



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**Efeito sinérgico entre a β -lapachona e agentes antimicrobianos
frente a cepas de *Staphylococcus aureus* multirresistentes.**

LUCIANA DA SILVA MACEDO

Recife

2012

LUCIANA DA SILVA MACEDO

**Efeito sinérgico entre a β -lapachona e agentes antimicrobianos
frente a cepas de *Staphylococcus aureus* multirresistentes.**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação
em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de
Pernambuco como requisito para obtenção do grau de
Mestre em Ciências Farmacêuticas na área de
concentração: Produtos Naturais e Bioativos.

Orientadora: Prof^{fa}. Dr^a. Eulália Camelo Pessoa de Azevedo Ximenes.

**Recife
2012**

**Efeito sinérgico entre a β -lapachona e agentes antimicrobianos
frente a cepas de *Staphylococcus aureus* multirresistentes**

Dissertação aprovada em: _____

Banca examinadora:

Prof^a Dr^a Eulália Camelo Pessoa de Azevedo Ximenes

Dept^o Antibióticos – Universidade Federal de Pernambuco

Presidenta da Banca

Prof^a Dr^a Teresinha Gonçalves da Silva

Dept^o Antibióticos – Universidade Federal de Pernambuco

Examinadora Interna

Prof^a Dr^a Mônica Camelo Pessoa de Azevedo Albuquerque

Dept^o Medicina Tropical - Universidade Federal de Pernambuco

Examinadora Interna

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

REITOR

Prof. Dr. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

VICE-REITOR

Prof. Dr. Silvio Romero de Barros Marques

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Dr. Francisco de Souza Ramos

DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Prof. Dr. José Thadeu Pinheiro

VICE-DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Prof. Dr. Márcio Antônio de Andrade Coelho Gueiros

CHEFE DO DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Prof. Dr. Dalci José Brondani

VICE-CHEFE DO DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Prof. Dr. Antônio Rodolfo de Faria

COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Prof^a. Dr^a. Nereide Stela Santos Magalhães

VICE-COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Prof^a. Dr^a. Ana Cristina Lima Leite

*"É melhor tentar e falhar, que se preocupar e ver a vida passar;
é melhor tentar, ainda que em vão, que se sentar fazendo nada até o final.
Eu prefiro na chuva caminhar, que em dias tristes em casa me esconder.
Prefiro ser feliz, embora louco, que em conformidade viver..."*

(Martin Luther King)

*Dedico este trabalho aos meus
filhos: Maria Clara e
Arthur Vinícius, pois sem eles,
tudo seria nada...*

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho àquela que torceu por mim a vida inteira, que me ensinou a ser menina, mãe e mulher, ao meu grande exemplo de vida e aconchego, ao meu grande e eterno amor: Nailde Soares da Silva (*in memoriam*).

*28/05/1935

+18/10/2011

Vozinha, tenho a certeza de que onde quer que você esteja, está de pé aplaudindo, orando e agradecendo a Deus por essa vitória, e certamente está muito, muito feliz por essa conquista.

Amarei-te para sempre...

Sua benção, minha vó...

AGRADECIMENTOS

Sozinhos, nada somos. Ilhados e cheios de nós mesmos, não chegamos a lugar nenhum; e este trabalho, este sonho, este degrau jamais seria conquistado, se não fosse a oferta, a doação, a ajuda de todos aqueles os quais cito agradecendo:

A **Deus** inicialmente, pela dádiva da vida e pelo constante, incansável, inesgotável, apoio na caminhada desta, e pelo milagre de fazer com que através de uma noite apenas, eu fosse esvaziada de mim mesma e preenchida de sua fé e esperança no alvorecer do dia, para continuar caminhando.

A minha orientadora **Profª Drª Eulália Ximenes**, pelos ensinamentos acadêmicos e ensinamentos de vida; pela paciência, boa vontade, carinho e amizade durante toda a execução deste trabalho, pois grande foi sua luta, a mim lapidando, amadurecendo, transformando e acima de tudo educando. Meu imensurável agradecimento.

Aos meus amigos do **Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de micro-organismo (LFBM)** do Deptº de Antibióticos da UFPE que sofreram, sorriram e torceram comigo nesta caminhada, **Thiago, Léo, Gustavo, Mônica e agregados**. Em especial aos grandes amigos que encontrei em momentos de aflição, desmotivação e medo, **Amanda e Lucas**, amigos que foram incansáveis na árdua tarefa do meu equilíbrio emocional. Não esquecendo também evidentemente do apoio técnico dessa dupla formidável.

Aos professores do Programa de Pós-graduação de Ciências Farmacêuticas (PPGCF), que compartilharam conosco, seu bem mais precioso: o conhecimento.

A toda equipe da grande família **Faintvisa Faculdades Integradas da Vitória de Santo Antão**, que me acolheu durante essa caminhada, em especial ao **Profº Ubirajara Carneiro da Cunha**, Presidente, à **Profª Graças Malheiros**, Diretora Geral, à **Profª Cida Malheiros**, Diretora Financeira, ao **Profº Manoel Aldo**, Diretor Administrativo, à **Profª Gilberande Pereira**, Coordenadora Geral da Graduação, por toda a copleensão, paciência e torcida na conquista desse título.

A minha adorável e competente secretária da graduação de Farmácia, **Eva Maria**, que me auxilia na administração de árduas tarefas e me ajuda com suas palavras de força, esperança e fé, na constante batalha do dia a dia.

Aos meus ilustríssimos docentes e amigos do curso de Farmácia da Faintvisa, pelo apoio moral e ajuda técnica, em especial a **Claiton Diniz, Diana Malta, Magaly Lyra e Ângela**.

À **Gerente de Saúde da Secretaria de Ressocialização (SERES)** do estado de Pernambuco, **Adelma Maria da Rocha**, pela compreensão e apoio nessa caminhada.

A toda equipe de saúde do **Complexo Prisional Aniba Bruno, PAMFA**, em especial a **Telma, Samuel, Bruno, Joanita, Juliana, Helena, Marcela, Çeça, Júnior** e claro minha chefinha querida e amiga **Agnes Cristina A. de Lima**, Supervisora de Saúde do PAMFA, pela grande paciência e toda compreensão nas ausências e faltas cometidas e que agora serão compensadas...Risos...

A minha grande amiga, irmã e companheira de todas as conquistas, derrotas, sorrisos e lágrimas, **Andréia Ferreira de Barros (Monguinha)**. Obrigada pelas incansáveis, longas e inesgotáveis palavras, nos omentos em que acho que tudo está perdido.

Às meninas Super Poderosas, **Marlene e Fátima**, que me ajudam diariamente na grande e prazerosa tarefa de cuidar dos bens mais preciosos que tenho: meus filhos e minha casa. “Sem a ajuda de vocês, certamente não conseguiria ter tranquilidade para executar esse projeto”. Obrigada é muito pouco para expressar o tamanho da gratidão que tenho por vocês.

Aos meus queridos pais, **Maria José da Silva Macedo e Jurandy Leite de Macedo**, pelos ensinamentos de vida, coragem, determinação e integridade ao longo da minha vida.

A minha irmã querida e amiga, **Virgínia da Silva Macedo** e meus filhos-sobrinhos, **Maria Eduarda e Matheus Macedo**, pelos momentos de descontração, carinho, amizade e amor. Amo muito vocês!

A toda minha família que torce diariamente pelo meu sucesso. Meus tios: **Fábio, Emerson, Edilson, Dino, Adelmo e todos seus filhos, esposas e agregados**.

À grande família icentivadora dos meus sonhos acadêmicos, minha tia **Maria de Fátima**, meu tio **Luiz José V. de Melo (cabeça)** e seus filhos, **Marília e Pedro**. Obrigada pela paciência aos incansáveis telefonemas desesperados e aos choros e lágrimas derramadas ao longo desta árdua caminhada . Amo vocês!

Ao meu grande amigo, companheiro, confidente e amor de todas as horas e momentos, **Claúdio Leandro Santos**. Obrigada, meu amor, pelo carinho, compreensão nos momentos de ausência e ajuda incondicional na realização deste trabalho. Sem você por perto, tudo seria bem mais difícil.

E a minha grande razão de viver, minha luz, minha motivação diária, minha garra, minha alegria, meu aconchego nas horas difíceis... aos verdadeiros amores da minha vida: meus dois pedacinhos, **Maria Clara Macedo Santos e Arthur Vinícius Macedo Santos**. Sem vocês nada, mas nada disso teria sentido.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: <i>Tabebuia avellanedae</i> (A) Flores (B), Frutos (C) Folhas (D) Sementes (E).....	06
Figura 2: Estrutura química do lapachol (A), β -lapachona (B) e α -lapachona (C).....	10
Figura 3: Mecanismo de ação das naftoquinonas.....	11
Figura 4: Representação da técnica de microdiluição utilizada para a concentração inibitória mínima CIM	21
Figura 5: Representação da técnica do tabuleiro de xadrez	22
Figura 6: Esquema da avaliação da técnica da atividade bactericida de $\frac{1}{2}$ CIM β -lapachona e $\frac{1}{4}$ CIM do meropenem.	24
Figura 7: Cinética bactericida da β -lapachona, meropenem e de sua associação frente a <i>Staphylococcus aureus</i> LFBM 01 (A) e <i>Staphylococcus aureus</i> LFBM 26 (B).	32

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Origem e susceptibilidade das cepas *Staphylococcus aureus* multirresistentes utilizados na determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM).....19

TABELA 2: Valores da CIM/CBM de três naftoquinonas e agentes antimicrobianos frente a cepas *Staphylococcus aureus* multirresistentes.....27

TABELA 3: Efeito da associação de β -lapachona com agentes antimicrobianos frente a cepas de *Staphylococcus aureus* multirresistentes30

RESUMO

Este estudo teve como objetivo avaliar a atividade antimicrobiana do lapachol, α -lapachona, β -lapachona e de cinco agentes antimicrobianos (ampicilina, amoxicilina/ácido clavulânico, cefoxitina, ciprofloxacina e meropenem), frente a 12 cepas de *Staphylococcus aureus*, cujo fenótipo de resistência fora previamente determinado pelo método de difusão em meio sólido. Cinco cepas de *S. aureus* (LFBM 16, LFBM 26, LFBM 28, LFBM 31, LFBM 33) apresentaram resistência a todos os agentes antimicrobianos testados e foram selecionados para a segunda etapa do trabalho: avaliação da interação entre β -lapachona e agentes antimicrobianos, que foi realizado pelo método do tabuleiro de xadrez (checkerboard). Os critérios utilizados para esta avaliação, foram definidos pelos valores do Índice de Concentração Inibitória Fracionada (FICI). Entre as naftoquinonas avaliadas, a β -lapachona foi a mais eficaz. A combinação de β -lapachona com os agentes antimicrobianos resultou em uma redução ≥ 5 vezes o valor da CIM destes últimos. Os valores do Índice de Concentração Inibitória Fracionada (FICI) para as associações variaram de 0,07 a 0,5 sugerindo uma atividade sinérgica. A cinética bactericida da associação de β -lapachona e meropenem foi avaliada frente as cepas LFBM 01 e LFBM 26 de *S. aureus* multirresistentes. As drogas foram testadas sozinhas e em combinações de $\frac{1}{2}$ e $\frac{1}{4}$ MIC para a β -lapachona e para o meropenem respectivamente. A associação dos antimicrobianos foi capaz de reduzir o crescimento das cepas de *S. aureus* LFBM 01 e LFBM 26 em $3,5 \log_{10}$ UFC/mL após 12h; e esterilizou estas culturas em 24h. Este estudo demonstrou que a β -lapachona combinada com antimicrobianos beta lactâmicos, fluoroquinolonas e carbapenêmicos, agem sinergicamente, inibindo cepas de *S. aureus* multiresistentes.

