



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

Adriana Oliveira dos Santos

**Investigação da Atividade Biológica do Óleo de Copaiba
Obtido de Diferentes Espécies de *Copaifera* spp**

Londrina
2008

Adriana Oliveira dos Santos

**Investigação da Atividade Biológica do Óleo de Copaiba
Obtido de Diferentes Espécies de *Copaifera* spp**

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

Orientação: Prof. Dr. Celso Vataru Nakamura

Londrina
2008

Adriana Oliveira dos Santos

**Investigação da Atividade Biológica do Óleo de Copaiba
Obtido de Diferentes Espécies de *Copaifera* spp**

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

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Celso Vataru Nakamura
Universidade Estadual de Londrina

Prof. Dr. Maurílio José Soares
Instituto de Biologia Molecular do Paraná

Prof^ª Dr^ª Sueli Fumie Yamada-Ogatta
Universidade Estadual de Londrina

Londrina, 26 de fevereiro de 2008.

Dedico este trabalho
aos meus pais, Jorge e Maria Helena; às minhas irmãs, Andréia e Alexandra; e ao
meu namorado Eduardo, com carinho.

AGRADECIMENTOS

“A diferença entre o possível e o impossível está na vontade humana”.

Louis Pasteur

Gostaria de agradecer a todos os amigos, professores e técnicos que de alguma maneira contribuíram para a realização desse trabalho.

Ao professor Dr. Celso Vataru Nakamura meus sinceros agradecimentos, não apenas pela orientação, mas também pela valiosa amizade, oportunidades, confiança e incentivo durante estes anos.

À professora Tânia Ueda Nakamura pela colaboração na realização deste trabalho, e pela amizade em todos os momentos.

Ao professor Benício Alves de Abreu Filho, pela valiosa amizade e ao professor Benedito Prado Dias Filho, por tudo.

Ao Dr. José Andrés Morgado-Díaz e à Simone S. Fernandes pelo auxílio nos trabalhos de microscopia eletrônica de transmissão.

Aos amigos Amanda Bortoluci da Silva, Aline Ferrazin, Ana Cecília Santin, Andréa Mayumi Koroishi, Cindy Hana Okuma, Elen Milagres Ribeiro, Eliana Harue Endo, Érika Izumi, Helena Teru Takahashi, Karin Juliane Pelizzaro Rocha, Karine Zanoli, Mariele Caroline Marques Nogueira Puhl, Marta Regina Santin, Mirian Ueda Yamagushi, Patrícia Regina

Santos, Rodrigo Hinojosa Valdez, pela amizade, apoio no desenvolvimento do trabalho e pelos momentos de descontração e alegria no laboratório.

Aos técnicos do laboratório de Microbiologia Básica: Marinete Martinez Vicentim, Márcio Guilhermetti, Maria Aparecida Ferreira Manzotti, Rosana Ferreira Carli e Adriana Rossetto Barriviera, pelo apoio técnico e amizade.

A todos da minha família, principalmente meus pais Jorge e Maria Helena por terem me ensinado a lutar pelos meus sonhos e transformá-los em conquistas.

Ao Eduardo, por sempre estar do meu lado, me apoiar e incentivar em todas as minhas decisões, seu carinho foi fundamental para vencer mais esta etapa da minha vida.

Aos grandes amigos Célia Regina Scoaris Granado, Simone Vieira Jabor e Rogério Marchiosi pela valiosa amizade.

Às Instituições Financiadoras: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina, pelos auxílios concedidos para a realização deste trabalho

"Nossa recompensa se encontra no esforço e não no resultado. Um esforço total é uma vitória completa". Ghandi

RESUMO

No presente estudo foi investigado a atividade antimicrobiana e antileishmania de óleos da copaíba obtidos de diferentes espécies do gênero *Copaifera* utilizados na medicina popular. Os óleos foram estudados quanto a sua ação sobre a inibição do crescimento de bactérias Gram-positivas, Gram-negativas, fungos filamentosos, leveduriformes, bem como sobre formas promastigotas, amastigota axênicas e intracelulares de *Leishmania amazonensis*. Resultados da atividade antimicrobiana demonstraram que os óleos obtidos das espécies *Copaifera martii*, *C. officinalis* e *C. reticulata* (coletada no estado do Acre) apresentaram significativa inibição do crescimento das bactérias Gram-positivas *Staphylococcus aureus* incluindo meticilina-resistente, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus subtilis* e *Enterococcus faecalis* (MIC = 31,3 – 62,5 µg/ml). O decréscimo da viabilidade de *S. aureus* foi observado a partir de 3 h de tratamento com o óleo obtido de *C. martii*. Para os fungos dermatófitos (*Trichophyton rubrum* e *Microsporum canis*), a atividade antifúngica foi moderada. Por outro lado, nenhum óleo obtido das espécies de *Copaifera* inibiu o crescimento de bactérias Gram-negativas e leveduras. Foram visualizadas alterações morfológicas e ultraestruturais por microscopia eletrônica de varredura e microscopia eletrônica de transmissão de *S. aureus* tratadas com óleo de *C. martii*. Dentre as alterações observadas, destacam-se os rompimentos e danos na parede celular, com conseqüente liberação do material citoplasmático. As alterações indicam que o óleo da copaíba pode ter efeito sobre a parede celular. Adicionalmente, todas as espécies de *Copaifera* estudadas foram ativas na inibição do crescimento de formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*. O óleo mais ativo foi o proveniente da espécie *C. reticulata* (coletada no Pará) com valores de IC₅₀ de 5, 15, e 20 µg/ml para promastigotas, amastigotas axênicas e amastigotas intracelulares respectivamente. O ensaio de citotoxicidade demonstrou que o óleo obtido de *C. reticulata* (coletado no Pará) tem efeito seletivo sobre os protozoários. Com base nesses resultados, pode-se dizer que óleos

da copaíba são fontes promissoras de novos compostos no tratamento das doenças infecciosas.

Palavras-Chave: *Copaifera*, óleo da copaíba, *Leishmania amazonensis*; dermatófitos; bactérias, leveduras.

ABSTRACT

In the present study, copaiba oils from different species of *Copaifera* sp were screened for their activity against Gram-positive, Gram-negative bacteria, yeasts, dermatophytes, and promastigote, amastigote axenic and intracellular amastigote forms of *Leishmania amazonensis*. Copaiba oils obtained from *Copaifera martii*, *C. officinalis*, and *C. reticulata* (collected in the State of Acre) were more active against Gram-positive species *Staphylococcus aureus*, methicillin-resistant *S. aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus subtilis*, and *Enterococcus faecalis* (MIC = 31.3 – 62.5 µg/ml). Copaiba oils have a bactericidal activity, resulting in decreased viability of Gram-positive bacteria within 3 h. Moderate activity was observed against dermatophyte fungi (*Trichophyton rubrum* and *Microsporum canis*). Oils from *Copaifera* species did not exhibit activity against Gram-negative bacteria and yeasts. Scanning electron microscopy of *S. aureus* treated with resin oil from *C. martii* revealed fusion of the bacteria, forming cellular agglomerates. Transmission electron microscopy revealed disruption and damage to the cell wall, resulting in the release of cytoplasmic compounds, alterations in the morphology, and decrease in cell volume, indicating that copaiba oil may affect the cell wall. On the other hand, copaiba oils showed variable levels of activity against promastigote forms of *L. amazonensis* with IC₅₀ values in the range between 5 and 22 µg/ml. The most active copaiba oil was *C. reticulata* (collected at Pará) with an IC₅₀ value of 5, 15, and 20 µg/ml for promastigote, amastigote axenic and intracellular amastigote forms of *L. amazonensis* respectively. The cytotoxicity assay shows that copaiba oil obtained from *C. reticulata* (collected at Pará) is more toxic to promastigote and amastigote forms than J774G8 macrophages. Based on the results of the currently study, copaiba oils is a future alternative treatment for infections diseases.

Keywords: *Copaifera*, Copaiba oil; *Leishmania amazonensis*, dermatophyte, bacteria, yeast.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	13
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
Plantas Medicinais.....	14
Gênero <i>Copaifera</i> e o óleo resina.....	18
<i>Staphylococcus aureus</i> e as doenças infecciosas	23
<i>Leishmania amazonensis</i> e as Leishmanioses	26
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	32
ANEXO 1 - Antimicrobial activity of Brazilian copaiba oils obtained from different species of <i>Copaifera</i> genus.....	41
ANEXO 2 - Effect of Brazilian copaiba oils on <i>Leishmania amazonensis</i>	63
ANEXO 3 - RESULTADOS COMPLEMENTARES	88
CONCLUSÕES	93

INTRODUÇÃO

Hoje sabemos que os microrganismos estão em praticamente todos os lugares. No entanto, as primeiras observações dessas criaturas minúsculas foram feitas somente entre 1673 e 1723 pelo holandês, comerciante e cientista amador, Antoni van Leeuwenhoek com o advento da microscopia óptica. Tempos mais tarde, os cientistas Louis Pasteur e Robert Koch estabeleceram as relações entre os microrganismos e as doenças. Desde então, sabia-se que o próximo desafio seria “descobrir” substâncias que poderiam destruir os microrganismos patogênicos sem prejudicar os animais infectados ou os seres humanos.

O médico alemão Paul Ehrlich, por volta de 1910, após testar centenas de substâncias encontrou um agente quimioterápico chamado *salvarsan* (derivado de arsênico), efetivo no combate a sífilis. Todavia, em 1928, um afortunado acidente aconteceu com o médico e bacteriologista escocês Alexander Fleming que, ocasionalmente, descobriu um tipo de mofo que podia inibir o crescimento de bactérias. O mofo, mais tarde, foi identificado como *Penicillium notatum* e o seu isolado ativo de penicilina.

Desde a primeira descoberta dos antibióticos, muitos outros foram desenvolvidos. No entanto, antibióticos e quimioterápicos não estão livres de problemas. Muitas drogas são limitadas pela sua toxicidade; administração por longos períodos; seleção de microrganismos resistentes; bem como elevado custo. Ante essas limitações existentes, as plantas podem ser fontes potenciais de novos fármacos seguros e efetivos de inestimável valor no tratamento de doenças infecciosas.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Plantas Medicinais

Historicamente, os produtos naturais derivados de plantas têm-se revelado uma fecunda fonte de novos agentes terapêuticos (Calixto, 2000). O emprego das plantas no tratamento das doenças dava-se de maneira empírica, de tal forma que os conhecimentos adquiridos foram sendo passados ao longo do tempo, de geração para geração (Cunha *et al.*, 2003). Ante as limitações dos fármacos existentes, o emprego de conhecimentos calcados no método empírico para a síntese de drogas derivadas de plantas tornou-se uma alternativa bastante promissora. Com efeito, as plantas podem ser fontes potenciais de novas drogas seguras e efetivas de inestimável valor no tratamento de doenças infecciosas.

Nesse contexto, a busca por novos princípios ativos isolados de plantas, bem como protótipos moleculares para síntese de substâncias análogas mais potentes e seletivas, as quais podem ser obtidas mais facilmente e a custos menores, tem fomentado o investimento de muitas indústrias farmacêuticas em estudos envolvendo plantas (Simões *et al.*, 2004). Dentro desta perspectiva, pode-se afirmar que o Brasil é um país privilegiado, uma vez que detém extensa e diversificada flora, com destaque para as formas de vegetação encontradas por todo o território nacional – Floresta Amazônica, Mata Atlântica, Cerrado, Caatinga e Pantanal (Souza Brito *et al.*, 1993; Calixto, 2000; Yunes *et al.*, 2001).

Inúmeros compostos encontrados em plantas superiores apresentam atividade seletiva em relação aos microrganismos patogênicos, dentre os quais, destacam-se os alcalóides, terpenos, quinonas e flavonóides. Estes podem ser objetos de estudo para a identificação de novas drogas e/ou para modificações semi-sintéticas para melhorar a atividade terapêutica e diminuir os efeitos tóxicos do composto (Rates, 2001; Anthony *et al.*, 2005).

Em todo o mundo, inúmeros grupos de pesquisa investigam as possíveis atividades biológicas das plantas, baseando-se em informações etnobotânicas. Os dados obtidos atestam cada vez mais, e de maneira científica, as propriedades terapêuticas das plantas, em detrimento dos resultados empíricos de outrora.

Em 1991, estudo realizado na Guatemala investigou a atividade *in vitro* de 68 plantas utilizadas popularmente para o tratamento de doenças respiratórias causadas pelas bactérias *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* e *Streptococcus pyogenes*. Dos extratos obtidos das plantas, 41,2% foram efetivos na inibição do crescimento de uma ou mais bactérias (Cáceres *et al.*, 1991).

Atividade antimicrobiana de extratos obtidos de 13 plantas brasileiras utilizadas na medicina popular foi estudada por Holetz e colaboradores (2002). Dez extratos dessas plantas mostraram variado nível de atividade antibacteriana, sobretudo na inibição do crescimento das bactérias *S. aureus* e *Bacillus subtilis*, entre eles extratos obtidos da planta *Piper regnellii*.

Extratos de folhas de *Piper regnellii*, planta medicinal utilizada no Brasil para tratar doenças infecciosas, foram também testados para a atividade antifúngica sobre as leveduras *Candida albicans*, *Candida. krusei*, *Candida. parapsilosis* e *Candida tropicalis*. As propriedades antifúngicas do extrato de *P. regnellii* demonstraram preliminar validação científica do uso da planta na medicina popular (Pessini *et al.*, 2005).

Luize e colaboradores (2005) pesquisaram a atividade biológica de 19 extratos de plantas com relatos etnobotânicos utilizados popularmente para o tratamento de diversas doenças. Os extratos foram testados contra os parasitas *Leishmania amazonensis* e *Trypanosoma cruzi*. As plantas *Baccharis trimera*, *Cymbopogon citratus*, *Matricaria chamomilla*, *Mikania glomerata*, *Ocimum gratissimum*, *Piper regnellii*, *Prunus domestica*, *Psidium guajava*, *Sambucus canadensis*, *Stryphnodendron adstringens*, *Tanacetum*

parthenium, e *Tanacetum vulgare* mostraram ser significativamente ativas para ambos parasitas, com porcentagem de inibição do crescimento entre 49,5% e 99%.

Cientistas franceses selecionaram 17 espécies de plantas e, a partir destas, prepararam extratos de algumas de suas partes, os quais foram posteriormente testados *in vitro* sobre protozoários e muitos apresentaram atividade antiproliferativa (Okpekon *et al.*, 2003). Vinte e nove extratos de 18 plantas medicinais usadas na França foram avaliados *in vitro* contra *Leishmania donovani*. Dentre as plantas selecionadas, *Scaevola balansae* e *Premna serratifolia* foram capazes de inibir o crescimento do parasita nas concentrações inibitórias 50% (IC₅₀) entre 5 e 10 µg/ml (Desrivot *et al.*, 2007).

Estudos sobre o efeito antiprotozoário de produtos naturais têm sido realizados por nosso grupo de pesquisa e resultados promissores foram obtidos com a planta *T. parthenium*, a partir da qual foi isolado o composto partenolídeo (Tiuman *et al.*, 2005 a, b; Izumi *et al.*, 2007) e também com as neolignanais isoladas de folhas de *P. regnellii* (Luize *et al.*, 2006 a, b; Nakamura *et al.*, 2006; Vendrametto *et al.*, 2006). Entre outros estudos realizados estão: atividade anti-oxidante e antifúngica dos extratos obtidos de *Stryphnodendron obovatum* (Sanches *et al.*, 2005). Propriedades cicatrizantes de *Stryphnodendron polyphyllum* e *S. obovatum* (Lopes *et al.*, 2005); atividade antibacteriana *Aspidosperma ramiflorum* (Tanaka *et al.*, 2006) atividade antifúngica do extrato, frações e subfrações de *S. adstringens*, conhecido popularmente como “barbatimão” (Ishida *et al.*, 2006); atividade antileishmania do extrato bruto e cumarinas isoladas de folhas *Calophyllum brasiliense* (Brenzan *et al.*, 2007).

Muitos óleos essenciais – isolados das plantas por destilação e arraste a vapor – também apresentam propriedades antimicrobianas. Resultados obtidos por vários grupos de pesquisa comprovam atividades antibacterianas, antivirais, anti-helmínticas, bem como antiprotozoários dos óleos essenciais (Holetz *et al.*, 2003; Nakamura *et al.*, 2004; Anthony *et*

al., 2005; Ueda-Nakamura *et al.*, 2006, Lertsatitthanakorn *et al.*, 2006, Santoro *et al.*, 2007; Santin, 2007).

Em 2006, Ueda-Nakamura e colaboradores constataram atividade leishmanicida do óleo essencial extraído da planta *O. gratissimum*, bem como do seu principal constituinte: o eugenol. Outra pesquisa realizada por Pedroso e colaboradores (2006) mostrou a atividade biológica do óleo essencial de *C. citratus* sobre *Crithidia deanei*. Santoro e colaboradores (2007) verificaram um efeito dose dependente do óleo essencial de “Capim Limão” (*C. citratus*) e do seu constituinte majoritário Citral no crescimento das diferentes formas evolutivas de *T. cruzi*. A eficácia dos óleos essenciais para o tratamento de infecções pode ser atribuída aos seus efeitos imunomodulatórios, que são potencializados pela baixa densidade dos óleos, resultando em uma rápida difusão através da membrana.

Gênero *Copaifera* e o óleo resina

As plantas do gênero *Copaifera* são árvores de grande porte (alcançam de 25 e 40 metros de altura), conhecidas popularmente como copaibeiras ou pau d'óleo e pertencem à família Fabaceae, sub-família Caesalpinoideae.

Tais árvores, que podem viver até 400 anos, secretam um óleo de propriedades quase mágicas, com o qual valentes guerreiros untavam seus corpos para descansar após suas batalhas. E dessa forma, através dos conhecimentos históricos da sua utilização, o óleo de copaíba vem sendo indicado para diversos fins na medicina popular, desde os primeiros anos do descobrimento do Brasil.

As copaibeiras são nativas da região tropical da América Latina e da África Ocidental. No Brasil, são encontradas nas Regiões Amazônicas e Centro-Oeste. Entre as espécies mais abundantes destacam-se: *C. officinalis* (norte do Amazonas, Roraima, Colômbia, Venezuela e San Salvador), *C. guianensis* (Guianas), *C. reticulata*, *C. multijuga* (Amazônia), *C. confertiflora* (Piauí), *C. langsdorffii* (Brasil, Argentina e Paraguai), *C. coriacea* (Bahia) e *C. cearensis* (Ceará) (Veiga-Jr e Pinto, 2002).

A designação correta para o óleo da copaíba é óleo-resina, por ser um exudato constituído por ácidos resinosos e compostos voláteis. Também é conhecido como “bálsamo” de copaíba, apesar de não ser um bálsamo verdadeiro, uma vez que não contém derivados do ácido benzóico ou cinâmico. Pode ser encontrado em mercados e feiras populares com diferentes denominações, dentre as quais, podem ser citadas: Panchimoiti, Palo de aceite, Cabimo, Copahyba, Copaibarana, Copaúba, Copaibo, Copal, Maram, Marimari e Bálsamo dos Jesuítas (Veiga Jr. *et al.*, 2001).

O óleo de copaíba é encontrado em canais secretores formados pela dilatação de espaços intercelulares (meatos) que se intercomunicam no meristema, chamados de canais esquizógenos. Estes canais estão localizados em todas as partes da árvore, no entanto, o

caráter mais saliente deste aparelho secretor está no tronco. A coleta indicada do óleo da copaíba é a realizada através de uma incisão com trado a cerca de 1 metro de altura do tronco. Terminada a coleta é aconselhável vedar o orifício com argila para impedir a infestação da árvore por fungos ou cupins. Dessa forma, a argila pode ser facilmente retirada, permitindo que se façam outras coletas no mesmo tronco. Segundo relatos, uma única árvore pode gerar de 40 a 50 litros de óleo por ano, apesar de nem todas as espécies serem capazes de produzir essa quantidade (Veiga-Jr e Pinto, 2002; Oliveira *et al.*, 2006; Gomes *et al.*, 2007).

Documentos históricos apontam os índios brasileiros como pioneiros no uso do óleo da copaíba. Era utilizado principalmente como cicatrizante, bem como no umbigo de recém-nascidos para evitar o mal-dos-sete-dias. Os guerreiros quando voltavam de suas lutas untavam o corpo com o óleo da copaíba e se deitavam sobre esteiras suspensas e aquecidas para curar eventuais ferimentos. Tudo indica que o uso deste óleo veio da observação do comportamento de certos animais que, quando feridos, esfregavam-se nos troncos das copaibeiras.

