and reports : Morbidity and mortality weekly report.**, v. 45, n. RR-7, 1996.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Prevention of perinatal group B Streptococcal disease. **MMWR. Recommendations and reports : Morbidity and mortality weekly report.**, v. 51, n. RR-11, p. 1–22, 2002.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Prevention of Perinatal Group B Streptococcal Disease. **MMWR. Recommendations and reports : Morbidity and mortality weekly report.**, v. 59, n. No. RR-10, p. 1–32, 2010.

CERMELLI, C.; FABIO, A.; FABIO, G.; QUAGLIO, P. Effect of *Eucalyptus* essential oil on respiratory bacteria and viruses. **Current Microbiology**, v. 56, n. 1, p. 89–92, 2008.

CHEN, F.; AL-AHMAD, H.; JOYCE, B.; ZHAO, N.; KO, T. G.; STEWART, C. N. Plant Physiology and Biochemistry Within-plant distribution and emission of sesquiterpenes from *Copaifera officinalis*. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 47, p. 1017–1023, 2009.

CHENG, Q.; STAFSLIEN, D.; PURUSHOTHAMAN, S. S.; CLEARY, P. The Group B Streptococcal C5a Peptidase is Both a Specific Protease and an Invasin. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 5, p. 2408–2413, 2002.

CHO, C.; TANG, Y.; CHEN, Y.; WANG, S.-Y.; YANG, Y.-H.; WANG, T.-H.; YEH, C.; WU, K.; JENG, M. Group B Streptococcal infection in neonates and colonization in pregnant women : An epidemiological retrospective analysis. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, p. 1–8, 2017.

CHURCH, D.; CARSON, J.; GREGSON, D. Point prevalence study of antibiotic susceptibility of genital group B streptococcus isolated from near-term pregnant women in Calgary , Alberta. v. 23, n. 3, p. 121–124, 2012.

CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard. In: **CLSI document M02-A11**. [s.l: s.n.]. v. 32p. 76.

CRESPO-ORTIZ, M. P.; CASTAÑEDA-RAMIREZ, C. R.; RECALDE-BOLAÑOS, M.; VÉLEZ-LONDOÑO, J. D. Emerging trends in invasive and noninvasive isolates of *Streptococcus agalactiae* in a Latin American hospital : a 17-year study. **BMC infectious diseases**, v. 14, p. 1–11, 2014.

CUEVA, C.; MINGO, S.; MUÑOZ-GONZÁLEZ, I.; BUSTOS, I.; REQUENA, T.; DEL CAMPO, R.; MARTÍN-ÁLVAREZ, P. J.; BARTOLOMÉ, B.; MORENO-ARRIBAS, M. V. Antibacterial activity of wine phenolic compounds and oenological extracts against potential respiratory pathogens. **Letters in Applied Microbiology**, v. 54, n. 6, p. 557–563, 2012.

CUTLER, R. R.; ODENT, M.; HAJJ-AHMAD, H.; MAHARJAN, S.; BENNETT, N. J.; JOSLING, P. D.; BALL, V.; HATTON, P.; ANTONIA, M. D. In vitro activity of an aqueous allicin extract and a novel allicin topical gel formulation against Lancefield group B streptococci. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 63, p. 151–154, 2009.

DANGL, J. L.; JONES, J. D. G. Plant pathogens and integrated defence responses to infection. **Nature**, v. 411, p. 826–833, 2001.

DE LIMA SILVA, J. J.; POMPEU, D. G.; XIMENES, N. C.; DUARTE, A. S. G.; GRAMOSA, N. V.; DE MORAIS CARVALHO, K.; DE CASTRO BRITO, G. A.; GUIMARÃES, S. B. Effects of Kaurenoic Acid and Arginine on Random Skin Flap Oxidative Stress, Inflammation, and Cytokines in Rats. **Aesthetic Plastic Surgery**, v. 39, n. 6, p. 971–977, 2015.

DESAI, S. H.; KAPLAN, M. S.; CHEN, Q.; MACY, E. M. Morbidity in Pregnant Women Associated with Unverified Penicillin Allergies , Antibiotic Use , and Group B Streptococcus Infections. **The Permanente Journal**, v. 21, p. 1–6, 2017.

DOARE, K. LE; HEATH, P. T. An overview of global GBS epidemiology. **Vaccine**, v. 31S, p. D7–D12, 2013.

DUTRA, V. G.; ALVES, V. M. N.; OLENDZKI, A. N.; DIAS, C. A G.; DE BASTOS, A. F. A.; SANTOS, G. O.; DE AMORIN, E. L. T.; SOUSA, M. Â. B.; SANTOS, R.; RIBEIRO, P. C. S.; FONTES, C. F.; ANDREY, M.; MAGALHÃES, K.; ARAUJO, A. A; PAFFADORE, L. F.; MARCONI, C.; MURTA, E. F. C.; FERNANDES, P. C.; RADDI, M. S. G.; et al. *Streptococcus agalactiae* in Brazil: serotype distribution, virulence determinants and antimicrobial susceptibility. **BMC infectious diseases**, v. 14, p. 323, 2014.

EL-KASED, R. F.; AMER, R. I.; ATTIA, D.; ELMAZAR, M. M. Honey-based hydrogel : In vitro and comparative In vivo evaluation for burn wound healing. **Scientific Reports**, p. 1–11, 2017.

ELAISSI, A.; ROUIS, Z.; ABID, N.; SALEM, B.; MABROUK, S.; SALEM, Y.; BEL, K.; SALAH, H.; AOUNI, M.; FARHAT, F.; CHEMLI, R.; HARZALLAH-SKHIRI, F.; KHOUJA, M. L. Chemical composition of 8 *Eucalyptus* species essential oils and the evaluation of their antibacterial , antifungal and antiviral activities. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 12, n. 1, p. 1, 2012.

FARLEY, M. M. Group B Streptococcal Disease in Nonpregnant Adults. **Clinical Infectious Diseases**, v. 33, p. 556–561, 2001.

FJALSTAD, J. W.; ESAIASSEN, E.; JUVET, L. K.; ANKER, J. N. VAN DEN; KLINGENBERG, C. Antibiotic therapy in neonates and impact on gut microbiota and antibiotic resistance development : a systematic review. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, p. 1–12, 2017.

FLORINDO, C.; DAMIÃO, V.; SILVESTRE, I.; FARINHA, C.; RODRIGUES, F.; NOGUEIRA, F.; CASTRO, R.; BORREGO, M. J.; SNTOS-SANCHES, I. Epidemiological surveillance of colonising group B Streptococcus epidemiology in the Lisbon and Tagus Valley regions , Portugal (2005 to 2012): emergence of a new epidemic type IV / clonal complex 17 clone. **Europe’s journal on infectious disease, epidemiology, prevention and control**, v. 269, p. 10–13, 2014.

FONSECA, A. P.; ESTRELA, F. T.; MORAES, T. S.; CARNEIRO, L. J.; BASTOS, J. K.; DOS SANTOS, R. A.; AMBRÓSIO, S. R.; MARTINS, C. H. G.; VENEZIANI, R. C. S. In Vitro antimicrobial activity of plant-derived diterpenes against bovine mastitis bacteria. **Molecules**, v. 18, n. 7, p. 7865–7872, 2013.

GAFITANU, C. A.; FILIP, D.; CERNATESCU, C.; IBANESCU, C.; DANU, M.; PÂSLARU, E.; RUSU, D.; TUCHILU, C. G.; MACOCINSCHI, D. Formulation and

evaluation of anise-based bioadhesive vaginal gels. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 83, p. 485–495, 2016.

GALÚCIO, C. S.; BENITES, C. I.; RODRIGUES, R. A. F.; MACIEL, M. R. W. Recuperação de sesquiterpenos do óleo-resina de copaíba a partir da destilação molecular. **Química Nova**, v. 39, n. 7, p. 795–800, 2016.

GARLAND, S. M.; FLIEGNER, J. R. Group B Streptococcus (GBS) and neonatal infections: the case for intrapartum chemoprophylaxis. **The Australian & New Zealand journal of obstetrics & gynaecology**, v. 31, n. 2, p. 119–122, 1991.

GONZÁLEZ-HENRÍQUEZ, C. M.; SARABIA-VALLEJOS, M. A.; RODRIGUEZ-HERNANDEZ, J. Advances in the Fabrication of Antimicrobial Hydrogels for Biomedical Applications. **Materials**, v. 10, p. 1–23, 2017.

GUIMARÃES, A. L. A.; CUNHA, E. A.; MATIAS, F. O.; GARCIA, P. G.; DANOPOULOS, P.; SWIKIDISA, R.; PINHEIRO, V. A.; NOGUEIRA, R. J. L. Antimicrobial Activity of Copaiba (*Copaifera officinalis*) and Pracaxi (*Pentaclethra macroloba*) Oils against *Staphylococcus aureus*: Importance in compound wound care. **International Journal of Pharmaceutical Compounding**, v. 20, n. 1, p. 58–62, 2016.

HAKANSSON, S.; LILJA, M.; JACOBSSON, B.; KÄLLÉN, K. Reduced incidence of neonatal early onset group B streptococcal infection after promulgation of guidelines for risk-based intrapartum antibiotic prophylaxis in Sweden: analysis of a national population-based cohort. **Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica**, p. 0–3, 2017.

HAMDI, A.; JARAMILLO-CARMONA, S.; BEJI, R. S.; TEJ, R.; ZAOUI, S.; RODRÍGUEZ-ARCOS, R.; JIMÉNEZ-ARAUJO, A.; KASRI, M.; LACHAAL, M.; BOURAOUI, N. K.; GUILLÉN-BEJARANO, R. The phytochemical and bioactivity profiles of wild *Asparagus albus* L. plant. **Food Research International**, v. 99, p. 720–729, 2017.

HAR, D.; SOLENSKY, R. Penicillin and Beta-Lactam Hypersensitivity. **Immunology and Allergy Clinics of North America**, v. 37, n. 4, p. 643–662, 2017.

HAYS, C.; LOUIS, M.; PLAINVERT, C.; DMYTRUK, N.; TOUAK, G.; TRIEU-CUOT, P.; POYART, C.; TAZI, A. Changing epidemiology of Group B Streptococcus susceptibility to fluoroquinolones and aminoglycosides in France. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, p. AAC.01374-16, 2016.

HOOD, M.; JANNEY, A.; DAMERON, G. Beta hemolytic streptococcus Group B associated with problems of the perinatal period. **American Journal of Obstetrics & Gynecology**, v. 82, n. 4, p. 809–818, 1961.

HRAOUI, M.; BOUTIBA-BEN BOUBAKER, I.; RACHDI, M.; SLIM, A.; BEN REDJEB, S. Macrolide and tetracycline resistance in clinical strains of *Streptococcus agalactiae* isolated in Tunisia. **Journal of Medical Microbiology**, v. 61, p. 1109–1113, 2012.

IZUMI, E.; UEDA-NAKAMURA, T.; VEIGA, V. F.; PINTO, A. C.; NAKAMURA, C. V. Terpenes from *Copaifera* demonstrated *in vitro* antiparasitic and synergic activity. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 55, n. 7, p. 2994–3001, 2012.

KARAPANDZOVA, M.; STEFKOV, G.; TRAJKOVSKA-DOKIC, E.; KAFTANDZIEVA,

- A.; KULEVANOVA, S. Antimicrobial activity of needle essential oil of *Pinus peuce* Griseb.(Pinaceae) from Macedonian flora. **Macedonian pharmaceutical bulletin**, v. 57, n. 1, p. 1–12, 2011.
- KERNÉIS, S.; PLAINVERT, C.; BARNIER, J.; TAZI, A.; DMYTRUK, N. Clinical and microbiological features associated with group B Streptococcus bone and joint infections , France 2004 – 2014. **Europe’s journal on infectious disease, epidemiology, prevention and control**, 2017.
- KIMURA, K.; NAGANO, N.; NAGANO, Y.; SUZUKI, S.; WACHINO, J. I.; SHIBAYAMA, K.; ARAKAWA, Y. High frequency of fluoroquinolone- and macrolide-resistant streptococci among clinically isolated group b streptococci with reduced penicillin susceptibility. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 68, n. 3, p. 539–542, 2013.
- KIMURA, K.; SUZUKI, S.; WACHINO, J. I.; KUROKAWA, H.; YAMANE, K.; SHIBATA, N.; NAGANO, N.; KATO, H.; SHIBAYAMA, K.; ARAKAWA, Y. First molecular characterization of group B streptococci with reduced penicillin susceptibility. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 8, p. 2890–2897, 2008.
- LAMAGNI, T. L.; KESHISHIAN, C.; EFSTRATIOU, A.; GUY, R.; HENDERSON, K. L.; BROUGHTON, K.; SHERIDAN, E. Emerging trends in the epidemiology of invasive group B streptococcal disease in England and Wales, 1991-2010. **Clinical Infectious Diseases**, v. 57, n. 5, p. 682–688, 2013.
- LAMBIASE, A.; AGANGI, A.; DEL PEZZO, M.; QUAGLIA, F.; TESTA, A.; ROSSANO, F.; MARTINELLI, P.; CATANIA, M. R. In vitro resistance to macrolides and clindamycin by group B streptococcus isolated from pregnant and nonpregnant women. **Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology**, v. 2012, 2012.
- LANCEFELD, B. Y. R. C.; HARE, R. The serological differentiation of pathogenic and non-pathogenic strains of hemolytic streptococci from parturient women. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 61, n. 3, p. 335-349.1935.
- LANDWEHR-KENZEL, S.; HENNEKE, P. Interaction of *Streptococcus agalactiae* and cellular innate immunity in colonization and disease. **Frontiers in Immunology**, v. 5, p. 1–11, 2014.
- LAUER, P.; RINAUDO, C. D.; SORIANI, M.; MARGARIT, I.; MAIONE, D.; ROSINI, R.; TADDEI, A. R.; MORA, M.; RAPPUOLI, R.; GRANDI, G.; TELFORD, J. L. Genome Analysis Reveals Pili in Group B Streptococcus. **Science**, v. 309, n. 5731, p. 105–105, 2005.
- LEANDRO, L. M.; VARGAS, F. DE S.; BARBOSA, P. C. S.; NEVES, J. K. O.; DA SILVA, J. A.; VEIGA-JUNIOR, V. F. Chemistry and biological activities of terpenoids from copaiba (*Copaifera* spp.) oleoresins. **Molecules**, v. 17, p. 3866–3889, 2012.
- LI, S.; JEDRZEJAS, M. J. Hyaluronan Binding and Degradation by *Streptococcus agalactiae* Hyaluronate Lyase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 44, p. 41407–41416, 2001.
- LIBSTER, R.; EDWARDS, K. M.; LEVENT, F.; EDWARDS, M. S.; RENCH, M. A.; CASTAGNINI, L. A.; COOPER, T.; SPARKS, R. C.; BAKER, C. J.; SHAH, P. E. Long-term Outcomes of Group B Streptococcal Meningitis. **Pediatrics**, v. 130, p. e8–e15, 2012.