Palavras-chave: β -lapachona, naftoquinonas, *Staphylococcus aureus* multidrogas resistentes; tabuleiro de xadrez; Índice de Concentração Inibitória Fracionada (FICI).

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the antimicrobial activity of the lapachol, α -lapachone, β -lapachone and five antimicrobials (ampicillin, amoxicillin/clavulanic acid, cefoxitin, ciprofloxacin, and meropenem), against 12 of *Staphylococcus aureus* strains which resistant phenotype was previously determined by the disk diffusion method. Five *S. aureus* strains (LFBM 16, LFBM 26, LFBM 28, LFBM 31, LFBM 33) showed resistance to all antimicrobial agents tested and were selected for the study of the interaction between β -lapachone and antimicrobial agents, by the checkerboard method. The criteria used to evaluate the synergic activity were defined by the Fractional Inhibitory Concentration Index (FICI). Among naphthoquinones the β -lapachone show be to most effective against *S. aureus* strains. The combination of the β -lapachone with the antimicrobial agents resulted in a reduction ≥ 5 fold MIC the last. The fractional inhibitory concentration index (FICI) ranged from 0.07 to 0.5, suggesting a synergic interaction against multi-drug resistant *S. aureus* strains. In order, the Time-Kill testing to β -lapachone and meropenen was perfomed against *S. aureus* LFBM 01 and LFBM 26 strains. The drugs were tested alone and in combinations at $\frac{1}{2}$ and $\frac{1}{4}$ MIC to β -lapachone and meropenen respectively. The combination was able to reduce $3.5 \log_{10}$ CFU/mL the *S. aureus* LFBM 01 and LFBM 26 strains after 12h. This combination sterilized these cultures in 24h. This study demonstrated that β -lapachone combined with beta lactamics antimicrobials, fluoroquinolones and carbapenems, acts synergistically inhibit multidrug resistant *S. aureus*.

Keywords: β -lapachone; naphthoquinones, multi-drug resistant *Staphylococcus aureus*; Checkerboard; Fractional Inhibitory Concentration Index.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	01
2. OBJETIVOS	04
2.1 OBJETIVO GERAL	04
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	04
3. REVISÃO DE LITERATURA	05
3.1 Família Bignoniacea e <i>Tabebuia avellanedae</i> (Ipê-Rôxo)	05
3.2 Quinonas de ocorrência natural	08
3.3 Naftoquinonas do Ipê-Rôxo (lapachol, α -lapachona, e β -lapachona)	09
3.3.1 Lapachol, α -lapachona, e β -lapachona	09
3.3.2 Atividade antimicrobiana das naftoquinonas	10
3.3.3 Mecanismo de ação das naftoquinonas	11
3.4 <i>Staphylococcus aureus</i>	12
3.4.1 Antibiocoterapia	13
3.5 Resistência Bacteriana	14
3.5.1 Conceitos gerais	14
3.5.2 Resistência- origem e classificação	16
3.5.3 Mecanismos bioquímicos da resistência bacteriana	15
4. MATERIAIS E MÉTODOS	18
4.1 Micro-organismos	18
4.2 Preparação e padronização dos Inóculos	18
4.3 Agentes antimicrobianos	18

4.4 Determinação da Concentração Mínima Inibitória (CIM) e Concentração Mínima Bactericida (CBM)	20
4.5 Determinação <i>in vitro</i> da interação da β -lapachona e agentes antimicrobianos	22
4.6 Cinética Bactericida	23
5. RESULTADOS	26
5.1 Atividade antimicrobiana	26
5.2 Atividade sinérgica da β -lapachona e agentes antimicrobianos	29
5.3 Cinética bactericida	31
6. DISCUSSÃO	33
7. CONCLUSÃO	36
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37

1. INTRODUÇÃO

A resistência bacteriana aos antibióticos e quimioterápicos é uma realidade bastante divulgada no meio científico e constitui um sério problema de saúde pública (KLEVENS, EDWARDS, RICHARDS, 2007).

O aumento na prevalência das infecções causadas por cocos Gram-positivos multidroga resistentes isolados do ambiente hospitalar inspiram preocupação dos órgãos de vigilância epidemiológica. Internações prolongadas aumentam o custo financeiro e torna o paciente mais suscetível a infecções graves. Resultando em um aumento da relação morbidade/mortalidade (VIGANOR *et al.*, 2011).

Entre os patógenos mais comumente associados às infecções nosocomiais, destacam-se *Staphylococcus aureus*. Estas bactérias podem provocar desde simples infecção, como espinhas e furúnculos, até patologias mais graves, como pneumonia, meningite, endocardite, artrite bacteriana e septicemia (PEREIRA, SIQUEIRA-JÚNIOR, TAKAKI, 2004; AN *et al.*, 2011).

Um estudo realizado pelo Programa de Vigilância Antimicrobiana da América Latina (SENTRY) revela, especialmente no Brasil, um aumento na prevalência de MRSA (*Staphylococcus aureus* resistentes à metilina) isolados nos centros médicos, de 33,7% em 1997 para 40,2% em 2006 (PICAO, SADER, JONES, 2008). No Rio Grande do Sul, em 2003, *S. aureus* foi o micro-organismo mais prevalente isolado de infecções nosocomiais, sendo que 64% destes eram MRSA (LISBOA *et al.*, 2007).

O aumento da resistência microbiana frente a antibióticos de última geração e a ineficácia das drogas têm induzido os pesquisadores a buscar novos fármacos de diversas origens, bem como novos métodos de obtenção e administração destas drogas (HEMAISWARYA, KRUTHIVENTI, DOBLE, 2008).

Dentro desta perspectiva, os fitofármacos surgem como uma estratégia para a inovação terapêutica, principalmente aquela destinada às infecções por micro-organismos multirresistentes (MURASE *et al.*, 2010; SEPUTIENE *et al.*, 2010). Estas moléculas possuem uma diversidade estrutural e farmacológica, possibilitando a obtenção de protótipos para o desenvolvimento de novos fármacos (OLIVEIRA, SILVA, 2008).

Neste contexto, surgem as quinonas, metabólitos possuidores de diferentes propriedades farmacológicas tais como: antitumorais (SANTANA *et al.*, 1968), moluscicidas (SANTOS *et al.*, 2000), antiulcerantes (GOEL *et al.*, 1987), antiinflamatórias (ALMEIDA *et al.*, 1990), antifúngicas (GUIROUD *et al.*, 1994), antiprotozoárias (TEIXEIRA *et al.*, 2001) e

antimicrobiana (SILVA, FERREIRA, SOUZA, 2003). Dentre as quinonas de origem natural, as naftoquinonas têm no lapachol o seu representante maior.

O lapachol é isolado de várias espécies botânicas, pertencentes às famílias *Verbenaceae*, *Proteaceae*, *Leguminosae*, *Sapotaceae*. Tem maior ocorrência na família *Bignoniaceae*, particularmente no gênero *Tabebuia* (COLMAN *et al.*, 1997; DUARTE *et al.*, 2000; ITO *et al.*, 2000; SHETGIRI, KOKITKAR, SAWANT, 2001). A partir do lapachol foram obtidas várias outras naftoquinonas, xiloidonas, α -lapachona e a β -lapachona, cujas atividades farmacológicas foram anteriormente descritas (LIMA *et al.*, 1962; SANTANA *et al.*, 1968; GOEL *et al.*, 1987; ALMEIDA *et al.*, 1990; GUIROUD *et al.*, 1994; SANTOS *et al.*, 2000; TEIXEIRA *et al.*, 2001; SILVA, *et al.*, 2003). Destas, a β -lapachona destaca-se por possuir uma atividade antimicrobiana relevante quando comparado com as demais naftoquinonas (LIMA *et al.* 1956; 1962; 1967; 1972).

Apesar de amplamente conhecidas as propriedades farmacológicas da β -lapachona (LIMA *et al.*, 1962; SANTANA *et al.*, 1968; GOEL *et al.*, 1987; ALMEIDA *et al.*, 1990; GUIROUD *et al.*, 1994; SANTOS *et al.*, 2000; TEIXEIRA *et al.*, 2001; SILVA, *et al.*, 2003), raros são os estudos que associam esta naftoquinona com agentes antimicrobianos (SILVA, MESQUITA, XIMENES, 2009).

Diante deste fato, o presente estudo teve como objetivo, numa primeira etapa, determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e a Concentração Mínima Bactericida (CMB) do lapachol, α -lapachona e β -lapachona, bem como de drogas comerciais (ampicilina, ciprofloxacino, gentamicina, meropenem, amoxicilina/ácido clavulânico e cefoxitina). Avaliar o potencial sinérgico das associações destes agentes antimicrobianos com β -lapachona, e por fim, verificar a atividade bactericida da associação de β -lapachona–meropenem ao longo de 24h.

Objetivos

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito sinérgico entre a β -lapachona e os agentes antimicrobianos frente a cepas de *Staphylococcus aureus* multirresistentes.

2.2 Objetivos Específicos

- Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e a Concentração Mínima Bactericida (CBM) do lapachol, α -lapachona, β -lapachona, bem como de drogas comerciais (ampicilina, ciprofloxacino, meropenem, amoxicilina/ácido clavulânico, cefoxitina, gentamicina), frente a 12 cepas de *Staphylococcus aureus* multirresistentes;
- Avaliar a associação entre a β -lapachona e os agentes antimicrobianos, através da determinação do Índice de Concentração Inibitória Fracionada (FICI), frente a cinco cepas de *Staphylococcus aureus* multirresistentes;
- Determinar a cinética bactericida da associação mais efetiva da β -lapachona- antimicrobiano, frente a duas cepas de *Staphylococcus aureus*, as mais resistentes.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Família Bignoniaceae e *Tabebuia avellanedae* Lor. ex Griseb (Ipê-roxo)

Tabebuia avellanedae Lor. ex Griseb., é uma espécie vegetal pertencente a família Bignoniaceae que engloba aproximadamente 120 gêneros e 800 espécies (Figura 1). Ocorrem nas regiões tropicais e subtropicais, especialmente na América do Sul e África Central (LORENZI, MATOS, 2002).

As espécies do gênero *Tabebuia* são conhecidas popularmente como “Ipê”. O nome comum *ipê*, bem como outros nomes, pau d’arco e lapacho são usados para muitas espécies diferentes de árvores de *Tabebuia* (PANIZZA, 1997).