A utilização do óleo da copaíba na medicina popular ocorre de várias maneiras: anti-bleorrágico, antiinflamatório, anti-séptico, anti-asmático, bronquite, espectorante, inflamações da garganta, pneumonia, dermatite, eczema, cicatrizante de feridas e úlceras, afrodisíaco, anti-tetânico, anti-reumático, anti-cancerígeno, leishmaniose, dores de cabeça, leucorréia e picadas de cobra. Com efeito, observa-se uma ampla gama de propriedades farmacológicas. Todavia, as principais atividades relatadas foram de antiinflamatório das vias superiores, inferiores e como cicatrizante (Lima *et al.*, 2003; Carvalho *et al.*, 2005; Veiga-Jr *et al.*, 2006; Fernandes *et al.*, 2007; Gomes *et al.*, 2007).

No tocante aos estudos da composição química dos óleos da copaíba, as principais metodologias empregadas são: a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), cromatografia com fluido super-crítico com detetor de infravermelho (SFC-FT-IR) e

cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas com colunas cromatográficas de fase estacionária quiral (β -ciclodextrina permetilada). Constatou-se serem os óleos constituídos por misturas de sesquiterpenos e de diterpenos.

Os sesquiterpenos compreendem aproximadamente 80% do óleo-resina. Dentre os compostos mais comuns estão α -copaeno, β -cariofileno, β -bisaboleno, α e β -selineno, α -humuleno, δ e γ -cadidene (Veiga-Jr e Pinto 2002). Por sua vez, os diterpenos pertencem aos esqueletos caurano, labdano e clerodano e totalizam 28 diterpenos descritos até o momento. Destes, o ácido copálico é comum a todos os óleos da copaíba até hoje estudados, por isso, talvez possa ainda ser utilizado como um biomarcador para a autenticação desses óleos (Veiga-Jr *et al.*, 1995; Veiga- Jr *et al.*, 1997; Braga *et al.*, 2000; Cascon e Gilbert, 2000).

Fatores climáticos e a época do ano devem ser considerados no processo de extração do óleo resina. A composição química das espécies de *Copaifera* pode apresentar diferenças quantitativas e qualitativas. A presença de substâncias químicas em uma determinada espécie pode estar atrelada a sua sazonalidade, variando em função de alguns fatores, tais como: temperatura, radiação solar e precipitação pluviométrica (Cascon e Gilbert, 2000; Oliveira *et al.*, 2006).

Hoje, o óleo da copaíba é um fitoterápico que pode ser encontrado em qualquer farmácia natural e de manipulação do país. Estudos farmacológicos mostram que o uso do óleo pelos índios é plenamente justificado. Estudos *in vitro* e *in vivo* demonstram que o óleo de várias espécies de *Copaifera* possui atividades biológicas. Dentre estas, destacam-se: antiinflamatória, antitumoral, antitetânica, antiblenorrágica, para cura da bronquite, sífilis, doenças da pele, úlcera, e também como cicatrizante de feridas (Veiga-Jr *et al.*, 2001; Lima *et al.*, 2003; Paiva *et al.*, 2004; Barreto-Jr. *et al.*, 2005; Brito *et al.*, 2005; Araújo-Jr *et al.*, 2005; Cavalcanti *et al.*, 2006).

Estudos realizados por Paiva e colaboradores (2004 a, b) mostraram a atividade gastroprotetora e antiinflamatória do óleo da copaíba coletado da espécie *C. langsdorffii*. Em estudo recente, realizado por Veiga-Jr e colaboradores (2007) a atividade antiinflamatória dos óleos provenientes das espécies *C. multijuga*, *C. reticulata* e *C. cearensis* foi confirmada. Sendo que destas, *C. multijuga* foi a que mostrou o mais potente efeito antiinflamatório.

Os resultados apresentados por Lima e colaboradores (2003) demonstram a atividade antitumoral do óleo da copaíba de *Copaifera multijuga*. Este, quando administrado oralmente em ratos C57black/6 reduzem o crescimento das células tumorais viáveis de melanoma B16F10, bem como o número de metástases.

Brito e colaboradores (2005) obtiveram resultados significativos com o óleo da copaíba (*C. multijuga*) na diminuição dos níveis séricos de uréia e creatina em ratos submetidos à síndrome de isquemia e reperfusão renal, mostrando assim um efeito protetor do óleo na insuficiência renal aguda. No entanto, Araújo-Jr e colaboradores (2005), quando estudaram o efeito do óleo de *C. officinalis* sobre as aminotransferases de ratos submetidos à isquemia e reperfusão hepática verificaram que o óleo não teve efeito protetor sobre a lesão hepática.

Atividade antimicrobiana do óleo da copaíba, obtido da espécie *C. paupera* sobre bactérias *B. subtilis*, *S. aureus* e *Staphylococcus epidermidis* foi demonstrada em estudo realizado por Tincusi e colaboradores (2002). Neste mesmo estudo, também foi mostrado que o óleo desta espécie de *Copaifera* não apresenta atividade leishmanicida, uma vez que na concentração de 300 µg/ml inibiu apenas 20% do crescimento das formas promastigotas de *L. braziliensis*.

A indústria de perfumes e de cosméticos utiliza o óleo da copaíba como matéria-prima de suma importância para produção de seus produtos. Dentre as propriedades estão a de ser um excelente fixador, emoliente, bactericida e antiinflamatório, na manufatura de sabonetes,

cremes e espumas de banho, shampoos, cremes condicionadores, loções hidratantes e capilares (Veiga-Jr e Pinto, 2002).

Apesar da extensa literatura que trata dos óleos de copaíba, ainda é pequeno o número de artigos nos quais é relatada a identificação botânica da espécie estudada. Os estudos de atividade biológica confirmam o conhecimento dos índios, repassados aos portugueses já no início da colonização, bem como a sabedoria popular.

Staphylococcus aureus e as doenças infecciosas

Os estafilococos são bactérias esféricas Gram-positivas com cerca de 0,5-1,5 μm de diâmetro, geralmente com distribuição em arranjos semelhantes a cachos de uva (Ingavale *et al.*, 2005). Atualmente, o gênero estafilococos é composto por cerca de 27 espécies, sendo algumas freqüentemente associadas a uma ampla variedade de infecções de caráter oportunista em seres humanos e animais.

Este grupo de bactérias é normalmente classificado, para fins clínicos, de acordo com a presença da enzima coagulase. Esta é uma enzima que coagula a fibrina no sangue. As cepas que apresentam esta enzima são denominadas de coagulase-positivas e as que não a apresentam, coagulase-negativas. Dentre os estafilococos coagulase-negativos estão *Staphylococcus epidermidis* e o *Staphylococcus saprophyticus*, ambos fazem parte da microbiota e normalmente não são patogênicos (Zetola *et al.*, 2005).

S. aureus é o mais patogênico dos estafilococos. Quase todas as cepas patogênicas de *S. aureus* são coagulase positivas. Os coágulos de fibrina podem proteger os microrganismos da fagocitose e isolá-los das outras defesas do hospedeiro.

As manifestações clínicas variam de infecções cutâneas superficiais a doenças sistêmicas. Isto se deve à capacidade do organismo de colonizar e sobreviver em diversos nichos do hospedeiro durante o processo infeccioso (Cegelski *et al.*, 2008). Dentre as infecções cutâneas estão a foliculite, furunculose, carbúnculo e impetigo. Já entre as doenças sistêmicas, pode-se citar a osteomielite, bacteremia, endocardite, pneumonia e, ocasionalmente, a meningite e artrite bacteriana. (Ingavale *et al.*, 2005; Zetola *et al.*, 2005). As infecções de caráter mais grave ocorrem, sobretudo em indivíduos debilitados por doenças crônicas, traumas físicos, queimaduras ou imunossuprimidos (Fung *et al.*, 2001; Okdakowska-Jedynak *et al.*, 2003; Masoodi *et al.*, 2007).

Além dessas infecções, *S. aureus* pode causar vários tipos de intoxicações, tais como: a síndrome da pele escaldada ou doença de Ritter, a intoxicação alimentar e a síndrome do choque tóxico. A importância clínica das doenças causadas por *S. aureus* tem crescido, particularmente, devido ao aumento na ocorrência de infecções hospitalares graves causadas por amostras multirresistentes (Jones *et al.*, 2001; Jacqueline *et al.*, 2003).

S. aureus apresenta uma formidável habilidade para adquirir resistência a muitos antibióticos (McCallum *et al.*, 2006). Desde a sua descoberta em 1880 *S. aureus* tem emergido como uma bactéria extremamente patogênica. Até a introdução da penicilina, a taxa de mortalidade de pacientes infectados com *S. aureus* era de 80%. No início de 1940, as infecções foram tratadas com beta-lactâmicos. Contudo, a primeira cepa resistente para esse antibiótico foi isolada já em 1942, primeiro em hospitais e depois na comunidade.

As linhagens resistentes são produtoras de beta-lactamase, uma enzima que inibe a ação da droga é codificada por genes plasmidiais. É dramático o aumento da resistência aos antibióticos nos isolados clínicos. Desde 1960, 80% de todos *S. aureus* isolados são resistentes para penicilina, e hoje, mais do que 90% dos estafilococos isolados são resistentes à penicilina (Cunha *et al.*, 2005; Deurenberg *et al.*, 2007; Cegelski *et al.*, 2008).

Com a introdução da meticilina, outro derivado beta-lactâmico, em 1960, a porcentagem de *S. aureus* meticilina-resistente (MRSA) aumentou de 60 a 70% nos casos clínicos. Relatos indicam um frenético aumento na frequência das comunidades que adquirem MRSA. A alta prevalência de MRSA nos hospitais tem sido associada com o aumento da mortalidade dos pacientes, e com os altos custos para os cuidados com a saúde. A resistência a meticilina está relacionada a alterações das proteínas ligadoras de penicilina (penicillin-binding proteins) (Harbarth, 2006).

O SENTRY (antimicrobial surveillance programme) relatou em um estudo que a prevalência de MRSA nos hospitais, entre 1997 e 1999, foi de 22,4% na Austrália; 66,8% no

Japão; 34,9% na América Latina; 40,4% na América do Sul; 32,4% nos Estados Unidos da América; e 26,3% na Europa (Deurenberg *et al.*, 2007).

O aumento da prevalência de comunidades adquirindo MRSA em diversos países e causando substancial morbidade e mortalidade associada com essas infecções sugere que MRSA é um desafiador problema de saúde pública (Nathwani, 2005; Zetola *et al.*, 2005). Assim, é necessário entender o processo de patogenicidade, para que novos alvos moleculares sejam identificados e o desenvolvimento de efetivos agentes terapêuticos sejam introduzidos no mercado (Ingavale *et al.*, 2005; Cegelski *et al.*, 2008).

Leishmania amazonensis e as Leishmanioses

As leishmanioses são infecções parasitárias que ocorrem em inúmeras espécies animais, incluindo o homem. São causadas por protozoários pertencentes ao gênero *Leishmania*, ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae (Serenó *et al.*, 2007). Cerca de 20 espécies de *Leishmania* são patogênicas para humanos (Desjeux, 2004). Os parasitas são agrupados em dois subgêneros: *Leishmania*, constituído pelos complexos *Leishmania donovani* e *Leishmania mexicana*; *Viannia*, que compreende apenas o complexo *Leishmania braziliensis*. Dentre os fatores considerados para tal classificação, estão: caracteres biológicos; imunológicos; bioquímicos; distribuição geográfica; bem como os aspectos clínicos da infecção humana (Cupolillo *et al.*, 2000).

A leishmaniose se manifesta em um amplo espectro de formas clínicas, que dependem da espécie ou subespécie do parasita infectante, da distribuição dos macrófagos infectados e, especialmente, da resposta imune do hospedeiro. As principais síndromes de leishmaniose humana, em ordem crescente de acometimento sistêmico e provável gravidade clínica, classificam-se como: formas cutâneas, mucocutâneas e visceral (Paris *et al.*, 2004).

No Brasil, as leishmanioses apresentam-se como duas doenças distintas: a leishmaniose tegumentar, que pode ser causada por diferentes espécies, sendo as mais importantes, *L. braziliensis*, *L. guyanensis* e *L. amazonensis*, e a leishmaniose visceral, também conhecida por calazar, causada pela *Leishmania (Leishmania) chagasi*.

A leishmaniose tegumentar, por sua vez, possui grande variedade de formas as quais de acordo com as variações clínicas, podem ser agrupadas da seguinte maneira: leishmaniose cutânea, cutânea difusa e mucocutâneas (Desjeux, 2004). A leishmaniose cutânea afeta principalmente rosto, nariz, braços e pernas, que são locais mais propícios para a picada do inseto. As úlceras tem como característica as bordas elevadas, em moldura. A leishmaniose cutânea difusa, caracteriza-se pela formação de lesões difusas não ulceradas por toda a pele. A

disseminação do parasita ocorre através de vasos linfáticos, bem como pela migração dos macrófagos parasitados. A forma clínica mucocutânea é conhecida por espúndia e nariz de tapir ou anta. As lesões ocorrem devido à disseminação do parasita por via hematogênica ou linfática. As regiões mais comumente afetadas são o nariz, a faringe, a boca e a laringe. O processo ulcerativo causa graves mutilações, as quais criam aos pacientes dificuldades de respirar, falar e se alimentar. Nesta fase, complicações respiratórias por infecções secundárias podem ocasionar a morte do paciente (Desjeux, 2001; Desjeux, 2004). No Brasil, a incidência de leishmaniose tegumentar tem aumentado em praticamente todas as regiões do país (Gontijo e Carvalho, 2003), sendo considerada endêmica, inclusive, no norte do Estado do Paraná (Silveira *et al.*, 1996).

A forma visceral da doença é crônica, progressiva e afeta vários órgãos, incluindo o baço, o fígado, a medula óssea, os linfonodos e a pele. A leishmaniose visceral é a forma mais grave e pode ser fatal, caso não seja tratada. Estatísticas preocupantes revelam que mais de 90% dos casos documentados nas Américas são encontrados no Brasil, sendo detectados casos em todos os estados costeiros, do Pará ao Paraná e em estados centrais como Minas Gerais, Goiás e Mato Grosso do Sul (Desjeux, 2004; Paris *et al.*, 2004; Murray *et al.*, 2005). As leishmanioses são causa de considerável mortalidade no mundo, uma vez que afetam mais de 12 milhões de pessoas, com 1 a 2 milhões de novos casos registrados anualmente. Perspectivas de controle dependem de alguns fatores, como o desenvolvimento de novas estratégias para o controle do vetor e tratamento (Carvalho e Ferreira, 2001; Rodrigues *et al.*, 2002; Camacho *et al.*, 2003; Desjeux, 2004; González *et al.*, 2005; Cohen-Freue *et al.*, 2007). Parasitas do gênero *Leishmania* apresentam um ciclo de vida heteroxênico, alternando entre formas promastigotas (extracelulares) e amastigotas (intracelulares). As amastigotas, são formas ovais ou esféricas com núcleo grande e arredondado ocupando aproximadamente, um terço do corpo do parasita. Multiplicam-se no citoplasma dos macrófagos localizados na pele,

nas vísceras ou no sangue, onde produzem pouco ou nenhum efeito patológico nos hospedeiros naturais. No entanto, nos hospedeiros eventuais, entre os quais está o homem, pode-se verificar uma violenta reação celular ocasionada pelo parasita, que resulta usualmente em lesões da pele e das mucosas (leishmaniose tegumentar) ou em severas alterações patológicas nos órgãos internos (leishmaniose visceral). As formas promastigotas são alongadas, com um flagelo livre e longo, emergindo da porção anterior do corpo do parasita. O núcleo é arredondado ou oval e está situado na região mediana do corpo do parasita. Estas formas do parasita são encontradas aderidas à parede intestinal do inseto vetor em pontos diferentes ou livres no lúmen, em processo de multiplicação. As formas infectantes, promastigotas metacíclicas, são encontradas principalmente livres ou aderidas na porção anterior do aparelho bucal do inseto (Cunningham, 2002; McConville *et al.*, 2007; Besteiro *et al.*, 2007).

Ambas as formas do agente etiológico da Leishmaniose, apresentam como característica da ordem, a presença de um cinetoplasto mitocondrial conspícuo, situado próximo à base do flagelo. O cinetoplasto é um compartimento especializado da mitocôndria onde se concentra grande quantidade de DNA organizado em mini e maxi-círculos, denominado kDNA. Ao microscópio eletrônico de transmissão observa-se que esses parasitas são delimitados por uma membrana citoplasmática lipoprotéica, sob a qual estão dispostos microtúbulos subpeliculares em número variável. Nas diferentes espécies de *Leishmania*, a membrana plasmática apresenta uma invaginação na região anterior do corpo do parasita formando a bolsa flagelar, onde se localiza o flagelo, e caracteriza-se por apresentar intensa atividade endocítica. Na matriz citoplasmática é possível observar a mitocôndria, que se estende por toda a célula, retículo endoplasmático, aparelho de Golgi, compartimentalização da via glicolítica em glicossomas e vacúolos de reserva, tais como os acidocalcissomas. Vale ressaltar, que formas amastigotas do parasita *Leishmania* do complexo mexicana apresentam

exclusivamente, abundantes estruturas elétron-densas no citoplasma, as quais variam em tamanho e número, designadas como megasomas. Estudos citoquímicos mostram que megasomas contém várias enzimas hidrolíticas, tais como as cisteínas proteinases, consideradas cruciais na diferenciação celular entre as formas distintas do parasita (Ueda-Nakamura *et al.*, 2001; De Souza, 2002; Besteiro *et al.*, 2007; McConville *et al.*, 2007; Ueda-Nakamura *et al.*, 2007).

A transmissão da leishmaniose ocorre por meio dos hospedeiros invertebrados, que são mosquitos flebótomos do gênero *Phlebotomus* ou *Lutzomyi* (Carvalho e Ferreira, 2001; Murray *et al.*, 2005). Os vetores inoculam as formas promastigotas metacíclicas, infectando o hospedeiro vertebrado. Uma vez no interior do hospedeiro, as formas promastigotas são fagocitadas pelos macrófagos. Após a interiorização ocorre a fusão do fagossoma contendo o parasita com os lisossomas da célula hospedeira, seguida pela diferenciação das formas promastigotas em amastigotas imóveis, capazes de se adaptarem ao ambiente ácido dos vacúolos fagocíticos, ricos em hidrolases. Destaca-se que o pH ácido deste compartimento, em torno de 4,7 a 5,2 - vital para o funcionamento das hidrolases lisossomais – não interfere no metabolismo de amastigotas de *Leishmania* que se dá preferencialmente entre pH 4,0 a 5,5. Ressalta-se que a natureza acídica do vacúolo parasitóforo, parece favorecer a diferenciação e proliferação deste parasita (Cunningham, 2002; Waller *et al.*, 2002; Besteiro *et al.*, 2007; McConville *et al.*, 2007).

As formas clássicas de leishmanioses – leishmaniose tegumentar e visceral – impõem dificuldades específicas em termos de diagnóstico e tratamento. Os protozoários, por serem eucariotos, apresentam processos metabólicos que se assemelham mais aos das células do hospedeiro humano do que aqueles apresentados pelos patógenos bacterianos procariontes. Dessa forma, os fármacos antiprotozoários causam sérios efeitos tóxicos para os hospedeiros (Murray *et al.*, 2005), particularmente em células com alta atividade metabólica, tais como:

células neuronais, tubulares renais, intestinais e germinativas da medula óssea (Harvey *et al.*, 1998; Delorenzi *et al.*, 2001).

Não há nenhuma vacina contra essa doença, a falta de imunidade cruzada entre os vários parasitas causadores da leishmaniose levanta problemas a esse respeito (Desjeux, 2001; Desjeux, 2004). O tratamento é dependente de um limitado número de drogas. A droga de primeira escolha é o Antimonial Pentavalente: antimoniato N-metil-glucamina. Este antimoniato é indicado para todas as formas de leishmaniose tegumentar, embora as formas mucosas exijam maiores cuidados, podendo apresentar respostas mais lentas e possibilidades de recidiva. Não havendo resposta satisfatória com esse medicamento, as drogas de segunda escolha são a Anfotericina B e a pentamidina (Croft *et al.*, 2005; Croft *et al.*, 2006; Sereno *et al.*, 2007; Alnaim *et al.*, 2007).