- LIMA DE OLIVEIRA, C.; TARGINO CAMPOS, L.; ALENCAR DUARTE, H.; MORAIS DORNELAS BEZERRA, L.; MENDES TEMÓTEO BRANDT, L.; MEDEIROS RODRIGUES CARDOSO, A.; DIAS DE CASTRO, R.; LEITE CAVALCANTI, A. Antimicrobial activity of *Copaifera officinalis* oil on oral biofilm bacteria. **Rev. Ciênc. Méd. Biol**, v. 15, n. 1, p. 34–38, 2016.
- LOPES, L. N.; SANTOS, F. A. F.; OLIVEIRA, L. C. M.; PERCÁRIO, S.; BARROS, C. A. V. DE; BRITO, M. V. H. Copaiba oil effect on induced fecal peritonitis in rats. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 30, n. 8, p. 568–573, 2015.
- LU, B.; LI, D.; CUI, Y.; SUI, W.; HUANG, L.; LU, X. Epidemiology of Group B streptococcus isolated from pregnant women in Beijing, China. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 20, n. 6, 2014.
- MARIÓ, M. J. S.; VALENZUELA, I.; VÁSQUEZ, A. E.; ILLANES, S. E. Prevention of Early-onset neonatal Group B Streptococcal Disease. **Reviews in Obstetrics & Gynecology**, v. 6, n. 2, p. 63–68, 2013.
- MAZIA, R. S.; REGINA, R.; PEREIRA, D. A.; MARIA, L.; FRANCISCO, B. DE; RAQUEL, M.; NATALI, M.; PRADO, B.; FILHO, D.; NAKAMURA, C. V.; BRUSCHI, M. L.; UEDA-NAKAMURA, T. Formulation and Evaluation of a Mucoadhesive Thermo-responsive System Containing Brazilian Green Propolis for the Treatment of Lesions Caused by Herpes Simplex Type I. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 105, p. 113–121, 2016.
- MELIN, P. Neonatal group B streptococcal disease : from pathogenesis to preventive strategies. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 17, n. 9, p. 1294–1303, 2011.
- MIRZA, M. A.; PANDA, A. K.; ASIF, S.; VERMA, D.; TALEGAONKAR, S.; MANZOOR, N.; KHAN, A.; AHMED, F. J.; DUDEJA, M.; IQBAL, Z. A vaginal drug delivery model. **Drug Delivery**, v. 23, n. 8, p. 3123–3134, 2016.
- MULYANINGSIH, S.; YOUNS, M.; EL-READI, M. Z.; ASHOUR, M. L.; NIBRET, E.; SPORER, F.; HERRMANN, F.; REICHLING, J.; WINK, M. Biological activity of the essential oil of *Kadsura longipedunculata* (Schisandraceae) and its major components. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 62, n. 8, p. 1037–1044, 2010.
- NAGANO, N.; NAGANO, Y.; TOYAMA, M.; KIMURA, K.; SHIBAYAMA, K.; ARAKAWA, Y. Penicillin-Susceptible Group B Streptococcal Clinical Isolates with Reduced Cephalosporin Susceptibility. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 52, n. 9, p. 3406–3410, 2014.
- NAGANO, N.; NAGANO, Y.; TOYAMA, M.; KIMURA, K.; TAMURA, T.; SHIBAYAMA, K.; ARAKAWA, Y. Nosocomial spread of multidrug-resistant group B streptococci with reduced penicillin susceptibility belonging to clonal complex 1. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, n. 4, p. 849–856, 2012.
- NEVES, J.; BAHIA, M. F. Gels as vaginal drug delivery systems. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 318, p. 1–14, 2006.
- NEVES, J.; DA SILVA, M. V.; GONÇALVES, M. P.; AMARAL, M. H.; BAHIA, M. F. Rheological Properties of Vaginal Hydrophilic Polymer Gels. **Current Drug Delivery**, v. 6,

p. 83–92, 2009.

NG, V. W. L.; CHAN, J. M. W.; SARDON, H.; ONO, R. J.; GARCÍA, J. M. Antimicrobial hydrogels: a new weapon in the arsenal against multidrug-resistant infection. **Advanced Drug Delivery Reviews**, p. 1–17, 2014.

OTAGUIRI, E. S.; MORGUETTE, A. E. B.; BIASI-GARBIN, R. P.; MOREY, A. T.; LANCHEROS, C. A. C.; KIAN, D.; OLIVEIRA JR, A. G.; KERBAUY, G.; PERUGINI, M. R. E.; DURÁN, N.; NAKAMURA, C. V.; VEIGA-JÚNIOR, V. F.; NAKAZATO, G.; PINGE-FILHO, P.; YAMAUCHI, L. M.; YAMADA-OGATTA, S. F. Antibacterial Combination of Oleoresin from *Copaifera multijuga* Hayne and Biogenic Silver Nanoparticles Towards *Streptococcus agalactiae*. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 18, p. 177–190, 2017.

OTAGUIRI, E. S.; MORGUETTE, A. E. B.; TAVARES, E. R.; MYRELLA, P.; MOREY, A. T.; CARDOSO, J. D.; REGINA, M.; PERUGINI, E.; YAMAUCHI, L. M. Commensal *Streptococcus agalactiae* isolated from patients seen at University Hospital of Londrina , Paraná , Brazil: capsular types , genotyping , antimicrobial susceptibility and virulence determinants. **BMC Microbiology**, v. 13, p. 297, 2013.

PAL, K.; BANTHIA, A. K.; MAJUMDAR, D. K. Polymeric Hydrogels : Characterization and Biomedical Applications. **Designed Monomers and Polymers**, v. 12, p. 197–220, 2009.

PENG, L.; KANG, S.; YIN, Z.; JIA, R.; SONG, X.; LI, L.; LI, Z. Antibacterial activity and mechanism of berberine against *Streptococcus agalactiae*. **International Journal of Clinical and Experimental Pathology**, v. 8, n. 5, p. 5217–5223, 2015.

PENG, S. C.; CHENG, C. Y.; SHEU, F.; SU, C. H. The antimicrobial activity of heyneanol A extracted from the root of taiwanese wild grape. **Journal of Applied Microbiology**, v. 105, n. 2, p. 485–491, 2008.

PHARES, C. R.; LYNFIELD, R.; FARLEY, M. M.; MOHLE-BOETANI, J.; HARRISON, L. H.; PETIT, S.; CRAIG, A. S.; SCHAFFNER, W.; ZANSKY, S. M.; GERSHMAN, K.; STEFONEK, K. R.; ALBANESE, B. A.; ZELL, E. R.; SCHUCHAT, A.; SCHRAG, S. J. Epidemiology of Invasive Group B Streptococcal Disease in the United States, 1999-2005. **Journal of the American Medical Association**, v. 299, n. 17, p. 2056–2065, 2008.

PIERI, F. A.; MARTINS MUSSI, M. C.; FIORINI, J. E.; SCATAMBURLO MOREIRA, M. A.; SCHNEEDORF, J. M. Bacteriostatic effect of copaiba oil (*Copaifera officinalis*) against *Streptococcus mutans*. **Brazilian Dental Journal**, v. 23, n. 1, p. 36–38, 2012.

PIERI, F. A.; MUSSI, M. C.; FIORINI, J. E.; SCHNEEDORF, J. M. Clinical and microbiological effects of copaiba oil (*Copaifera officinalis*) on dental plaque forming bacteria in dogs. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 62, n. 3, p. 578–585, 2010.

PIERI, F. A.; SOUZA, C. F.; COSTA, J. C. M.; BARRERO, M. A. O.; ESPESCHIT, I. F.; SILVA, V. O.; SCATAMBURLO MOREIRA, M. A. Inhibition of *Escherichia coli* from mastitic milk by copaiba oil. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 32, p. 1929–1934, 2011.

PIERI, F. A.; SOUZA, M. C. DE C.; VERMELHO, L. L. R.; VERMELHO, M. L. R.; PERCIANO, P. G.; VARGAS, F. S.; BORGES, A. P. B.; DA VEIGA-JUNIOR, V. F.;

MOREIRA, M. A. S.; KYLLAR, M.; WITTER, K.; NIEMIEC, B.; PIERI, F.; MUSSI, M.; FIORINI, J.; SCHNEEDORF, J.; HOFFMAN, L.; D'ARGENIO, D.; MACCOSS, M.; et al. Use of β -caryophyllene to combat bacterial dental plaque formation in dogs. **BMC Veterinary Research**, v. 12, n. 1, p. 216, 2016.

RANDIS, T. M.; GELBER, S. E.; HOOVEN, T. A.; ABELLAR, R. G.; AKABAS, L. H.; LEWIS, E. L.; WALKER, L. B.; BYLAND, L. M.; NIZET, V.; RATNER, A. J. Group B Streptococcus β -hemolysin / Cytolysin Breaches Maternal-Fetal Barriers to Cause Preterm Birth and Intrauterine Fetal Demise in Vivo. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 210, n. November, p. 265–273, 2014.

ROMAIN, A.-S.; COHEN, R.; PLAINVERT, C.; JOUBREL, C.; BÉCHET, S.; PERRET, A.; TAZI, A.; POYART, C.; LEVY, C. Clinical and laboratory features of Group B Streptococcus meningitis in infants and newborns: study of 848 cases in France from 2001-2014. **Clinical Infectious Diseases**, v. cix896, p. 1–27, 2017.

ROMERO, R.; DEY, S. K.; FISHER, S. J. Preterm labor: One syndrome, many causes. **Science**, v. 760, n. 6198, p. 760–765, 2014.

ROSSITER, S. E.; FLETCHER, M. H.; WUEST, W. M. Natural Products as Platforms To Overcome Antibiotic Resistance. **Chemical Reviews**, v. 117, p. 12415–12474, 2017.

RUPPEN, C.; NOTTER, J.; STRAHM, C.; SONDEREGGER, B.; SENDI, P. Osteoarticular and skin and soft-tissue infections caused by *Streptococcus agalactiae* in elderly patients are frequently associated with bacteremia. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, p. 9–11, 2017.

RUSSELL, N. J.; SEALE, A. C.; SULLIVAN, C. O.; DOARE, K. LE; HEATH, P. T.; LAWN, J. E.; BARTLETT, L.; CUTLAND, C.; GRAVETT, M.; IP, M.; MADHI, S. A.; RUBENS, C. E.; SAHA, S. K.; SCHRAG, S.; MEULEN, A. S. Risk of Early-Onset Neonatal Group B Streptococcal Disease With Maternal Colonization Worldwide : Systematic Review and Meta-analyses. **Clinical Infectious Diseases**, v. 65, n. S2, p. S152–S159, 2017.

SADEH, M.; FIROUZI, R.; DERAKHSHANDEH, A.; KHALILI, M. B.; KONG, F.; KUDINHA, T. Molecular characterization of *Streptococcus agalactiae* isolates from pregnant and non-pregnant women at yazd university hospital, Iran. **Jundishapur Journal of Microbiology**, v. 9, n. 2, p. 0–5, 2016.

SALEEM, M.; NAZIR, M.; ALI, M. S.; HUSSAIN, H.; LEE, Y. S.; RIAZ, N.; JABBAR, A. Antimicrobial natural products : an update on future antibiotic drug candidates. **Natural Product Reports**, v. 27, p. 238–254, 2010.

SANTOS, A. O.; IZUMI, E.; UEDA-NAKAMURA, T.; DIAS-FILHO, B. P.; DA VEIGA-JÚNIOR, V. F.; VATARU NAKAMURA, C. Antileishmanial activity of diterpene acids in copaiba oil. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 108, n. 1, p. 59–64, 2013a.

SANTOS, A. O.; UEDA-NAKAMURA, T.; DIAS FILHO, B. P.; VEIGA-JÚNIOR, V. F.; PINTO, A. C.; NAKAMURA, C. V. Antimicrobial activity of Brazilian copaiba oils obtained from different species of the *Copaifera* genus. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 103, n. 3, p. 277–281, 2008a.

SANTOS, A. O.; UEDA-NAKAMURA, T.; DIAS FILHO, B. P.; VEIGA JUNIOR, V. F.;

- PINTO, A. C.; NAKAMURA, C. V. Effect of Brazilian copaiba oils on *Leishmania amazonensis*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 120, n. 2, p. 204–208, 2008b.
- SANTOS, E. C. G.; DONNICI, C. L.; CAMARGOS, E. R. DA S.; REZENDE, A. A. DE; ANDRADE, E. H. D. A.; SOARES, L. A. L.; CARVALHO, M. A. R. DE; ALMEIDA, M. DAS G. Effects of *Copaifera duckei* Dwyer oleoresin on the cell wall and cell division of *Bacillus cereus*. **Journal of Medical Microbiology**, v. 62, p. 1032–1037, 2013b.
- SANTOS, R. C. V.; ALVES, C. F. DOS S.; SCHNEIDER, T.; LOPES, L. Q. S.; AURICH, C.; GIONGO, J. L.; BRANDELLI, A.; VAUCHER, R. DE A. Antimicrobial activity of Amazonian oils against *Paenibacillus* species. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 109, p. 265–268, 2012.
- SCHRAG, S. J.; FARLEY, M. M.; PETIT, S.; REINGOLD, A. Epidemiology of Invasive Early-Onset Neonatal Sepsis, 2005 to 2014. **Pediatrics**, v. 138, n. 6, p. e20162013, 2016.
- SCHRAG, S. J.; VERANI, J. R. Intrapartum antibiotic prophylaxis for the prevention of perinatal group B streptococcal disease: Experience in the United States and implications for a potential group B streptococcal vaccine. **Vaccine**, v. 31, n. S4, p. D20–D26, 2013.
- SCHUCHAT, A. Infectious Group B streptococcal disease in newborns : a global perspective on prevention. v. 1985, p. 19–25, 1995.
- SEALE, A. C.; KOECH, A. C.; SHEPPARD, A. E.; BARSOSIO, H. C.; LANGAT, J.; ANYANGO, E.; MWAKIO, S.; MWARUMBA, S.; MORPETH, S. C.; ANAMPIU, K.; VAUGHAN, A.; GIESS, A.; MOGENI, P.; WALUSUNA, L.; MWANGUDZAH, H.; MWANZUI, D.; SALIM, M.; KEMP, B.; JONES, C.; et al. Maternal colonization with *Streptococcus agalactiae* and associated stillbirth and neonatal disease in coastal Kenya. **Nature Microbiology**, v. 1, p. 1–10, 2016.
- SEKI, T.; KIMURA, K.; REID, M. E.; MIYAZAKI, A.; BANNO, H.; JIN, W.; WACHINO, J. I.; YAMADA, K.; ARAKAWA, Y. High isolation rate of MDR group B streptococci with reduced penicillin susceptibility in Japan. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 70, n. 10, p. 2725–2728, 2015.
- SLOTVED, H.; KONG, F.; LAMBERTSEN, L.; SAUER, S.; GILBERT, G. L. Serotype IX , a Proposed New *Streptococcus agalactiae* Serotype. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 9, p. 2929–2936, 2007.
- TOBOUTI, P. L.; MARTINS, T. C. DE A.; PEREIRA, T. J.; MUSSI, M. C. M. Antimicrobial activity of copaiba oil : A review and a call for further research. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 94, p. 93–99, 2017.
- TOBOUTI, P. L.; MUSSI, M. C. M.; ROSSI, D. C. P.; PIGATTI, F. M.; TABORDA, C. P.; DE ASSIS TAVEIRA, L. A.; DE SOUSA, S. C. O. M. Influence of melaleuca and copaiba oils on *Candida albicans* adhesion. **Gerodontology**, v. 33, n. 3, p. 380–385, 2016.
- UPADHYAY, A.; UPADHYAYA, I.; KOLLANOOR-JOHN, A.; VENKITANARAYANAN, K. Combating Pathogenic Microorganisms Using Plant-Derived Antimicrobials : A Minireview of the Mechanistic Basis. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1–18, 2014.