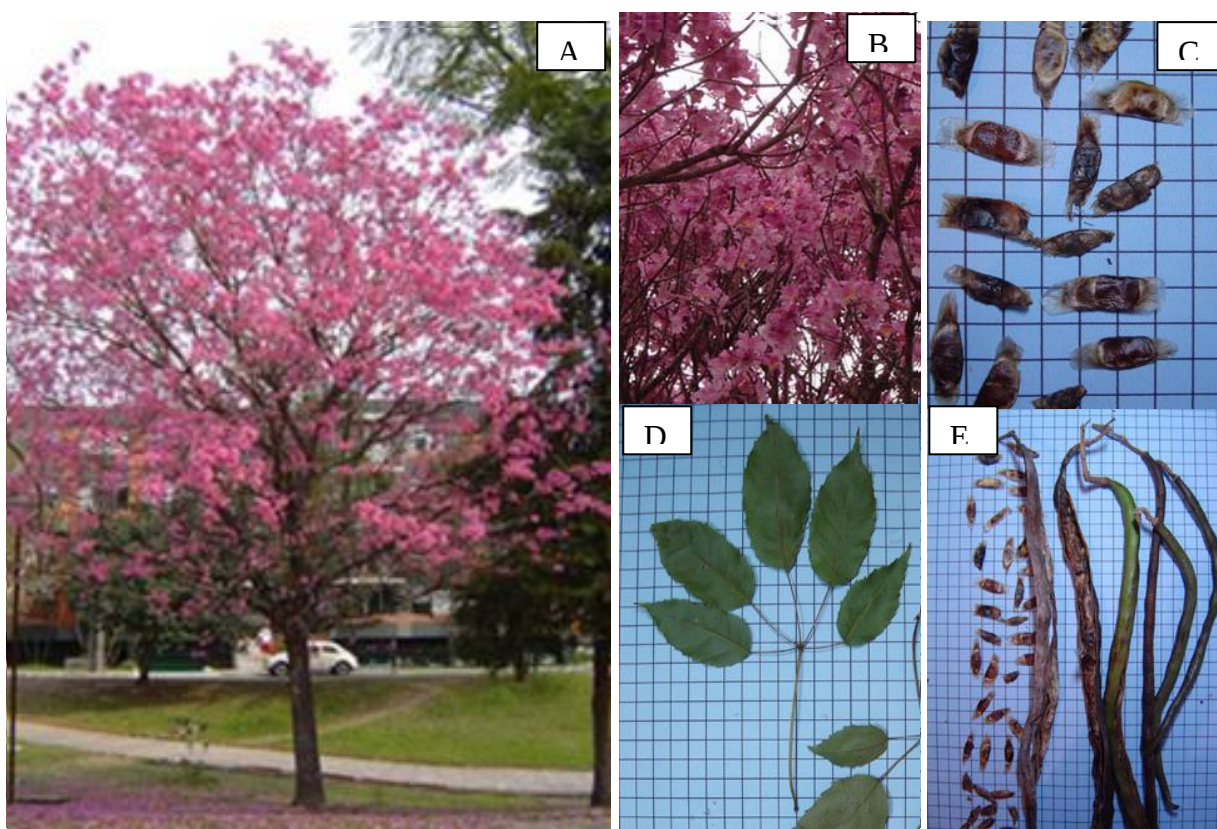


Figura 1 - *Tabebuia avellanedae* (A) Flores (B), Frutos (C) Folhas (D) Sementes (E).

Fonte: <http://w3.ufsm.br/herbarioflorestal>

Trata-se de uma árvore com 20 a 35 m de altura, possui uma casca grossa de cor marrom escura com fissuras longitudinais finas e espaçadas. Esta árvore possui ramificações grossas e tortuosas, formando uma copa grande de folhagem esparsa verde-escura. As folhas são digitadas, coriáceas, glabras, com margem serrilhada, (com 5 folíolos) desiguais. As

flores são róseas a violáceas que florescem de agosto a meados de setembro. O fruto é uma sílica deiscente, coriácea, pontuada, medindo 25 – 30 cm de comprimento. As sementes são aladas e retangulares, sendo facilmente transportadas pelo vento (LORENZI, MATOS, 2002).

Dentre as espécies catalogadas destacam-se: o Ipê-roxo (*Tabebuia avellanedae*) Lord, que possuem flores roxas, róseas ou lilás, tendo como sinonímia científica: *Tabebuia ipê* (Martius), *Tecoma curialis* (Freire), *Tecoma violaceae* (Hub), *Tecoma ipê* (Martius), e as espécies afins *Tabebuia impetiginosa* (Martius) e *Tabebuia serratifolia* (Vahl). Estas espécies possuem características, componentes químicos, propriedades farmacológicas e uso popular similar (PANIZZA 1997; LÜBECK 2001; LORENZI; MATOS 2002).

A denominação conhecida entre os Índios: pau d'arco, em Tupi; rorot deve-se a utilização para preparo de arcos e bодоques, devido à sua resistência e durabilidade. Os efeitos conhecidos do Ipê para tratar diversas doenças, consagrou sua utilização na cultura Indígena (LORENZI; MATOS 2002; GRAÇA, AIRES, 1994).

Na medicina tradicional, o Ipê-roxo tem uma longa e bem documentada história de uso pela população, destacando-se as propriedades adstringentes, utilização para o tratamento de úlceras pépticas, para as infecções do trato urinário, para o diabetes, alergias, reumatismo e artrites. No entanto, são propriedades atribuídas sem a comprovação através de estudos científicos (TAYLOR, 2005).

Inicialmente foi utilizada pela tribo dos Callawaya, descendentes dos Incas, na medicina caseira (PANIZZA 1997), para tratar doenças, originando o uso de decocções e infusões das cascas secas para tratamento local de eczemas e impetigos, em tratamento oral para uso de inflamações, dores de dente, dores articulares, como antimicrobiano, antitumoral e no Herpes (LÜBECK 2001; ALMEIDA, 2003).

Na Amazônia, as populações indígenas utilizavam infusões das cascas secas para o tratamento de anemia, malária, colite, doenças respiratórias, distúrbios gastrintestinais, resfriados, infecções fúngicas, febres, artrite e reumatismo, picadas de cobras, problemas circulatórios, sífilis e câncer (LÜBECK, 2001).

As naftoquinonas do Ipê-roxo foram estudadas pioneiramente na metade do século passado pelo Instituto de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco, com destaque para o lapachol e para a β -lapachona. Estudos *in vitro* desta época, com as quinonas do Ipê-roxo, evidenciaram suas atividades: antitumoral (SANTANA *et al.*, 1968), antiulcerante (GOEL *et al.*, 1987), anti-inflamatória (ALMEIDA *et al.*, 1990) e

antifúngica (GUIROUD *et al.*, 1994); com destaque no seu potencial antitumoral e antimicrobiano (LIMA *et al.*, 1956; 1962; 1967; 1972).

Além do lapachol, foram isolados de *Tabebuia avellanedae* Lor. ex Griseb (*Bignoniaceae*) e em outras espécies, naftoquinonas e antraquinonas. Das naftoquinonas destacam-se: as menaquinonas-1, lapachol, α -lapachona, β -lapachona, desoxilapachol e xiloidona. Das antraquinonas são citadas: a 2-metilantraquinona (tectoquinona), 2-aldeído-antraquinona, 2-carboxiantraquinona, 2-hidro-3-metilantraquinona, 1-hidroxiantraquinona, 1-metoxiantraquinona, 2-hidroximetilantraquinona, 2-acetoximetilantraquinona e tabebuína. Contém ainda lapachenol, quercetina, ácido orto- e para-hidroxibenzóico. A presença de filoquinona (vitamina K) foi registrada apenas nas folhas desta planta. As substâncias mais estudadas nesta espécie são: o Lapachol, os dois isômeros, α -lapachona e β -lapachona, e a xiloidona (desidro- α -lapachona), todos com atividades biológicas (BURNET, THOMSON, 1967; FONSECA, BRAGA, SANTANA, 2003; TAYLOR, 2005).

T. avellanedae possui atividade antiinflamatória, superior a fenilbutazona (ALMEIDA colaboradores, 1990). Esta atividade foi confirmada em outro estudo realizado por MIRANDA e colaboradores, (2001) que demonstrou a ação antinociceptiva e antiedematogênica do extrato aquoso da casca de *T. avellanedae*. Estes efeitos devem-se, provavelmente ao bloqueio dos mediadores da inflamação, como bradicinina e prostaglandinas. De acordo com estes autores, uma dose de 150mg/kg de lapachol administrado por via oral não produziu alterações nos ratos.

T. avellanedae possui amplo espectro de ação frente a diversas infecções cutâneas causadas por micro-organismos. Vários estudos apresentaram forte atividade *in vitro* contra bactérias, fungos filamentosos e leveduras, principalmente frente a *Candida* spp., *Aspergillus* spp., *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Brucella* spp. e *Helicobacter pylori* (LIMA *et al.*, 1956; 1962; 1967; 1972; TAYLOR, 2005). O extrato aquoso, obtido a quente da casca de *T. avellanedae* mostrou ação contra *Staphylococcus aureus* e *Helicobacter pylori*, bactéria causadora da úlcera péptica (TAYLOR, 2005). O extrato da casca obtido com diclorometano da *T. avellanedae* apresentou atividade antifúngica de amplo espectro (PORTILLO *et al.*, 2001).

Estudos realizados da atividade antimicrobiana com extratos de 54 plantas caracterizadas como antimicrobianas, o Ipê-roxo apresentou a maior atividade, comparado aos demais extratos de diferentes plantas (ANESINI, PEREZ, 1993). As bactérias Gram-negativas que foram inibidas pelo extrato aquoso da casca de Ipê-roxo incluem os gêneros

Haemophilus spp., *Moraxella spp.*, *Campylobacter spp.* e *Helicobacter spp.* (NAGATA *et al.* 1998). Entretanto, muitas bactérias Gram-negativas não são inibidas pelos extratos de Ipê-roxo como: *Escherichia coli*, *Citrobacter spp.*, *Enterobacter spp.*, *Serratia spp.*, *Klebsiella spp.*, *Proteus spp.*, *Morganella spp.*, *Acinetobacter spp.*, *Pseudomonas spp.* e *Neisseria spp.* (NAGATA *et al.*, 1998; ANESINI, PEREZ, 1993).

Estes resultados validam o uso popular do Ipê-roxo e indicam o potencial desta planta para o desenvolvimento de medicamentos no tratamento de infecções por bactérias Gram-positivas (ANESINI, PEREZ, 1993; MACHADO *et al.* 2003).

Nagata e colaboradores, 1998, descreveram a atividade antifúngica da *T. avellaneda* sobre *Tricophyton spp.*, micro-organismos causadores de micoses superficiais e subcutâneas em grande frequência. O uso tradicional para o tratamento de doenças na pele, do extrato aquoso da casca do Ipê-roxo demonstrou “*in vitro*” que sua atividade era direcionada para *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus fumigatus*, *Microsporum gypseum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Penicilium purpurogenum* (PORTILLO *et al.*, 2001).

As propriedades farmacológicas do extrato aquoso da casca do Ipê roxo, sendo elas: antibacteriana, antivirais, antifúngicas, antioxidante, moluscicida, tripanossomicida, antimalárica, embriotóxica e antineoplásica, devem-se à presença de naftoquinonas, cujo efeito oxidativo desencadeia a produção de radicais livres de oxigênio, peróxido de hidrogênio e superóxido. Estes radicais promovem peroxidação de lipídios e desnaturam as proteínas. (KUMAGAI *et al.*, 1997; RIFFEL *et al.*, 2002).

3.2. Quinonas de ocorrência natural

Quinonas formam um grupo de compostos coloridos com 2 grupamentos carbonilas, que podem ser adjacentes ou separados, geralmente em um anel insaturado de seis átomos. Representam uma grande e diversificada família de metabólitos de distribuição natural. É relevante o destaque cada vez maior que estes metabólitos vêm apresentando (THOMSON, 1971).

As quinonas desempenham funções importantes na bioquímica celular e exercem relevante atividade biológica; São facilmente oxidadas ou reduzidas. As ubiquinonas e as plastoquinonas participam de etapas importantes do ciclo de vida dos seres vivos, atuando como componentes móveis no transporte de elétrons da respiração e da fotossíntese nos diversos níveis da cadeia respiratória e participam dos processos enzimáticos, onde atuam

como co-fatores (MALTA, 2000; ABREU, FERRAZ, GOULART, 2002; MURRAY *et al.*, 2003). As naftoquinonas atuam como vitaminas do tipo K, que são bastante necessárias aos seres vivos, participando diretamente do processo de coagulação sanguínea (NELSON, 2004).

Baseado em sua estrutura molecular, as quinonas podem ser classificadas em diferentes grupos, estabelecendo o tipo de sistema aromático relacionado com o anel quinonoídico: **Benzoquinonas** – um anel benzênico; **Naftoquinonas** – um anel naftalênico; **Antraquinonas** – um anel antracênico linear ou angular (THOMPSON, 1971).