No entanto, todas essas drogas são limitadas pela sua toxicidade; requerem administração intravenosa por um longo período; e apresentam custo elevado. Novos fármacos estão sendo adotados no tratamento das leishmanioses, como a Miltefosina[®], que é considerada a primeira droga de aplicação oral efetiva. Todavia, ainda é muito pequeno o número de drogas efetivas, seguras e disponíveis (Croft e Coombs, 2003; Leandro *et al.*, 2003; Kafetzis *et al.*, 2005; Natera *et al.*, 2007). Ante o exposto, a busca de novas drogas antiparasitárias é uma prioridade na área médica. Estudos visando o melhor entendimento da patogênese, bem como a elucidação de novos alvos quimioterápicos, tais como enzimas, transportadores e metabólitos que são distintos nos parasitas e seus hospedeiros são de suma importância para a obtenção de fármacos efetivos e seguros para o controle das leishmanioses.

OBJETIVOS

- Investigar o efeito do óleo de copaíba extraído de diferentes espécies de *Copaifera* (*C. reticulata* (coletadas no Estado do Acre e Pará), *C. multijuga*, *C. martii*, *C. cearensis*, *C. paupera*, *C. langsdorffii*, *C. officinalis*, e *C. lucens*) no crescimento de bactérias Gram-positivas, bactérias Gram-negativas, fungos filamentosos e leveduriformes, bem como sobre formas promastigotas, amastigotas axênicas e intracelulares de *Leishmania amazonensis*;
- Realizar a curva de tempo de morte de *Staphylococcus aureus* metilina-sensível e *S. aureus* metilina-resistente (MRSA);
- Analisar as alterações morfológicas e ultra-estruturais de *S. aureus* tratado com óleo de *C. martii* por microscopia eletrônica de varredura e microscopia eletrônica de transmissão;
- Analisar as alterações morfológicas e ultra-estruturais de *L. amazonensis* tratado com óleo de *C. reticulata* por microscopia fotônica comum, eletrônica de varredura e de transmissão;
- Observar a atividade do óleo da copaíba na multiplicação de *L. amazonensis* no interior de macrófagos peritoniais;
- Realizar ensaios de citotoxicidade em macrófagos da linhagem J774G8.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALNAIM, L.; ALSOUD, N. A.; ZAGHLOUL, I.; AL-JASER, M. Effects of fluconazole on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of antimony in cutaneous leishmaniasis-infected hamsters. **Int. J. Antimicrob. Agents.**, Amsterdam, v. 29, p. 728-732, 2007.

ANTHONY, J. P.; FYFE, L.; SMITH, H. Plant active components - A resource for antiparasitic agents? **Trends Parasitol.**, Oxford, v. 21, p. 462-468, 2005.

ARAÚJO-JUNIOR, F. A.; BRAZ, M. N.; ROCHA-NETO, O. G.; D'ALMEIDA COSTA, F.; BRITO, M. V. H. Copaiba oil effect in rats aminotransferases submitted to hepatic ischemic and reperfusion with and without preconditioning. **Acta Cir. Bras.**, São Paulo, v. 20, p. 93-99, 2005.

BARRETO-JÚNIOR, A.G.; BISCAIA-JÚNIOR, E. C.; VEIGA-JÚNIOR, V. F.; PINTO, A. C.; CARVALHAES, S. F.; MACIEL, M. A. M. Ion exchange chromatography applied to the fractionation of the copaiba oil (*Copaifera multijuga*) and sacaca (*Croton cajucara*) extracts. **Quím. Nova.**, São Paulo, v. 28, 2005.

BESTEIRO, S.; WILLIAMS, R. A. M.; COOMBS, G. H.; MOTTRAM, J. C. Protein turnover and differentiation in *Leishmania*. **Int. J. Parasitol.**, Oxford, v. 37, p. 1063-1075, 2007.

BRAGA, W. F.; PATITUCCI, M. L.; ANTUNES, O. A. C.; VEIGA-JUNIOR, V. F.; BERGTER, L.; GARRIDO, F. M. S.; PINTO, A. C. Separation of Acid Diterpenes of *Copaifera cearensis* Huber ex Ducke by Flash chromatography Using Potassium Hydroxide Impregnated Silica Gel. **J. Braz. Chem. Soc.**, São Paulo, v. 11, p. 355-360, 2000.

BRENZAN, M. A. B.; NAKAMURA, C. V.; DIAS-FILHO, B. P.; UEDA-NAKAMURA, T.; YOUNG, M. C. M.; CORTEZ, D. A. G. Antileishmanial activity of crude extract and coumarin from *Calophyllum brasiliense* leaves against *Leishmania amazonensis*. **Parasitol. Res.**, Berlin, v. 101, p. 715-722, 2007.

BRITO, M. V. H.; MOREIRA, R. J.; TAVARES, M. L. C.; CARBALLO, M. C. S.; CARNEIRO, T. X.; SANTOS, A. A. S. Copaiba oil effect on urea and creatinine serum levels in rats submitted to kidney ischemia and reperfusion syndrome. **Acta Cir Bras**, São Paulo, v. 20, p. 243-246, 2005.

CÁCERES, A.; MENENDEZ, H.; MÉNDEZ, E.; COHOBÓN, E.; SAMOYA, B. E.; JÁUREGUI, E.; PERALTA, E.; CARRILHO, G. Antigonorrhoeal activity of plants used in Guatemala for the treatment of sexually transmitted disease. **J. Ethnopharmacol.**, Lausanne, v. 48, p. 85-88, 1995.

CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Braz. J. Med. Biol. Res.**, São Paulo, v. 33, p.179- 189, 2000.

- CAMACHO, M. D. R.; PHILLIPSON, J. D.; CROFT, S. L.; SOLIS, P. N.; MARSHALL, S. J.; GHAZANFAR, S. A. Screening of plant extracts for antiprotozoal and cytotoxic activities. **J. Ethnopharmacol.**, Lausanne, v. 89, p.185-191, 2003.
- CARVALHO, J. C. T.; CASCON, V.; POSSEBON, L. S.; MORIMOTO, M. S. S.; CARDOSO, L. G. V.; KAPLAN, M. A. C.; GILBERT, B. Topical antiinflammatory and analgesic activities of *Copaifera duckei* dwyer. **Phytother. Res.**, London, v. 19, p. 946-950, 2005.
- CARVALHO, P. B.; FERREIRA E. I. Leishmaniasis phytotherapy. Nature's leadership against an ancient disease. **Fitoterapia.**, Milano, v. 72, p. 599-618, 2001.
- CASCON, V.; GILBERT, B. Characterization of the chemical composition of oleoresins of *Copaifera guianensis* Desf., *Copaifera duckei* Dwyer and *Copaifera multijuga* Hayne. **Phytochemistry.**, New York v. 55, p. 773-778, 2000.
- CAVALCANTI, B. C.; COSTA-LOTUFO, L. V.; MORAES, M. O.; BURBANO, R. R.; SILVEIRA E. R.; CUNHA, K. M. A.; RAO, V. S. N.; MOURA, D. J.; ROSA, R. M.; HENRIQUES J. A. P.; PESSOA, C. Genotoxicity evaluation of kaurenoic acid, a bioactive diterpenoid present in Copaíba oil. **Food Chem. Toxicol.**, Oxford, v. 44, p. 388-392, 2006.
- CEGELSKI, L.; MARSHALL, G. R.; ELDRIDGE, G. R.; HULTGREN, S. J. The biology and future prospects of antivirulence therapies. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 6, p.17-27, 2008.
- COHEN-FREUE, G.; HOLZER T. R.; FORNEY J. D.; MCMASTER W. R. Global gene expression in *Leishmania*. **Int. J. Parasitol.**, Oxford, v. 37, p.1077-1086, 2007.
- CROFT, S. L.; COOMBS, G. H. Leishmaniasis: current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. **Trends in Parasitol.**, Oxford, v. 19, no. 11, p. 502-508, 2003.
- CROFT, S. L.; BARRETT, M. P.; URBINA, J. A. Chemotherapy of trypanosomiasis and leishmaniasis. **Trends in Parasitol.**, Oxford, v. 21, 508-512, 2005.
- CROFT, S. L.; SEIFERT, K.; YARDLEY, V. Current scenario of drug development for leishmaniasis. **Indian J. Med. Res.**, Calcutta, v. 123, p. 399-410, 2006.
- CUNHA P.; SILVA, A. P.; ROQUE O. R. **Plantas e produtos vegetais em fitoterapia.** Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2003.
- CUNHA, B. A. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: clinical manifestations and antimicrobial therapy. **Clin. Microbiol. Infect.**, Paris, v.11, p. 33-42, 2005.
- CUNNINGHAM, A. C. Parasitic adaptive mechanisms in infection by *Leishmania*. **Exp. Mol. Pathol.**, New York, v. 72, p. 132-141, 2002.

CUPOLILLO, E.; MEDINA-ACOSTA, E.; NOYES, H. L.; MOMEN, H.; GRIMALDI JUNIOR, G. A revised classification for *Leishmania* and *Endotrypanum*. **Parasitol. Today.**, Amsterdam, v. 16, p. 142-144, 2000.

DELORENZI, J. C.; ATTIAS, M.; GATTASS, C. R.; ANDRADE, M.; REZENDE, C.; CUNHA PINTO, A.; HENRIQUES, A.T.; BOU-HABIB D. C.; SARAIVA E. M. B. Antileishmanial Activity of an Indole Alkaloid from *Peschiera australis*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, Washington, v. 45, p. 1349-1354, 2001.

DESJEUX, P. The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. **Tran. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, London, v. 95, p. 239-243, 2001.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.**, Oxford, v. 27, p. 305-318, 2004.

DESRIVOT, J.; WAIKEDRE, J.; CABALION, P.; HERRENKNECHT, C.; BORIES, C.; HOCQUEMILLER, R.; FOURNET, A. Antiparasitic activity of some New Caledonian medicinal plants. **J. Ethnopharmacol.**, Lausanne, v. 112, p. 7-12, 2007.

DE SOUZA, W. Special organelles of some pathogenic protozoa. **Parasitol. Res.**, Berlin, v. 88, p. 1013-1025, 2002.

DEURENBERG, R. H.; VINK, C.; KALENIC, S.; FRIEDRICH, A.W.; BRUGGEMAN C. A.; STOBBERINGH, E. E. The molecular evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Clin. Microbiol. Infect.**, Paris, v.13, p. 222–235, 2007.

FERNANDES, F. F.; FREITAS E. P. S. Acaricidal activity of an oleoresinous extract from *Copaifera reticulata* (Leguminosae: Caesalpinioideae) against larvae of the southern cattle tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). **Vet. Parasitol.**, Amsterdam, v. 147, p. 150-154, 2007.

FUNG, H.B.; KIRSCHENBAUM, H. L.; OJOFEITIMI B. O. Linezolid: An Oxazolidinone Antimicrobial Agent. **Clin. Ther.**, Princeton, v. 23, p. 356-391, 2001.

GOMES, N. M.; REZENDE, C. M.; FONTES, S. P.; MATHEUS, M. E.; FERNANDES, P. D. Antinociceptive activity of Amazonian Copaiba oils. **J. Ethnopharmacol.**, Lausanne, v. 12, p. 486-492, 2007.

GONTIJO, B; CARVALHO, M. L. R. Leishmaniose Tegumentar Americana. **Rev. Soc. Bras. Méd. Trop.**, Rio de Janeiro, v. 36, n. 1, p.71-80, 2003.

GONZÁLEZ, P.; MARÍN, C.; RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ, I.; HITOS, A. B.; ROSALES M.J.; REINA, M.; DÍAZ, J. G.; GONZÁLEZ-COLOMA, A.; SÁNCHEZ-MORENO, M. In vitro activity of C₂₀-diterpenoid alkaloid derivatives in promastigotas and intracellular amastigotes of *Leishmania infantum*. **Int. J. Antimicrob. Agents.**, Amsterdam, v. 25, p.136-141, 2005.

HARBARTH, S. Control of endemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*-recent advances and future challenges. **Clin. Microbiol. Infect.**, Paris, v. 12, p. 1154–1162, 2006.
HARVEY, R. C.; CHAMPE, P. C. **Farmacologia Ilustrada**. 2. ed. São Paulo: Artmed, 1998.

HOLETZ, F. B.; PESSINI, G. L.; SANCHES, N. R.; CORTEZ, D. A. G.; NAKAMURA, C. V.; DIAS-FILHO, B. P. Screening of some plants used in Brazilian folk medicine for treatment of infectious diseases. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.**, Rio de Janeiro, v. 97, no. 7, p. 1027-1031, 2002.

HOLETZ, F.B.; UEDA-NAKAMURA, T.; DIAS-FILHO, B. P.; CORTEZ, D. A. G.; MORGADO-DÍAZ, J. A.; NAKAMURA, C. V. Effect of oil essential of *Ocimum gratissimum* on the trypanosomatid *Herpetomonas samuelpessoai*. **Acta Protozool.**, Warszawa, v. 45, p. 231-240, 2003.

INGAVALE, S.; WAMEL, W.; LUONG, T. T.; LEE, C. Y.; CHEUNG, A. L. Rat/MgrA, a Regulator of Autolysis, Is a Regulator of Virulence Genes in *Staphylococcus aureus*. **Infect. Immun.**, Bethesda, v. 73, p. 1423-1431, 2005.

ISHIDA, K.; PALAZZO DE MELLO, J. C.; CORTEZ, D. A. G.; DIAS-FILHO, B. P.; UEDA-NAKAMURA, T.; NAKAMURA, C. V. **J. Antimicrob. Chemother.**, London, v. 58, p. 942-949, 2006.

IZUMI, E.; MORELLO, L. G.; UEDA-NAKAMURA, T.; YAMADA-OGATTA, S. F.; DIAS-FILHO, B. P.; CORTEZ, D. A. G.; FERREIRA, I. C. P.; MORGADO-DIAZ, J. A.; NAKAMURA, C. V. *Trypanosoma cruzi*: Antiprotozoal activity of parthenolide obtained from *Tanacetum parthenium* (L.) Schultz Bip. (Asteraceae, Compositae) against epimastigote and amastigote forms. **Exp. Parasitol.**, Lausanne, 2007. DOI: 10.1016/j.exppara.2007.08.015.

JACQUELINE, C.; CAILLON, J.; MABECQUE, V.; MIÈGEVILLE, A. F.; DONNIO, P.Y.; BUGNON, D.; POTEL, G. In vitro activity of linezolid alone and in combination with gentamicin, vancomycin or rifampicin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by time-kill curve methods. **J. Antimicrob. Chemother.**, London, v. 51, p. 857-864, 2003.

JONES, R. N; HARE, R. S; SABATELLI, F. J. In vitro Gram-Positive Antimicrobial Activity of Evernimicin (SCH 27899), a Novel Oligosaccharide, Compared With Other Antimicrobials: a multicentre international trial. **J. Antimicrob. Chemother.**, London, v. 47, p. 15-25, 2001.

KAFETZIS, D. A.; VELISSARIOU, I. M.; STABOULI, S.; MAVRIKOU, M.; DELIS, D.; LIAPI, G. Treatment of paediatric visceral leishmaniasis: amphotericin B or pentavalent antimony compounds? **Int. J. Antimicrob. Agents.**, Amsterdam, v. 25, p. 26-30, 2005.

LEANDRO, C.; CAMPINO, L. Leishmaniasis: efflux pumps and chemoresistance. **Int. J. Antimicrob. Agents.**, Amsterdam, v. 22, p. 352-357, 2003.

LERTSATITTHANAKORN, P.; TAWEECHAI SUPAPONG, S.; AROMDEE, C.; KHUNKITTI, W. In vitro bioactivities of essential oils used for acne control. **The International Journal of Aromatherapy.**, Edinburgh, v. 16, p. 43-49, 2006.

LIMA, S. R. M.; VEIGA-JUNIOR, V. F.; CHRISTO, H. B.; PINTO, A.C.; FERNANDES, P. D. In vivo and in vitro Studies on the Anticancer Activity of *Copaifera multijuga* Hayne and its Fractions. **Phytother. Res.**, London, v. 17, p. 1048-1053, 2003.

LOPES, G. C.; SANCHES A. C. C.; NAKAMURA, C. V.; DIAS-FILHO, B. P.; HERNANDES, L.; PALAZZO DE MELLO, J. C. Influence of extracts of *Stryphnodendron polyphyllum* Mart. and *Stryphnodendron obovatum* Benth. on the cicatrisation of cutaneous wounds in rats. **J. Ethnopharmacol.**, Lausanne, v. 99, p. 265–272, 2005.

LUIZE, P. S.; TIUMAN, T.S.; MORELLO, L. G.; MAZA, P. K.; UEDA-NAKAMURA, T.; DIAS-FILHO B. P.; CORTEZ, D. A. G.; PALAZZO DE MELLO J. C.; NAKAMURA C. V. Effects of medicinal plant extracts on growth of *Leishmania (L.) amazonensis* and *Trypanosoma cruzi*. **Braz. J. Pharm. Sci.**, São Paulo, 41, p. 85-94, 2005.

LUIZE, P. S.; UEDA-NAKAMURA, T.; DIAS-FILHO, B. P.; CORTEZ, D. A. G.; NAKAMURA, C. V. Activity of Neolignans Isolated from *Piper regnellii* (MIQ.) C. DC. var. *pallescens* (C. DC.) YUNCK against *Trypanosoma cruzi*. **Biol. Pharm. Bull.**, Tóquio, v. 29, p. 2126-2130, 2006a.

LUIZE, P. S.; UEDA-NAKAMURA, T.; DIAS-FILHO, B. P.; CORTEZ, D. A. G.; NAKAMURA, C. V. Ultrastructural alterations induced by the neolignan dihydrobenzofuranic eupomatenoid-5 on epimastigote and amastigote forms of *Trypanosoma cruzi*. **Parasitol. Res.**, Berlin, v. 100, p. 31-37, 2006b.

MASOODI, S. R.; WANI, A.I.; MISGAR, R. A.; GUPTA, V. K.; BASHIR, M. I.; ZARGAR, A.H. Patter of infections in patients with diabetes mellitus – Data from a tertiary care medical centre in Indian sub-continent. **Diabetes Metab. Syndr.**, Amsterdam, v. 1, p. 91-95, 2007.

McCALLUM, N.; SPEHAR, G.; BISCHOFF, M.; BERGER-BACHI, B. Strain Dependence of the Cell Wall-Damage Induced Stimulon in *Staphylococcus aureus*. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v. 1760, p. 1475-1481, 2006.

MCCONVILLE, M. J.; HANDMAN, E. The molecular basis of Leishmania pathogenesis. **Int. J. Parasitol.**, Oxford, v. 37, p. 1047-1051, 2007.

MURRAY, H. M.; BERMAN, J. D.; DAVIES, C. R.; SARAVIA, N. G. Advances in leishmaniasis. **Lancet.**, v. 366, p. 1561-1577, 2005.

NAKAMURA, C. V.; ISHIDA, K.; FACCIN, L. C.; DIAS-FILHO B. P.; CORTEZ, D. A. G. ROZENTAL, S.; SOUZA, W.; UEDA-NAKAMURA, T. In vitro activity of essential oil from *Ocimum gratissimum* L. against four *Candida* species. **Res. Microbiol.**, Amsterdam, v. 155, p. 579-586, 2004.

NAKAMURA, C. V.; SANTOS, A. O.; VENDRAMETTO, M. C.; LUIZE, P. S.; DIAS-FILHO, B. P.; CORTEZ, D. A. G.; UEDA-NAKAMURA, T. Atividade antileishmania do extrato hidroalcoólico e de frações obtidas de folhas de *Piper regnellii* (Miq.) C. DC. var. *pallescens* (C. DC.) Yunck. **Rev. Bras. Farmacogn.**, São Paulo, v. 16, p. 61-66, 2006.

NATERA, S.; MACHUCA, C.; PADRÓN-NIEVES, M.; ROMERO, A.; DÍAZ, E.; PONTE-SUCRE, A. *Leishmania spp.*: proficiency of drug-resistant parasites. **Int. J. Antimicrob. Agents.**, Amsterdam, v. 29, p. 637-642, 2007.

NATHWANI, D. Tigecycline: clinical evidence and formulary positioning. **Int. J. Antimicrob. Agents**, Amsterdam, v. 25, p.185-192, 2005.

OKDAKOWSKA-JEDYNAK, U.; PACZEK, L.; KRAWCZYK, M.; ZIENIEWICZ, K.; NYCKOWSKI, P.; PAWIAK, J.; PATKOWSKI, W.; SKWAREK, A.; PACZKOWSKA, A. Resistance of Gram-Positive Pathogens to Antibiotic is a Therapeutic Challenge After Liver Transplantation: Clinical Experience in One Center With Linezolid. **Transplant Proc.**, v. 35, p. 2304-2306, 2003.