VEIGA JR, V. F.; PINTO, A. C. O gênero *Copaifera* L. v. 25, n. 2, p. 273–286, 2002.

VORNHAGEN, J.; WALDORF, K. M. A.; RAJAGOPAL, L. Perinatal Group B Streptococcal Infections : Virulence Factors , Immunity , and Prevention Strategies. **Trends in Microbiology**, v. 25, n. 11, p. 919–931, 2017.

WICHTERLE, O.; LIM, D. Hydrophilic gels for biological use. **Nature**, v. 185, p. 117–118, 1960.

5. APÊNDICES

5.1 APÊNDICE A

Prevalência e sensibilidade aos antimicrobianos de *Streptococcus agalactiae* em gestantes atendidas no Hospital Universitário de Londrina, Paraná, Brazil.

Prevalence and antimicrobial susceptibility profile of *Streptococcus agalactiae* in pregnant women seen at the University Hospital of Londrina, Paraná, Brazil.

Ana Elisa Belotto Morguette¹, Renata Perugini Biasi-Garbin¹, Eliane Saori Otaguiri¹, Marcia Regina Eches Perugini², Marsileni Pelisson², Floristher Elaine Carrara-Marroni², Eliana Carolina Vespero², Renata Aparecida Belei³, Gilselena Kerbauy³, Jaqueline Dario Capobiango⁴, Lucy Megumi Yamauchi¹, Sueli Fumie Yamada-Ogatta¹

¹ Departamento de Microbiologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brazil.

² Departamento de Patologia, Análises Clínicas e Toxicológicas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brazil.

³ Departamento de Enfermagem, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brazil.

⁴ Departamento de Clínica Médica, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brazil.

Resumo

Um estudo retrospectivo foi realizado com gestantes atendidas no Hospital Universitário de Londrina, Paraná, Brasil para determinar a prevalência de colonização vaginal-retal por *Streptococcus* do Grupo B (EGB) e o perfil de sensibilidade de EGB aos antimicrobianos utilizados para a antibioticoterapia profilática intraparto. *Swabs* vaginais-retais foram coletados de 2.901 mulheres entre a 35^a e 37^a semana de gestação. Destes, 528 (18,2%) apresentaram cultura positiva para EGB, e 0,4%, 10,2% e 10% dos isolados foram resistentes à penicilina, eritromicina e clindamicina, respectivamente. Estes resultados destacam a importância de vigilância contínua da colonização por EGB em gestantes para a prevenção de infecções em neonatos por EGB.

Palavras-Chave: *Streptococcus agalactiae*, colonização, resistência antimicrobiana, prevalência.

Abstract

A retrospective study of pregnant women seen at the University Hospital of Londrina, Paraná, Brazil was performed to determine the prevalence of Group B *Streptococcus* (GBS) vaginal-rectal colonization, and the GBS susceptibility for antimicrobials used in intrapartum antibiotic prophylaxis. A vaginal-rectal swab was collected from 2,901 women between 35 and 37 weeks of gestation. Of these, 528 (18.2%) had a positive culture for GBS, and 0.4%, 10.2% and 10% of the isolates were resistant to penicillin, erythromycin and clindamycin, respectively. These results highlight the importance of continuous surveillance of GBS colonization in pregnant women for preventing GBS infections in neonates.

Key words: *Streptococcus agalactiae*, colonization, antimicrobial resistance, prevalence.

Introduction

Streptococcus agalactiae (group B *Streptococcus* - GBS) can be found as a harmless colonizer of the human microbiota, mainly in the gastrointestinal and genitourinary tract (MCCORD, 2001). Vaginal-rectal GBS colonization in pregnant women is usually asymptomatic but increases the risk of preterm birth and vertical transmission to newborns (HANSEN et al., 2004). Importantly, around 1-3% of neonates colonized during delivery may develop early-onset GBS diseases (BOYER; GOTOFF, 1985; CDC, 2010), which are associated with high mortality rates or long-term disabilities such as serious neurological sequelae (EMBLETON et al., 1999; EVANGELISTA; FREITAS, 2015).

Preventive universal strategies for detecting GBS vaginal-rectal colonization in pregnant women at 35 and 37 weeks of gestation and administration of intrapartum antibiotic prophylaxis (IAP) led to a significant reduction in the incidence of GBS early neonatal infections in many parts of the world (VERANI; SCHRAG,2010). Currently, the antenatal strategy for detecting GBS colonization recommended by Center for Diseases Control of the United States (CDC, 2010) is based on culture methods, and penicillin is the first-line for IAP. In penicillin-allergic pregnant women with high risk of anaphylaxis, erythromycin, clindamycin or vancomycin are recommended as alternatives. However, this prevention strategy is yet to be adopted by most of the underdeveloped or developing countries (EVANGELISTA; FREITAS, 2015). In Brazil, although the Brazilian Society of Gynecology and Obstetrics recommends the GBS screening and IAP in colonized pregnant women, there is no consensus regarding prophylactic measures to reduce the incidence of neonatal GBS infection.

In that sense, GBS detection and determination of susceptibility profile on recommended gestational period should be expanded at health care services to perform the IAP properly, as an attempt to reduce the risk of both bacterial transmission to newborns and development of resistance to commercially available antibiotics. Therefore, the present study aimed to evaluate the prevalence and antimicrobial susceptibility profile of GBS isolated from pregnant women seen at the University Hospital of Londrina in northern Paraná, Brazil.

Material and Method

Patients and study design

This retrospective study based on medical record review was conducted at the University Hospital of Londrina (UHL) between January 2014 and December 2016. This hospital is the major referral center for the “Sistema Único de Saúde (SUS)”, the Brazilian governmental health system, in northern Paraná, Brazil. Besides the population of Londrina and neighboring municipalities, this hospital is also a reference for tertiary care for individuals from several localities in the states of São Paulo and Mato Grosso do Sul. UHL has adopted the CDC recommendations to prevent GBS early-onset diseases in neonates. Penicillin (first-line), and clindamycin or vancomycin (second-lines) were used for IAP (CDC, 2010). Vaginal-rectal swabs were collected from all pregnant *women* between the 35th and 37th weeks of gestational age seen at the hospital. Sampling was performed on the lower third of vagina followed by the rectum using COPAN Transystem Stuart collection device (COPAN Diagnostic, Italy) and immediately transported to the microbiology laboratory. Data

from AGTA healthcare information system database, LABHOS[®] module indicated that 2,901 pregnant women were seen at the UHL during the analyzed period. The study protocols were approved by the Ethics Committee of Universidade Estadual de Londrina (Document 193/12-CEP/UEL).

Microbiological analysis

The swab specimens were inoculated into Granada Biphasic broth (bioMérieux, Brazil) and incubated at 37°C for 24 hours, in accordance with the hospital routine. After incubation, the samples were subcultured on Muller-Hinton agar (MHA) containing 5% sheep blood at 37°C for 24 hours. All isolates were identified to the species level by standard phenotypic methods based on colony morphology, Gram staining, catalase and CAMP (Christie, Atkins, Munch-Petersen) tests. Bacteria were kept at -20°C in TSB containing 20% glycerol and 5% sheep blood.

All GBS isolates were tested for penicillin G, clindamycin and erythromycin (Oxoid[™], Brazil) susceptibility using the disk diffusion method following the recommendations of the Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI, 2012). *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619 was used as the quality control of the assays.

Results and Discussion

Vaginal-rectal GBS colonization in pregnant and non-pregnant women can be transient, intermittent or persistent (HANSEN et al., 2004). Accordingly, the risk of maternal GBS transmission to newborn as well as development of early-onset infection have been maintained overtime. Therefore, continuous surveillance of vaginal GBS carriage in pregnant women is essential for prevention of neonatal GBS diseases.

The prevalence rates of GBS colonization in pregnant women vary between geographic regions, with the lowest and highest prevalence of colonization in Asia (11.1%) and Africa (22.4%), respectively. Although this regional heterogeneity is not fully understood, it does not seem to be due to the differences in culture methods or in the timing of vaginal-rectal swab collection in pregnancy (KWATRA et al, 2014).

In this study, 2,901 pregnant women (1,137, 820 and 944 during 2014, 2015 and 2016, respectively) with no clinical evidence of streptococcal infection were included. Of these, 528 (18.2%) had a positive culture for GBS, which is in accordance with the average prevalence of 19.7% previously reported for countries in the Americas (KWATRA et al, 2014). The GBS colonization prevalence in pregnant women did not vary significantly ($P > 0.05$) over the

analysis period, ranging between 17.7% (201/1137), 19.2% (157/820) and 18.0% (170/944) in 2014, 2015 and 2016, respectively (Table 1). Overall, the average age of pregnant women was 27 years (ranging from 13 to 54 years) and there were no significant differences ($P > 0.05$) in the prevalence of GBS colonization in between age groups (Table 2). In Brazil, differences in the prevalence of GBS colonization in pregnant women have also been detected according to the geographic region and the data are summarized in Table 3.

Table 1 - Antimicrobial susceptibility profile of GBS isolated from pregnant women seen at UHL from January 2014 to December 2016.

Year	N	n (%)	Antimicrobial						
			Penicilin		Erythromycin			Clindamycin	
			S	R	S	I	R	S	R
			n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
2014	1137	201 (17.7)	201 (100)	0	168 (83.6)	5 (2.5)	28 (13.9)	170 (84.6)	31 (15.4)
2015	820	156 (19.2)	154 (98.7)	2 (1.3)	135 (86.0)	6 (3.8)	15 (9.6)	143 (91.7)	13 (8.3)
2016	944	170 (18.0)	170 (100)	0	154 (90.0)	6 (3.5)	11 (6.5)	161 (94.7)	9 (5.3)
Total	2901	528 (18.2)	526 (99.6)	2 (0.4)	457 (86.6)	17 (3.2)	54 (10.2)	475 (90.0)	53 (10.0)

N: number of pregnant woman seen at UHL during the analyzed period; n: number of positive cultures for GBS; S: susceptible; I: intermediate; R: resistant

Table 2 - Age groups of pregnant women positive for vaginal-rectal GBS colonization seen at UHL from January 2014 to December 2016.

Age group	2014		2015		2016	
	N	%	N	%	N	%
< 20 years	41	20.4	29	18.6	24	14.1
20 to 24 years	25	12.4	44	28.2	44	25.9
25 to 29 years	53	26.4	27	17.3	35	20.6
30 to 34 years	39	19.4	22	14.1	36	21.2
> 35 years	43	21.4	34	21.8	31	18.2
Total	201	100	157	100	170	100

N: number of pregnant women seen at UHL during the analyzed period

Currently the use of intravenous penicillin G remains the first-line antibiotic for the IAP (VERANI; SCHRAG, 2010). The decrease in susceptibility to penicillin in GBS is rare, and 100% of penicillin-sensitive isolates were found in several regions of the world (WANG et al, 2015; BERG et al, 2014; FROHLICHER et al, 2014; OTAGUIRI et al. 2013). However, GBS isolates with decreased susceptibility to penicillin were previously described. This phenomenon occurs due to the accumulation of mutations in the penicillin-binding proteins PBP1, PBP2b and PBP2x, which participate in cell wall biosynthesis (NAGANO et al, 2009). In this study, we detected only two isolates (0.4%) resistant to penicillin. In Brazil, most of the GBS isolates remain sensitive to penicillin. Nonetheless, high-rate resistance to this antibiotic was detected in GBS isolated from pregnant women seen at a maternity facility in Sobral, Ceará (Table 3).

Table 3 - Prevalence of GBS colonization among pregnant women previously reported in Brazilian studies.

City/State	<i>N</i>	Site/Timing of swab collection	Enrichment medium	<i>n</i> (%)	Antimicrobial resistance (%)	Reference
Rio de Janeiro/RJ	86	V/NE	TH+5% sheep blood+CN 8µg/mL+NA 15µg/mL	22 (25.6)	NT	Benchetrit et al., 1982
Londrina/PR	309	VR/≥36 weeks	HPTH	46 (14.9)	NT	Beraldo et al., 2004
Florianópolis/SC	273	VR/≥35 weeks	TH+CT 10µg/mL+NA 15µg/mL	59 (21.6)	NT	Pogere et al., 2005
Ribeirão Preto/SP	598	V/35–37 weeks	LIM'S+CT 10µg/mL+NA 15µg/mL	107 (17.9)	NT	Zusman et al., 2006
São Luís/MA	201	VR/≥36 weeks	TH+CT 10µg/mL+NA 15µg/mL	41 (20.4)	E (23.6) DA (25.4) CRO (12.7)	Costa et al., 2008

Campinas/ SP	203	V/22–37 weeks	TH	56 (27.6)	NT	Nomura et al., 2009
Rio de Janeiro/RJ	3,929	VR/35–37 weeks	NU	186 (4.7)	NT	Costa et al., 2010
Juiz de Fora/MG	221	VR/< and ≥37 weeks	TH+CN 8µg/mL+NA 15µg/mL+ sodium azide 0.02%	21 (9.5)	E (22.7) DA (50)	Castellano Filho et al., 2010
Maringá/PR	102	VR/≥35 weeks	HPTH TH+CN 8µg/mL+NA 15µg/mL	25 (24.5)	NT	Chaves Jr et al., 2010
Sobral/CE	213	VR/>20 weeks	TH+CN 8µg/mL+NA 15µg/mL	9 (4.2)	AMP, KF, P (44.4) E (33.3) DA (77.8) C (11.1)	Linhares et al., 2011
Tubarão/SC	118	VR/35–37 weeks	NE	32 (27.1)	NT	Kruk et al., 2013
Tubarão/SC	203	VR/≥35 weeks	TH+CN 8µg/mL+NA 15µg/mL	41 (19.7)	NT	Schörner et al., 2014
Maringá/PR	544	VR/≥35 weeks	HPTH TH+CN 8µg/mL+NA 15µg/mL	136 (25)	E (8.1) DA (5.9) C (4.4) TE (82.3)	Melo et al., 2016
Londrina/ PR	2,901	VR/35–37 weeks	Granada Broth	528 (18.2)	P (0.4) E (10.2) DA (10.0)	This study

N: Number of pregnant women analyzed; *n*: number of positive cultures for GBS; V: vaginal; VR: vaginal-rectal; NE: not specified; NT: not tested; NU: not used; TH: Todd-Hewitt Broth; HPTH: Hitchens-Pike-Todd-

Hewitt; AMP: ampicillin; P: penicillin G; CRO: ceftriaxone; KF: cephalothin; E: erythromycin; DA: clindamycin; CN: gentamicin; C: chloramphenicol; TE: tetracycline; NA: nalidixic acid; CT: colistin.