Tem sido observado um aumento no interesse dessas substâncias, devido a sua importância nos processos bioquímicos vitais, como também à descoberta de atividades apresentadas em variados estudos farmacológicos (MAHLER, LORDES, 1971).

3.3 Naftoquinonas do ipê-roxo (lapachol, α -lapachona, β -lapachona)

Naftoquinonas são compostos com destacada atuação, tanto na química quanto na farmacologia (PORTELA, VILLAMIL, STOPPANI, 1996).

As análises fitoquímicas do Ipê-roxo registram como componentes principais da madeira, as naftoquinonas, com destaque para o lapachol, considerado um dos principais representantes do grupo das quinonas, e seus principais derivados, a β -lapachona e a α -lapachona (ALMEIDA *et al.*, 1990; ALMEIDA, 2009; STEINERT, KHALAF, RIMPLER, 1996; PANIZZA, 1997; LORENZI, MATOS 2002).

3.3.1 Lapachol, α -lapachona, β -lapachona

O lapachol (Figura 2A) foi descoberto e estudado desde o século passado. Foi descrito pela primeira vez por Paternò, em 1882, tendo sua estrutura química estabelecida desde 1896, por Hooker, que o identificou como sendo uma naftoquinona de fórmula, 2-hidroxi-3-(3-metil-2-butenil)-1,4-naftalenodiona, de peso molecular 242,26g/mol, tem forma de cristais prismáticos, sua fórmula química $C_{15}H_{14}O_3$, com ponto de fusão 139,5 – 140,2°C. Sofre a ação controlada do calor, e fornece em sequência, a desidrolapachona (xiloidona) e os isômeros α - e β - lapachona (D'ALBUQUERQUE, 1968).

α -lapachona é uma naftoquinona (Figura 2C) obtida a partir do lapachol, metabólitos encontrados na espécie vegetal de *Tabebuia avellaneda*.

β -lapachona é uma naftoquinona (Figura 2B) encontrada como constituinte minoritário em extratos da casca do caule do ipê roxo (*Tabebuia avellanedae*). Sua produção em larga escala é realizada através da ciclização ácida do lapachol, composto natural mais abundante nos extratos de ipê roxo. A β -lapachona tem sido amplamente estudada devido ao seu potencial farmacológico frente a diferentes doenças. Esta molécula possui potente atividade antitumoral (SANTANA *et al.*, 1968), moluscicida (SANTOS *et al.*, 2000), antiulcerante (GOEL *et al.*, 1987), anti-inflamatória (ALMEIDA *et al.*, 1990), antifúngica (GUIROUD *et al.*, 1994), antiprotozoária (TEIXEIRA *et al.*, 2001), mas é destacado o seu potencial antitumoral e antimicrobiano (SILVA, *et al.*, 2003; DA SILVA *et al.*, 2010).

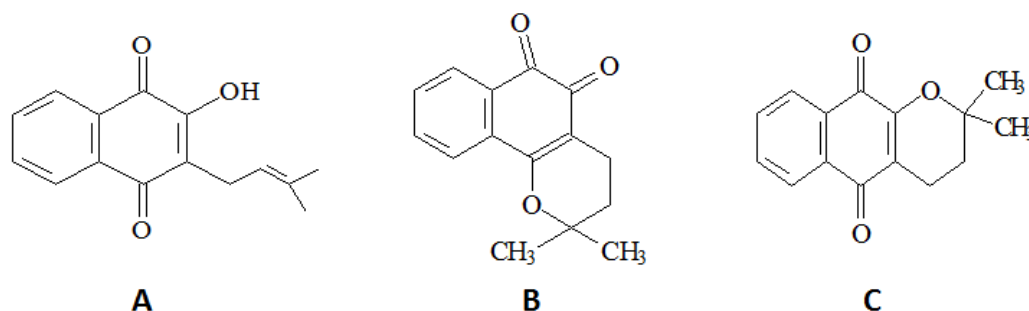


Figura 2: Estrutura química do lapachol (A), β -lapachona (B) e α -lapachona (C)

3.3.2 Atividade antimicrobiana das naftoquinonas

Desde os primeiros trabalhos de Oswaldo G. de Lima e colaboradores (1956; 1962; 1967; 1972;) e Ivan Leôncio D’Albuquerque (1968), que a atividade antibiótica do lapachol é estudada, sendo, contudo verificada uma predominância de atividade contra certos micro-organismos Gram-positivos e ácido resistentes, porém uma baixa atuação contra Gram-negativos, exceto contra o gênero *Brucella*. Por estes pesquisadores, verificou-se também que à medida que se eleva o grau de pureza do lapachol, diminui-se progressivamente

sua atividade antimicrobiana, o que pode ser explicado pelo fato de que outras naftoquinonas extraídas junto com o lapachol também possuem atividade antimicrobiana.

Guiraud e colaboradores (1994), compararam a atividade bactericida e fungicida do lapachol e β -lapachona e determinaram a sua concentração inibitória mínima. Os resultados confirmaram que a β -lapachona tem uma maior eficiência antimicrobiana quando comparada ao lapachol, e estes dados confirmaram os reportados por Gonçalves de Lima e colaboradores (1962). Os fungos foram consideravelmente mais sensíveis que as bactérias, particularmente para a β -lapachona. Lapachol e a β -lapachona foram mais ativos quando comparados ao cetoconazol.

As quinonas apresentam diversas biodinamicidades, com destaque, dentre tantos, para as propriedades: microbicidas, tripanossomicidas, viruscidas e antitumorais (MIRANDA, 2001; SILVA, FERREIRA, SOUZA, 2003).

Atualmente, na farmacologia, há um grande interesse no modo de atuação dessas substâncias, como é evidenciado pelo número de publicações que vem crescendo sobre o mecanismo de atuação da β -lapachona (ALMEIDA, 2009).

O avanço da química computacional, na evolução dos conhecimentos da atividade enzimática, pode contribuir muito para a explicação em maior profundidade dos mecanismos de atividade dessas substâncias e consequentemente para o planejamento de novos medicamentos comerciais (SILVA, FERREIRA, SOUZA, 2003; ALMEIDA, 2009).

3.3.3 Mecanismo de ação das naftoquinonas

As etapas bioquímicas do processo do estresse oxidativo induzido pelas quinonas, relatadas por diversos autores nos últimos 30 anos, está apresentada de forma sucinta na figura 3 (SILVA, FERREIRA, SOUZA, 2003). Um substrato quinonoídico catalisado pelas enzimas flavinas NADPH redutases, reduz-se com um elétron para formar o ânion semiquinona ($Q^{\cdot-}$).

Vários fatores influenciam e determinam a cinética da redução, incluindo o potencial de redução da quinona. Após a formação da semiquinona $Q^{\cdot-}$, a mesma reduz o oxigênio molecular ao ânion-radical superóxido $O_2^{\cdot-}$, estando na presença da enzima superóxido dismutase (SOD) é transformado em peróxido de hidrogênio. O ânion-radical superóxido $O_2^{\cdot-}$ gera $HO^{\cdot}$ no interior da célula, seja por reação com peróxido de hidrogênio (reação de Harber-

Weiss), seja por catálise com metais de transição (reação de Fenton). O radical hidroxila (HO) é a principal espécie responsável pelo estresse oxidativo celular (SILVA, FERREIRA, SOUZA, 2003)

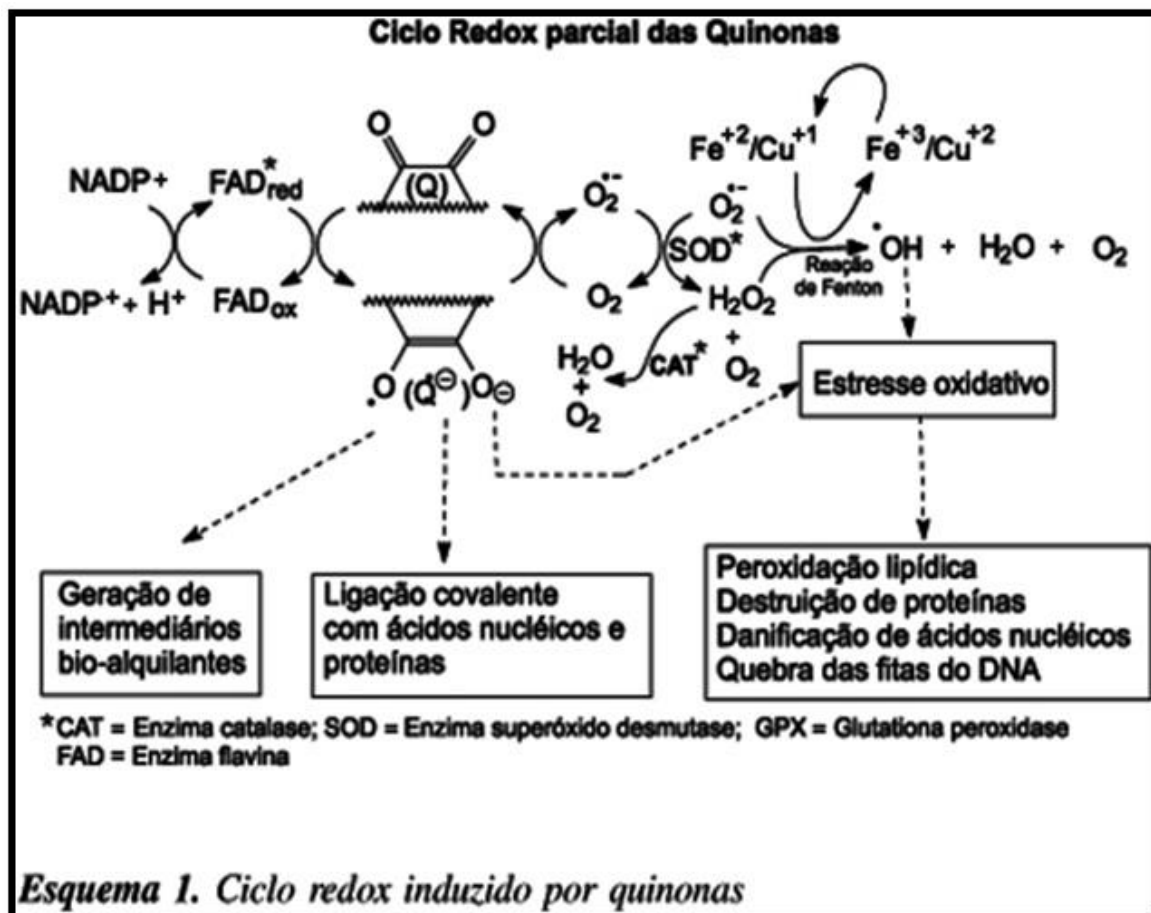


Figura 3 – Mecanismo de ação das naftoquinonas (SILVA *et al.*, 2003).

3.4 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus são cocos Gram-positivos pertencentes à família *Micrococcaceae*. Possuem aproximadamente 0,5 a 1,5 μm de diâmetro, são imóveis, não produzem esporos, e geralmente, não apresentam cápsulas. Esses micro-organismos podem apresentar-se de forma isolada, aos pares, em cadeias curtas, ou agrupados irregularmente, com aspecto semelhante a um cacho de uva (TRABULSI, 2005; SANTOS *et al.*, 2007).

O gênero *Staphylococcus*, atualmente, está composto por 33 espécies, das quais 17 podem ser isoladas de amostras biológicas humanas. A espécie de maior interesse médico, principalmente em ambiente nosocomial é o *Staphylococcus aureus*, descrito pela primeira

vez há mais de 120 anos pelo médico escocês Alexander Ogston (CASSETTARI, STRABELLI, MEDEIROS, 2005; KONEMAN, 2008).