OKPEKON, T.; YOLOU, S.; GLEYE, C.; ROBLLOT, F.; LOISEAU, P.; BORIES, C.; GRELLIER, P.; FRAPPIER, F.; LAURENS, A.; HOCQUEMILLER, R. Antiparasitic activities of medicinal plants used in Ivory Coast. **J. Ethnopharmacol.**, Lausanne, v. 90, p. 91-97, 2003.

OLIVEIRA E. C. P.; LAMEIRA O. A.; ZOGHBI M. G. B. Identificação da época de coleta do óleo-resina de copaíba (*Copaifera spp.*) no município de Moju, PA. **Rev. Bras. Pl. Med.**, v. 3, p. 14-23, 2006.

PAIVA, L. A. F.; GURGEL, L. A.; CAMPOS, A. R.; SILVEIRA, E. R.; RAO, V. S. N. Attenuation of ischemia/reperfusion-induced intestinal injury by óleo-resin from *Copaifera langsdorffii* in rats. **Life Sci.**, Oxford, v. 75, p. 1979-1987, 2004a.

PAIVA, L. A. F.; GURGEL, L. A.; DE SOUZA, E. T.; SILVEIRA, E. R.; SILVA, R. M.; SANTOS, F. A.; RAO, V. S. N. Protective effect of *Copaifera langsdorffii* oil-resin against acetic acid-induced colitis in rats. **J. Ethnopharmacol.**, Lausanne, v. 93, p. 51-56, 2004b.

PARIS, C.; LOISEAU, P. M.; BORIES, C.; BRÉARD, J. Miltefosine induces apoptosis-like death in *Leishmania donovani* promastigotes. **Antimicrob. Agents Chemother.**, Washington, v. 48, no. 3, 2004.

PEDROSO, R. B.; UEDA-NAKAMURA, T.; DIAS-FILHO, B. P.; CORTEZ, D. A. G.; CORTEZ, L. E. R.; MORGADO-DÍAZ, J. A.; NAKAMURA, C. V. Biological activities of essential oil obtained from *Cymbopogon citratus* on *Crithidia deanei*. **Acta Protozool.**, Warszawa, v. 45, p. 231-240, 2006.

PESSINI, G. L.; DIAS-FILHO, B. P.; NAKAMURA, C. V.; CORTEZ, D. A. G. Antifungal Activity of the Extracts and Neolignans from *Piper regnellii* (Miq.) C. DC. var. *pallescens* (C. DC.) Yunck. **J. Braz. Chem. Soc**, São Paulo, v. 16, p. 1130-1133, 2005.

RATES, S. M. K. Plants as source of drugs. **Toxicol.**, Elmsford, v. 39, p. 603-316, 2001.

RODRIGUES, J. C. F.; ATTIAS, M.; RODRIGUEZ, C.; URBINA, J.A.; SOUZA, W. Ultrastructural and biochemical alterations induced by 22,26-azasterol, a $\Delta^{24(25)}$ -sterol

methyltransferase inhibitor, on promastigote and amastigote forms of *Leishmania amazonensis*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, Washington, v. 46, p. 487-499, 2002.

SANCHES, A. C. C.; LOPES, G. C.; NAKAMURA, C. V.; DIAS-FILHO, B. P.; PALAZZO DE MELLO, J. C. Antioxidant and antifungal activities of extracts and condensed tannins from *Stryphnodendron obovatum* Benth. **Rev. Bras. Ciênc. Farm.**, São Paulo, v. 41, p. 102-107, 2005.

SANTIN, M. R. **Atividade antileishmania in vitro do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* e do seu componente principal (citral)**. Dissertação (Mestrado)—Departamento de Farmácia e Farmacologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2007.

SANTORO, G. F.; CARDOSO, M. G.; GUIMARÃES, L. G. L.; FREIRE, J. M. Anti-proliferative effect of the essential oil of *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf (lemongrass) on intracellular amastigotes, bloodstream trypomastigotes and culture epimastigotes of *Trypanosoma cruzi* (Protozoa: Kinetoplastida). **Parasitology.**, London, v. 134, p. 1649-1656, 2007.

SERENO, D.; SILVA, A. C.; MATHIEU-DAUDE, F.; OUAISSI A. Advances and perspectives in *Leishmania* cell based drug-screening procedures. **Parasitol. Int.**, v. 56, no. 1, p. 3-7, 2007.

SILVEIRA, T. G. V.; TEODORO, U.; LONARDONI, M. V. C.; GUILHERME, A. L. F.; TOLEDO, M. J. O.; RAMOS, M.; ARRAES, S. M. A.; BERTOLINE, D.A.; SPINOZA, R. O.; BARBOSA, O. C. Aspectos epidemiológicos da leishmaniose tegumentar em área endêmica do Estado do Paraná, Brasil. **Cad. Saúde Pública.**, Rio de Janeiro, v. 12, n. 2, p. 141-147, abr./jun. 1996.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Florianópolis: Ed. da UFRGS: UFSC, 2004.

SOUZA-BRITO, A. R. M.; SOUZA BRITO, A. A. Forty years of Brazilian medicinal plant research. **J. Ethnopharmacol.**, Lausanne, v. 39, p. 53-67, 1993.

TANAKA, J. C. A.; DA SILVA, C. C.; DE OLIVEIRA, A. J. B.; NAKAMURA, C. V., DIAS-FILHO; B. P. Antibacterial activity of indole alkaloids from *Aspidosperma ramiflorum*. Antimicrobial activity of *A. ramiflorum*. **Braz. J. Méd. Biol. Res.**, São Paulo, v. 39, p. 387-391, 2006.

TINCUSI, B. M.; JIMÉNEZ, I. A.; BAZZOCCHI, I. L.; MOUJIR, L. M.; MAMANI, Z. A.; BARROSO, J. P.; RAVELO, A.G.; HERNÁNDEZ, B. V. Antimicrobial Terpenoids from the Oleoresin of the Peruvian Medicinal Plant *Copaifera paupera*. **Planta Med.**, Stuttgart, v. 68, p. 808-812, 2002.

TIUMAN, T. S.; UEDA-NAKAMURA, T.; CORTEZ, D. A. G.; DIAS FILHO, B. P.; MORGADO-DÍAZ, J. A.; SOUZA, W.; NAKAMURA, C. V. Antileishmanial activity of

parthenolide, a sesquiterpene lactone isolated from *Tanacetum parthenium*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, Washington, v. 49, 176-182, 2005.

UEDA-NAKAMURA, T.; ATTÍAS, M.; SOUZA, W. Megasome biogenesis in *Leishmania amazonensis*: a morphometric and cytochemical study. **Parasitol. Res.**, Berlin, v. 87, p. 89-97, 2001.

UEDA-NAKAMURA, T.; MENDONÇA-FILHO, R. R.; MORGADO-DÍAZ, J. A.; MAZA, P. K.; DIAS-FILHO, B. P.; CORTEZ, D. A. G.; ALVIANO, D. S.; ROSA, M. S. S.; LOPES, A. H. C. S.; ALVIANO, C. S.; NAKAMURA, C. V. Antileishmanial activity of Eugenol-rich essential oil from *Ocimum gratissimum*. **Parasitol. Int.**, Amsterdam, v. 55, p. 99-105, 2006.

UEDA-NAKAMURA, T.; ATTÍAS, M.; DE SOUZA, W. Comparative analysis of megasomes in members of the *Leishmania mexicana* complex. **Res. Microbiol.**, Amsterdam, v. 158, p. 456-462, 2007.

VEIGA-JR, V. F.; PATITUCCI, M. L.; PINTO A. C. Controle de adulteração de óleos de copaíba por cromatografia gasosa de alta resolução. **Quím. Nova.**, São Paulo, v. 20, p. 612-615, 1997.

VEIGA-JR, V. F.; PINTO, A.C. The *Copaifera* L. Genus. **Quím. Nova.**, São Paulo, v. 25, p. 273-286, 2002.

VEIGA-JR, V. F.; ROSAS, E. C.; CARVALHO, M. V.; HENRIQUES, M. G. M. O.; PINTO, A. C. Chemical composition and anti-inflammatory activity of copaiba oils from *Copaifera cearensis* Huber ex Ducke, *Copaifera reticulata* Ducke and *Copaifera multijuga* Hayne-A comparative study. **J. Ethnopharmacol.**, Lausanne, v. 112, p. 248-254, 2007.

VEIGA-JR, V. F.; SILVA, J. R. A.; ZOGHBI, M. G. B.; PATITUCCI, M. L.; PINTO, A.C. Utilização de cromatografia gasosa de alta resolução na detecção de classes de terpenos em extratos brutos vegetais. **Quím. Nova.**, São Paulo, v. 18, p. 262-266, 1995.

VEIGA-JR, V. F.; ZUNINO, L.; CALIXTO, J. B.; PATITUCCI, M. L.; PINTO, A. C. Phytochemical and Antioedematogenic Studies of Commercial Copaiba Oils Available in Brazil. **Phytother. Res.**, London, v. 15, p. 476-480, 2001.

VEIGA-JR, V. F.; ZUNINO, L.; PATITUCCI, M. L.; PINTO, A. C.; CALIXTO, J. B. The Inhibition of Paw Oedema formation caused by the oil of *Copaifera multijuga* Hayne and its fractions. **J. Pharma. Pharmacol.**, London, v. 58, p. 1405-1410, 2006.

VENDRAMETTO, M. C. **Atividade antileishmania do eupomatenóide-5, substância isolada de folhas de *Piper regnellii* var. *pallescens***. Dissertação.(Mestrado)–Departamento de Farmácia e Farmacologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2006.

WALLER, R. F.; MCCONVILLE, M. J. Developmental changes in lysosome morphology and function *Leishmania* parasites. **Int. J. Parasitol.**, Oxford, v. 32, p. 1435-1445, 2002.

YUNES, R. A.; PEDROSA, R. C.; CECHINEL FILHO, V. Fármacos e Fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. **Quím. Nova.**, São Paulo, v. 24, p. 147-152, 2001.

ZETOLA, N.; FRANCIS, J. S.; NUERMBERGER, E. L.; BISHAI, W. R. Community-acquired meticillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an emerging threat. **Lancet. Infect. Dis.**, New York, v. 5, p. 275-286, 2005.

ANEXO 1

Antimicrobial activity of copaiba oils - Adriana O. Santos et al.

**Antimicrobial activity of Brazilian copaiba oils obtained from different species of
Copaifera genus**

**Adriana Oliveira dos Santos /++ , Tânia Ueda-Nakamura* , Benedito Prado Dias
Filho* , Valdir F. Veiga Junior** , Ângelo C. Pinto*** , Celso Vataru Nakamura*/+**

Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Universidade Estadual de Londrina; *
Laboratório de Microbiologia Aplicada aos Produtos Naturais e Sintéticos, Universidade
Estadual de Maringá, Av. Colombo 5790, 87020-900 Maringá, PR, Brasil. ** Departamento
de Química, Universidade Federal do Amazonas, Av. Gal. Rodrigo Octávio Jordão Ramos,
3000, Japiim, 69077-000, Manaus, AM, Brasil. *** Instituto de Química – Universidade
Federal do Rio de Janeiro, Ilha do Fundão, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

Antimicrobial activity of copaiba oils was tested against Gram-positive and Gram-negative bacteria, yeasts, and dermatophytes. Oils obtained from *Copaifera martii*, *C. officinalis*, and *C. reticulata* (collected in the State of Acre) were more active against Gram-positive species (*Staphylococcus aureus*, methicillin-resistant *S. aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus subtilis*, and *Enterococcus faecalis*) with MICs = 31.3 – 62.5 µg/ml. The oils showed bactericidal activity, decreasing the viability of these Gram-positive bacteria within 3 h. Moderate activity was observed against dermatophyte fungi (*Trichophyton rubrum* and *Microsporum canis*). The oils showed no activity against Gram-negative bacteria and yeasts. Scanning electron microscopy of *S. aureus* treated with resin oil from *C. martii* revealed lysing of the bacteria, forming cellular agglomerates. Transmission electron microscopy revealed disruption and damage to the cell wall, resulting in the release of cytoplasmic compounds, alterations in morphology, and decrease in cell volume, indicating that copaiba oil may affect the cell wall.

Keywords: Copaiba oil; yeast, dermatophyte, bacteria, *Copaifera*; Leguminosae

The bacteria responsible for severe post-surgery infections are predominantly Gram-positive (Okdakowska-Jedynak et al. 2003). *Staphylococcus aureus* is the major cause of community- and hospital-acquired infections. It is responsible for skin or soft-tissue infections, urinary tract infections, gastrointestinal abscesses, peritonitis, lower respiratory tract infections, osteomyelitis, tropical myositis, endocarditis, and bacteremia (Fung et al. 2001). *S. aureus* has a formidable ability to rapidly acquire resistance to any antibiotic. The multi-resistance of Gram-positive bacteria to antimicrobial agents is increasing at a alarming rate for many commonly prescribed classes of antimicrobial agents, including the penicillinase-resistant penicillins, other β -lactams, fluoroquinolones, and macrolides (Zetola et al. 2005). The increasing resistance of bacteria to conventional antibiotics has encouraged intensive efforts to develop new antimicrobial agents that are effective against resistant bacteria. Plants provide great chemical diversity and bioactivity, which has led to the development of hundreds of pharmaceutical drugs (Shu 1998).

Copaiba oils are produced by exudation from the trunks of trees belonging to the genus *Copaifera*. The exuded material is a transparent, yellow to light-brown liquid (Veiga-Junior and Pinto 2002). The medicinal properties of copaiba oils were known among American Indians, who probably observed that animals rubbed themselves on copaiba tree trunks to heal their wounds (Veiga-Junior et al. 2001). The effects attributed to copaiba oils in folk medicine are anti-inflammatory, antitetanus, antitumour, antibleorrhagea, and urinary antiseptic. In addition, it is used to treat bronchitis, skin diseases, ulcers, and syphilis, as well as for healing wounds (Gomes et al. 2007). Pharmacological studies have demonstrated its properties as an anti-inflammatory, gastroprotective, analgesic, wound-cicatrisation (Paiva et al. 2004a,b; Araújo-Junior et al. 2005; Brito et al. 2005; Carvalho et al. 2005; Veiga-Junior et al. 2006; Veiga-Junior et al. 2007); antinociceptive (Gomes et al. 2007); antitumour (Lima et

al. 2003); insect repellent (Gilbert et al. 1999); and antimicrobial (Costa-Lotufo et al. 2002; Tincusi et al. 2002). The cosmetic industry uses copaiba oils in shampoos, capillary lotions, and bathing foams. Previous studies have demonstrated that the oleoresin did not show cytotoxicity to mammal cells, induce behavioural alterations, or cause lesions or bleeding in stomachs of mice (Veiga-Junior et al. 2007; Gomes et al. 2007).

Many of these studies were performed with commercial oils, without botanical identification. Oils from more than 20 species of *Copaifera* are used in folk medicine in Brazil, and significant differences of chemical composition occur among them (Veiga-Junior et al. 2007). Here, we report the antimicrobial activity of oils from 8 species of this genus: *C. multijuga*, *C. martii*, *C. cearensis*, *C. paupera*, *C. langsdorffii*, *C. officinalis*, and *C. lucens*, *C. reticulata*, collected in the states of Acre and Pará.

MATERIALS AND METHODS

Plant material

The copaiba oils are exuded directly from the trunks of the trees. *Copaifera multijuga* Hayne was collected at Manaus, Amazonas (INPA 82.418); *C. officinalis* Jacq. was collected at Boa Vista, Rondonia (INPA 191.211); *C. reticulata* Ducke was collected at Belém, Pará (INPA 61.212); specimens of all three were deposited in the Herbarium of INPA (Manaus). *C. reticulata* Ducke was collected at Tarauacá, Acre (RB 359.606); *C. lucens* was collected in Rio de Janeiro, state of Rio de Janeiro (RB 348.717); *C. langsdorffii* Desf. was collected at Campinas, São Paulo (RB 344.931); *C. paupera* Dwyer was collected at Tarauacá, Acre (RB 359.599); specimens of these four species were deposited in the Herbarium of the Botanical Garden in Rio de Janeiro. *C. martii* was collected at Tapará, Pará (DC 349) and the sample was deposited in the Herbarium Chico Mendes (Rio de Janeiro). *C. cearensis* Huber was collected in Minas Gerais (SP 55.425) and the sample was deposited in the Herbarium of the Instituto de Botânica da Universidade de São Paulo.

Microorganisms

The test organisms included Gram-positive bacteria: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus subtilis* ATCC 6623, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) ATCC 33591, and *Enterococcus faecalis* ATCC 29212; and Gram-negative bacteria: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Proteus mirabilis* ATCC 25933, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Shigella flexnerii* ATCC 12022, and *Enterobacter cloacae* ATCC 13047. Bacteria were grown in Mueller-Hinton broth (Difco Becton Dickinson Co., Sparks, Maryland, USA) at 37 °C for 24 h and maintained on slopes of nutrient agar (Difco). The yeasts *Candida albicans* ATCC

10231, *Candida tropicalis* ATCC 28707, and *Candida parapsilosis* ATCC 22019 were stored in water suspensions at room temperature and subcultured in Sabouraud-dextrose broth before being used in each test. The filamentous fungi *Trichophyton rubrum* ATCC 28189, *Trichophyton mentagrophytes* ATCC 4481, *Microsporum canis* ATCC 32903, and *Microsporum gypseum* ATCC 14683 were subcultured every 15 days to prevent pleomorphic transformations. The yeasts and dermatophyte fungi were grown on Sabouraud-dextrose agar (Merck SA, São Paulo, Brazil) at 37 °C or 28 °C, respectively. All standard microorganisms were kindly provided by the Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil.

Antimicrobial susceptibility testing

Antibacterial assay

The minimum inhibitory concentrations (MIC) of copaiba oils and reference antibiotics (tetracycline, vancomycin, penicillin, and oxacillin from Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri, USA) were determined by microdilution techniques in Mueller-Hinton broth (Difco) for Gram-positive and Gram-negative bacteria (CLSI, 2005a). The assay was carried out in 96-well microtitre plates. Each oil was mixed with an inoculum prepared in the same medium at a density adjusted to tube 0.5 of the McFarland scale (10^8 bacterial cells) and diluted 1:10 for the broth microdilution procedure. Microtitre trays were incubated at 37 °C and the MICs were recorded after 24 h of incubation. The minimum inhibitory concentration was defined as the lowest concentration of compounds that produced 80% reduction in visible growth compared with the control. The minimum bactericidal concentration (MBC) was defined as the lowest concentration yielding negative subcultures or only one colony, when subcultured in Mueller-Hinton Agar (MHA) without test compound. These tests were performed in duplicate on separate occasions.

Antifungal assay

The antifungal assay was performed by microdilution techniques in sterile flat-bottom microplates (CLSI, 2005b,c). The MICs of copaiba oils and reference drugs (nystatin, fluconazole, and amphotericin B) were determined by microdilution techniques in RPMI 1640 (Sigma Chemical Co., Missouri, USA) and approximately 10^4 spores or 10^5 yeasts were inoculated in a total volume of 100 μ l. The plates were incubated at 28 °C for 48 h for yeasts and 72 h for dermatophytes. MIC was defined as the lowest concentration of oil at which the microorganism tested did not show visible growth. Each experiment was performed twice on different occasions.

Time-kill curve methodology

The antibacterial activity of *C. martii* against *S. aureus* and methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) was studied over a range of multiples of MIC (62.5 μ g/ml), from 0.12 to 2.0 X MIC. Tests were performed in triplicate and incubated at 37 °C. At predetermined time points (0, 3, 6, 9, 12, 24, 48 h) a 100 μ l sample was removed from each test suspension, serially diluted in sterile saline, and plated on Mueller-Hinton agar plates for colony count determination. Data from triplicate runs were averaged and plotted as log CFU/ml versus time (h) for each time point (CLSI, 2005a).

Morphological and ultrastructural analysis

Scanning electron microscopy

Staphylococcus aureus treated with *C. martii* (31.5 and 50 μ g/ml) was collected by centrifugation after 3 h incubation at 37 °C, washed in PBS, and fixed with 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M sodium cacodylate buffer containing 1.0 mM CaCl_2 . After fixation,

small drops of the sample were placed on a specimen support with poly-L-lysine. Subsequently, the samples were dehydrated in graded ethanol, critical-point dried in CO₂, coated with gold and observed in a Shimadzu SS-550 scanning electron microscope.