Clindamycin, erythromycin, and vancomycin are alternatives for both pregnant women colonized with penicillin-resistant GBS or allergic to penicillin with high risk of anaphylaxis (VERANI; SCHRAG, 2010). The susceptibility for erythromycin and clindamycin between GBS isolated from these patients can also vary according to geographic location. In African countries, rates of erythromycin and clindamycin resistance ranging from 6.5% to 21.1% and 3.2% to 17.2%, respectively, were reported among GBS isolates from pregnant women (BERG et al., 2014; BOLUKAOTO et al., 2015). Data from North America reported rates of resistance to erythromycin and clindamycin ranging from 27.4% to 36% and 27.4% to 33%, respectively (BERG et al., 2014; TEATERO et al., 2017). High rates of GBS resistance for both antimicrobials were reported in Italy (32.2% for erythromycin and 43.8% for clindamycin) (MATANI et al, 2016) and China (78.6% for erythromycin and 64.3% for clindamycin) (WANG et al., 2015). In contrast, lower rates of resistance were detected in Swiss (14.6% for erythromycin and 8.2% for clindamycin) (FROHLICHER et al., 2014) and Saudi Arabia (15.7% for erythromycin and 5.1% for clindamycin) (KHAN; FAIZ; ASHSHI, 2015).

Here, we detected resistance to erythromycin in 54 isolates (10.2%) and, of those, 46 (85.2%) were also resistant to clindamycin. Resistance only to erythromycin was observed in 8 isolates (1.5%), while 7 (1.3%) were resistant only to clindamycin (Table 1). Similar rates of erythromycin and clindamycin resistance between GBS colonizer of pregnant women were detected in a Public Health Service of Maringá city in northern Paraná, Brazil (MELO et al., 2016). Rates of resistance ranging from 0% to 14.3% and 7.7% to 12.2% for erythromycin and clindamycin, respectively were detected in studies performed in GBS isolated from pregnant women in Rio de Janeiro, Brazil (SORAES, et al., 2014; BARROS; DE SOUZA; LUIZ, 2016). In contrast, high rates of resistance for both antimicrobials were detected in other Brazilian studies (Table 3).

Conclusion

In our region, resistance to penicillin between vaginal-rectal GBS colonizer of pregnant women is rare. However, we identified two penicillin-resistant GBS isolates in this study. In addition, a substantial number of GBS isolates resistant to clindamycin was also detected. These results highlight the importance of continuous surveillance of vaginal-rectal GBS colonization in pregnant women and monitoring antimicrobial resistance for proper IAP.

In turn, these measures greatly contribute to the prevention of GBS early-onset diseases in neonates.

Agradecimentos

This study was supported by grants from DECIT/SCTIE/MS/CNPq, “Fundação Araucária/SESA-PR” (Research Programm for “Sistema Único de Saúde-PPSUS”/2011). A.E.B. Morguette was supported by student scholarship from CNPq. S.F. Yamada-Ogatta was supported by research fellowship from CNPq. E.S. Otaguiri and R.P. Biasi-Garbin were supported by student scholarships from CAPES.

References

- BARROS, R. R.; DE SOUZA, A. F.; LUIZ, F. B. Polyclonal spread of *Streptococcus agalactiae* resistant to clindamycin among pregnant women in Brazil. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 71, p. 2054-2056, 2016.
- BELARD, S.; TOEPFNER, N.; CAPAN-MELSER, M.; MOMBO-NGOMA, G.; ZOLEKOMANEGO, R.; GROGER, M., MATSIEGUI, P.; AGNANDJI, S. T.; ADEGNIKA, A. A.; GONZÁLEZ, R.; KREMSNER, P. G.; MENENDEZ, C.; RAMHARTER, M.; BERNER, R. *Streptococcus agalactiae* serotype distribution and antimicrobial susceptibility in pregnant women in Gabon, Central Africa. *Scientific Reports*, v. 5, p. 17281, 2015.
- BENCHETRIT, L. C.; FRACALANZZA, S. E.; PEREGRINO, H.; CAMELO, A. A.; SANCHES, L. A. Carriage of *Streptococcus agalactiae* in women and neonates and distribution of serological types: a study in Brazil. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 15, n. 5, p. 787-790, 1982.
- BERALDO, C.; BRITO, A. S. J.; SARIDAKIS, H. O.; MATSUO, T. Prevalence of vaginal and anorectal colonization by group B *Streptococcus* in pregnant women in the last three months of gestation. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia*, v. 26, n. 7, p. 543-549, 2004.
- BERG, B. R.; HOUSEMAN, J. L.; TERSTEEG, Z. E.; LEBAR, W. D.; NEWTON, D. W. Antimicrobial susceptibilities of group B *Streptococcus* isolates from prenatal screening samples. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 52, n. 9, p. 3499-3500, 2014.
- BOLUKAOTO, J. Y.; MONYAMA, C. M.; CHUKWU, M. O.; LEKALA, S. M.; NCHABELENG, M.; MALOBA, M. R.; MAVENYENGWA, R. T.; LEBELO, S. L.; MONOKOANE, S. T.; TSHEPUWANE, C.; MOYO, S. R. Antibiotic resistance of *Streptococcus agalactiae* isolated from pregnant women in Garankuwa, South Africa. *BMC Research Notes*, v. 8, p. 364, 2015.

- BOYER, K. M.; GOTOFF, S. P. Prevention of early-onset neonatal group B streptococcal disease with selective intrapartum chemoprophylaxis. *The New England Journal of Medicine*, 314(26), 1665–1669, 1985.
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Prevention of Perinatal Group B Streptococcal Disease. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, v. 59, n. RR-10, p. 1-36, 2010.
- CHAVES, M. JR.; PÁDUA, R. A.; CAMPANERUT, P. A.; PELLOSO, S. M.; CARVALHO, M. D.; SIQUEIRA, V. L.; SCODRO R. B.; CARDOSO, R. F. Preliminary evaluation of Hitchens-Pike-Todd-Hewitt medium (HPTH) for detection of group B *streptococci* in pregnant women. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, v. 24, p. 403-406, 2010.
- COSTA, A. L. R.; LAMY FILHO, F.; CHEIN, M. B. C.; BRITO, L. M. O.; LAMY, Z. C.; ANDRADE, K. L. Prevalence of colonization by group B *Streptococcus* in pregnant women from a public maternity of Northwest region of Brazil. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia*, v. 30, n. 6, p. 274-280, 2008.
- COSTA, N. D. L.; CARVALHO, M.; PONE, S. M.; CLAIR, G.; JÚNIOR S. Beta-hemolytic *Streptococcus* in pregnant women and their newborn infants: a critical analysis of the protocol used at Fernandes Figueira Institute, Oswaldo Cruz Foundation, in Brazil. *Revista Paulista de Pediatria*, v. 28, n. 2, p. 155-161, 2010.
- DAGNEW, A. F.; CUNNINGTON, M. C.; DUBE, Q.; EDWARDS, M. S.; FRENCH, N.; HEYDERMAN, R. S.; MADHI, S. A.; SLOBOD, K.; CLEMENS, S. A. Variation in reported neonatal group B streptococcal disease incidence in developing countries. *Clinical Infectious Diseases*, v. 55, n. 1, p. 91-102, 2012.
- EMBLETON, N.; WARIYAR, U.; HEY, E. Mortality from early onset group B streptococcal infection in the United Kingdom. *Archives of Diseases in Childhood Fetal and Neonatal Edition*, v. 80, n. 2, p. F139-141, 1999.
- EVANGELISTA, M. L.; FREITAS, F. T. Group B *Streptococcus* neonatal infection in an intensive care unit in Brazil: high fatality and missed opportunities for antibiotic prophylaxis. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, v. 19, n. 1, p. 98-99, 2015.
- FROHLICHER, S.; REICHEN-FAHRNI, G.; MÜLLER, M.; SURBEK, D.; DROZ, S.; SPELLERBERG, B.; SENDI, P. Serotype distribution and antimicrobial susceptibility of group B *streptococci* in pregnant women: results from a Swiss tertiary centre. *Swiss Medical Weekly*, v. 144, p. w13935, 2014.

- HANSEN, S. M.; ULDBJERG, N.; KILIAN, M.; SØRENSEN, U. B. Dynamics of *Streptococcus agalactiae* colonization in women during and after pregnancy and in their infants. *Journal of Clinical Microbiology*, p. 42, n. 1, p. 83-89, 2004.
- KHAN, M. A.; FAIZ, A.; ASHSHI, A. M. Maternal colonization of group B *Streptococcus*: prevalence, associated factors and antimicrobial resistance. *Annals of Saudi Medicine*, v. 35, n. 6, p. 423-427, 2015.
- KRUK, C. R.; FEUERSCHUETTE, O. H. SILVEIRA, S. K., CORDAZO, M., & TRAPANI JÚNIOR, A. Epidemiologic profile of *Streptococcus agalactiae* colonization in pregnant women attending prenatal care in a city of southern of Brazil. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, v. 17, n. 6, p. 722–723, 2013.
- KWATRA, G.; CUNNINGTON, M. C.; MERRALL, E.; ADRIAN, P. V.; IP, M.; KLUGMAN, K. P.; TAM, W. H.; MADHI, S. A. Prevalence of maternal colonisation with group B *Streptococcus*: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet Infectious Diseases*, v. 16, p. 1076–1084, 2016.
- LI, S.; HUANG, J.; CHEN, Z.; GUO, D.; YAO, Z.; YE, X. Antibiotic prevention for maternal Group B Streptococcal colonization on neonatal GBS-related adverse outcomes: a meta-analysis. *Frontiers in Microbiology*, v. 8, p. 374, 2017.
- LINHARES, J. J.; CAVALCANTE NETO, P. G.; VASCONCELOS, J. L. M.; SARAIVA, T. V.; RIBEIRO, A. M. F.; SIQUEIRA, T. M.; ROCHA, F. R. Prevalence of the colonization by *Streptococcus agalactiae* in pregnant women from a maternity in Ceará, Brazil, correlating with perinatal outcomes. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia*, v. 33, n. 12, p. 395-400, 2011.
- MATANI, C.; TREZZI, M.; MATTEINI, A.; CATALANI, C.; MESSERI, D.; CATALANI, C. *Streptococcus agalactiae*: prevalence of antimicrobial resistance in vaginal and rectal swabs in Italian pregnant women. *Le Infezioni in Medicina*, v. 24, n. 3, p. 217-221, 2016.
- MCCORD, N.; OWEN, P.; POWLS, A.; LUNAN, B. A complete audit cycle of intrapartum group B *Streptococcus* prophylaxis. *Health Bulletin (Edinb)*, v. 59, n. 4, p. 263-267, 2001.
- MELO, S. C. C. S., SANTOS, N. C., OLIVEIRA, M., SCODRO, R. B., CARDOSO, R. F., PÁDUA, R. A., SILVA, F. T. R.; COSTA, A. B.; CARVALHO, M. D. B; PELLOSO, S. M. Antimicrobial susceptibility of *Streptococcus agalactiae* isolated from pregnant women. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 58, p. 83, 2016.
- NAGANO, N.; KIMURA, K.; NAGANO, Y.; YAKUMARU, H.; ARAKAWA, Y. Molecular characterization of group B streptococci with reduced penicillin susceptibility recurrently

- isolated from a sacral decubitus ulcer. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 64, n. 6, p. 1326-1328, 2009.
- NOMURA, M. L.; PASSINI JÚNIOR, R.; OLIVEIRA, U. M.; CALIL, R. Group B *Streptococcus* maternal and neonatal colonization in preterm rupture of membranes and preterm labor. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia*, v. 31, n. 8, p. 397-403, 2009.
- OTAGUIRI, E. S., MORGUETTE, A. E. B., TAVARES, E. R., DOS SANTOS, P. M., MOREY, A. T., CARDOSO, J. D., PERUGINI, M. R. E.; YAMAUCHI, L. M.; YAMADA-OGATTA, S. F. Commensal *Streptococcus agalactiae* isolated from patients seen at University Hospital of Londrina, Paraná, Brazil: capsular types, genotyping, antimicrobial susceptibility, and virulence determinants. *BMC Microbiology*, v. 13, p. 297, 2013.
- POGERE, A.; ZOCCOLI, C. M.; TOBOUTI, N. R.; FREITAS, P. F.; D'ACAMPORA, A. J.; ZUNINO, J. N. Prevalence of group B *Streptococcus* in pregnant women from a prenatal care center. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia*, v. 27, n. 4, p. 174-180, 2005.
- SCHÖRNER, M. A.; MAY FEUERSHUETTE, O. H.; SCHEFFR, M. C.; SENNA, S. G.; BAZZO, M. L. Detection of Group B *Streptococcus agalactiae* from anorectal and vaginal screening tests. *Clinical Microbiology*, v. 3, p. 169, 2014.
- SOARES, G. C.; ALVIANO, D. S.; DA SILVA SANTOS, G.; ALVIANO, C. S.; MATTOS-GUARALDI, A. L.; NAGAO, P. E. Prevalence of Group B *Streptococcus* serotypes III and V in pregnant women of Rio de Janeiro, Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 44, n. 3, p. 869-872, 2014.
- TEATERO, S., FERRIERI, P., MARTIN, I., DEMCZUK, W., MCGEER, A., & FITTIPALDI, N. Serotype distribution, population structure, and antimicrobial resistance of group B *Streptococcus* strains recovered from colonized pregnant women. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 55, n. 2, p. 412-422, 2017.
- VERANI, J. R.; SCHRAG, S. J. Group B streptococcal disease in infants: progress in prevention and continued challenges. *Clinics in Perinatology*, v. 37, p. 375-392, 2010.
- WANG, P.; TONG, J. J.; MA, X. H.; SONG, F. L.; FAN, L.; GUO, C. M.; SHI, W.; YU, S. J.; YAO, K. H.; YANG, Y. H. Serotypes, antibiotic susceptibilities, and multi-locus sequence type profiles of *Streptococcus agalactiae* isolates circulating in Beijing, China. *PLoS One*, v. 10, n. 3, p. e0120035, 2015.
- ZUSMAN, A. S.; BALTIMORE, R. S.; FONSECA, S. N. Prevalence of maternal group B streptococcal colonization and related risk factors in a Brazilian population. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, v. 10, n. 4, p. 242-246, 2006.

5.2 APÊNDICE B

Development of a hydrogel containing oleoresin from *Copaifera officinalis* with antibacterial activity against *Streptococcus agalactiae*

Ana Elisa Belotto Morguette¹; Sueli Fumie Yamada-Ogatta¹

¹Departamento de Microbiologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brazil.

Abstract

In this study, we describe the antibacterial activity of oleoresin from *Copaifera officinalis* against *Streptococcus agalactiae* or Group B *Streptococcus* (GBS), including resistant isolates, and the development of a topical formulation based on carbomer enriched with copaiba oil. The copaiba oil formulation preserved the antimicrobial activity with appropriated pH, non-Newtonian pseudoplastic profile with absence of cytotoxicity for mice cervicovaginal mucosa. The minimum and bactericidal concentration values of copaiba oil ranged from 0.03 to 0.06 mg/mL and 0.06 to 0.12 mg/mL, respectively. Six formulations enriched with copaiba oil 0.5% (w/w) and 1.0% (w/w), but only carbomer 940® plus copaiba oil 1.0% (COF1 1.0%) was capable to inhibit all isolates growth. After 12 and 8 hours of treatment with copaiba oleoresin and COF1 1.0%, no CFU was detected, respectively, and both treatments caused morphological alterations, such as cell wall lysis and cytoplasmic content release, compared to untreated control. No damage to cervicovaginal mucosa of mice treated with COF1 1.0% were found after histological evaluation. The results showed the antibacterial activity of copaiba oleoresin from *C. officinalis* against GBS and suggest a topical formulation to decrease vaginal GBS colonization and prevent GBS transmission to the newborns.