S. aureus possuem colônias arredondadas, lisas e brilhantes. A coloração destas colônias varia de cinza ao amarelo. A pigmentação amarelada aumenta com o prolongamento do tempo de incubação, exceto nos casos de crescimento em condições anaeróbicas ou na cultura em meio líquido. A presença do halo de hemólise desenvolvido em torno das colônias formadas em placas de ágar-sangue é devido à presença da hemolisina, enzima, que promove a lise das hemácias (TRABULSI, 2005; SANTOS *et al.*, 2007).

Esse patógeno está envolvido em diversas infecções nos seres humanos, desde lesões superficiais, como foliculites e furúnculos, até infecções sistêmicas, tais como, osteomielites, endocardites, bacteremias, meningites e pneumonias. Sendo também o maior causador de intoxicação alimentar, síndrome da pele escaldada e síndrome do choque tóxico (ÁLVAREZ-LERMA *et al.*, 2006; SANTOS *et al.*, 2007).

A distribuição na natureza de *S. aureus* é muito grande, por se tratar de uma bactéria altamente resistente à dessecação e ao frio, pode permanecer viável por bastante tempo. O seu principal reservatório é o homem, embora seja um micro-organismo facilmente encontrado no ambiente em que os seres humanos circulam (SANTOS *et al.*, 2007).

Staphylococcus aureus é encontrado em diversas partes do corpo, como: fossas nasais, garganta, intestinos e pele. Destes sítios anatômicos, as narinas possuem o maior índice de colonização, cuja prevalência é de cerca de 40 % na população adulta, podendo ser ainda maior, dentro de hospitais (SANTOS *et al.*, 2007).

Recém-nascidos e indivíduos submetidos a internamentos prolongados em unidades de terapia intensiva constituem uma população de risco para a infecção causada por *S. aureus*. Outros fatores importantes para o início de uma infecção é o comprometimento das barreiras naturais do corpo, como pele e mucosas; e através de traumas ou cirurgias, que provoca colonização do tecido e conseqüente lesão local (ROBERT, CHAMBERS, 2005; SANTOS *et al.*, 2007).

Um estudo realizado por Sales e colaboradores (2006) reporta *S. aureus* resistente a meticilina como a segunda maior causa da sepse em unidades de terapia intensiva. É preocupante o crescimento do *S. aureus* resistente a meticilina (MRSA), que se tornou uma epidemia nas instalações hospitalares de todo o mundo (ALANIS, 2005; CAVALCANTI *et al.*, 2005).

3.4.1 Antibioticoterapia

A implantação da antibioticoterapia no início da década de 1930, com o emprego da sulfanilamida, aparentemente decretavam o fim das doenças infecciosas. Contudo, ao analisar a evolução da resistência do *S. aureus*, observa-se que, no final daquela década, surgiam as primeiras cepas de *S. aureus* resistentes (ALANIS, 2005).

Com a introdução da penicilina na clínica médica no início da década de 40, imaginava-se que o sucesso da antibioticoterapia para as infecções estava garantido. Contudo, apesar de penicilina ter sido bastante eficiente num primeiro momento, dois anos depois, *S. aureus* passou a desenvolver resistência a este β -lactâmico por produzir uma enzima (β -lactamase) capaz de hidrolisar o anel β -lactâmico da penicilina e torná-la ineficaz (ALANIS, 2005).

Em 1944, apenas 5% das cepas de *S. aureus* eram resistentes à penicilina, em 1949, esta resistência passou para 29% (ALANIS, 2005).

Em 1959, a resistência à penicilina chegou a 80% das cepas de *S. aureus*, sendo atualmente também resistentes à amoxicilina e à ampicilina (ALANIS, 2005; SANTOS *et al.*, 2007).

Sabe-se hoje que mais de 90% dos *Staphylococcus spp.* isolados são produtores da β -lactamase (OLIVEIRA *et al.*, 2002).

Com a resistência desenvolvida pelo *Staphylococcus aureus* aos antimicrobianos β -lactâmicos, surge a meticilina, como a primeira penicilina semi-sintética resistente a β -lactamase, tendo como alvo as cepas de *S. aureus* produtoras dessa enzima. Entretanto em 1961, dois anos após a introdução da meticilina, *S. aureus* desenvolveu resistência a este antimicrobiano, devido à aquisição do gene *Meca*, o qual codifica para um nova proteína ligadora de penicilina (PBP) denominada de PBP2a ou PBP2'. Essa nova PBP se liga fracamente às penicilinas e a outros β -lactâmicos atuando como uma transpeptidase substituta na formação das pontes transversas, durante a síntese da parede celular bacteriana, quando as PBPs normais se encontram bloqueadas pela ligação covalente com o β -lactâmico. Dessa forma, a biossíntese da parede celular é restabelecida, mesmo na presença do antimicrobiano. (DEURENBERG, STOBBERINGH, 2008; BERGER, ROHRER, 2002).

No início da década de 70, começaram rapidamente a serem isoladas, cepas resistentes à meticilina, denominada MRSA (Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*), que devido a presença do gene *Meca* e de outros genes como *SCCmec I*, *SCCmec II*, *SCCmec III*, que codificam resistências não só aos β -lactâmicos, desenvolveram também resistência a

múltiplas classes de antimicrobianos, por serem portadores de outros genes de resistência integrados, dentre eles os plasmídeos pUB110 e pT181 e o transposon Tn554 (genes que codificam resistência à aminoglicosídeos, tetraciclina, eritromicina e espectinomicina, respectivamente). (DEURENBERG e STOBBERINGH, 2008; ITO *et al.*, 2003)

Estas cepas MRSA foram rapidamente disseminadas em ambientes hospitalares restando apenas a vancomicina e a teicoplanina como opções terapêuticas (LUTZ *et al.*, 2003; SANTOS *et al.*, 2007).

A vancomicina é um antibiótico glicopeptídeo, eficiente no tratamento de cepas MRSA, embora, apresente efeitos nefrotóxicos e ototóxicos (LUTZ *et al.*, 2003; SANTOS *et al.*, 2007).

O surgimento das primeiras cepas de MRSA se deu três anos após a introdução da meticilina na prática clínica em 1961, na Inglaterra (JEVONS, 1961). A disseminação gradual em alguns países da Europa aconteceu durante toda a década de 60 e na década de 70 foi disseminado por todo o planeta (STEFANI e VARALDO., 2003). Nas décadas de 80 e 90, a prevalência dos MRSA em infecções nosocomiais teve aumento em diversos países (CHAMBERS e DELEO., 2009). Sendo assim, os MRSA têm sido para a saúde pública mundial, um grave problema, devido à sua multirresistência às diversas classes de antimicrobianos hoje utilizados em clínica, dificultando o tratamento das infecções e consequentemente aumentando a relação de morbidade/mortalidade (BRITES *et al.*, 2006).

Dados epidemiológicos relatam que nos Estados Unidos, o principal agente etiológico das infecções nosocomiais é o *Staphylococcus aureus* (FRAZEE *et al.*, 2005; MORAN *et al.* 2006).

O Programa de Vigilância Antimicrobiana da América Latina (SENTRY) observou que entre 1997 e 1999 a prevalência dos MRSA foi de 23% na Austrália, 67% no Japão, 35% na América Latina, 32% nos Estados Unidos e 26% na Europa (DIEKEMA *et al.*, 2001). Já o estudo TEST (Tigercycline Evaluation and Surveillance Trial) realizado entre 2004 e 2007 detectou que 48,3% dos *Staphylococcus aureus* isolados de 33 centros da América Latina foram resistentes à meticilina (ROSSI *et al.*, 2008).

Dados do Programa de Vigilância a Antimicrobianos no Brasil, revelam que MRSA é responsável por 56% da causa de infecções nosocomiais e comunitárias, sendo considerado o patógeno mais comum e está se tornando cada vez mais prevalente em infecções de origem comunitária (BRITES *et al.*, 2006).

Para a investigação epidemiológica no combate a resistência bacteriana é imprescindível a detecção precoce de portadores de MRSA, para que se faça o isolamento

destes pacientes colonizados, auxiliando na decisão da terapêutica mais adequada e no controle e prevenção da disseminação destes isolados (KUMAR *et al.*, 2008).

3.5 Resistência Bacteriana

3.5.1 Conceitos gerais

Uma bactéria é considerada resistente a um determinado antibacteriano quando é capaz de crescer *in vitro*, em concentrações mais altas do que a maior concentração alcançada pelo fármaco no sítio da infecção (TORTORA, 2005; TRABULSI e ALTHERTHUM, 2005; HOIBY *et al.*, 2010).

As concentrações terapêuticas possíveis de serem atingidas no sangue, que deve ser bem inferior àquela alcançada em certos fluidos, secreções e tecidos, são bem relativas, e este mecanismo é o que define resistência (ANG, EZIKE, ASMAR, 2004).

Seja qual for a estratégia de sobrevivência das bactérias, independentemente de seu mecanismo de ação frente ao antibacteriano, urge a necessidade de buscar uma nova alternativa para o tratamento, pois a troca do antimicrobiano durante o tratamento está cada vez mais limitada, devido à redução do perfil de sensibilidade que as bactérias vêm apresentando às drogas de uso clínico (JACOBY, 2005; ROLAIN, RAULT 2005; EBRAHIM, 2010). Esse desafio se mostra ainda mais crítico nos dias atuais, frente ao crescente aparecimento de cepas bacterianas multirresistentes e permuta de genes de resistência entre as diferentes espécies bacterianas. (MIN *et al.*, 2007; ANDERSSON, HUGHES, 2010).

3.5.2 Resistência - origem e classificação

A resistência bacteriana aos antibióticos pode ser classificada, quanto à origem, como natural ou adquirida (FREITAS, 1989).

Quando a resistência está associada ao cromossomo da bactéria, tendo assim um caráter hereditário transmitido às células filhas, chamamos de resistência natural ou intrínseca. Esta resistência é, por conseguinte, uma característica transmitida, verticalmente, às bactérias

descendentes, que são geradas sem a presença dos receptores alvo do antibacteriano ou com a presença de estruturas e mecanismos que impede à ação antibacteriana (BRIGOTTI *et al.*, 2010). A resistência bacteriana adquirida a um ou mais antibacterianos, consiste na exibição de alguma modificação por alguma célula da população de uma determinada espécie de bactéria. Estes exemplares (modificados) da população bacteriana não respondem mais à ação de antibacterianos, apesar de ativos contra o restante das bactérias presentes (RAVAT *et al.*, 2010).

A resistência natural não apresenta importância na clínica médica relevante, por ser previsível e constante, bastando-se conhecer o espectro de ação do antibiótico para evitá-la; entretanto a resistência adquirida ao contrário, é responsável por graves problemas de saúde pública, tendo em vista a modificação aos antibacterianos dos micro-organismos com sensibilidade aos fármacos, dificultando o tratamento das infecções (ROLAIN, ROULT, 2005).

3.5.3 Mecanismos bioquímicos da resistência bacteriana

Os mecanismos bioquímicos que as bactérias desenvolveram para conferir resistência a drogas antimicrobianas, são diversos; Modificação química do antibacteriano, através de enzimas específicas; alteração do sítio de ligação do antibacteriano; substituição do sítio de ligação; diminuição da permeabilidade ao antibacteriano; aumento da síntese de substrato com o qual o fármaco compete; efluxo do antibacteriano, por intermédio de transporte ativo. Um exemplo de bactérias que desenvolvem diversos tipos de mecanismos de resistência é o *S. aureus* e destes as cepas resistentes à meticilina são um grande problema de saúde pública (JACOBY 2005; HOOPER 2005; BOMONO e SZABO, 2006; MIN *et al.*, 2007; CLANCY, MELVIN, MCCAFFERTY, 2010).