Transmission electron microscopy

The bacterium *S. aureus* collected from the exponential phase was cultured with *C. martii* (31.5 and 50 µg/ml) for 3 h at 37 °C, washed in PBS, and fixed with 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M sodium cacodylate buffer containing 1.0 mM CaCl₂. Cells were then washed with 0.1 M sodium cacodylate buffer and postfixed for 1 h at room temperature in 1% osmium tetroxide plus 0.8% potassium ferrocyanide and 5 mM calcium chloride. After rinsing, cells were dehydrated in acetone and embedded in Epon[®] resin. Ultrathin sections obtained in a Reichert Ultracut E ultramicrotome were stained with uranyl acetate and lead citrate, and observed in a Zeiss CEM-900 electron microscope.

RESULTS

Antimicrobial susceptibility

The activity of the copaiba oils against Gram-positive bacteria using the microdilution technique is reported in Table 1. The *in vitro* antimicrobial activity was classified according to MIC values as follows: MIC < 100 µg/ml, good; 100 < MIC < 500 µg/ml, moderate; 500 < MIC < 1000 µg/ml, weak; MIC > 1000, inactive. Copaiba oils obtained from *C. martii*, *C. officinalis* and *C. reticulata* (collected in Acre) exhibited good antibacterial activity against Gram-positive bacteria, including MRSA, with a MIC range of 62.5 – 125 µg/ml. In contrast, all oils tested were inactive against Gram-negative bacteria. Results of antifungal activity showed that oils from *C. paupera* and *C. lucens* exhibited moderate activity against *T. rubrum* and *M. canis*, and those from *C. cearensis*, *C. langsdorffii* and *C. multijuga* showed moderate activity only against *T. rubrum* (MIC = 250 - 500 µg/ml). Copaiba oils were inactive against *T. mentagrophytes*, *M. gypseum* or yeasts. The solvent DMSO and the Petrolatum oil (NUJOL), used as an indifferent oil, showed no effect on the growth of microorganisms (data not shown). The MICs of the reference drugs used in this study (tetracycline, vancomycin, penicillin, oxacillin, nystatin, fluconazole, and amphotericin B) were similar to those reported elsewhere. The times needed by the copaiba oil from *C. martii* to kill *S. aureus* are shown in Fig. 1. Analysis of the time-kill curves showed that after 3 h of treatment with copaiba oil at 2.0 X MIC, no viable cells remained. Furthermore, a steep decline in CFU/ml was observed after 6 h exposure when treated with 1.0 X MIC treatment. The concentration 0.5 X MIC showed a bacteriostatic effect and a regrowth after 9 h of treatment. Concentrations = 0.25 and 0.12 X MIC did not show activity. The time-kill curve of the same oil against MRSA was similar to Fig. 1.

Effect of copaiba oil from C. martii on the morphology and ultrastructure of S. aureus

Scanning and transmission electron microscopy analyses of untreated and treated *S. aureus* were performed in order to determine morphological and ultra-structural changes caused by at sub-inhibitory concentrations (31.5 and 50 $\mu\text{g/ml}$) *C. martii* oil for 3 h (Figs. 2 and 3). In scanning electron microscopy, untreated *S. aureus* appeared to have a regular, smooth surface, spherical, and in grape-like clusters (Fig. 2A). Bacteria treated with sub-inhibitory concentrations of the copaiba oil at 31.5 (Fig. 2B) and 50 $\mu\text{g/ml}$ (Fig. 2C, D) during 3 h, showed lysed, and agglomerated cells. These morphological features in bacterial cells may be due to the action on the cell wall followed by loss of cell volume. These data were confirmed by transmission electron microscopy (Fig. 2F). Control cells demonstrated their structural integrity with a thicker cell wall (Fig. 2E, 3A, and 3B). In addition, transmission electron microscopy analyses of *S. aureus* treated with oil from *C. martii* showed the cell wall being disrupted and damaged, resulting in a release of cytoplasmatic compounds (Fig. 3C), loss of cell walls (Fig. 3D), alterations in morphology, and decrease in cell volume (Fig. 3E, F, G, and H).

DISCUSSION

There are more than 20 species of *Copaifera* genus in Brazil which they provide oils differ significantly in chemical composition. The main constituents of these oils are sesquiterpenes and diterpenes (Braga et al. 1998; Veiga-Júnior et al. 2001). Although different activities have been reported and a variety of substances have been identified, little is known about the relationship between the structures and activity of the components (Tincusi et al. 2002). Sesquiterpenes comprise about 80% of the oils; the most common are α -copaene, β -cariofilene, β -bisabolene, α and β -selinene, α -humulene, and δ and γ -cadinene (Veiga-Júnior and Pinto 2002). The present study was designed to evaluate the antimicrobial activities of copaiba oils obtained from several species of *Copaifera*. Copaiba oils obtained from *C. martii*, *C. officinalis* and *C. reticulata* (collected in Acre) showed *in vitro* bactericidal activity against a wide spectrum of Gram-positive organisms. This spectrum includes MRSA, for which there are very few therapeutic alternatives (Samuelsen et al. 2005). Despite many recent advances in antimicrobial therapy, resistance among Gram-positive pathogens continues to pose a serious and growing clinical problem. Increasing resistance has created a need for new antimicrobial agents. The major compounds of *C. martii*, *C. officinalis*, and *C. reticulata* (Acre) are 3- α -hydroxy-copalic acid, hardwickiic acid, and α -copaene, respectively (Veiga-Junior and Pinto 2002; Oliveira et al. 2006).

Variation in chemical composition is common among different species and even among individual trees (Cascon and Gilbert 2000). For example, resin oils from *C. reticulata* collected in Acre and Pará showed differences in activity against bacteria because of differences of chemical composition.

Were considered in the present study prokaryotes (bacteria) and eukaryotes (yeasts and dermatophytes). Copaiba oils showed good activity only against Gram-positive bacteria,

and moderate activity against dermatophytes. *B. subtilis* was the most sensitive organism. Interestingly enough, copaiba oils were active not only against a wild strain of *S. aureus*, but also against MRSA. Morphological and ultrastructural alterations of the bacterium treated with copaiba oils for 3 h, were revealed by scanning and transmission electron microscopy. Cell wall disruption, release of cytoplasmic compounds, and decrease in the cellular volume were observed, indicating that the copaiba oil *from C. martii* might affect the cell wall. Additionally, in the time-kill curve, copaiba oils showed good and rapid bactericidal activity within 3 h. The observations from electron microscopy seemed to be well correlated with the effects observed in the time-kill experiment.

In conclusion, the results of the present study suggest that copaiba oils may be potential sources of new and selective agents for the treatment of important infectious diseases. Further laboratory and clinical studies of these oils are required in order to understand their antibacterial principles.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Dr. José Andrés Morgado-Díaz, INCa – Rio de Janeiro, for performing the transmission electron microscopy.

REFERENCES

- Araújo-Junior FA, Braz MN, Rocha-Neto OG, D'Almeida Costa F, Brito MVH 2005. Copaíba oil effect in rats aminotransferases submitted to hepatic ischemic and reperfusion with and without preconditioning. *Acta Cirurgica Brasileira* 20: 93-99.
- Braga WF, Rezende CM, Antunes OAC, Pinto AC 1998. Terpenoids from *Copaiba cearensis*. *Phytochemistry* 49: 263-264.
- Brito MVH, Moreira RJ, Tavares MLC, Carballo MCS, Carneiro TX, Santos AAS 2005. Copaíba oil effect on urea and creatinine serum levels in rats submitted to kidney ischemia and reperfusion syndrome. *Acta Cirurgica Brasileira* 20: 243-246.
- Carvalho JCT, Cascon V, Possebon LS, Morimoto MSS, Cardoso LGV, Kaplan MAC, Gilbert B 2005. Topical antiinflammatory and analgesic activities of *Copaifera duckei* Dwyer. *Phytotherapy Research* 19: 946-950.
- Cascon V, Gilbert B 2000. Characterization of the chemical composition of oleoresins of *Copaifera guianensis* Desf., *Copaifera duckei* Dwyer and *Copaifera multijuga* Hayne. *Phytochemistry* 55: 773-778.
- CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute 2005a. Approved standard M7-A6. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically, Pennsylvania, US.
- CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute 2005b. Approved standard M27-A2. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts, Pennsylvania, US.
- CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute 2005c. Approved standard M38-A. Reference Method for Broth Microdilution Test for Screening of Filamentous Fungi Pennsylvania, US.

- Costa-Lotufo LV, Cunha GMA, Farias PAM, Viana GSB, Cunha KMA, Pessoa C, Moraes MO, Silveira ER, Gramosa NV, Rao VSN 2002. The cytotoxic and embryotoxic effects of kaurenoic acid, a diterpene isolated from *Copaifera langsdorffii* oleo-resin. *Toxicon* 40: 1231-1234.
- Fung HB, Kirschenbaum HL, Ojofeitimi BO 2001. Linezolid: An oxazolidinone antimicrobial agent. *Clinical Therapeutics* 23: 356-391.
- Gilbert B, Teixeira DF, Carvalho ES, De Paula AE, Pereira JF, Ferreira JL, Almeida MB, Machado Rda S, Cascon V 1999. Activities of the Pharmaceutical Technology Institute of the Oswaldo Cruz Foundation with medicinal, insecticidal and insect repellent plants. *Academia Brasileira de Ciências* 71: 265-271.
- Gomes NM, Rezende CM, Fontes SP, Matheus ME, Fernandes PD 2007. Antinociceptive activity of Amazonian Copaiba oils. *Journal of Ethnopharmacology* 12: 486-492.
- Lima SRM, Veiga-Jr VF, Christo HB, Pinto AC, Fernandes PD 2003. In vivo and in vitro Studies on the Anticancer Activity of *Copaifera multijuga* Hayne and its fractions. *Phytotherapy Research* 17: 1048-1053.
- Okdakowska-Jedynak U, Paczek L, Krawczyk M, Zieniewicz K, Nyckowski P, Pawiak J, Patkowski W, Skwarek A, Paczkowska A 2003. Resistance of Gram-positive pathogens to antibiotic is a therapeutic challenge after liver transplantation: clinical experience in one center with linezolid. *Transplantation Proceedings* 35: 2304-2306.
- Oliveira ECP, Lameira OA, Zoghbi MGB 2006. Identificação da época de coleta do óleo-resina de copaíba (*Copaifera spp.*) no município de Moju, PA. *Rev. Bras. Pl. Med.* 3: 14-23.
- Paiva LAF, Gurgel LA, Campos AR, Silveira ER, Rao VSN 2004a. Attenuation of ischemia/reperfusion-induced intestinal injury by oleo-resin from *Copaifera langsdorffii* in rats. *Life Sciences* 75: 1979-1987.

- Paiva LAF, Gurgel LA, De Souza ET, Silveira ER, Silva RM, Santos FA, Rao VSN 2004b. Protective effect of *Copaifera langsdorffii* oleo-resin against acetic acid-induced colitis in rats. *Journal of Ethnopharmacology* 93: 51-56.
- Samuelson O, Haukland HH, Kahl BC, von Eiff C, Proctor RA, Ulvatne H, Sandvik K, Vorland LH 2005. *Staphylococcus aureus* small colony variants are resistant to the antimicrobial peptide lactoferrin B. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 56: 1126-1129.
- Shu Y 1998. Recent natural products based drug development: a pharmaceutical industry perspective. *Journal of Natural Products* 61: 1053-1071.
- Tincusi BM, Jiménez IA, Bazzocchi IL, Moujir LM, Mamani ZA, Barroso JP, Ravelo AG, Hernández BV 2002. Antimicrobial terpenoids from the oleoresin of the peruvian medicinal plant *Copaifera paupera*. *Planta Medica* 68: 808-812.
- Veiga-Junior VF, Zunino L, Calixto JB, Patitucci ML, Pinto AC 2001. Phytochemical and antioedematogenic studies of commercial copaiba oils available in Brazil. *Phytotherapy Research* 15: 476-480.
- Veiga-Junior VF, Pinto AC 2002. The *Copaifera* L. Genus. *Química Nova* 25: 273-286.
- Veiga-Júnior VF, Rosas EC, Carvalho MV, Henriques MGMO, Pinto AC 2007. Chemical composition and anti-inflammatory activity of copaiba oils from *Copaifera cearensis* Huber ex Ducke, *Copaifera reticulata* Ducke and *Copaifera multijuga* Hayne-A comparative study. *Journal of Ethnopharmacology* 112: 248-254.
- Veiga-Júnior VF, Zunino L, Patitucci ML, Pinto AC, Calixto JB 2006. The inhibition of paw oedema formation caused by the oil of *Copaifera multijuga* Hayne and its fractions. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 58: 1405-1410.

Zetola N, Francis JS, Nuermberger EL, Bishai WR 2005. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an emerging threat. *Lancet Infectious Diseases* 5: 275-286.

Table I. Antimicrobial activity (MIC/MBC in µg/ml) of copaiba oil obtained from several species of *Copaifera* genus.

Oils/Ref antibiotic	<i>S. aureus</i>	<i>MRSA</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>E. faecalis</i>
<i>C. reticulata</i> (Pará)	>1000/nt	1000/1000	250/250	1000/>1000	250/1000
<i>C. reticulata</i> (Acre)	62.5/62.5	125/250	31.25/31.25	62.5/62.5	62.5/62.5
<i>C. martii</i>	62.5/62.5	62.5/125	15.62/31.25	62.5/62.5	62.5/62.5
<i>C. cearensis</i>	250/1000	125/500	62.5/125	250/500	500/1000
<i>C. paupera</i>	250/1000	250/500	62.5/62.5	1000/1000	62.5/500
<i>C. langsdorfii</i>	>1000/nt	>1000/nt	62.5/62.5	>1000/nt	>1000/nd
<i>C. officinalis</i>	62.5/62.5	125/250	31.25/31.25	31.25/31.25	31.25/62.5
<i>C. multijuga</i>	500/1000	125/250	125/125	1000/>1000	250/500
<i>C. lucens</i>	125/500	>1000/nt	125/250	250/1000	1000/1000
Penicillin	0.075/nt	nt	nt	10.0/nt	0.15
Vancomycin	nt	nt	0.78/nt	nt	nt
Oxacyline	nt	>500/nt	nt	nt	nt

MIC = Minimal inhibitory concentration
MBC = Minimal bactericidal concentration
nt= not tested

Legends for figures

Fig. 1. Time-kill curve of *Staphylococcus aureus* treated with copaiba oil obtained from *Copaifera martii* ◆ control; ▲ 0.12 MIC; ■ 0.25 MIC; ● 0.5 MIC; ○ 1.0 MIC; □ 2.0 MIC

Fig. 2. Scanning electron microscopy and Transmission electron microscopy of *Staphylococcus aureus* treated with copaiba oil obtained from *Copaifera martii* for 3 h at 37 °C. **A** and **E** Control; **B** and **F** 31.5 µg/ml treated; **C** and **D** 50 µg/ml treated. bars = 1 µm

Fig. 3. Transmission electron microscopy of *Staphylococcus aureus* treated with copaiba oil obtained from *Copaifera martii* for 3 h at 37 °C. **A** and **B** Control; **C**, **E**, **F**, **G** and **H** 31.5 µg/ml treated; **D** 50 µg/ml treated. bars **A**, **C**, **E**, **F** = 1 µm; **B** and **D** = 0.1 µm

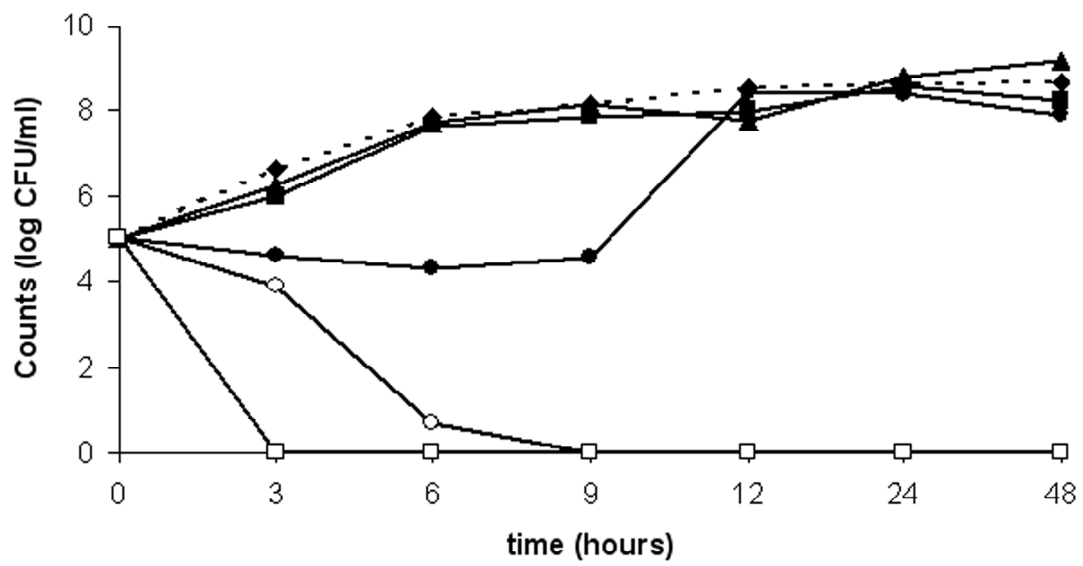


Figure 1

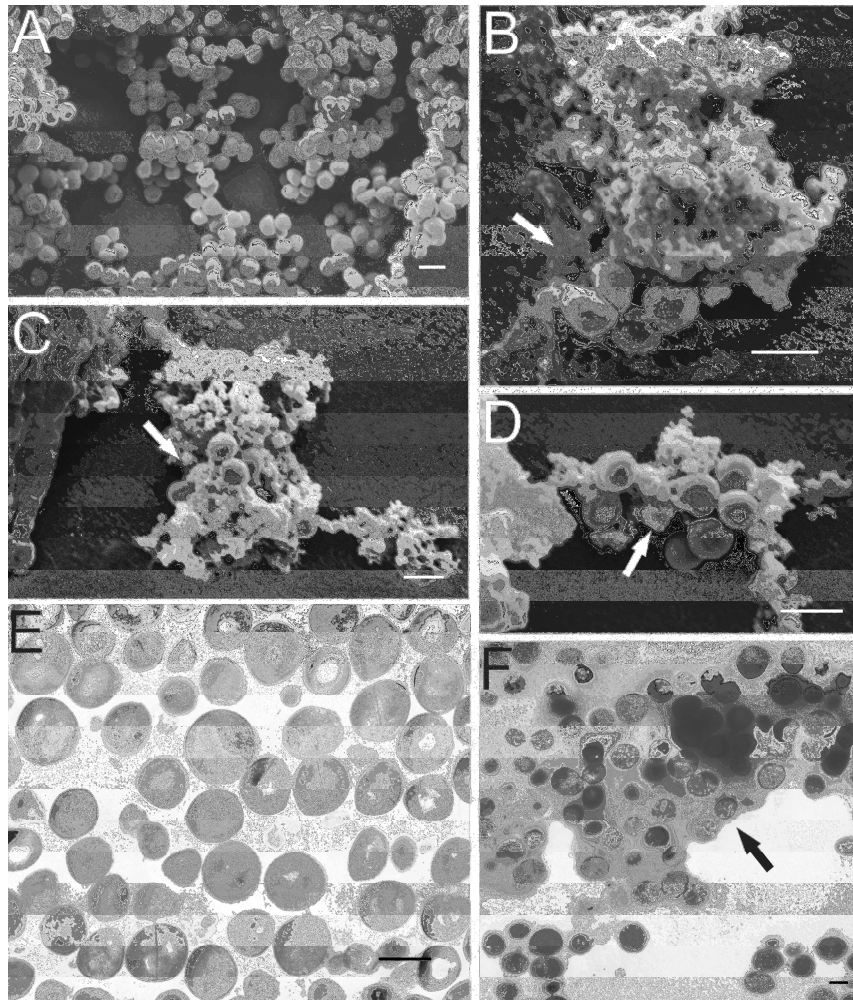


Figure 2

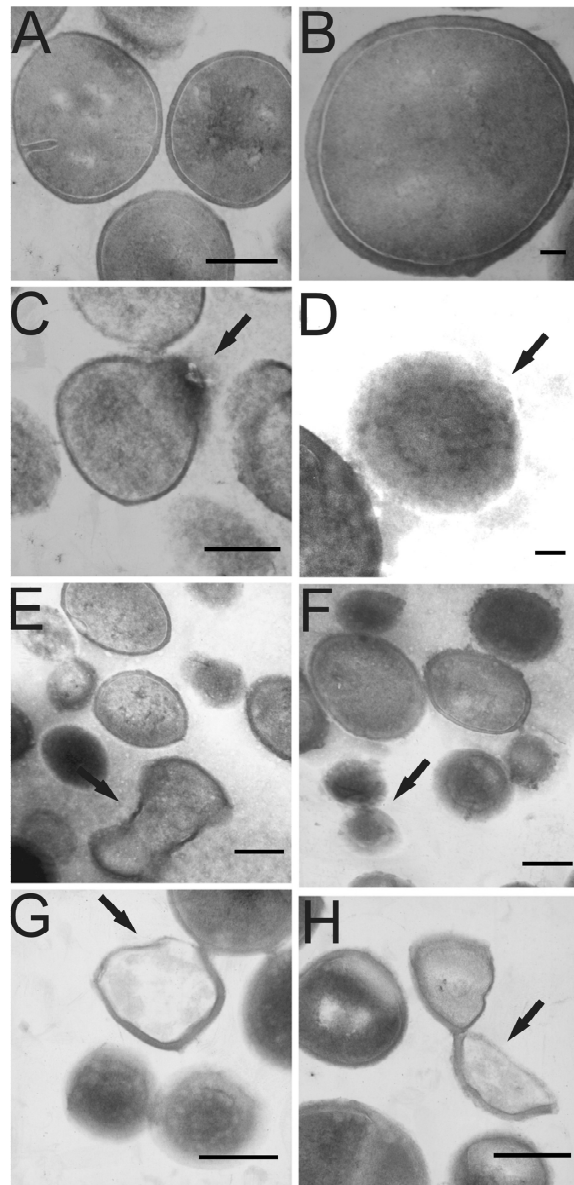


Figure 3

ANEXO 2**Effect of Brazilian copaiba oils on *Leishmania amazonensis***

Adriana O. Santos^a; Tânia Ueda-Nakamura^b; Benedito P. Dias Filho^{ab}; Valdir F. Veiga Junior^{cd}; Angelo C. Pinto^d; Celso Vataru Nakamura^{ab*}

^a Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Universidade Estadual de Londrina.