Introduction

Streptococcus agalactiae or Group B *Streptococcus* (GBS) is part of the gastrointestinal and genitourinary microbiota of healthy individuals. During pregnancy or in the postpartum period, vaginal-rectal colonization by GBS is generally asymptomatic. However, it may increase the risk of preterm birth and perinatal transmission to newborns (CDC, 2010) and it is the major cause of sepsis in the first three days of life (SCHRAG et al., 2016).

Currently, intrapartum antimicrobial prophylaxis (IAP) is the strategy for prevention of GBS neonatal infections. Beta-lactams (penicillin and ampicillin) are the first-line antibacterials used and clindamycin is the alternative for penicillin-allergic pregnant women (CDC, 2010). IAP has reduced effectively the incidence of neonatal infection, however it increases the antimicrobial use which can be partly responsible for resistant strains selection among GBS and non-GBS species (SCHRAG, VERANI, 2013). In general, GBS isolates preserve the susceptible profile to beta-lactams (HAYS et al., 2016; OTAGUIRI et al., 2013; TURNER et al., 2012). However, reduced susceptibility and resistance to this antimicrobial have already been described (NAGANO et al., 2012; SEKI et al., 2015, CRESPO-ORTIZ et al., 2014; MORGUETTE et al., 2017). Moreover, increasing rates of erythromycin and clindamycin resistance have been reported worldwide (BERG et al., 2014; HAYS et al., 2016; JI et al., 2017; LU et al., 2014; OTAGUIRI et al., 2013). Antimicrobial use in neonates is associated with decreased gut microbial diversity and protective anaerobic bacteria and increased risk of antimicrobial resistance development (FJALSTAD et al., 2017). Thus, the search for safer and novel antibacterial substances for the control of GBS infections is of a great interest.

Plants are a rich source for new bioactive molecules with various biological effects, including antibacterial activity. In fact, the antibacterial activity of several plant compounds has been described previously. *Copaifera officinalis* L. (Leguminosae Jess family, Caesalpinoidae Kunt sub-family) is native to the tropical regions of Latin America and west Africa. In Brazil, these species are mostly found in Amazon and Roraima states (VEIGA JR; PINTO, 2002). Like other species, it is a source of an oleoresin that has been used in folk medicine for a long time, mainly as wound healing. However, various biological activities can be attributed for this oleoresin, such as anti-inflammatory, antiseptic, analgesic, and antimicrobial (ABRÃO et al., 2015; DA SILVA MORAES et al., 2016; GUIMARÃES et al., 2016; IZUMI et al., 2012; MENDONÇA; ONOFRE, 2009; OTAGUIRI et al., 2017;

SANTOS et al., 2008a; SANTOS et al., 2008b; SOUZA et al., 2011; VEIGA JR; PINTO, 2002)

Moreover, hydrogels have been explored in drug delivery research for their physical properties, like high water content, softness, flexibility, and biocompatibility. (CALÓ, KHUTORYANSKIY, 2015). Hydrogels are polymers forming a 3D network able to hold water in this porous structure, due to their hydrophilic groups (PAL, BANTHIA, MAJUMDAR, 2009) and have been explored for drug delivery, including for vaginal drug delivery (NEVES, BAHIA, 2006). Overall, their antimicrobial applications have been explored and its association with antimicrobial compounds enhances their efficacy and specificity, through cytotoxicity reduction and improvement of stability and biocompatibility (GONZALEZ-HENRÍQUEZ, SARABIA-VALLEJOS, RODRIGUES-HERNANDEZ, 2017).

In this study, we evaluated the antibacterial activity of copaiba oil from *C. officinalis* against GBS isolated from pregnant women, including those resistant to clindamycin and erythromycin. Besides, we developed a copaiba oil topical formulation, using carbomer as polymer former which preserves the bactericidal activity of copaiba oil, and showed no toxicity for mice cervicovaginal mucosa.

Materials and Methods

1. Bacterial strains

Nine GBS strains were obtained from the Laboratório de Microbiologia Clínica collection of the Hospital Universitário de Londrina, Londrina, PR, Brazil. Among them, two were resistant only to erythromycin, presenting an efflux-pump encoded by *mefA/E*, and two were resistant to both antibacterials, due to the expression of *ermA* or *ermB* genes, which post-transcriptionally modify the 23S ribosomal RNA (DUTRA et al., 2014). Phenotypic and genotypic characteristics were previously described (Table 2) (OTAGUIRI et al., 2013). Reference strain *S. agalactiae* ATCC 13813 was kindly donated by Fundação Instituto Oswaldo Cruz (INCQS-FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil). For each experiment, three colonies forming unit (CFU) were transferred from Tryptic Soy Agar supplemented with 5% sheep defibrinated blood (TSA-blood) to 0.85% NaCl solution (saline) to achieve a turbidity equivalent to 0.5 McFarland (1.0 to 2.0×10^8 CFU/mL) standard utilizing the DensiCHECK™ PLUS colorimeter (bioMérieux).

2. Oleoresin from *Copaifera officinalis*

Oleoresin from *C. officinalis* was obtained from Ferquima Indústria e Comércio de Óleos Essenciais (São Paulo, Brazil). The copaiba oil (batch 165) was collected by direct puncture of trunk tree and its density (0,930 g/mL) and characteristics (viscous and yellow liquid) was described in a technical report. A stock solution of 10 mg/mL was prepared in 10% dimethylsulfoxide (DMSO). DMSO did not exceed 1% in assays.

3. Copaiba oil activity against GBS

3.1 Determination of minimum inhibitory and bactericidal concentration

Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of copaiba oleoresin was determined by broth microdilution assay according to Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI, 2017). Briefly, twofold serial dilutions of copaiba oleoresin (0.001 to 1.0 mg/mL) in Tryptic Soy Broth (TSB – Oxoid, Brazil) were prepared in 96-wells U-bottom microtiter plates (Techno Plastic Products, Switzerland) and a cell suspension were added to wells to reach 5×10^5 CFU/mL per well. Wells containing medium or medium plus DMSO 1%, and wells without bacterial cells were used as growth and sterility control, respectively. MIC was detected at total inhibition of bacterial growth after 24 hours incubation compared to untreated cells.

Minimum bactericidal concentration (MBC) was established when the content from wells (10 μ L) showing no growth were inoculated on TSA-blood and the incubation proceed for 24 hours at 37 °C. MBC was defined at absence of growth compared to untreated cells (MILES; MISRA; IRWIN, 1938).

3.2. Time-kill kinetics of copaiba oil

For time-kill kinetics analysis, planktonic cells of *S. agalactiae* ATCC 13813, GBS 66 and GBS 121 at a density of 5×10^5 CFU/mL were incubated at MIC and MBC of copaiba oil. At determined points (0, 0.5, 1, 2, 4, 8, 12 and 24 hours), aliquots (20 μ L) were removed for each treatment and growth control and diluted tenfold in 0.15 M phosphate-buffered saline pH 7.2 (PBS). An aliquot of 10 μ L were inoculated in TSA-blood plates and CFU count was performed after 24 hours incubation at 37 °C.

4. Preparation of hydrogel formulations

Nine hydrogel topical formulations were developed based on three different polymers with or without copaiba oil (CO), whose concentrations were 0.5 % (w/w) and 1.0 % (w/w). Formulations were named 1) BF1: base formulation of carbomer without; CO 2) COF1 0.5%: formulation based on carbomer with 0.5% (w/w) of CO; 3) COF1 1.0%:

formulation based on carbomer with 1.0% (w/w) of CO; 4) BF2: base formulation of hydroxyethylcellulose (HC) without CO; 5) COF2 0.5%: formulation based on HC with 0.5% (w/w) of CO; 6) COF2 1.0%: formulation based on HC with 1.0% (w/w) of CO 7) BF3: base formulation of sodium acrylates copolymer and lecithin (SAL) without CO; 8) COF3 0.5%: formulation based on SAL with 0.5% (w/w) of CO; 9) COF3 1.0%: formulation based on SAL with 1.0% (w/w) of CO.

For the preparation of Carbopol based formulations, the polymer was dispersed in sterile distilled water with constant and vigorous stirring. Then, aminomethyl propanol with stirring until a transparent gel was formed. The formulations based on hydroxyethylcellulose and sodium acrylates copolymer and Lecithin were formulated in two steps. Both have a common phase composed by sterile distilled water, allantoin, and glycerin which were heated to 75 °C until complete dissolution. Next, the polymers were added with vigorous stirring until the hydrogel network were established. Finally, copaiba oleoresin 0.5% (w/w) and 1.0% (w/w) was added to the formulations.

Table 1 - Chemical composition of formulations enriched with copaiba oil

Formulations	Composition (%; w/w)								
	BF1	COF1 0.5%	COF1 1.0%	BF2	COF2 0.5%	COF2 1.0%	BF3	COF3 0.5%	COF3 1.0%
Distilled water (q.s.)	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
Carbomer 940®	0.6	0.6	0.6	-	-	-	-	-	-
Aminomethyl propanol	0.3	0.3	0.3	-	-	-	-	-	-
Allantoin	-	-	-	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Glycerin	-	-	-	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0
Hydroxyethylcellulose	-	-	-	2.0	2.0	2.0	-	-	-
Sodium acrylates copolymer and Lecithin	-	-	-	-	-	-	2.0	2.0	2.0
Copaiba oil	-	0.5	1.0	-	0.5	1.0	-	0.5	1.0

BF: base formulation; COF: copaiba oil formulation

5. Characterization of formulation

For pre-stability test, 10 g of each formulation were centrifuged at 3200 rpm for 30 minutes (Baby I Fanem 206-BL, Brazil) to determine modifications or instabilities such as phases separation, compact sediment formation, or coalescence (Brazil, 2004). The assay was performed in triplicate and the results were obtained by visual analysis.

All formulations were examined for color and homogeneity (Brazil, 2007). Briefly, 1.5g of each formulation was visually analyzed on dark background for color determination. The maintenance of macroscopic characteristics was evaluated by visual analysis after 24 hours settled.

For physical-chemical characteristics, pH, density, and viscosity were evaluated. Formulations pH were measured using pH meter (MS Tecnopon Special Equipment Ltda). The probe was directly immersed on the formulation. The assays were carried out in triplicate and pH was determined for average values. The density was evaluated using a glass pycnometer with 10 mL capacity and temperature monitored at 20°C. The ratio between the sample mass and water mass represents the specific density of each sample tested. To determine the formulations viscosity, the samples were arranged in a cylindrical vessel (1.9 cm diameter and 6.3 cm height) fully filled at 25 °C. The measures were performed at six different spins (0.50, 0.80, 1.10, 1.40, 1.70 and 2.00 rpm). Apparent viscosity (Viscometer DV-III ULTRA), shear and strain rate data were collected after 45, 90, and 135 seconds.

6. Antibacterial activity of copaiba oil formulation

Planktonic cells (5×10^5 CFU/mL) of all tested isolates were spread on TSA surface. Then, 200 μ L of each copaiba oil formulations and base formulations developed were spread over the inoculum. After incubation for 24 hours at 37 °C, the formulation which promoted total inhibition of GBS growth, compared to an untreated control, was selected for following assays.

6.1 Time-kill kinetics of copaiba oil formulation

For time-kill kinetics analysis, planktonic cells of *S. agalactiae* ATCC 13813, GBS 66 and GBS 121 (100 μ L of 5×10^5 CFU/mL) were incubated with COF1 1.0%. At determined points (0, 0.5, 1, 2, 4, 8, 12 and 24 hours), aliquots (20 μ L) were removed for each treatment and growth control and diluted tenfold in PBS. An aliquot of 10 μ L were inoculated in TSA-blood plates and CFU count was performed after 24 hours incubation at 37 °C.

7. Scanning Electron Microscopy (SEM) of planktonic cells treated with copaiba oil and COF1 1.0% (w/w)

Morphological changes produced by copaiba oil and COF1 1.0% on planktonic cells after 24 hours of treatment were analyzed by SEM. The samples were fixed for 24 h with 2% glutaraldehyde, 2% paraformaldehyde in 0.1 M sodium cacodylate buffer, pH 7.2, and post-fixed in 1% OsO₄ for 2 h. The cells were dehydrated with a series of washes in an ethanol gradient (70, 80, 90 and 100 °GL) and then were critical point dried in CO₂ (BALCTED CPD 030 Critical Point Dryer), coated with gold (BALTEC SDC 050 Sputter Coater) and observed under a Shimadzu SS-550 scanning electron microscope.

8. Histological evaluation of cervicovaginal mucosa after hydrogel application

Female BALB/c mice (8-12 weeks old) were treated with β -estradiol (5 mg/mL) before the assay. To assess the formulation toxicity, COF1 1.0% (20 μ L) were applied once at cervicovaginal mucosa. Mice treated with PBS and BF1 were used as negative control to evaluate the organ normal architecture. After 24 hours of single-dose gel application, mice were euthanized and the cervicovaginal mucosa was surgically excised (FERNÁNDEZ-ROMERO et al., 2011). The tissues were fixed in Bouin's solution and embedded in paraffin before preparing tissue sections of 6 μ m. The sections were stained using hematoxylin and eosin (H&E) and morphological analysis was performed. The study protocol was approved by the Ethics Committee of Universidade Estadual de Londrina (Document 127/2017-CEUA/UEL).

9. Statistical analysis

Data were analyzed using the software GRAPHPAD Prism version 6.0 (GRAPHPAD Software, San Diego, CA). Kruskal-Wallis and Dunn's' multiple comparison post hoc test were utilized to analyze MIC and MBC values, and time-kill curve data.

Results

1. Copaiba oil exhibits bactericidal activity against GBS

Copaiba oil inhibits planktonic GBS cells growth of all tested isolates, including erythromycin and clindamycin resistant strains exhibiting different mechanisms of resistance. The MIC obtained for copaiba oil are shown on Table 2. MIC values were 0.03 and 0.06 mg/mL and MBC values were 0.06 and 0.12 mg/mL (2x MIC for most isolates), showing bactericidal activity for the tested isolates. There was no significant difference between MIC and MBC values ($p > 0.05$), therefore reference strain *S. agalactiae* ATCC

13813 and clinical strains GBS 66 and GBS 121 was selected to evaluate the copaiba oil time-kill kinetics.