Cepas de *S. aureus* podem se tornar MRSA a partir da aquisição do gene *MecA*, que codifica a proteína ligadora de penicilina (PBP2a), presente em sua membrana, apresentando dessa forma baixa afinidade a meticilina, bem como aos antimicrobianos betalactâmicos (TENOVER *et al.*, 2004; WHITENER *et al.*, 2004; SABAT *et al.*, 2006). Desta forma as cepas de MRSA apresentam fenótipo de resistência não somente aos beta-lactâmicos, mas também a fluoroquinolonas, cloranfenicol, clindamicina, tetraciclina e aminoglicosídeos (HIRAMATSU *et al.*, 2002).

Os glicopetídeos vancomicina e teicoplanina são utilizados para o tratamento de infecções causadas por MRSA, no entanto modificações na terapêutica mostram-se

necessárias devido à intolerância por parte dos pacientes ou falha no tratamento por seleção de cepas resistentes (TENOVER *et al.*, 2004).

As cepas de MRSA estão se tornando resistentes a vancomicina, resultando em três cepas adicionais resistentes ao antimicrobiano: *S. aureus* vancomicina intermediário, *S. aureus* vancomicina intermediário heterogêneo, *S. aureus* vancomicina resistente (CLANCY, MELVIN, MCCAFFERTY, 2010). As cepas de MRSA com resistência intermediária e heterogênea à vancomicina podem se tornar totalmente resistentes durante infecções persistentes em que há falha na resposta ao tratamento com glicopeptídeos, com significativas mudanças de fenótipo (WHITENER *et al.*, 2004).

Uma estratégia empregada para contornar a resistência bacteriana é a combinação de agentes antimicrobianos. Inibidores das β -lactamases são administrados como co-droga. Uma estratégia bem sucedida foi a adoção do ácido clavulânico às drogas como amoxicilina, sulbactam e tazobactam, para a inibição das β lactamases. Mas a freqüente utilização do clavulanato tem favorecido o surgimento de cepas bacterianas resistentes (ENRIGHT *et al.*, 2002; BLASQUEZ *et al.*, 1993; SHELBURNE *et al.*, 2004).

Pesquisas utilizando amostras de *S. aureus* multirresistentes revelaram que a eficácia de agentes antimicrobianos pode ser potencializada através da combinação destes fármacos com extratos de plantas superiores, ou com seus fitoquímicos (DARWISH *et al.*, 2002; AQIL *et al.*, 2005; BRAGA *et al.*, 2005; BETONI *et al.*, 2006; ESIMONE *et al.*, 2006; ADWAN , ABU-SHANAB, ADWAN, 2008).

Metabólitos secundários, produzidos por vegetais superiores, são considerados como fontes promissoras para a terapia antimicrobiana seja ela combinada ou não. Vários fitoquímicos atuam como modificadores da resistência bacteriana, agindo em pontos específicos da célula procariótica, seja por modificação de sítios receptores ou bloqueio de rotas metabólicas. Desta forma, potencializa o efeito do antimicrobiano sintético (SHELBURNE, *et al.*, 2004; SHELDON, 2005; HEMAISWARYA , KRUTHIVENTI, DOBLE, 2008).

Materiais e Métodos

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Micro-organismos

Neste trabalho foram utilizadas 11 cepas de *Staphylococcus aureus* isoladas de amostras clínicas e de alimentos, bem como uma cepa padrão obtida do *American Type Culture Collection*, (ATCC), da coleção 25923.

O fenótipo de resistência destas cepas foi obtido através do método de difusão em meio sólido e está apresentado na tabela 1. Estas cepas foram mantidas em meio sólido Mueller Hinton, sob óleo mineral inclinado. Repiques foram realizados a cada experimento.

4.2 Preparação e padronização dos inóculos

As culturas de *Staphylococcus aureus* foram preparadas em caldo Mueller Hinton e incubadas por 24 horas. Após o período de incubação estas culturas foram padronizadas em 10^8 UFC/mL, utilizando o tubo 0,5 da escala de Mac Farland, e em seguida diluídas em soro fisiológico a fim de obter um inóculo com concentração final de 10^7 UFC/mL.

4.3 Agentes antimicrobianos

Os agentes antimicrobianos obtidos da Eurofarma Laboratório Ltda, em forma de pó, foram escolhidos com base em seus mecanismos de ação: Ampicilina; Amoxicilina/Ácido clavulânico; Cefoxitina; Ciprofloxacino; Gentamicina; Meropenem.

O critério de resistência foi definido para cada agente antimicrobiano com base ao que preconiza o Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI) 2010: ampicilina (AMP, CIM $\geq 0,25\mu\text{g/mL}$); amoxicilina/ácido clavulânico (AMC, CIM $\geq 8\mu\text{g/mL}$); cefoxitina (CFO, CIM $\geq 4\mu\text{g/mL}$); ciprofloxacina (CIP, CIM $\geq 4\mu\text{g/mL}$); gentamicina (GEN, CIM $\geq 8\mu\text{g} / \text{mL}$ e meropenem (MER, CIM $\geq 16\mu\text{g} / \text{mL}$) (CLSI, 2010) .

O lapachol, α -lapachona e a β -lapachona, foram obtidos no Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco – UFPE.

Tabela 1 - Origem e susceptibilidade das cepas *Staphylococcus aureus* multirresistentes utilizados na determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM).

<i>Staphylococcus aureus</i>	Origem	Sensibilidade	Resistência
ATCC 25923	ATCC	CFO; OXA; SZT; GEN; MER; TEC; AZI; AMC; TET	AMP; CIP
LFBM 01	Queijo	TET, TEC	CFO; CIP; SZT; AMP; AZI; AMC; GEN; OXA; MER
LFBM 05	Secreção	TEC; GEN; SZT;TET	CFO; AMP; AZI; OXA; MER
LFBM 08	Secreção vaginal	GEN; SZT; TEC; AMC; TET; MER	CFO; CIP; AMP; AZI; OXA; GEN
LFBM 16	Escarro	GEN; SZT; TEC; TET; MER	CFO; OXA; AMP; AZI; CIP
LFBM 26	Sangue	GEN; TEC	CFO; OXA; CIP; SZT; AMP; AZI; AMC; MER
LFBM 28	Sangue	TEC; TET	CFO; OXA; CIP; GEN; SZT; AMP; AZI; AMC; MER
LFBM 29	Sangue	GEN; SZT; TEC; AZI; TET	CFO; OXA; AMP; AMC; CIP; MER
LFBM 30	Secreção traqueal	GEN; SZT; TEC; TET	CFO; OXA; CIP; AMP; AZI; AMC; MER
LFBM 31	Secreção traqueal	GEN; SZT; TEC; TET; MER	CFO; OXA; CIP; AMP; AZI; AMC
LFBM 32	Sangue	GEN; SZT; TEC	CFO; OXA; AMP; CIP; MER
LFBM 33	Sangue	TET; TEC	CFO; OXA; CIP; SZT; AMP; AZI; AMC; GEN

AMP: Ampicilina 10 µg; AMC: Amoxicilina/Ác. Clavulânico 30 µg; AZI: Azitromicina 15 µg; CFO: Cefoxitina 30µg; CIP: Ciprofloxacina 5 µg; GEN: Gentamicina 10 µg; MER: Meropenen 10 µg; TEC: Teicoplanina 30 µg; TET: Tetraciclina 30 µg; SZT – Sulfametoxazol/Trimetoprim 25 µg; OXA – Oxacilina 1 µg. ATCC: American Type Culture Collection; LFBM: Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de micro-organismos.

4.4 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida mínima (CBM)

Para determinação da CIM foi utilizado o método de microdiluição, com algumas modificações (CLSI, 2010). Este ensaio foi realizado em placas de microdiluição com 96 poços de fundo em forma de “U” (Figura 4).

O lapachol, α -lapachona, β -lapachona e os agentes antimicrobianos foram pesados analiticamente. Para solubilização do lapachol, α -lapachona e a β -lapachona foi utilizado um sistema de solventes composto por DMSO (dimetilsulfóxido)/Tween 80/H₂O destilada esterilizada (1:0,5:8,5 v/v/v), para os demais antimicrobianos foram utilizados água destilada esterilizada. As soluções estoques destes agentes antimicrobianos foram filtradas utilizando membrana milipore de 0,22 μ m. Destas soluções, 200 μ L foram pipetados e depositados nos poços de 1 a 12 da linha A. Os demais poços foram preenchidos com 100 μ L de caldo Mueller Hinton (MHB) duas vezes mais concentrados.

Uma alíquota de 100 μ L do conteúdo de cada poço da linha A foi transferido para a linha B, e este procedimento foi repetido até a linha H, a fim de obter concentrações que variaram de 1024 a 8 μ g/mL para o lapachol, α -lapachona, β -lapachona e de 512 a 4 μ g/mL para os agentes antimicrobianos.

Um volume de 5 μ L das culturas padronizadas de *S. aureus* foi inoculado em todos os poços. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 35°C por 24 horas. A análise da inibição do crescimento bacteriano foi realizada por densidade óptica utilizando um leitor de microplacas Thermo Plate – (TP Reader), com comprimento de onda de 630 nm. Considerando o crescimento (100%) no poço que continha (MHB + bactérias), o percentual de redução do crescimento foi atribuído aos poços restantes contendo os agentes antimicrobianos após subtração das suas absorbâncias.

Para confirmação da inibição do crescimento bacteriano após leitura espectrofotométrica foi adicionado a cada poço 20 μ L de uma solução aquosa a 0,5% de cloreto de 2,3,5-trifenil tetrazólio (TTC) e as placas reincubadas por três horas a 35°C. A presença de uma coloração vermelha nos poços foi interpretada como prova negativa do efeito inibitório, enquanto a ausência da coloração vermelha foi considerada como prova positiva da atividade antimicrobiana.

A este experimento foi adicionada uma placa de microdiluição para verificar a atividade intrínseca do sistema de solventes (DMSO/Tween 80/H₂O (1:0.5:8.5 v/v/v)), sobre as cepas de *S. aureus*.

A CIM foi definida como a menor concentração do agente antimicrobiano capaz de inibir o crescimento visível das cepas de *S.aureus*.

Para a determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM), dos poços que apresentaram uma inibição de crescimento maior ou igual a 70%, foram semeados 10µl em Ágar Mueller Hinton (MHA). Após 24 h de incubação a 37° C, o número de sobreviventes de *S. aureus* foi determinado. A CBM foi definida como a menor concentração dos agentes antimicrobianos capaz de inviabilizar 99,9% das bactérias. Todos os experimentos foram realizados em duplicata.

Com base nos resultados obtidos neste estudo, foi possível estabelecer a concentração inibitória mínima e selecionar a naftoquinona mais ativa frente as cepas *Staphylococcus aureus*.