^b Departamento de Análises Clínicas, Universidade Estadual de Maringá.

^c Departamento de Química, Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal do Amazonas.

^d Instituto de Química – Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Corresponding author:

Tel: +55 44 3261-4863; Fax: +55 44 3261-4860; e-mail: cvnakamura@uem.br

Abstract. Leishmaniasis is an important public-health problem in Latin America. It is estimated that at least 15-20 million people are infected, with 2 million new cases each year. Re-emerging infectious diseases and the resistance of many pathogens to currently used drugs are widely recognised as being of serious and immediate concern. There is an urgent need for better drugs against *Leishmania* spp. Plants are clearly a potential source of new antiprotozoal drugs. In the present study, copaiba oils from different species of *Copaifera* were screened for their activity against *Leishmania amazonensis*. Copaiba oils showed variable levels of activity against promastigote forms of *L. amazonensis* with IC₅₀ values in the range between 5 and 22 µg/mL. The most active oil was that from *C. reticulata* (collected in Pará State, Brazil) with IC₅₀ values of 5, 15, and 20 µg/mL for promastigote, axenic amastigote and intracellular amastigote forms of *L. amazonensis*, respectively. Cytotoxicity assay showed that this copaiba oil obtained from *C. reticulata* showed low cytotoxicity against J774G8 macrophages. Based on the results of the current study, copaiba oils appear to be a future alternative treatment for leishmaniasis. These promising results will be followed up by *in vivo* testing.

Keywords: *Copaifera*, copaiba oil, *Leishmania amazonensis*, antileishmanial activity.

1 Introduction

Plants provide a potential alternative source of therapeutic agents in the search for new and selective agents for the treatment of tropical diseases caused by protozoa (Tiuman et al., 2005; Izumi et al., 2008; Estevez et al., 2007; Osório et al., 2007; Patrício et al., 2008).

Brazil is well known for the exuberance and variety of its tropical plants. Many of these plants are used as natural medicines by the native population, including to treat infectious diseases. The value of searching for medicinal agents from plants based on documented history of folk use has already been demonstrated (Souza Brito et al., 1993; Alves et al., 2000).

Plants of the *Copaifera* L. genus (Fabaceae-Caesalpinioideae), popularly known as “copaiba”, are large trees that grow in the states of Amazonas, Pará, and Ceará in northern Brazil (Paiva et al., 2004a). The exuded material from these trees, traditionally obtained by tapping the trunk of the tree (Veiga Junior and Pinto, 2002) is called copaiba oil, a transparent liquid whose color varies from yellow to light brown (Braga et al., 2000; Veiga Junior et al., 2001). The main constituents of these oils are sesquiterpenes and diterpenes (Patitucci et al., 1995).

Indians from the North and Northeast of Brazil have been using copaiba oil since the 19th Century (Lima et al., 2003). The medicinal properties of copaiba oils were probably known through the observations of the animals rubbed themselves on copaiba tree trunks to heal their wounds (Veiga Junior et al., 2001). Even today, copaiba balsam is one of the most-used medicines in the Brazilian Amazon (Veiga Junior et al., 2007).

Copaiba oil has been used in folk medicine as an anti-inflammatory, antitumour, antiblenorrhagea, and urinary antiseptic, as well as to treat bronchitis, skin diseases, ulcers, and syphilis. It is also valued for its properties for healing wounds, gastroprotective,

analgesic, wound-cicatrisation, antinociceptive, insect repellent, and antimicrobial (Gilbert et al., 1999; Tincusi et al., 2002; Lima et al., 2003; Paiva et al., 2004 a,b; Araújo-Junior et al., 2005; Brito et al., 2005; Carvalho et al., 2005; Veiga Junior et al., 2006; Gomes et al., 2007). Copaiba oil is also used in the cosmetic industry in capillary lotions, shampoos, soaps, creams, and bathing foams (Veiga Junior et al., 2001). The use of copaiba oils to treat leishmaniasis is cited in several ethnopharmacological studies with data obtained from the Western, at Peru (Kvist et al., 2006), Eastern, at the Maranhão State of Brazil (Moreira et al., 2002), and Northern Amazonia, at French Guiana (Fleury, 1997; Grenand and Moretti, 1987).

Leishmania is a protozoan parasite responsible for several pathologies collectively known as leishmaniasis, an important public-health problem in Latin America (Sereno et al., 2007). It is estimated that 2 million new cases occur each year, with at least 15-20 million infected people. (WHO, 2008). The pathology is manifested in visceral, mucocutaneous, or cutaneous forms (Paris et al., 2004).

There are no vaccines against leishmaniasis, and its treatment is dependent upon a limited range of drugs (Desjeux, 2004; Croft et al., 2006; Sereno et al., 2007). The drugs recommended for treatment include pentavalent antimonials, amphotericin B, lipid formulations of amphotericin B in the case of visceral leishmaniasis, and miltefosine, the only orally administered drug (Paris et al., 2004; Alnaim et al., 2007). All of these drugs are limited to some extent by their toxicity, lack of efficacy, requirement for hospitalisation, or cost (Davis et al., 2004; Croft et al., 2006; McConville and Handman, 2007).

The re-emerging infectious diseases and the resistance of many pathogens to currently used drugs are widely recognised as being of serious and immediate concern. There is an urgent need for better drugs against *Leishmania* spp. (Carvalho and Ferreira, 2001; Camacho et al., 2003; Leandro and Campino, 2003). Plants are clearly a potential source of new antiprotozoal drugs (Tiuman et al., 2005; Izumi et al., 2007; Estevez et al., 2007; Osorio et al.,

2007; Patrício et al., 2008). Studies to find new natural active compounds from traditional medicine are necessary.

In this context, copaiba oils were investigated, and it was found that oils from different *Copaifera* species collected in Brazil were active against promastigote and amastigote forms of *Leishmania amazonensis*.

2 Materials and methods

2.1 Plant material

Copaiba oils were collected from the trunks of the *Copaifera* trees. *Copaifera multijuga* Hayne was located at Manaus, Amazonas State; *C. officinalis* Jacq. was located at Boa Vista, Roraima State; and *C. reticulata* Ducke was located at Belém, Pará State. Specimens of all three plants were deposited in the Herbarium of the Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA-Manaus) under the numbers INPA 82,418; 61,212 and 61,212, respectively. Another *C. reticulata* Ducke had its copaiba oil collected, located at Tarauacá, Acre State (RB 359.606). *C. lucens* was collected in Rio de Janeiro (RB 348.717); *C. langsdorfii* Desf. was collected at Campinas, São Paulo (RB 344.931); and *C. paupera* Dwyer was collected at Tarauacá, Acre (RB 359.599). Specimens of these four species are deposited in the Herbarium of the Jardim Botânico do Rio de Janeiro (JBRJ-Rio de Janeiro). *C. martii* was collected at Tapará, Pará (DC 349), and the sample was deposited in the Herbarium Chico Mendes (Maricá, Rio de Janeiro). *C. cearensis* Huber was collected in Minas Gerais (SP 55.425), and the sample was deposited in the Herbarium of the Instituto de Botânica da Universidade of São Paulo (IB-USP).

2.2 Chromatographic analysis

High-resolution gas chromatography (HRGC) analyses of the copaiba oils were carried out with a Hewlett-Packard (HP) model 5890 instrument equipped with a flame ionisation detector (300 °C). Samples were esterified with freshly prepared diazomethane and injected using the split mode (1:20) with the injector temperature at 270 °C. High-resolution

gas chromatography-mass spectrometry (HRGC-MS) analyses were performed by using a Hewlett-Packard model 5880 (quadrupole analyser), operated in the electron impact mode (70 eV), coupled to a Hewlett-Packard model 5897A mass spectrometer. In both analyses, was used a SE-54 capillary glass column: 25 m × 0.25 mm i.d., film thickness 0.25 µm; high-purity hydrogen at 2 mL/min, and the oven temperature was programmed from 110 to 130 °C at 3 °C /min and (no hold) to 290 °C at 8.5 °C /min.

Retention indices (RI) were calculated using co-chromatographed standard linear alkanes. Sesquiterpene identifications were made by comparison with MS literature data, computer matching with the Wiley275 library, and by comparison of their RI values with those of pure standards, and confirmed with the aid of RI from published sources whenever necessary (Adams, 2007). Diterpenes were identified by comparing retention times and spectrometric data from the analysed samples with previously isolated standards (Braga et al., 2000).

2.3 Preparation of stock solution

Each 10 mg of copaiba oil of different species of *Copaifera* was solubilised in 100 µL dimethyl sulphoxide (DMSO), and then 900 µL of appropriate culture medium was added to obtain a final concentration of 10 mg/mL. The stock solutions were then diluted at different concentrations for the experiments, where the highest copaiba oil concentration used was 1,000 µg/mL. The final concentration of DMSO never exceeded 1.0% in the test media, a concentration which had no effect on growth of parasites or cells.

2.4 Parasites and cells

The *Leishmania amazonensis* MHOM/BR/75/Josefa strain used in the present study was isolated from a patient with diffuse cutaneous leishmaniasis by C. A. Cuba-Cuba (Universidade de Brasília, Brazil). Promastigotes were cultured at 25 °C in Warren's medium (brain heart infusion plus haemin and folic acid) pH 7.0, supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) (Gibco Invitrogen Corporation, New York, U.S.A.) in a tissue flask with weekly transfers. Axenic amastigote forms were obtained by in-vitro incubation of infective promastigotes (Ueda-Nakamura et al. 2001), at 32 °C in Schneider's insect medium (Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri, U.S.A), pH 4.6, with 20% FBS. J774G8 murine macrophages were maintained in tissue flasks with RPMI 1640 medium (Gibco Invitrogen Corporation, New York, U.S.A.) pH 7.6, with sodium bicarbonate and L-glutamine added, and supplemented with 10% FBS at 37 °C in a 5% CO₂ – air mixture.

2.5 Activity against promastigote and axenic amastigote forms

The assays were carried out in 24-well microtitre plates. Promastigotes from a 48-h-old logarithmic-phase culture were suspended to yield 10⁶ cells/mL and treated with copaiba oils from different *Copaifera* species. The oil concentrations used were 1, 10, 100, and 1,000 µg/mL. Control wells containing cultures without copaiba oil were also included. Plates were incubated at 25 °C for 72 h. The activity of the oils was evaluated by cell counting using a Neubauer haemocytometer. The 50% inhibitory concentration (IC₅₀) was determined.

Promastigote and axenic amastigote forms of *L. amazonensis* in the logarithmic growth phase (10⁶ parasites/mL) were treated with *C. reticulata* (collected in Pará). Copaiba oil assays were performed in 24-well microtitre plates and incubated at 25 °C. Activity of the

copaiba oil was evaluated by cell counting using a Neubauer haemocytometer, and the results are expressed as log number cells/ml after 24, 48, 72, and 96 h incubation periods.

2.6 Activity against intracellular amastigotes

BALB/c mice received 5% thioglycolate medium. After 72 h, resident peritoneal cells from the mice were harvested in RPMI 1640 medium (Gibco Invitrogen Corporation, New York, U.S.A.) pH 7.6. Cells were plated on coverslips (diameter 13 mm) in 24-well plates and allowed to adhere for 24 h at 37 °C in 5% CO₂ atmosphere. Next, macrophages were infected in multiples of 10 promastigotes per host cell and were incubated at 37 °C in 5% CO₂ atmosphere. After 24 hours, infected macrophages were treated with copaiba oil from *C. reticulata* (collected in Pará). The concentrations used were 10, 20, and 30 µg/mL. After 24 h, the monolayers were washed with PBS at 37 °C, fixed in methanol, and stained with Giemsa. The number of amastigotes was determined by counting at least 200 macrophages in duplicate cultures, and results were expressed as the survival index. The survival index was obtained by multiplying the percentage of infected macrophages by the number of amastigotes per infected macrophage.

2.7 Cytotoxicity assay

Adherent J774G8 macrophage cells at the logarithmic growth phase were suspended to yield 10⁵ cells/mL in RPMI 1640 medium supplemented with 10% FBS and added to each well in 96-well microtitre plates. The plates were incubated in a 5% CO₂-air mixture at 37 °C to obtain confluent cell growth. After 24 h, the medium was removed. The cells were treated with copaiba oils from *C. reticulata* (collected in Pará). The concentrations used were 1, 10,

100, and 1,000 $\mu\text{g/mL}$. Control wells without copaiba oil were included. The plates were incubated in a 5% CO_2 -air mixture at 37 $^\circ\text{C}$ for 48 h. The cultures were then fixed with 10% trichloroacetic acid for 1 h at 4 $^\circ\text{C}$, stained for 30 minutes with 0.4% sulforhodamine B (SRB) in 1% acetic acid and subsequently washed 5 times with deionised water. Bound SRB was solubilised with 200 μL 10 mM unbuffered Tris-base solution. Absorbance was read at 492 nm. Dose-response curves were plotted (values expressed as percentage of control optical density) and CC_{50} values (50% cytotoxicity concentration) were estimated by regression analysis.

2.8 Statistical analysis

All experiments were performed in duplicate. The means and standard deviations were determined from at least three experiments. Statistical analysis was performed with the program GraphPad Prism 4 (GraphPad Software, San Diego, California, U.S.A.). Student's t test was applied, and a p value less than 0.05 was regarded as significant.

3 Results and Discussion

In the present study, copaiba oils from different *Copaifera* species were screened for their activity against *L. amazonensis*. The *in-vitro* antiprotozoal activity and the main constituents of the oils are shown in Table 1. All copaiba oils showed some level of activity against the promastigote form of *L. amazonensis* with IC₅₀ values in the range between 5 and 22 µg/mL. Student's *t* test ($p < 0.05$) indicated significant differences between these oils compared to the control group.

The biological properties of *Copaifera* spp. are attributed to a group of sesquiterpenes and diterpenes (Fernandes et al., 2007), some of them occurring only in *Copaifera* spp. (Cascon and Gilbert, 2000). The main sesquiterpenes and diterpenes can be observed in Table 1. The most common sesquiterpenes are β-caryophyllene, α-copaene, zingiberene, β-bisabolene, and bergamotene. The main diterpenes are kaurenoic, hardwichiic, kovalenic, polyalthic, and copalic acid (this last is considered a characteristic diterpene of the genus *Copaifera*). The biological effect of copaiba oils may be explained by the complex nature of the sesquiterpene and diterpene mixture that might interfere with the active component by a synergistic effect, as suggested in a previous report that showed that fractionation of copaiba oils results in fractions that are less active than the crude copaiba oil (Lima et al., 2003).

The most active copaiba oil was that from *C. reticulata* (collected in Pará), showing an IC₅₀ value of 5 and 15 µg/mL for promastigote and axenic amastigote forms of *L. amazonensis* after 72 h of incubation, respectively (Figure 1A and 1B). All results were significant at $p \leq 0.05$ as compared to the control group, by Student's *t* test. The effect of the copaiba oil on intracellular amastigotes was observed during 24 h of incubation (Figure 2). *C. reticulata* (collected in Pará) demonstrated a strong effect against intracellular amastigotes, with an IC₅₀ value of 20 µg/mL. The internalisation index was calculated as 274 for 10

$\mu\text{g/mL}$, 222 for 20 $\mu\text{g/mL}$, and 201 for 30 $\mu\text{g/mL}$, which represents a decrease of 35.4%, 47.7%, and 52.6% respectively as compared to the control. Association indexes of copaiba oil-treated systems were significantly different from the association index of non-treated macrophages. Of our samples, *C. reticulata* copaiba oil is characterised by the great predominance of β -caryophyllene. The inhibitory effect of this oil on growth of *L. amazonensis* might be partially linked to the presence of this component since *C. multijuga* copaiba oil showed to be a higher amount of this sesquiterpene. β -caryophyllene has been mentioned in studies of several essential oils as an anti-inflammatory, anti-oedemic, local anaesthetic, antimicrobial, and anti-oxidant agent (Shimizu et al., 1990; Ghelardini et al., 2001; Sahin et al., 2004).

The cytotoxicity of copaiba oil from *C. reticulata* (collected in Pará) on J774G8 macrophage cells was compared with the activity against promastigotes and axenic amastigotes of *L. amazonensis*, by using the selective index (SI) (ratio: CC_{50} J774G8 cells/ IC_{50} protozoa). A value greater than 1 is considered to be more selective for the parasite. *C. reticulata* (collected in Pará) is more toxic to promastigotes (8 times) and amastigotes (2.5 times) than to J774G8 macrophages. Previous studies have demonstrated that the copaiba oil from *C. reticulata* did not alter the viability of peritoneal macrophages at a concentration of 500 $\mu\text{g/mL}$ (Veiga Junior et al., 2007). In addition, treatment with copaiba oil at 500 mg/kg from *C. reticulata* and *C. multijuga* did not induce behavioural alterations and caused no lesions or bleeding in stomachs of mice (Gomes et al., 2007).

Ethnopharmacological investigations of medicinal plants have great potential for the discovery of new agents to combat tropical infectious diseases. The biological activity of plant extracts has been attributed to compounds belonging to diverse chemical groups, such as isoquinoline alkaloids, indole alkaloids, quinones, and terpenes (Rates, 2001; Anthony *et al.*, 2005). Natural compounds have been identified for the treatment of leishmaniasis, and

research on plants and their metabolites can contribute to overcome the drug resistance of protozoan parasites.

4 Conclusion

In this study, 8 different kinds of Brazilian copaiba oils obtained from different species of *Copaifera* were screened for antileishmanial activity. All the oils showed variable levels of activity against *L. amazonensis*, with *C. reticulata* (collected in Pará) showing the strongest antileishmanial activity. Based on the results of the current study, copaiba oils appear to be a future alternative treatment for leishmaniasis. These promising results will be followed up by *in vivo* testing.

Acknowledgements

This study was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM), Capacitação e Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, (Capes), Fundação Araucária, and Programa de Pós-graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina.