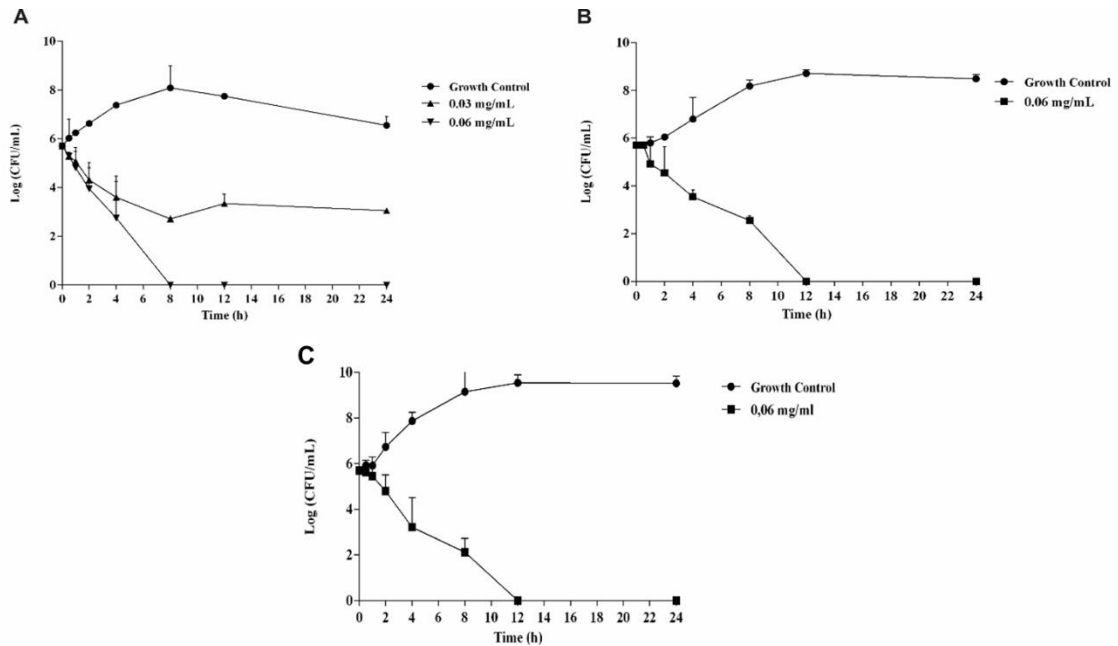
Table 2 - *Streptococcus agalactiae* susceptibility profile and antibacterial and activity of copaiba oil.

GBS isolate	Resistance genes ¹	Capsular type	Susceptibility profile ¹		Copaiba oil	
			DA	E	MIC ^b (mg/mL)	MBC ^c (mg/mL)
<i>S. agalactiae</i> ATCC 13813	-	II	S	S	0.03	0.06
GBS 1	-	V	S	S	0.03	0.06
GBS 2	-	Ia	S	S	0.06	0.12
GBS 37	-	Ia	S	S	0.06	0.12
GBS 46	<i>mefA/E</i>	Ia	S	R	0.03	0.12
GBS 65	<i>ermA</i>	V	R	R	0.03	0.06
GBS 66	<i>ermB</i>	III	R	R	0.06	0.06
GBS 84	-	V	S	S	0.06	0.06
GBS 89	-	Ia	S	S	0.06	0.06
GBS 121	<i>mefA/E</i>	Ia	S	R	0.06	0.06

¹Genotypic and phenotypic characterization of GBS isolates and erythromycin and clindamycin susceptibility profile previously described (Otaguiri et al, 2013). DA: clindamycin; E: erythromycin; MIC: minimum inhibitory concentration; MBC: minimum bactericidal concentration.

Planktonic cells of reference strain and selected clinical isolates were grown in the presence of copaiba oil MIC and MBC and the CFU counts were determined at specified time points (Figure 1). Copaiba oil MIC for *S. agalactiae* ATCC 13813 (0.03 mg/mL) was capable to reduce 2 log₁₀ after 24 hours of treatment (Figure 1A) and, after 8 hours at copaiba oil MBC (0.06 mg/mL), no viable cells were detected for reference strain (Figure 1A). The CFU counts of GBS 66 and 121 were zero after 12 hours of treatment with copaiba oleoresin MBC (0.06 mg/mL).

Figure 1 - Time-kill curve of GBS in presence of copaiba oil at MIC and MBC. *S. agalactiae* ATCC 13813 (A), erythromycin and clindamycin-resistant GBS 66 (B) and erythromycin-resistant GBS 121 (C) were incubated with copaiba oil at MIC (0.03 or 0.06 mg/mL) and MBC (0.06 mg/mL) for 24 h at 37 °C and the CFU counts were determined at specified time points.

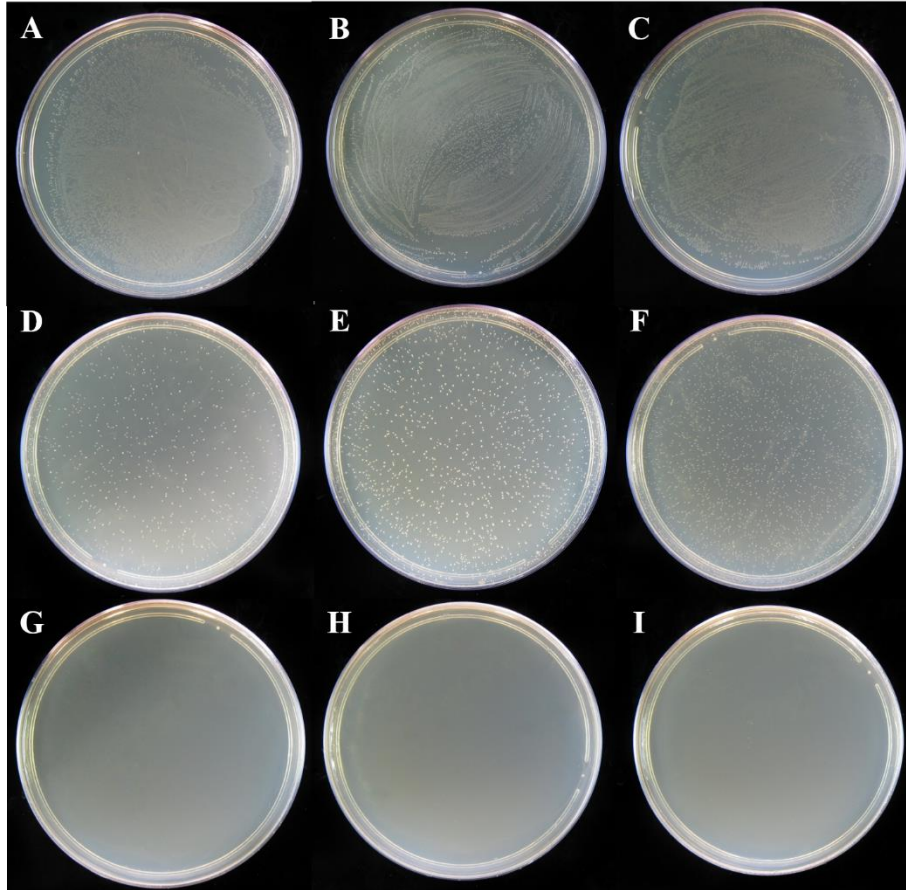


2. Copaiba oil formulation has antibacterial activity against GBS

In this study, three different polymers forming were used to develop copaiba oil formulations which were added with 0.5% (w/w) and 1.0% (w/w) of copaiba oil. However, among the formulations, only COF1 1.0% preserved the bactericidal activity, inhibiting planktonic GBS cells growth. Then, this formulation was chosen for further assays.

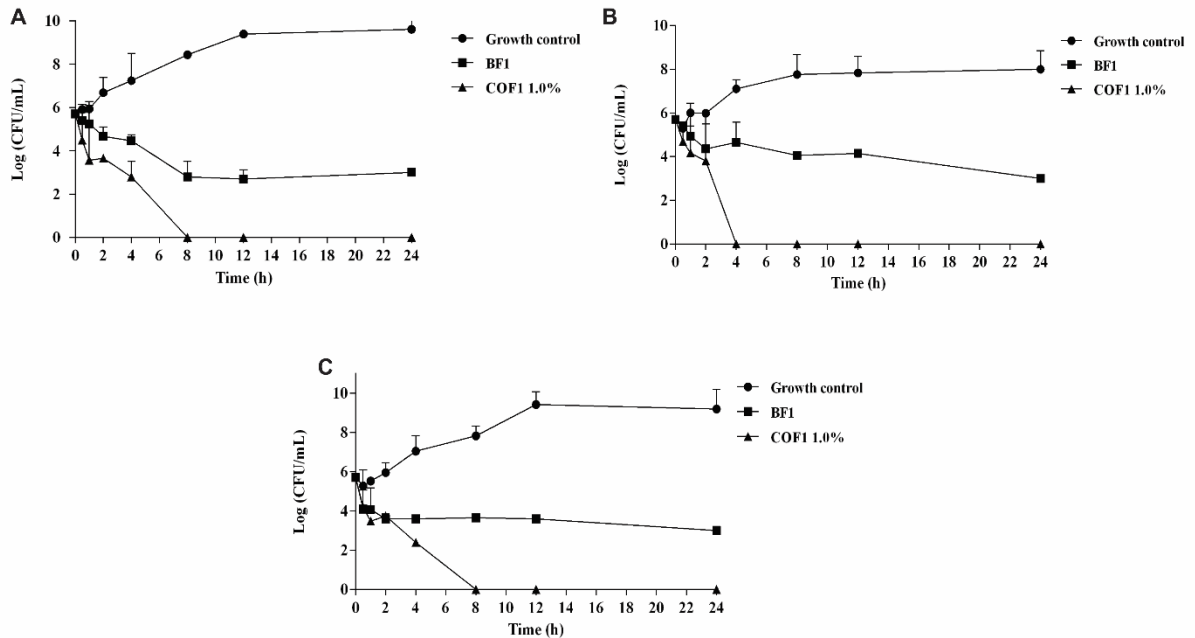
Figure 2 illustrates the antibacterial test of COF1 1.0%. This hydrogel was able to inhibit the growth of all isolates, represented in Figure 2 by *S. agalactiae* ATCC 13813 (Figure 2G), GBS 66 (Figure 2H) and GBS 121 (Figure 2I). Formulation based on carbomer without copaiba oil caused a modest inhibition of GBS growth (Figure 2D-F), presenting fewer characteristic colonies compared to the untreated cells control (Figure 2A-C).

Figure 2 - Antibacterial activity of copaiba oil formulation against GBS. *S. agalactiae* ATCC 13813 (A, D, and G), erythromycin and clindamycin-resistant GBS 66 (B, E, and H) and erythromycin-resistant GBS 121 (C, F, and I) were incubated with BF1 (D - F) and COF1 1.0% (G - I). Planktonic cells without treatment were used as growth control (A – C).



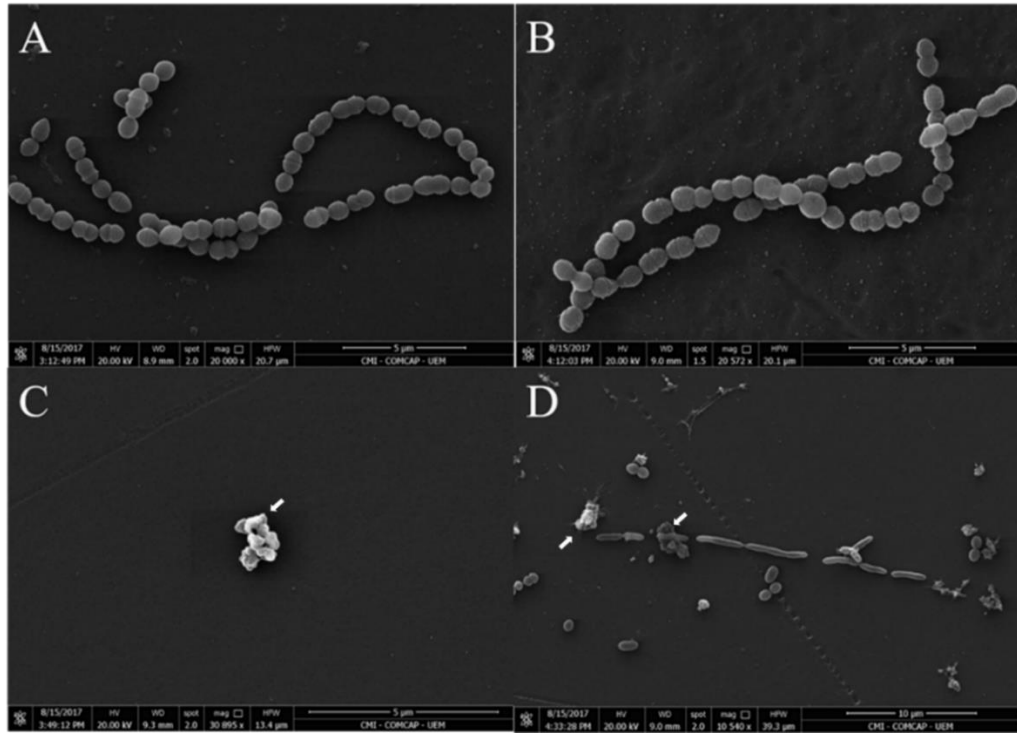
Planktonic cells of reference strain and two clinical isolates (GBS 66 and GBS 121) were incubated with BF1 and COF1 1.0% to assess the time-kill kinetics (Figure 3). BF1 decreased 2 log₁₀ after 24 hours of treatment for all isolates. No viable cells were detected for reference strain (Figure 3A) and GBS 121 (Figure 3C) after 8 hours at copaiba oil formulation presence. A faster effect was observed for GBS 66, which the CFU count was zero after 4 hours (Figure 3C).

Figure 3 - Time-kill curve of GBS in presence of BF1 and COF1 1.0%. *S. agalactiae* ATCC 13813 (A), erythromycin and clindamycin-resistant GBS 66 (B) and erythromycin-resistant GBS 121 (C) were incubated with BF1 and COF1 1.0% for 24 h at 37 °C and the CFU counts were determined at specified time points.



Analysis by SEM of reference strain planktonic cells demonstrated regular morphology, smooth surface, and chain arrangement (Figure 4A) and identical results were observed for planktonic cells treated with BF1 (Figure 4B). In presence of copaiba oil 1.0% for 24 hours, cell wall appeared to be lysed, due to abnormal material on cell surface (Figure 4C). Lysis of cell wall and interruption of cellular division were noticed after treatment with COF1 1.0% (Figure 4D).

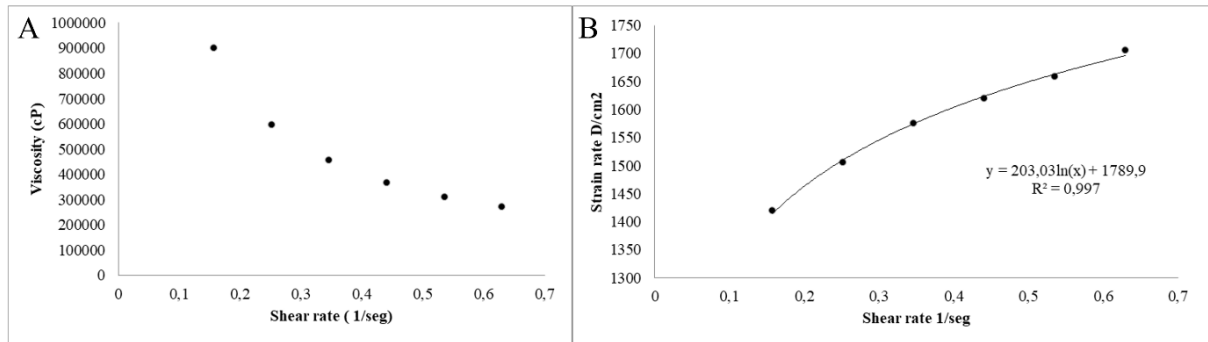
Figure 4 - Effect of copaiba oil and COF1 1.0% on planktonic cells of *Streptococcus agalactiae* ATCC 13813 after 24 hours of treatment observed by scanning electron microscopy. (A) Untreated cells and (B) BF1 treated cells presented regular characteristics. (C) Copaiba oil and (D) COF1 1.0% treated cells appeared to be lysed with amorphous material on cell surface (white arrow). Bar: 5 and 10 μm .