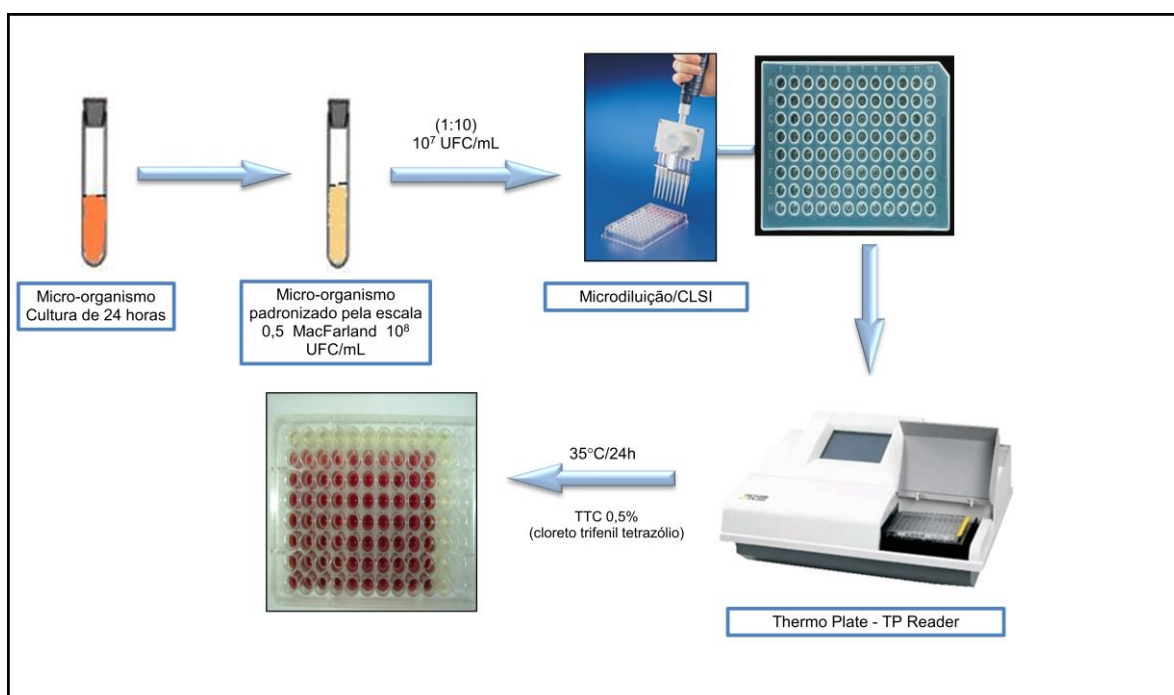


Figura 4 - Representação da técnica de microdiluição utilizada para a Concentração Inibitória Mínima

4.5 Determinação *in vitro* da associação de β -lapachona e agentes antimicrobianos

O estudo da interação entre β -lapachona e ampicilina, ciprofloxacina, amoxicilina/ác. Clavulânico, meropenem e cefoxitina, foi realizado de acordo com a técnica do tabuleiro de xadrez (**checkerboard method**) (LORIAN, 1996).

Com base nos valores da CIM foram preparados tubos contendo soluções em caldo Mueller Hinton da β -lapachona e dos agentes antimicrobianos de forma a obter seis concentrações sub-inibidoras para a β -lapachona e nove concentrações sub-inibidoras para os agentes antimicrobianos. Nos poços das placas de microdiluição, foram pipetados 100 μ L das soluções de β -lapachona e 100 μ L das soluções dos agentes antimicrobianos (Figura 5).

Cada poço foi inoculado com 5 μ L da suspensão bacteriana padronizada em 10^7 UFC/mL das seguintes cepas, LFBM 01; LFBM 16; LFBM 26; LFBM 28; LFBM 33 e as placas foram incubadas por 24 horas.

A interpretação dos resultados destas interações foi realizada através do Índice da Concentração Inibitória Fracionada (FICI), obtido através da seguinte equação, $FICI = (CIM \text{ da associação } \beta\text{-lapachona-agente antimicrobiano} / CIM \text{ de } \beta\text{-lapachona}) + (CIM \text{ da associação agente antimicrobiano-}\beta\text{-lapachona} / CIM \text{ do agente antimicrobiano})$. O FICI foi interpretado como sendo sinérgico quando o valor fora $\leq 0,5$; aditivo ou indiferente quando o valor fora $= 1$; e antagônico quando ≥ 2 (ELIOPOULUS, MOELLERING, 1991).

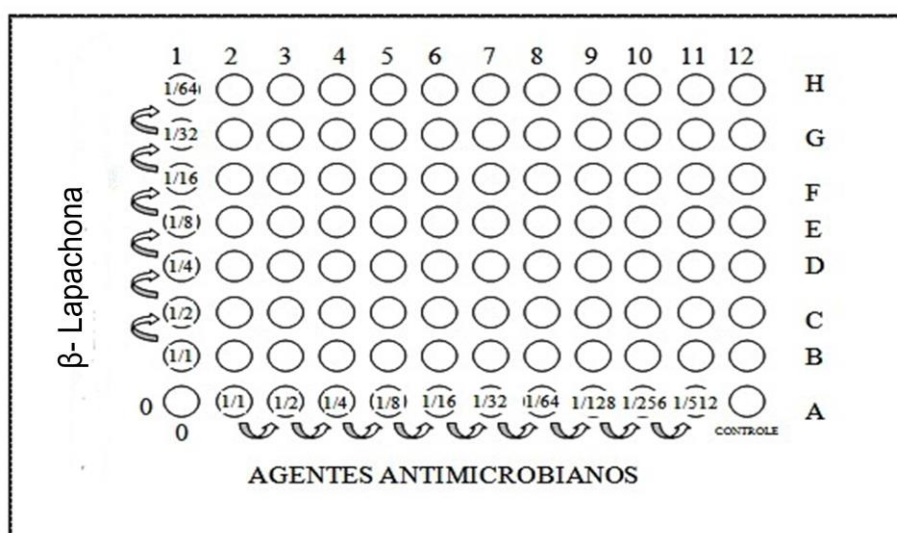


Figura 5: Representação da técnica do tabuleiro de xadrez.

4.6 Cinética Bactericida

Com base nos resultados obtidos no item 4.5 foi realizado um estudo cinético da atividade bactericida da melhor associação frente aos *Staphylococcus aureus*, mais resistentes.

A metodologia utilizada para este estudo foi preconizada por Krogstad e Moellering, (1986) e consistiu em determinar, por enumeração das unidades formadoras de colônias, o número de bactérias sobreviventes de um inóculo previamente padronizado exposto a uma concentração conhecida das drogas, em função do tempo (Figura 6).

Neste estudo foram utilizadas concentrações equivalentes a $\frac{1}{2}$ CMI para a β -lapachona e $\frac{1}{4}$ CIM para o meropenen.

Os inóculos bacterianos foram obtidos segundo metodologia descrita no item 4.2. Volumes de 9,0 mL da cultura de *S. aureus* previamente padronizada em 10^8 UFC/mL, foram transferidos para tubos rosqueados esterilizados que continham um volume de 1,0 mL das soluções de β -lapachona, meropenen ou de suas associações. No tubo controle foi adicionado 1,0 mL de água destilada esterilizada (COURVALIN, 1985; KROGSTAD, MOELLERING 1986).

A enumeração inicial (T_0) das bactérias viáveis (UFC/mL), foi efetuada a partir de uma alíquota de 0,5mL da solução agente antimicrobiana + cultura e diluída de 10^{-1} a 10^{-6} . Destas diluições foram plaqueadas cinco alíquotas de 10 μ L de todas as diluições sobre meio sólido de Mueller Hinton. As placas foram incubadas a 35°C por um período de 24 horas.

O acompanhamento da atividade bactericida foi realizado após 6, 9, 12 e 24 h, seguindo a metodologia acima descrita.

Os valores das UFC/mL obtidos, permitiram traçar para a β -lapachona, meropenen e sua associação, uma curva de morte (time kill curves) representando o número de bactérias viáveis, expresso em logaritmo decimal (ordenada), em função do tempo de exposição em horas (abscissa).

Os experimentos foram realizados em duplicata e em dias diferentes.

Desse modo, os dados apresentados são os resultados das médias aritméticas e o desvio padrão das manipulações.

Os critérios estabelecidos para uma boa atividade bactericida de uma associação, determinam que o decréscimo do inóculo bacteriano seja igual ou superior a $2\log_{10}$ UFC/mL em relação a droga mais ativa (ELIOPOULUS, MOELLERING, 1991).

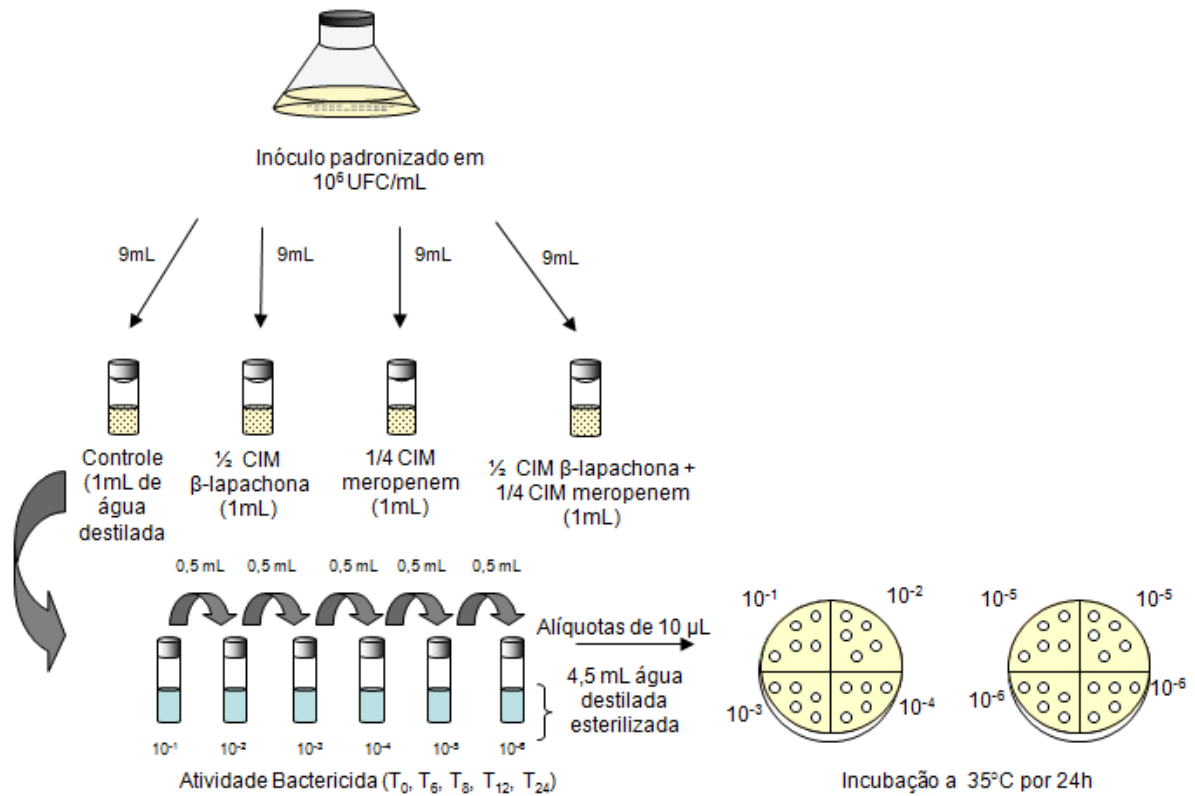


Figura 6 – Esquema da avaliação da técnica da atividade bactericida de $\frac{1}{2}$ CIM β -lapachona e $\frac{1}{4}$ CIM do meropenem

Resultados

5. RESULTADOS

5.1 Atividade antimicrobiana

Os valores da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e da Concentração Bactericida Mínima (CMB) dos agentes antimicrobianos frente às 12 cepas de *Staphylococcus aureus* estão apresentados na tabela 2.

Para a classificação da suscetibilidade destes micro-organismos aos agentes antimicrobianos, foram utilizados os critérios descritos pelo Clinical Laboratory Standard Institute CLSI 2010, exceto para a β -lapachona.

A atividade anti-estafilocócica do lapachol e da α -lapachona foi inferior àquela obtida para a β -lapachona. A CIM para o lapachol variou de 256 a 512 $\mu\text{g/mL}$ e para a α -lapachona variou de 64 a 256 $\mu\text{g/mL}$. A β -lapachona foi capaz de inibir o crescimento de todas as cepas de MRSA, cuja concentração inibitória mínima variou de 8,0 a 32 $\mu\text{g/mL}$.