References

- Adams, R.P., 2007. Identification of Essential Oil Components By Gas Chromatography/Mass Spectrometry, Allured, New York, 4th ed., 804p.
- Alnaim, L., Alsoud, N.A., Zaghoul, I., AL-Jaser, M., 2007. Effects of fluconazole on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of antimony in cutaneous leishmaniasis-infected hamsters. *International Journal of Antimicrobial Agents* 29, 728-732.
- Alves, T. M. A., Silva, A. F., Brandão, M., Grandi, T. S. M., Smânia, E. F. A., Smânia Júnior, A., Zani C. L., 2000. Biological Screening of Brazilian Medicinal Plants. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 95, 367-373.
- Anthony, J.P., Fyfe, L., Smith, H., 2005. Plant active components - A resource for antiparasitic agents? *Trends Parasitol* 21, 462-468.
- Araújo-Junior, F.A., Braz, M.N., Rocha-Neto, O.G., D'Almeida Costa, F., Brito, M.V.H., 2005. Copaíba oil effect in rats aminotransferases submitted to hepatic ischemic and reperfusion with and without preconditioning. *Acta Cirurgica Brasileira* 20, 93-99.
- Braga, W.F., Patitucci, M.L., Antunes, O.A.C., Veiga Junior, V.F., Bergter, L., Garrido, F.M.S., Pinto, A.C., 2000. Separation of Acid Diterpenes of *Copaifera cearensis* Huber ex Ducke by Flash chromatography Using Potassium Hydroxide Impregnated Silica Gel. *Journal of the Brazilian Chemical Society* 11, 355-360.
- Brito, M.V.H., Moreira, R.J., Tavares, M.L.C., Carballo, M.C.S., Carneiro, T.X., Santos, A.A.S., 2005. Copaíba oil effect on urea and creatinine serum levels in rats submitted to kidney ischemia and reperfusion syndrome. *Acta Cirurgica Brasileira* 20, 243-246.
- Camacho, M.D.R., Phillipson, J.D., Croft, S.L., Solis, P.N., Marshall, S.J., Ghazanfar, S.A., 2003. Screening of plant extracts for antiprotozoal and cytotoxic activities. *Journal of Ethnopharmacology* 89, 185-191.

- Carvalho, J.C.T., Cascon, V., Possebon, L.S., Morimoto, M.S.S., Cardoso, L.G.V., Kaplan, M.A.C., Gilbert, B., 2005. Topical antiinflammatory and analgesic activities of *Copaifera duckei* dwyer. *Phytotherapy Research* 19, 946-950.
- Carvalho, P.B., Ferreira, E.I., 2001. Leishmaniasis phytotherapy. Nature's leadership against an ancient disease. *Fitoterapia* 72, 599-618.
- Cascon, V., Gilbert, B., 2000. Characterization of the chemical composition of oleoresins of *Copaifera guianensis* Desf., *Copaifera duckei* Dwyer and *Copaifera multijuga* Hayne. *Phytochemistry* 55, 773-778.
- Croft, S.L., Seifert, K., Yardley, V., 2006. Current scenario of drug development for leishmaniasis. *Indian Journal of Medicinal Research* 123, 399-410.
- Davis, A.J., Murray, H.W., Handman, E., 2004. Drugs against leishmaniasis: a synergy of technology and partnerships. *Trends in Parasitology* 20, 73-76.
- Desjeux, P., 2004. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases* 27, 305-318.
- Estevez, Y., Castillo, D., Tangoa Pisango, M., Arevalo, J., Rojas, R., Alban, J., Deharo, E., Bourdy, G., Sauvain, M., 2007. Evaluation of the leishmanicidal activity of plants used by Peruvian Chayahuita ethnic group. *Journal of Ethnopharmacology* 114, 254-259.
- Fernandes, F.F., Freitas E.P.S., 2007. Acaricidal activity of an oleoresinous extract from *Copaifera reticulata* (Leguminosae: Caesalpinioideae) against larvae of the southern cattle tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). *Veterinary Parasitology* 147, 150-154.
- Fleury, M., 1997. A propos de l'intérêt médicinal du baume de Copahu. *Acta Botanica Gallica* 144, 473-479.
- Ghelardini, C., Galeotti, N., Mannelli, L.C., Mazzanti, G., Bartolini, A., 2001. Local anesthetic activity of β -caryophyllene. *II Farmaco* 56, 387-389.

- Gilbert, B., Teixeira, D.F., Carvalho, E.S., De Paula, A.E., Pereira, J.F., Ferreira, J.L., Almeida, M.B., Machado Rda, S., Cascon, V., 1999. Activities of the Pharmaceutical Technology Institute of the Oswaldo Cruz Foundation with medicinal, insecticidal and insect repellent plants. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 71, 265-271.
- Gomes, N.M., Rezende, C.M., Fontes, S.P., Matheus, M.E., Fernandes, P.D., 2007. Antinociceptive activity of Amazonian Copaiba oils. *Journal of Ethnopharmacology* 12, 486-492.
- Grenand, P.; Moretti, C.; *Pharmacopées traditionnelles en Guyane. Créoles Palikur, Wayãpi.*; Orstom, Paris, 1987, p. 569.
- Izumi, E., Morello, L.G., Ueda-Nakamura, T., Yamada-Ogatta, S.F., Dias-Filho, B. P., Cortez, D.A.G.; Ferreira, I.C.P.; Morgado-Diaz, J.A., Nakamura, C.V., 2008. *Trypanosoma cruzi*: Antiprotozoal activity of parthenolide obtained from *Tanacetum parthenium* (L.) Schultz Bip. (Asteraceae, Compositae) against epimastigote and amastigote forms. *Experimental Parasitology* 118, 324-330.
- Kvist, L.P., Christensen, S.B., Rasmussen, H.B., Mejia, K., Gonzalez, A., 2006. Identification and evaluation of Peruvian plants used to treat malaria and leishmaniasis. *Journal of Ethnopharmacology* 106, 390–402.
- Leandro, C., Campino, L., 2003. Leishmaniasis: efflux pumps and chemoresistance. *International Journal of Antimicrobial Agents* 22, 352-357.
- Lima, S.R.M., Veiga Junior, V.F., Christo, H.B., Pinto, A.C., Fernandes, P.D., 2003. In vivo and in vitro Studies on the Anticancer Activity of *Copaifera multijuga* Hayne and its Fractions. *Phytotherapy Research* 17, 1048-1053.
- McConville, M.J., Handman, E., 2007. The molecular basis of Leishmania pathogenesis. *International Journal for Parasitology* 37, 1047-1051.

- Moreira, R.C.R., Rebelo, J.M.M., Gama, M.E.A., Costa, J.M.L., 2002. Nível de conhecimentos sobre Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) e uso de terapias alternativas por populações de uma área endêmica da Amazônia do Maranhão, Brasil. *Cadernos de Saúde Pública* 18, 187-195.
- Osório, E., Arango, G.J., Jimenez, N., Alzate, F., Ruiz, G., Gutiérrez, D., Paco, M.A., Gimenez, A., Robledo, S., 2007. Antiprotozoal and cytotoxic activities in vitro of Colombian Annonaceae. *Journal of Ethnopharmacology* 111, 630-635.
- Paiva, L.A.F., Gurgel, L.A., Campos, A.R., Silveira, E.R., Rao, V.S.N., 2004a. Attenuation of ischemia/reperfusion-induced intestinal injury by óleo-resin from *Copaifera langsdorffii* in rats. *Life Sciences* 75, 1979-1987.
- Paiva, L.A.F., Gurgel, L.A., De Souza, E.T., Silveira, E.R., Silva, R.M., Santos, F.A., Rao, V.S.N., 2004b. Protective effect of *Copaifera langsdorffii* oil-resin against acetic acid-induced colitis in rats. *Journal of Ethnopharmacology* 93, 51-56.
- Paris, C., Loiseau, P.M., Bories, C., Bréard, J., 2004. Miltefosine induces apoptosis-like death in *Leishmania donovani* promastigotes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 48, 852-859.
- Patitucci, M.L., Veiga Junior, V.F., Pinto, A.C., Zoghby, M.G.B., Silva, J.R.A., 1995. Utilização de cromatografia gasosa de alta resolução na detecção de classes de terpenos em extratos brutos vegetais. *Quimica Nova* 18, 262-266.
- Patrício, F.J., Frazão, J.B., Pereira, W.S., Maciel, M.C.G., Silva, L.A., Amaral, F.M.M., Rebelo, J.M.M., Guerra, R.N.M., Ribeiro, M.N.S., Nascimento, F.R.F., 2008. Efficacy of the intralesional treatment with *Chenopodium ambrosioides*. *Journal of Ethnopharmacology* 115, 313-319.
- Rates, S.M.K., 2001. Plants as source of drugs. *Toxicon* 39, 603-316.

- Sahin, F., Gulluce, M., Daferera, D., Sokmen, A., Sokmen, M., Polissiou, M., Agar, G., Ozer, H., 2004. Biological activities of the essential oils and methanol extract of *Origanum vulgare*-spp. in the Eastern Anatolia region of Turkey. *Food Control* 15, 549-554.
- Sereno, D., Silva, A.C., Mathieu-Daude, F., Ouaisi A., 2007. Advances and perspectives in *Leishmania* cell based drug-screening procedures. *Parasitology International* 56, 3-7.
- Shimizu, M., Shogawa, H., Matsuzawa, T., Yonezawas, S., Hayashi, T., Arisawa, M., Suzuki, S., Yoshizaki, M., Morita, N., 1990. Anti-inflammatory constituents of topically applied crude drugs. IV. Constituents and inflammatory effect of Paraguayan crude drug "Alhucema" (*Lavandula latifolia* Vill.). *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 38, 2283-2284.
- Souza-Brito, A.R.M., Souza Brito, A.A., 1993. Forty years of Brazilian medicinal plant research. *Journal of Ethnopharmacology* 39, 53-67.
- Tincusi, B.M., Jiménez, I.A., Bazzocchi, I.L., Moujir, L.M., Mamani, Z.A., Barroso, J.P., Ravelo, A.G., Hernández, B.V., 2002. Antimicrobial Terpenoids from the Oleoresin of the Peruvian Medicinal Plant *Copaifera paupera*. *Planta Medica* 68, 808-812.
- Tiuman, T.S., Ueda-Nakamura, T., Cortez, D.A.G., Dias Filho, B.P., Morgado-Díaz, J.A., Souza, W., Nakamura, C.V., 2005. Antileishmanial activity of parthenolide, a sesquiterpene lactone isolated from *Tanacetum parthenium*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 49, 176-182.
- Ueda-Nakamura, T., Attias, M., Souza, W., 2001. Megasome biogenesis in *Leishmania amazonensis*: a morphometric and cytochemical study. *Parasitology Research* 87, 89-97.
- Veiga Junior, V.F., Zunino, L., Calixto, J.B., Patitucci, M.L., Pinto, A.C., 2001. Phytochemical and Antioedematogenic Studies of Commercial Copaiba Oils Available in Brazil. *Phytotherapy Research* 15: 476-480.
- Veiga Junior, V.F., Pinto, A.C., 2002. The *Copaifera* L. Genus. *Química Nova* 25, 273-286.

- Veiga Junior, V.F., Rosas, E.C., Carvalho, M.V., Henriques, M.G.M.O., Pinto, A.C., 2007. Chemical composition and anti-inflammatory activity of copaiba oils from *Copaifera cearensis* Huber ex Ducke, *Copaifera reticulata* Ducke and *Copaifera multijuga* Hayne-A comparative study. *Journal of Ethnopharmacology* 112, 248-254.
- Veiga Junior, V.F., Zunino, L., Patitucci, M.L., Pinto, A.C., Calixto, J.B., 2006. The Inhibition of Paw Oedema formation caused by the oil of *Copaifera multijuga* Hayne and its fractions. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 58, 1405-1410.
- World Health Organization. Urbanization: an increasing risk factor for leishmaniasis. *Weekly epidemiological record*, Geneva, v.77, n.44, p.365-370. Disponível em <http://www.who.int/wer>>. Acesso em: 10.01.2008.

Legends for Figures

Figure 1. Effects of *Copaifera reticulata* (collected in Pará) on the growth curves of promastigote (1A) and axenic amastigote (1B) of *L. amazonensis*. The results are from three experiments in duplicate. The bars indicate standard deviations. All results were significant at $p \leq 0.05$ (compared to the control group, Student's *t* test).

Figure 2. Effects of *Copaifera reticulata* (collected at Pará) on *L. amazonensis*–cell interaction. Peritoneal macrophage cells were infected with promastigotes of *L. amazonensis* and then treated with 10, 20 or 30 $\mu\text{g/mL}$ of copaiba oil. Each bar represents the mean \pm standard error of at least three independent experiments, which were performed in duplicate.

Table 1. Correlation of values of IC₅₀ for promastigotes of *L. amazonensis* with the percentage of sesquiterpene and diterpene content in copaiba oils from different species of *Copaifera*.

Oleoresins	IC ₅₀ (µg/mL)*	Main sesquiterpenes	%	Total sesquiterpene content (%)	Main acid diterpenes	%	Total diterpene content (%)
<i>C. reticulata</i> (Pará)	5 ± 0.833	α-copaene bergamotene β-caryophyllene	3.0 4.1 40.9	78.2	copalic kaurenoic	2.4 3.9	21.8
<i>C. reticulata</i> (Acre)	22 ± 0.044	α-copaene β-caryophyllene	25.1 13.1	68.2	copalic kaurenoic hardwickiic	7.7 7.5 6.9	31.8
<i>C. martii</i>	14 ± 0.997	β-bisabolene zingiberene	10.7 7.2	37.7	kaurenoic kovalenic	7.9 29.0	62.3
<i>C. cearensis</i>	18 ± 0.012	β-caryophyllene α-copaene	19.7 8.2	76.5	hardwickiic copalic	6.2 2.1	23.5
<i>C. paupera</i>	11 ± 0.455	β-bisabolene α-zingiberene	20.2 19.4	45.5	kaurenoic copalic	13.3 6.1	54.5
<i>C. langsdorfii</i>	20 ± 0.868	β-caryophyllene	32.8	40.4	kaurenoic copalic hardwickiic	44.3 5.6 8.2	59.6
<i>C. officinalis</i>	20 ± 0.405	β-caryophyllene	8.5	22.7	hardwickiic copalic	30.7 13.9	77.3
<i>C. multijuga</i>	10 ± 0.857	β-caryophyllene	57.5	85.5	copalic	6.2	14.5
<i>C. lucens</i>	20 ± 0.956	β-caryophyllene	1.8	18.6	polyalthic copalic	69.8 11.1	81.4

*Student's *t* test ($p \leq 0.05$) indicated significant differences between these oils compared to the control group. Values represent the mean ± S.D. of at least two experiments performed in duplicate

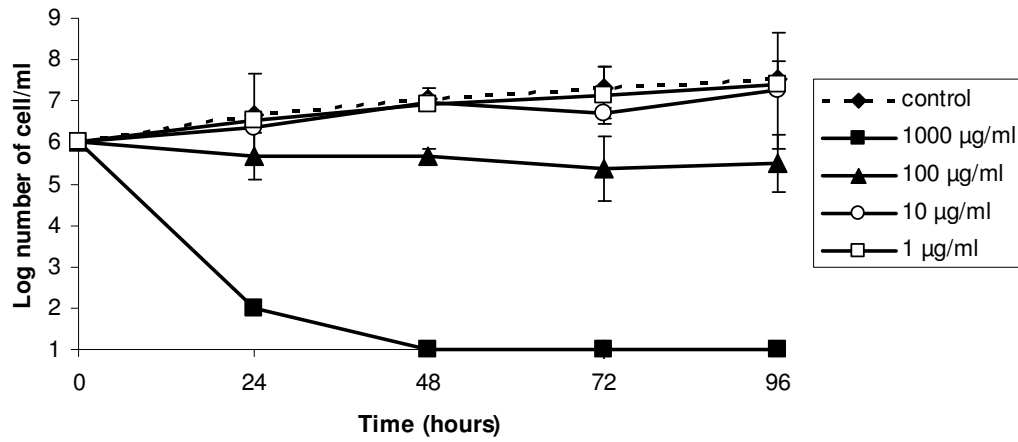


Figure 1A

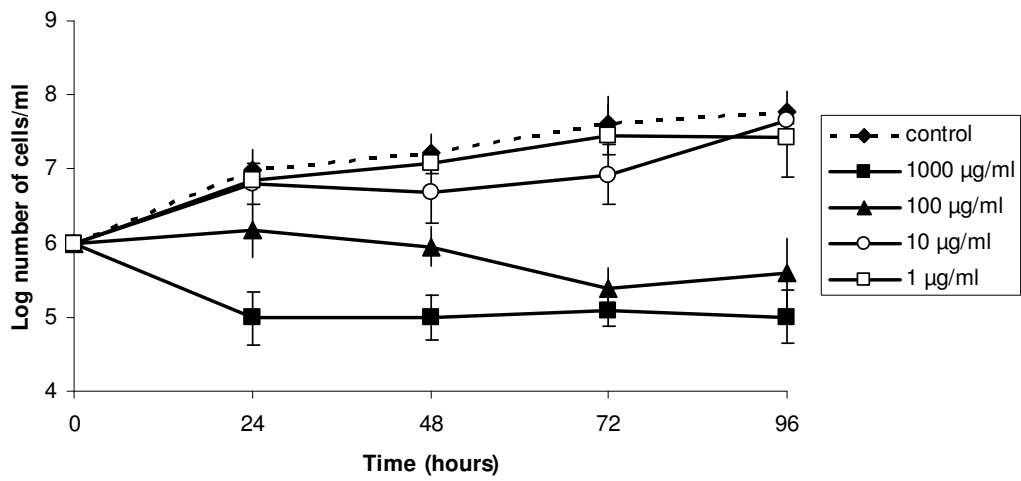


Figure 1B

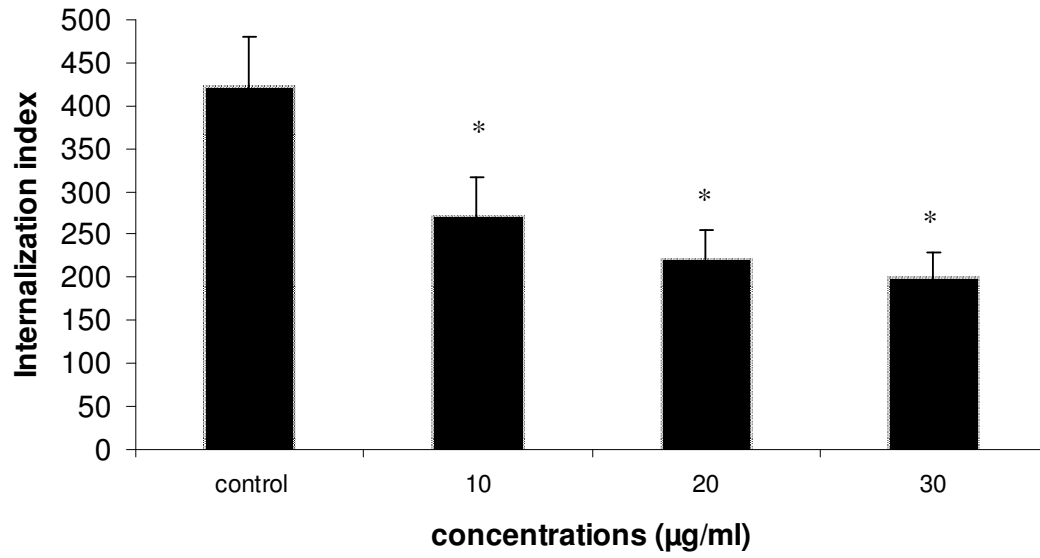


Figure 2

ANEXO 3

RESULTADOS COMPLEMENTARES

Análise do efeito do óleo de copaíba extraído da espécie *Copaifera reticulata* (coletado no Pará) na morfologia e ultra-estrutura das formas promastigotas e amastigotas de *L. amazonensi*, foi realizada por microscopia fotônica comum, e microscopia eletrônica de varredura e de transmissão. Alterações no tamanho, na forma e na estrutura do protozoário foram constatadas em relação ao controle utilizando as técnicas de microscopia fotônica comum (Figuras 1 e 2) e confirmadas com observações ao microscópio eletrônico de varredura (Figuras 4 e 5). O efeito do óleo da copaíba na inibição da proliferação de formas amastigotas intracelulares pode ser evidenciado através da Figura 3. Dados complementares foram obtidos com a técnica de microscopia eletrônica de transmissão (Figuras 6 e 7). Dentre as alterações observadas destaca-se: alterações na membrana plasmática, presença de duplo flagelo, membranas concêntricas (figuras de mielina), vacuolização citoplasmática múltipla e intensa atividade exocítica na região da bolsa flagelar.