3. Physical-chemical characteristic of COF1 1.0% and BF1.

After centrifugation, COF 1.0% did not show phase separation, or any instability sign. Copaiba oil hydrogel was homogeneous and showed a slight turbidity, due to oil presence, and BF1 kept its transparent characteristic. The pH of 5.48 and 5.75 and density of 1.0366 g/mL and 1.0658 g/mL were detected for BF1 and COF1 1.0%, respectively. These data indicate that the COF1 1.0% pH is suitable for skin application, presenting a density-like water, due to its high-water content. Rheological analysis showed a non-Newtonian behavior of COF1 1.0%, which shows a decreasing on viscosity while shear rates are higher (Figure 5A). The equations followed the power law model with $n < 1$ ($\sigma = k \cdot \gamma^n$), indicating further that COF1 1.0% showed pseudoplastic profile (Figure 5B), suggesting improved retention on vaginal mucosa.

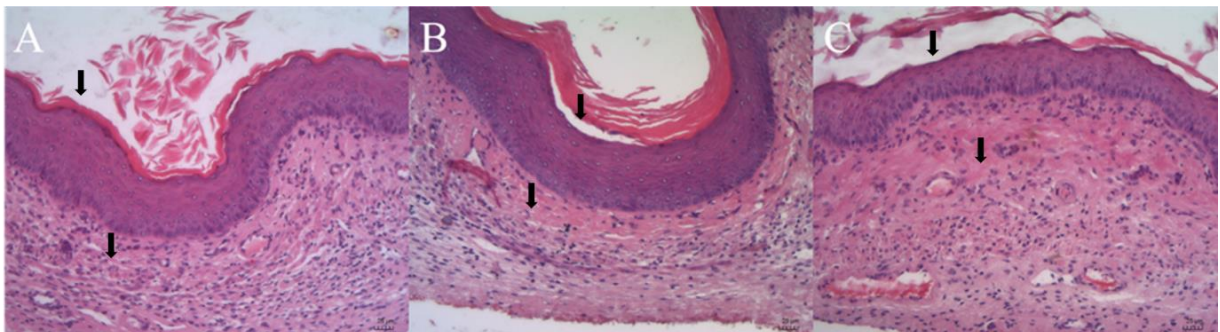
Figure 5 – Rheological analysis of COF1 1.0%. (A) Viscosity *versus* shear rate of COF1 1.0%. (B) COF1 1.0% rheogram.



4. Cytotoxicity of COF1 1.0% and BF1 for mice cervicovaginal mucosa

Furthermore, we performed the histological analysis cervicovaginal of mucosa of mice treated with COF1 1.0% (w/w) to establish the *in vivo* cytotoxicity. After 24 hours of gel application, cervicovaginal mucosa was surgically excised, fixed, and embedded in paraffin. Tissue sections were staining with H&E for morphological analysis. The finding demonstrates no damage for vaginal epithelium with absence of inflammatory infiltrate after 24 hours of copaiba oil formulation application for group treated with BF1 (Figure 6B) and COF1 1.0% (Figure 6C) in comparison to the untreated control group (Figure 6A). The epithelial layers were complete with keratin deposition, normal architecture and thickness, and the lamina propria was intact.

Figure 6 – Histological analysis of mice cervicovaginal mucosa treated with copaiba oil hydrogel. Eight-week-old BALB/c mice treated with PBS (A), FB1 (B) and COF1 1.0% (C) showed epithelial integrity and intact lamina propria (black arrow). 400X magnification.



Discussion

The increasing number of studies describing GBS isolates resistant to antimicrobials used in IAP shows the need to develop new alternatives for prophylaxis of GBS infections. Products and molecules derived from plants have been extensively studied to find new molecules with antimicrobial activity. Then, in attempt to develop a new product as an alternative to overcome the increase of resistant isolates, this study designs a copaiba oil topical formulation utilizing carbomer as forming polymer with antimicrobial activity against GBS.

Among more than twenty *Copaifera* species, *Copaifera officinalis* is one of the most abundant species and its anti-inflammatory and antioxidant activities have been described (BAYLAC, RACINE, 2003; DE LIMA SILVA, 2015). In addition, some studies reported antimicrobial activity of copaiba oil from *C. officinalis* against a wide spectrum of Gram positive bacterium. Santos et al. (2008) showed the oleoresin from *C. officinalis* has bactericidal activity against *Staphylococcus aureus*, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus epidermidis* and *Enterococcus faecalis* with MIC values ranged from 31.25 µg/mL to 125 µg/mL and MBC values ranged from 31.25 µg/mL to 250 µg/mL. Guimarães et al. (2016) also showed the antibacterial activity against *S. aureus* with lowest MIC and MBC values of 31.25 µg/mL. The oleoresin from *C. officinalis* was able to inhibit *Streptococcus mutans* growth, showing bacteriostatic activity (PIERI et al., 2012).

This study demonstrates a time-dependent copaiba oil activity against planktonic cells of GBS, regardless the resistance mechanism, and a bactericidal activity. No viable cells were detected after 12 hours of treatment with copaiba oil, which is a decreased time compared to the treatment with copaiba oil from *C. multijuga* (OTAGUIRI et al 2017).

The mechanism of action of copaiba oil has not been completely elucidated and may be due to interactions between its chemical components. This study shows morphological alterations induced by copaiba oil on GBS planktonic cells. Cell wall lysis, leakage of cytoplasmic compounds and cellular volume decrease were observed by SEM after 24 hours of treatment with copaiba oil and COF1 1.0% (w/w). Treatment with BF1 did not cause morphological changes on GBS cells. Only three studies investigated the copaiba oil mechanism of action. Herein, identical alterations observed also occurred for *S. aureus* and GBS treated with copaiba oil from *C. martii* and *C. multijuga*, respectively (SANTOS et al, 2008; OTAGUIRI et al., 2017). Moreover, copaiba oil from *C. duckei* caused material loss and thickening of *Bacillus cereus* cell wall (SANTOS et al., 2013). These findings can suggest the bacterial cell wall as a target for copaiba oil activity.

After determination of copaiba oil antimicrobial activity, nine different hydrogels enriched with copaiba oil were formulated. However, only carbomer preserved the bactericidal activity of copaiba oil. Acrylic acid polymer (Carbopol 940[®]) has anionic characteristic due to the presence of hydroxyl and carboxyl groups and mucoadhesive properties. In fact, this polymer is recommended for bioadhesion purpose because it can form hydrogen bond to penetrate the mucus layer (GAFITANU et al, 2016). Polymeric excipients incorporated into formulations contribute for mucoadhesion because it improves the contact between formulation and vaginal surface and extends the drug residence time (BODDUPALLI et al., 2010). Carbomer based hydrogel demonstrated the best mucoadhesive properties due to many hydrogen bond and Van der Waals forces with the vaginal environment (BERRETTA et al., 2013).

The pH of COF1 1.0% (w/w) was 5.75, slightly higher than the vaginal pH (3.5 ~ 4.5) which may result from the polymer characteristic. Despite this, Carbopol has been used as a forming polymer in vaginal hydrogels without toxicity *in vivo* and it is the choice for bioadhesive applications (BERRETTA et al., 2013; NAZAR et al., 2012). In general, antimicrobial products for vaginal application are applied in occasional periods. Therefore, it may be admissible values out of physiological vaginal pH range (MACHADO et al., 2017).

Copaiba oil hydrogel showed non-Newtonian pseudoplastic behavior which is associated with better spreadability on biological surfaces. Rheological analysis is important to develop semisolid formulations and can provide information about spreading and retention properties when the hydrogel is introduced in the vaginal canal. Spreadability and retention are needed characteristics for successful clinical results of vaginal semisolid preparations. Rheological behavior depends on the type of gelling agent and acrylic acid polymer gels were described as easier to spread at vaginal mucosa (DAS NEVES et al., 2009).

Usually, antimicrobial agents alone are unstable molecules and are impaired for environmental factors. Physically integrated antimicrobials on biocompatible polymers is an attempt to overcome these adverse circumstances (GONZÁLEZ-HENRÍQUEZ; SARABIA-VALLEJOS; RODRIGUEZ-HERNANDEZ, 2017). Then, some studies have been suggesting new hydrogel formulations with incorporated natural and synthetic antimicrobials. El-Kased et al (2017) developed a Carbopol[®]-based hydrogel enriched with honey, but with a limited antimicrobial activity against wound infections bacteria. A vaginal gel supplemented with organic sucrose octasulfate silver salt with antimicrobial objective was developed by Marianelli et al. (2014), using Carbopol[®] as gel-forming polymer.

We showed that copaiba oil hydrogel based on carbomer 940[®] did not disturb the vaginal mucosa architecture, indicating safety for *in vivo* model. A similar result, with no inflammation and characteristic cervicovaginal mucosa architecture, were found for a propolis Carbopol[®] based hydrogel with antifungal properties against *C. albicans* on a vaginal candidiasis *in vivo* model (BERRETTA et al., 2013). These facts demonstrate that hydrogel is an alternative for vaginal drug delivery and copaiba oil formulation appears to be a future option for GBS prophylaxis. However, a limitation of this study the antibacterial activity of copaiba oleoresin hydrogel on a vaginal colonization *in vivo* model was not evaluated here. Then, further studies are needed to ensure the safety and biological activity of copaiba oil hydrogel *in vivo*.

Conclusions

We showed that the copaiba oleoresin from *C. officinalis* has bactericidal activity against *Streptococcus agalactiae*, leading to cell wall lysis and leakage of cytoplasmic content. The copaiba oleoresin hydrogel with carbomer (COF1 1.0%) presented skin suitable pH and non-Newtonian pseudoplastic profile, preserved copaiba oleoresin antimicrobial activity and did not cause any damage for mice cervicovaginal mucosa. The results presented here showed a future alternative for colonized pregnant women to prevent GBS transmission to the newborns. However, additional studies are needed to determine hydrogel antibacterial activity against GBS *in vivo* and evaluate the formulation safety.

References

- ABRÃO, F.; DE ARAÚJO COSTA, L.D.; ALVES, J.M.; SENEDESE, J.M.; DE CASTRO, P.T.; AMBRÓSIO, S.R.; VENEZIANI, R.C.; BASTOS, J.K.; TAVARES, D.C.; MARTINS, C.H. *Copaifera langsdorffii* oleoresin and its isolated compounds: antibacterial effect and antiproliferative activity in cancer cell lines. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 15, p. 443, 2015.
- BAYLAC, S.; RACINE, P. Inhibition of 5-lipoxygenase by essential oils and other natural fragment extracts. **International Journal of Aromatherapy**, v. 13, n. 2-3, p. 138–142, 2003.
- BERG, B. R.; HOUSEMAN, J. L.; TERSTEEG, Z. E.; LEBAR, W. D.; NEWTON, D. W. Antimicrobial Susceptibilities of Group B *Streptococcus* Isolates from Prenatal Screening Samples. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 52, n. 9, p. 3499–3500, 2014.
- BERRETTA, A. A.; DE CASTRO, P. A.; CAVALHEIRO, A. H.; FORTES, V. S.; BOM, V. P.; NASCIMENTO, A. P.; MARQUELE-OLIVEIRA, F.; PEDRAZZI, V.; RAMALHO, L. N. Z.; GOLDMAN, G. H. Evaluation of Mucoadhesive Gels with Propolis (EPP-AF) in Preclinical Treatment of Candidiasis Vulvovaginal Infection. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, p. 1-18, 2013.

BRAZIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Gerência Geral de cosméticos. Guia de estabilidade de produtos cosméticos. Brasília, 2004.

BRAZIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Gerência Geral de cosméticos. Guia de controle de qualidade de produtos cosméticos. Brasília, 2007.

BODDUPALLI, B.M.; MOHAMMED, Z. N. K.; NATH, R. A.; BANJI, D. Mucoadhesive drug delivery system: An overview. **Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research**, v. 1, n. 4, p. 381–387, 2010.

CALÓ, E.; KHUTORYANSKIY, V. V. Biomedical applications of hydrogels: A review of patents and commercial products. **European Polymer Journal**, v. 65, p. 252–267, 2015.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. Prevention of Perinatal Group B Streptococcal Disease Revised Guidelines from CDC. **MMWR** v. 59, No. RR-10, p. 1 – 36, 2010.

CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 27^a ed. **CLSI Supplement M-100**. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2017.

CRESPO-ORTIZ, M. P.; CASTAÑEDA-RAMIREZ, C. R.; RECALDE-BOLAÑOS, M.; VÉLEZ-LONDOÑO, J. D. Emerging trends in invasive and noninvasive isolates of *Streptococcus agalactiae* in a Latin American hospital : a 17-year study. **BMC Infectious Diseases**, v. 14, p. 1–11, 2014.

DA SILVA MORAES, T.; LEANDRO, L.F.; DE OLIVEIRA SILVA L.; SANTIAGO, M.B.; SOUZA A.B.; FURTADO, R.A.; TAVARES D.C.; VENEZIANI, R.C.; AMBRÓSIO, S.R.; BASTOS, J.K.; MARTINS, C.H. *In vitro* evaluation of *Copaifera oblongifolia* oleoresin against bacteria causing oral infections and assessment of its cytotoxic potential. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 17, n. 10, p. 894-904, 2016.

DAS NEVES, J.; DA SILVA, M. V.; GONÇALVES, M. P.; AMARALA, M. H.; BAHIA, M. F. Rheological Properties of Vaginal Hydrophilic Polymer Gels. **Current Drug Delivery**, v. 6, p. 83-92, 2009.

DE LIMA SILVA, J. J.; POMPEU, D. G.; XIMENES, N. C.; DUARTE, A. S. G.; GRAMOSA, N. V.; DE MORAIS CARVALHO, K.; DE CASTRO BRITO, G. A.; GUIMARÃES, S. B. Effects of Kaurenoic Acid and Arginine on Random Skin Flap Oxidative Stress, Inflammation, and Cytokines in Rats. **Aesthetic Plastic Surgery**, v. 39, n. 6, p. 971–977, 2015.

DUTRA, V. G.; ALVES, V. M. N.; OLENDZKI, A. N.; DIAS, C. A. G.; DE BASTOS, A. F. A.; SANTOS, G. O.; DE AMORIN, E. L. T.; SOUSA, M. Â. B.; SANTOS, R.; RIBEIRO, P. C. S.; FONTES, C. F.; ANDREY, M.; MAGALHÃES, K.; ARAUJO, A. A; PAFFADORE, L. F. MARCONI, C.; MURTA, E. F. C.; FERNANDES, P. C.; RADDI, M. S. G.; MARINHO, P. S.; BORNIA, R. B. G.; PALMEIRO, J. K.; DALLA-COSTA, L. M.; PINTO, T. C. A.; BOTELHO, A. C. N.; TEIXEIRA, L. M.; FRACALANZZA, S. E. L. *Streptococcus agalactiae* in Brazil: serotype distribution, virulence determinants and antimicrobial susceptibility. **BMC Infectious Disease**, v. 14, p. 323, 2014.