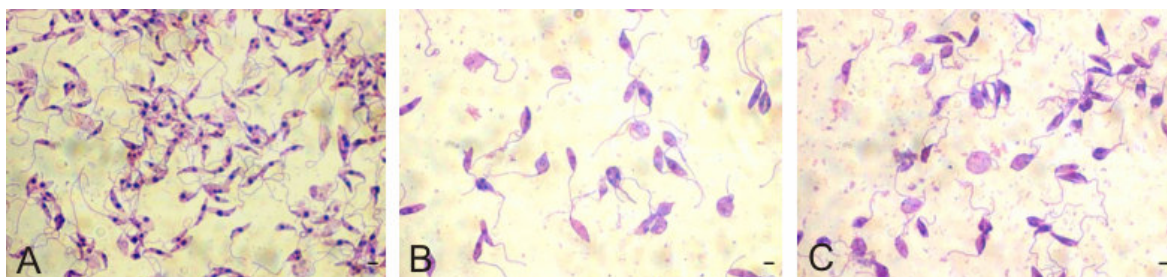


Figura 1: Microscopia Fotônica Comum de *L. amazonensis* cultivada em meio de Warren. Promastigotas não tratadas (A); Tratadas com óleo de *C. reticulata* 10 µg/ml - IC₅₀ - (B); Tratadas com óleo de *C. reticulata* 80 µg/ml - IC₉₀ - (C). Bars = 5 µm.

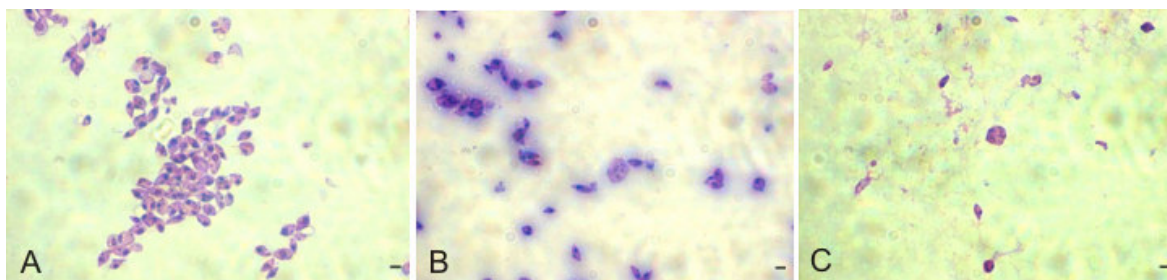


Figura 2: Microscopia Fotônica Comum de *L. amazonensis* cultivada em meio de Schneider. Amastigotas não tratadas (A); Tratadas com óleo de *C. reticulata* 15 µg/ml - IC₅₀ - (B); Tratadas com óleo de *C. reticulata* 75 µg/ml - IC₉₀ - (C). Bars = 5 µm.



Figura 3: Microscopia Fotônica Comum da interação de formas promastigotas de *L. amazonensis* com macrófagos J774G8. Controle de células infectado (A). Amastigotas intracelulares tratadas com óleo de *C. reticulata* 10 µg/ml (B e C). Bars = 5 µm.

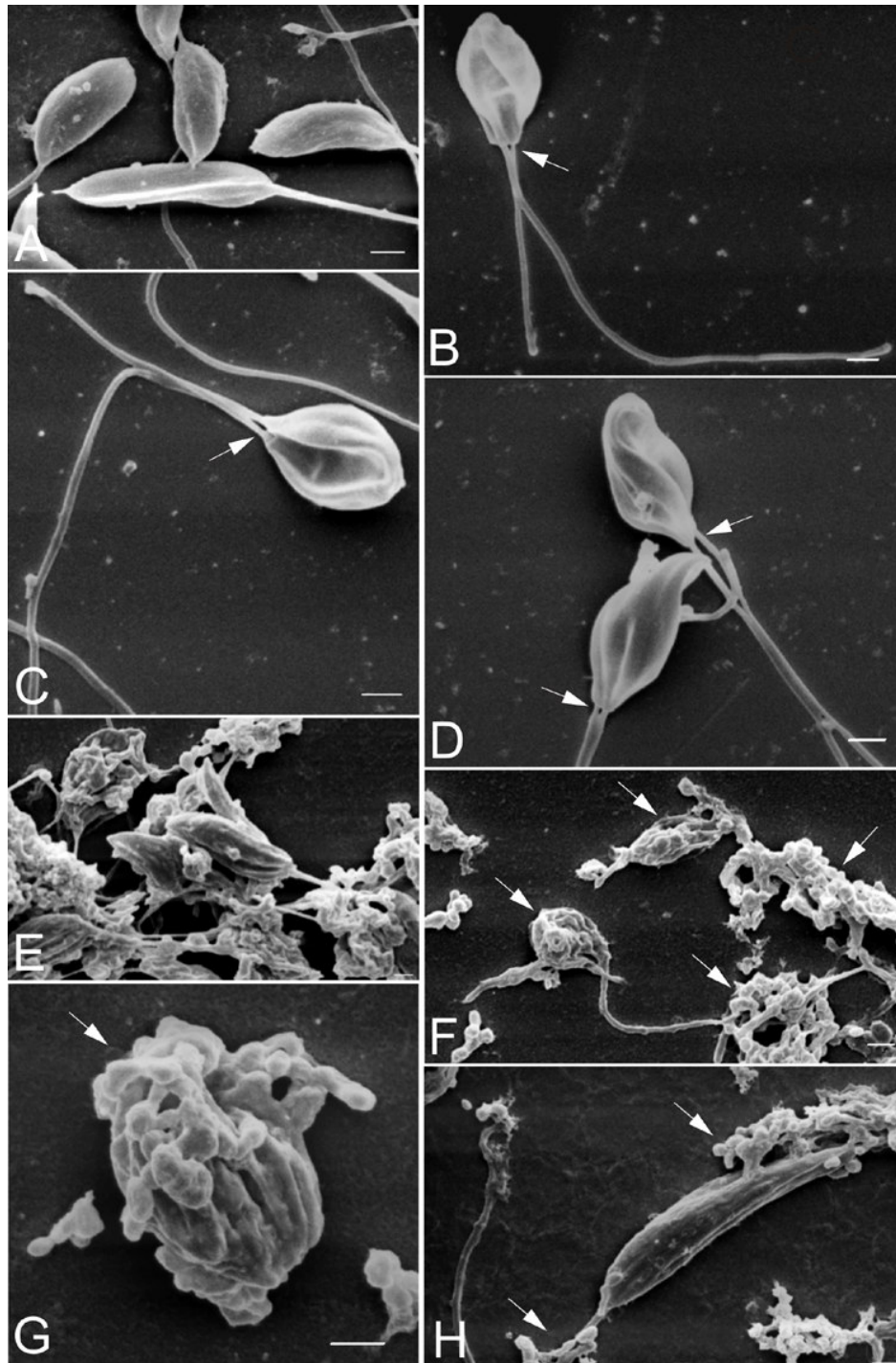


Figura 4: Microscopia Eletrônica de Varredura de *L. amazonensis* cultivada em meio de Warren. Promastigotas não tratadas (A); Tratadas com óleo de *C. reticulata* 10 µg/ml - IC₅₀ - (B, C, D); Tratadas com óleo de *C. reticulata* 80 µg/ml - IC₉₀ - (E, F, G e H). (Bars = 1 µm)

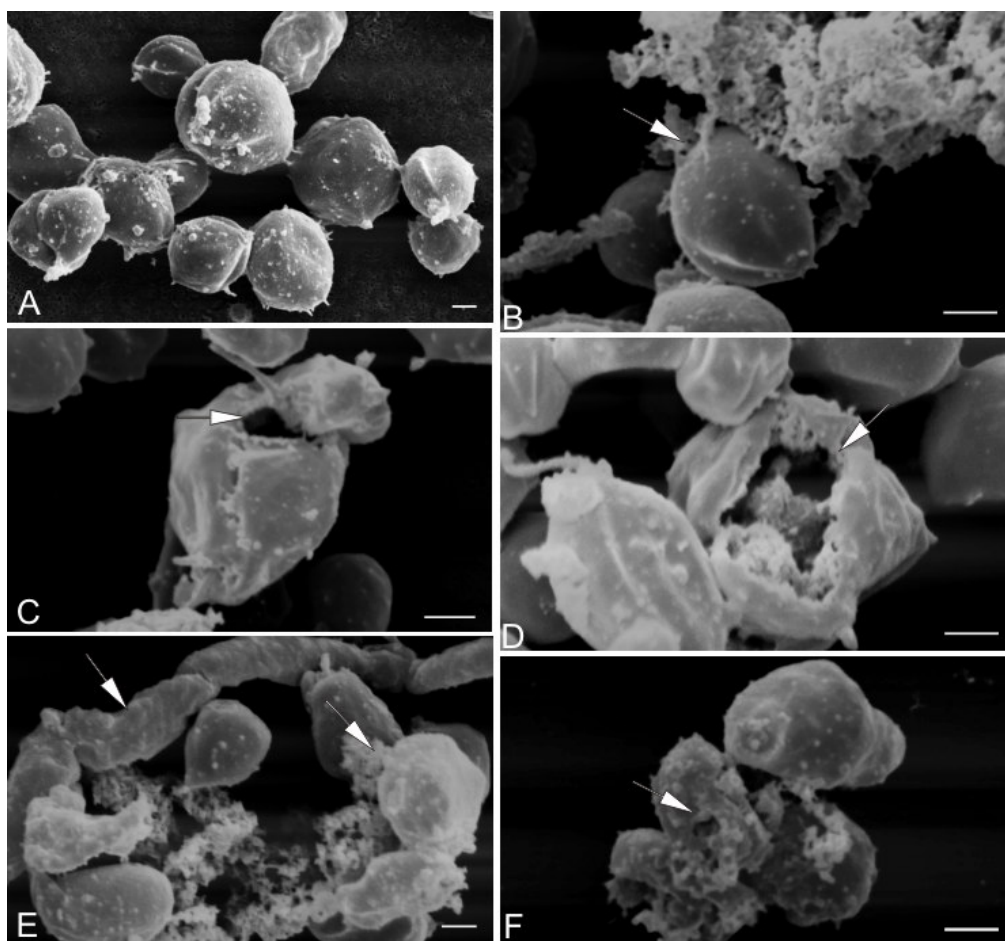


Figura 5: Microscopia Eletrônica de Varredura de *L. amazonensis* cultivada em meio de Schneider . Amastigotas não tratadas (A); Tratadas com óleo de *C. reticulata* 15 µg/ml - IC₅₀ - (B, C e D); Tratadas com óleo de *C. reticulata* 75 µg/ml - IC₉₀ - (E e F). Bars = 1 µm.

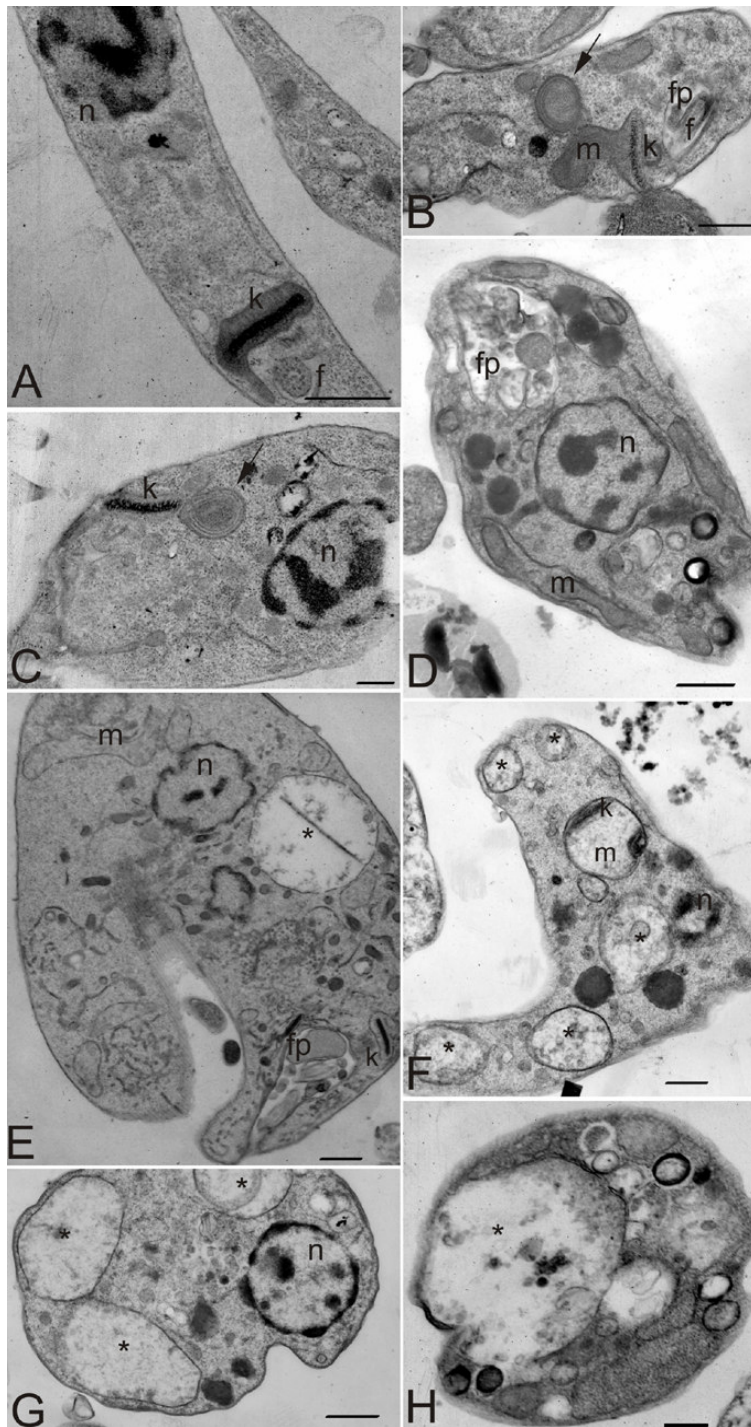


Figura 6: Microscopia Eletrônica de Transmissão *L. amazonensis* cultivada em meio de Warren. Promastigotas não tratadas (A); Tratadas com *C. reticulata* 10 µg/ml - IC₅₀ - (B e C); Tratadas com *C. reticulata* 80 µg/ml - IC₉₀ - (D, E, F, G e H). m, mitocôndria; fp, bolsa flagelar; f, flagelo; n, núcleo; k, cinetoplasto; *, vacúolos. (Bars = 1 µm).

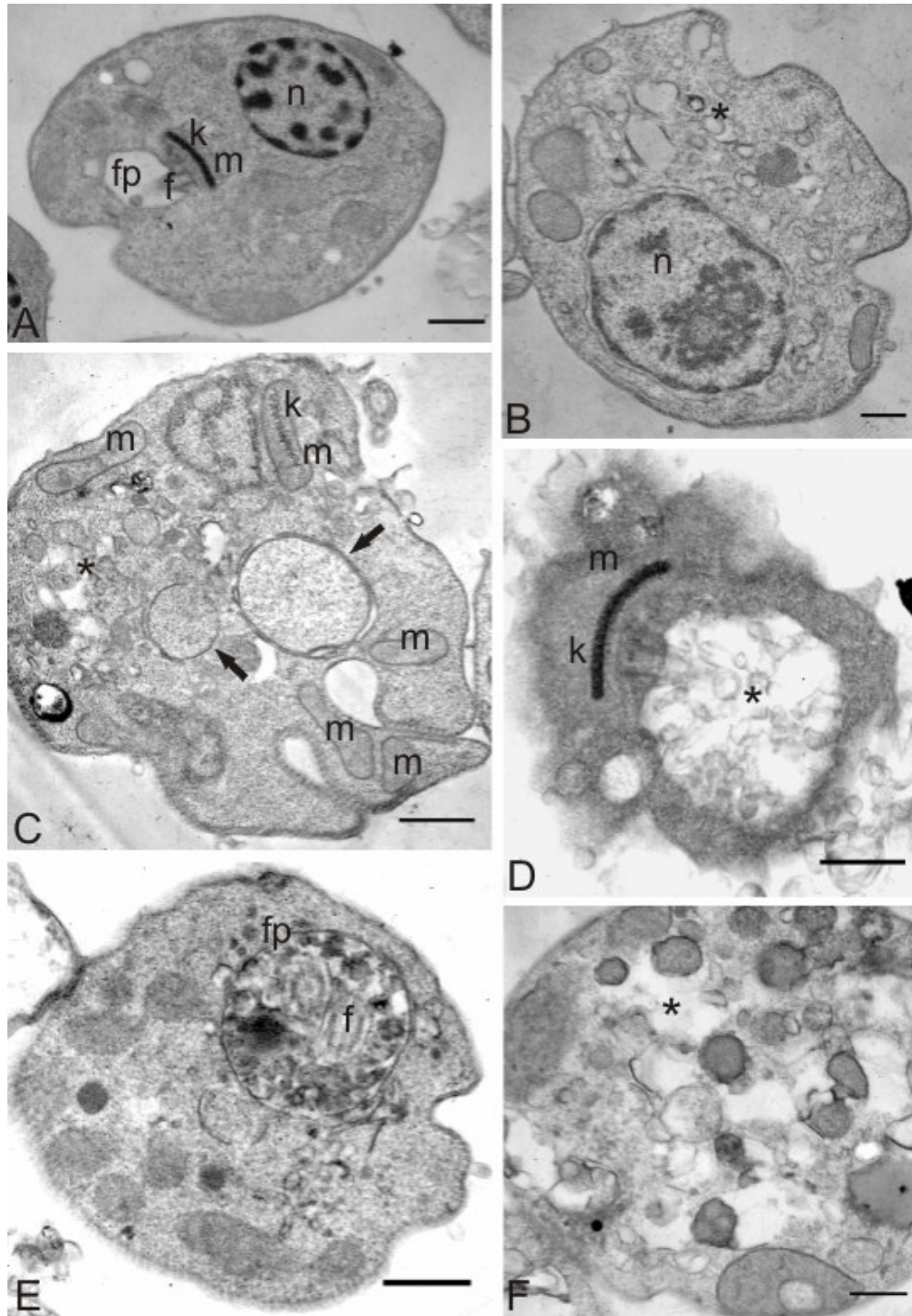


Figura 7: Microscopia Eletrônica de Transmissão *L. amazonensis* cultivada em meio de Schneider Amastigotas não tratadas (A); Tratadas com *C. reticulata* 15 µg/ml - IC₅₀ - (B,C); Tratadas com *C. reticulata* 75 µg/ml - IC₉₀ - (D,E,F,G e H). m, mitocôndria; fp, bolsa flagelar; f, flagelo; n, núcleo; k, cinetoplasto; *, vacúolos. (Bars = 1 µm)

CONCLUSÕES

- O óleo da copaíba obtido das espécies *Copaifera martii*, *C. officinalis* e *C. reticulata* (coletada no estado do Acre) apresentaram significativa inibição do crescimento das bactérias Gram-positivas: *Staphylococcus aureus* incluindo as meticilina-resistente, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus subtilis*, e *Enterococcus faecalis*;
- Os testes para atividade antifúngica revelaram que os óleos das espécies *C. paupera* e *C. lucens* apresentaram moderada atividade contra *Trichophyton rubrum* e *Microsporum canis*. Por sua vez, *C. cearensis*, *C. langsdorfii*, e *C. multijuga* mostraram moderada atividade somente contra *T. rubrum*. Todavia, nenhum óleo testado no presente estudo inibiu o crescimento dos fungos *T. mentagrophytes*, *M. gypseum*, bactérias Gram-negativas e leveduras.
- Análises da curva do tempo de morte realizada com *S. aureus* meticilina-sensível e *S. aureus* meticilina-resistente (MRSA) revelaram que o decréscimo da viabilidade de ambas espécies foi observado a partir de 3 h de tratamento com o óleo obtido de *C. martii*.
- Alterações morfológicas e ultraestruturais de *S. aureus* tratado com óleo de *C. martii* foram visualizadas por microscopia eletrônica de varredura e microscopia eletrônica de transmissão. Dentre as alterações observadas, destacam-se os rompimentos e danos na parede celular, com conseqüente liberação do material citoplasmático. As alterações indicam que o óleo da copaíba pode ter efeito sobre a parede celular.

- Todas as espécies de *Copaifera* estudadas foram ativas na inibição do crescimento de formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*. O óleo mais ativo na inibição do crescimento dessas formas foi o obtido a partir de *C. reticulata* (coletado no Pará).
- Testes de citotoxicidade em macrófagos J774G8 comprovaram que o óleo da copaíba obtido da espécie *C. reticulata* (coletado no Pará) apresenta concentrações tóxicas superiores às demonstradas em promastigotas de *L. amazonensis*.
- Ensaios da atividade do óleo *C. reticulata* (coletado no Pará) sobre amastigotas axênicas e intracelulares mostraram que o óleo da copaíba inibe o crescimento de ambas as formas do parasita.