- EL-KASED, R. F.; AMER, R. I.; ATTIA, D.; ELMAZAR, M. M. Honey-based hydrogel: *In vitro* and comparative *In vivo* evaluation for burn wound healing. **Scientific Reports** v. 7, n. 9692, p. 1-11, 2017.
- FERNÁNDEZ-ROMERO, J. A.; ABRAHAM, C. J.; RODRIGUEZ, A; KIZIMA, L.; JEAN-PIERRE, N.; MENON, R.; BEGAY, O.; SEIDOR, S.; FORD, B. E.; GIL, P. I.; PETERS, J.; KATZ, B. D.; ROBBIANI, M.; ZYDOWSKYA, T. M. Zinc Acetate/Carrageenan Gels Exhibit Potent Activity *In Vivo* against High-Dose Herpes Simplex Virus 2 Vaginal and Rectal Challenge. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, n. 1, p. 358–368, 2011.
- FJALSTAD, J. W.; ESAIASSEN, E.; JUVET, L. K.; ANKER, J. N. VAN DEN; KLINGENBERG, C. Antibiotic therapy in neonates and impact on gut microbiota and antibiotic resistance development : a systematic review. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, p. 1–12, 2017.
- GAFITANU, C. A.; FILIP, D.; CERNATESCU, C.; IBANESCU, C.; DANU, M.; PÂSLARU, E.; RUSU, D.; TUCHILUS, C. G.; MACOCINSCHI, D. Formulation and evaluation of anise-based bioadhesive vaginal gels. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 83, p. 485–495, 2016.
- GUIMARÃES, A. L. A.; CUNHA, E. A.; MATIAS, F. O.; GARCIA, P. G.; DANOPOULOS, P.; SWIKIDISA, R.; PINHEIRO, V. A.; NOGUEIRA, R. J. L. Antimicrobial Activity of Copaiba (*Copaifera officinalis*) and Pracaxi (*Pentaclethra macroleoba*) Oils against *Staphylococcus aureus*: Importance in compound wound care. **International Journal of Pharmaceutical Compounding**, v. 20, n. 1, p. 58–62, 2016.
- GONZÁLEZ-HENRÍQUEZ, C. M.; SARABIA-VALLEJOS, M. A.; RODRIGUEZ-HERNANDEZ, J. Advances in the Fabrication of Antimicrobial Hydrogels for Biomedical Applications. **Materials**, v. 10, n. 232, p. 1-23, 2017.
- HAYS, C.; LOUIS, M.; PLAINVERT, C.; DMYTRUK, N.; TOUAK, G.; TRIEU-CUOT, P.; POYART, C.; TAZI, A. Changing epidemiology of Group B *Streptococcus* susceptibility to fluoroquinolones and aminoglycosides in France. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 60, n. 12, p. 7424-7430, 2016.
- IZUMI, E.; VEIGA, V. F.; PINTO, A. C.; NAKAMURA, C. V. Terpenes from *Copaifera* Demonstrated *In Vitro* Antiparasitic and Synergic Activity. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 55, n. 7, p. 2994-3001, 2012.
- JI, W.; ZHANG, L.; GUO, Z.; XIE, S.; YANG, W.; CHEN, J.; WANG, J.; CHENG, Z.; WANG, X.; ZHU, X.; WANG, J.; WANG, H.; HUANG, J.; LIANG, N.; MCIVER, D. J. Colonization prevalence and antibiotic susceptibility of Group B *Streptococcus* in pregnant women over a 6-year period in Dongguan, China. **PLoS ONE**, v. 12, n. 8, p. e0183083, 2017.
- LU, B.; LI, D.; CUI, Y.; SUI, W.; HUANG, L.; LU, X. Epidemiology of Group B *Streptococcus* isolated from pregnant women in Beijing, China. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 20, n. 6, 2014.
- MACHADO, R. M.; PALMEIRA-DE-OLIVEIRA, A.; MARTINEZ-DE-OLIVEIRA, J.; PALMEIRA-DE-OLIVEIRA, R. Vaginal semisolid products: Technological performance considering physiologic parameters. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 109, p. 556–568, 2017.

MARIANELLI, C.; PETRUCCI, P.; COMELLI, M. C.; CALDERINI, G. Silver sucrose octasulfate (IASOS) as a valid active ingredient into a novel vaginal gel against human vaginal pathogens: *In vitro* antimicrobial activity assessment. **PLoS ONE**, v. 9, n. 6, p. e97791, 2014.

MENDONÇA, D.E.; ONOFRE, S.B. Antimicrobial activity of the oil-resin produced by copaiba *Copaifera multijuga* Hayne (Leguminosae). **The Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 19, n. 2B, p. 577-581, 2009.

MILES, A.A.; MISRA, S.S.; IRWIN, J.O. The estimation of the bactericidal power of the blood. **Journal of Hygiene**, v. 38, n. 6, p. 732-749, 1938.

MORGUETTE, A. E. B.; BIASI-GARBIN, R. P.; OTAGUIRI, E. S.; PERUGINI, M. R. E.; PELISSON, M.; CARRARA-MARRONI, F. E.; VESPERO, E. C.; BELEI, R. A.; KERBAUY, G.; CAPOBIANGO, J. D.; YAMAUCHI, L. M.; YAMADA-OGATTA, S. F. Prevalence and susceptibility profile of *Streptococcus agalactiae* in pregnant women seen at the University Hospital of Londrina, Paraná, Brazil. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, 2017.

NAGANO, N.; NAGANO, Y.; TOYAMA, M.; KIMURA, K.; TAMURA, T.; SHIBAYAMA, K.; ARAKAWA, Y. Nosocomial spread of multidrug-resistant group B streptococci with reduced penicillin susceptibility belonging to clonal complex 1. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, n. 4, p. 849–856, 2012.

NAZAR, H.; ROLDO, M.; FATOUROS, D. G.; VAN DER MERWE, S. M.; TSIBOUKLIS, J. Hydrogels in mucosal delivery. **Therapeutic Delivery**, v. 3, n. 4, 2012.

OTAGUIRI, E. S.; MORGUETTE, A. E. B.; TAVARES, E. R.; DOS SANTOS, P. M. C.; MOREY, A. T.; CARDOSO, J. D.; PERUGINI, M. R. E.; YAMAUCHI, L. M.; YAMADA-OGATTA, S. F. Commensal *Streptococcus agalactiae* isolated from patients seen at University Hospital of Londrina, Paraná, Brazil: capsular types, genotyping, antimicrobial susceptibility and virulence determinants. **BMC Microbiology**, v. 13, p. 297, 2013.

OTAGUIRI, E. S.; MORGUETTE, A. E. B.; BIASI-GARBIN, R. P.; MOREY, A. T.; LANCHEROS, C. A. C.; KIAN, D.; DE OLIVEIRA JR, A. G.; KERBAUY, G.; PERUGINI, M. R. E.; DURÁN, N.; NAKAMURA, C. V.; VEIGA JUNIOR, V. F.; NAKAZATO, G.; PINGE-FILHO, P.; YAMAUCHI, L. M.; YAMADA-OGATTA, S. F. Antibacterial Combination of Oleoresin from *Copaifera multijuga* Hayne and Biogenic Silver Nanoparticles Towards *Streptococcus agalactiae*. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 18, n. 2, 2017.

PAL, K.; BANTHIA, A. K.; MAJUMDAR, D. K. Polymeric Hydrogels: Characterization and Biomedical Applications, **Designed Monomers and Polymers**, v. 12, n. 3, p. 197-220, 2009.

PIERI, F. A.; MARTINS MUSSI, M. C.; FIORINI, J. E.; SCATAMBURLO MOREIRA, M. A.; SCHNEEDORF, J. M. Bacteriostatic effect of copaiba oil (*Copaifera officinalis*) against *Streptococcus mutans*. **Brazilian Dental Journal**, v. 23, n. 1, p. 36–38, 2012

SANTOS, A. O.; UEDA-NAKAMURA, T.; DIAS FILHO, B. P.; VEIGA-JÚNIOR, V. F.; PINTO, A. C.; NAKAMURA, C. V. Antimicrobial activity of Brazilian copaiba oils obtained from different species of the *Copaifera* genus. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 103, n. 3, p. 277–281, 2008a.

SANTOS, A. O.; UEDA-NAKAMURA, T.; DIAS FILHO, B. P.; VEIGA-JÚNIOR, V. F.; PINTO, A. C.; NAKAMURA, C. V. Effect of Brazilian copaiba oil on *Leishmania amazonensis*. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 120, n. 2, p. 204-208, 2008b.

SANTOS, E. C. G.; DONNICI, C. L.; CAMARGOS, E. R. DA S.; REZENDE, A. A. DE; ANDRADE, E. H. D. A.; SOARES, L. A. L.; CARVALHO, M. A. R. DE; ALMEIDA, M. DAS G. Effects of *Copaifera duckei* Dwyer oleoresin on the cell wall and cell division of *Bacillus cereus*. *Journal of Medical Microbiology*, v. 62, p. 1032–1037, 2013.

SCHRAG, S. J.; VERANI, J. R. Intrapartum antibiotic prophylaxis for the prevention of perinatal group B streptococcal disease: Experience in the United States and implications for a potential group B streptococcal vaccine. *Vaccine*, v. 31, n. S4, p. D20–D26, 2013.

SCHRAG, S. J.; FARLEY, M. M.; PETIT, S.; REINGOLD, A. Epidemiology of Invasive Early-Onset Neonatal Sepsis, 2005 to 2014. *Pediatrics*, v. 138, n. 6, p. e20162013, 2016.

SEKI, T.; KIMURA, K.; REID, M. E.; MIYAZAKI, A.; BANNO, H.; JIN, W.; WACHINO, J. I.; YAMADA, K.; ARAKAWA, Y. High isolation rate of MDR group B streptococci with reduced penicillin susceptibility in Japan. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 70, n. 10, p. 2725–2728, 2015.

SOUZA, A.B.; MARTINS, C.H.; SOUZA, M.G.; FURTADO, N.A.; HELENO, V.C.; DE SOUSA, J.P.; ROCHA, E.M.; BASTOS, J.K.; CUNHA, W.R.; VENEZIANI, R.C.; AMBRÓSIO, S.R. Antimicrobial activity of terpenoids from *Desf.* against cariogenic bacteria. *Phytotherapy Research*, v. 25, n. 2, p. 215-220, 2011.

TURNER, C.; TURNER, P.; PO, L.; MANER, N.; DE ZOYSA, A.; AFSHAR, B.; EFSTRATIOU, A.; HEATH, P. T.; NOSTEN, F. Group B streptococcal carriage, serotype distribution and antibiotic susceptibilities in pregnant women at the time of delivery in a refugee population on the Thai-Myanmar border. *BMC Infectious Diseases*, v. 12, n. 34, p. 1-6, 2012.

VEIGA JR, V. F.; PINTO, A. C. O gênero *Copaifera* L. v. 25, n. 2, p. 273–286, 2002.

6 CONCLUSÃO

Este estudo reportou que a taxa de prevalência de EGB entre as gestantes atendidas no HUL entre 2014-2016 foi de 18,2%, sendo 20,6% dos isolados resistentes aos antimicrobianos utilizados para tratamento e profilaxia das infecções por EGB. Esses resultados reafirmam a necessidade da continuidade da vigilância da colonização por EGB para gestantes, contribuindo com a prevenção das doenças neonatais.

Além disso, o óleo de copaíba extraído de *C. officinalis* apresentou atividade antibacteriana *in vitro* contra EGB. Então, desenvolveu-se a formulação de um hidrogel contendo óleo de copaíba que foi capaz de manter essa propriedade do princípio ativo. O produto também apresentou característica desejável para aplicação vaginal, com perfil pseudoplástico não-Newtoniano e ausência de toxicidade para a mucosa cervicovaginal de camundongos fêmea.

ANEXOS

ANEXO A

Parecer Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS
Universidade Estadual de Londrina
Registro CONEP 5231

Parecer CEP/UEL:	193/2012
CAAE:	06258612.8.0000.5231
Data da Relatoria:	30/04/2014
Pesquisador(a):	Lucy Megumi Yamauchi Lionú
Unidade/Órgão:	CCB - Departamento de Microbiologia

Prezado(a) Senhor(a):

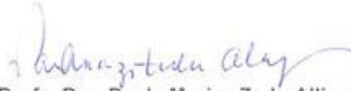
O "Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina" (Registro CONEP 5231) – de acordo com as orientações da Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde/MS e Resoluções Complementares, avaliou o projeto:

"Monitoramento da qualidade de atenção ao pré-natal relacionada ao risco de infecção neonatal por Streptococcus agalactiae em usuárias do SUS no Paraná e análise de estratégias para prevenção da enfermidade."

Situação do Projeto: **Aprovado**

Informamos que deverá ser comunicada, por escrito, qualquer modificação que ocorra no desenvolvimento da pesquisa, bem como deverá apresentar ao CEP/UEL, via Plataforma Brasil, relatório final da pesquisa.

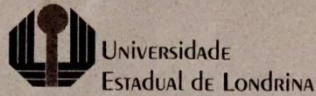
Londrina, 30 de maio de 2014.


Prof. Dra. Paula Mariza Zedu Alliprandini
Vice-Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos
Universidade Estadual de Londrina



ANEXO B

Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

OF. CIRC. CEUA Nº 127/2017

Londrina, 26 de Outubro de 2017.

Prezado (a) professor (a)

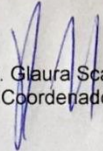
Certificamos que o projeto intitulado: "**Avaliação da atividade antimicrobiana e toxicidade da formulação em gel do óleo de copaíba em modelo de colonização vaginal por *Streptococcus agalactiae*.**" protocolo CEUA nº18901.2017.65 sob a responsabilidade de **Sueli Fumie Yamada Ogatta**, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), foi **aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Londrina (CEUA/UUEL), em reunião realizada em **10/10/2017**

O objetivo do projeto é avaliar a toxicidade e a atividade de uma formulação em gel com óleo-resina de *Copaifera officinalis* em modelo de colonização por *Streptococcus agalactiae*. Grau de invasividade=1

Vigência do Projeto	01/11/2017 a 31/10/2019
Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / BALB/c
Nº de animais	170
Peso/Idade	20 - 25 g/ 2 meses
Sexo	Fêmeas
Origem	Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá
Amostras a serem coletadas	Mucosa vaginal

Cumpra orientar que caso pretendam-se quaisquer alterações no protocolo experimental aprovado, deve-se submeter o novo protocolo à apreciação da CEUA/UUEL anteriormente à execução das modificações.

Coloco-me à disposição para quaisquer esclarecimentos que se fizerem necessária. Sem mais para o momento, subscrevo, cordialmente.


 Profa. Dra. Glaura Scantamburlo Alves Fernandes
 Coordenadora da CEUA/UUEL

Ilmo.(a) Sr.(a)
Prof. (a) Dr (a). Sueli Fumie Yamada Ogatta
 Responsável pelo projeto
 Departamento de Microbiologia

C/C para a Chefia do Depto. de Microbiologia
 C/C para a Direção do CCB