As cepas de MRSA mostraram-se resistentes aos agentes antimicrobianos, em particular, aos beta lactâmicos, cuja concentração inibitória mínima (CMI) variaram de: 4 $\mu\text{g/mL}$ a 512 $\mu\text{g/mL}$ para ampicilina, de 4 $\mu\text{g/mL}$ a 256 $\mu\text{g/mL}$ para a cefoxitina e 4 $\mu\text{g/mL}$ a 64 $\mu\text{g/mL}$ para a Amoxicilina/Ácido clavulânico.

Todas as cepas de *S. aureus* mostraram serem resistentes ao meropenem, exceto as cepas ATCC 25923; LFBM 08; LFBM 16 e LFBM 31 com a CIM de 4 a 8 $\mu\text{g/mL}$.

Todas as cepas apresentaram sensibilidade a gentamicina, com exceção das cepas LFBM 01; LFBM 26; LFBM 28; LFBM 33, que foram resistentes com a CIM de 16 a 64 $\mu\text{g/mL}$.

As cepas de *S. aureus* LFBM 01, LFBM 26, LFBM 28 e LFBM 33, demonstraram resistência a todos os agentes antimicrobianos avaliados. Esse perfil de resistência direcionou a escolha dos micro-organismos para o estudo da interação entre a β -lapachona e os agentes antimicrobianos. Os valores da Concentração Bactericida Mínima (CBM) dos agentes antimicrobianos foram iguais a uma diluição superior a da CIM.

Tabela 2 – Valores da CIM/CBM de três naftoquinonas e agentes antimicrobianos frente a cepas *Staphylococcus aureus* multirresistentes.

<i>Staphylococcus aureus</i>	CIM/ CBM (µg/mL)									
	AMC	AMP	CFO	CIP	GET	MER	LAP	α-LAP	β-LAP	Perfil de Resistência ¹
ATCC 25923	4,0/8,0	4,0/8,0	4,0/8,0	4,0/8,0	4,0/8,0	4,0/8,0	256/512	64/128	8,0/16	Cepas controle
LFBM 01	32/64	512/1024	256/512	64/128	16/32	32/64	512/1024	128/256	8,0/16	AMC, CFO, CIP, GET
LFBM 05	8,0/16	128/256	32/64	4,0/8,0	4,0/8,0	16/32	512/1024	64/128	8,0/16	AMP, AZI, CFO, PEN
LFBM 08	4,0/8,0	128/256	16/32	4,0/8,0	4,0/8,0	8,0/16	256/512	128/256	16/32	AMP; AZI, CIP, CFO
LFBM 16	16/32	32/64	16/32	4,0/8,0	4,0/8,0	8,0/16	512/1024	128/256	8,0/16	AMP, AZI, CFO, PEN
LFBM 26	64/128	512/1024	256/512	64/128	32/64	32/64	512/1024	128/256	16/32	AMC, AMP, CFO, CIP
LFBM 28	32/64	512/1024	128/256	64/128	32/64	16/32	512/1024	256/512	8,0/16	AMC, CIP, CFO, GET
LFBM 29	16/32	64/128	32/64	4,0/8,0	4,0/8,0	16/32	512/1024	256/512	16/32	AMC, AMP, CFO, PEN
LFBM 30	16/32	256/512	16/32	64/128	4,0/8,0	16/32	256/512	256/512	16/32	AMC, AMP, CFO, CIP
LFBM 31	16/32	128/256	16/32	64/128	4,0/8,0	8,0/16	512/1024	256/512	32/64	AMP, AZI, CFO; CIP;
LFBM 32	16/32	256/512	16/32	64/128	4,0/8,0	16/32	256/512	128/256	16/32	AMP, CFO, CIP, PEN
LFBM 33	16/32	256/512	128/256	64/128	64/128	16/32	256/512	128/256	16/32	AMC, AMP, CFO, CIP

CIM: Concentração inibitória Mínima; CBM: Concentração Mínima Bactericida; ATCC: American Type Culture Collection; LFBM: Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Micro-organismos; AMC: Amoxicilina/ Ácido clavulânico. Clavulânico; AMP: Ampicilina; AZI: Azitromicina; CFO: Cefoxitina; CIP : Ciprofloxacino; GET : Gentamicina; PEN : Penicillina; MER : Meropenem ; LAP : Lapachol; α-LAP : α-Lapachona; β-LAP: β-Lapachona;

¹ Perfil de Resistência determinado pelo método de difusão em meio sólido.

5.2 Atividade sinérgica da β -lapachona e agentes antimicrobianos

Os resultados obtidos da associação entre a β -lapachona e ampicilina, ciprofloxacino, amoxicilina/ác. clavulânico, meropenem e cefoxitina, estão apresentados na tabela 3.

A avaliação da atividade sinérgica, através da técnica do Tabuleiro de xadrez (**Checkboard**), foi realizada com a β -lapachona e cinco tipos de agentes antibacterianos, incluindo os betalactâmicos: ampicilina, amoxicilina/Ác. Clavulânico, meropenem, cefoxitina e uma fluoroquinolona, ciprofloxacino.

Concentrações sub-inibidoras da β -lapachona aumentaram a atividade anti-estafilocócica de todos os agentes antimicrobianos. Individualmente estes agentes mostraram uma atividade moderada ou nenhuma atividade. Entretanto, interações sinérgicas foram observadas para as combinações de β -lapachona com: ampicilina (FICI = 0,37); ciprofloxacino (FICI = 0,25 a 0,56); amoxicilina/Ác. Clavulânico (FICI = 0,06 a 0,31); meropenem (FICI = 0,09 a 0,37); cefoxitina (FICI = 0,25 a 1,0), frente aos cinco isolados de MRSA.

Nas associações, a atividade sinérgica foi detectada por um decréscimo dos valores da CIM, dos agentes antimicrobianos que variou de três a oito vezes e por um FICI $\leq$ 0,5.

A combinação da β -lapachona e amoxicilina/ác. clavulânico mostrou os mais baixos valores do FICI, cujos valores variaram de 0,06 a 0,31.

A associação da β -lapachona com a meropenem também foi eficaz apresentando valores do FICI que variaram de 0,09 a 0,37. Esta associação foi capaz de reduzir o CIM individual de 75 a 98,4 %, quando os agentes antimicrobianos foram combinados.

Para os isolados de MRSA avaliados, os valores da Concentração Inibitória Mínima do meropenem (CMI individual de 8 a 32 $\mu\text{g/mL}$) decresceram de 1/16 (CIM da associação variou de 0,5 a 4,0 $\mu\text{g/mL}$), quando este foi associado com a β -lapachona em concentrações iguais ou inferiores a $\frac{1}{4}$ da CIM.

Para a fluoroquinolona e ciprofloxacino, esta associação também foi eficaz, apresentando um FICI de 0,25 a 0,56; Reduzindo o CIM individual dos agentes de 50 a 99,2%.

Para a ampicilina, esta associação também foi eficaz, apresentando um FICI de 0,37; Reduzindo o CIM individual dos agentes de 75 a 87,5%.

As associações da cefoxitina apresentaram os maiores valores do FICI, cujos valores variaram de 0,25 a 0,50, para as associações que expressaram atividade sinérgica; apresentando

efeito indiferente apenas para o LFBM 33. No entanto apesar dos valores do FICI serem maiores, estas associações também apresentaram perfil sinérgico, sendo capazes de reduzir os valores do CIM individual de 0 a 99,8%.

Para todas as cepas de MRSA foram observadas reduções das células viáveis superior a 70% quando os agentes antimicrobianos foram associados a β -lapachona, utilizada numa concentração equivalente a $\frac{1}{2}$ da CIM.

Tabela 3. Efeito da associação de β -lapachona com agentes antimicrobianos frente a cepas de *Staphylococcus aureus* multirresistentes.

<i>Staphylococcus aureus</i>	Associação	Individual CIM ($\mu\text{g/mL}$)	CIM Associação ($\mu\text{g/mL}$)	FIC Individual	FIC Índice (FICI)	Interpretação	Redução CIM %	% Redução de células viáveis ¹
LFBM 01	β -Lap + AMP	8,0/512	2,0/64	0,25/0,125	0,37	Sinérgica	75,0/87,5	84,33
	β -Lap + CIP	8,0/64	2,0/8,0	0,25/0,125	0,37	Sinérgica	75,0/87,5	91,76
	β -Lap + AMC	8,0/32	2,0/2,0	0,25/0,06	0,31	Sinérgica	75,0/93,7	76,36
	β -Lap + MER	8,0/32	2,0/4,0	0,25/0,125	0,37	Sinérgica	75,0/87,5	76,71
	β -Lap + CFO	8,0/256	4,0/0,5	0,5/0,001	0,50	Sinérgica	50,0/99,8	80,76
LFBM 26	β -Lap + AMP	16/512	4,0/64	0,25/0,125	0,37	Sinérgica	75,0/87,5	80,51
	β -Lap + CIP	16/64	4,0/0,5	0,25/0,007	0,25	Sinérgica	75,0/99,2	84,52
	β -Lap + AMC	16/64	0,5/2,0	0,03/0,03	0,06	Sinérgica	96,8/96,8	75,45
	β -Lap + MER	16/32	4,0/0,5	0,25/0,010	0,26	Sinérgica	75,0/98,4	81,52
	β -Lap + CFO	16/256	4,0/1,0	0,25/0,003	0,25	Sinérgica	75,0/99,6	82,02
LFBM 28	β -Lap + AMP	8,0/512	2,0/64	0,25/0,125	0,37	Sinérgica	75,0/87,5	82,21
	β -Lap + CIP	8,0/64	2,0/8,0	0,25/0,125	0,37	Sinérgica	75,0/87,5	85,55
	β -Lap + AMC	8,0/32	0,5/0,5	0,06/0,01	0,07	Sinérgica	93,7/98,4	78,96
	β -Lap + MER	8,0/16	2,0/1,0	0,25/0,06	0,31	Sinérgica	75,0/93,7	80,52
	β -Lap + CFO	8,0/128	4,0/1,0	0,5/0,007	0,50	Sinérgica	50,0/99,2	79,86
LFBM 33	β -Lap + AMP	32/128	8,0/16	0,25/0,125	0,37	Sinérgica	75,0/87,5	80,29
	β -Lap + CIP	32/64	8,0/8,0	0,25/0,125	0,37	Sinérgica	75,0/87,5	85,63
	β -Lap + AMC	32/16	1,0/2,0	0,03/0,125	0,15	Sinérgica	96,8/87,5	71,03
	β -Lap + MER	32/8,0	1,0/0,5	0,03/0,06	0,09	Sinérgica	93,7/93,7	82,36
	β -Lap + CFO	32/16	32/0,125	1,0/0,007	1,00	Indiferente	0/99,2	83,52
LFBM 34	β -Lap + AMP	16/256	4,0/32	0,25/0,125	0,37	Sinérgica	75,0/87,5	81,54
	β -Lap + CIP	16/64	8,0/4,0	0,5/0,06	0,56	Aditivo	50,0/93,7	82,56
	β -Lap + AMC	16/16	0,5/2,0	0,03/0,125	0,15	Sinérgica	96,8/87,5	81,53
	β -Lap + MER	16/16	4,0/0,5	0,25/0,03	0,28	Sinérgica	75,0/96,8	83,52
	β -Lap + CFO	16/128	8,0/2,0	0,5/0,01	0,50	Sinérgica	50,0/98,4	78,54

CIM: Concentração Inibitória Mínima; FIC: Concentração Inibitória Fracionada; AMC: Amoxicilina/ Ácid. Clavulânico; AMP: Ampicilina; CEF: Cefoxitina; CIP: Ciprofloxacina; MER: Meropenem; β -Lapachona; LFBM: Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Micro-organismos. % Redução de células viáveis¹: Associação da β -lapachona/ácid. clavulânico ½ e 1/16 respectivamente. E para as demais associações foi utilizada ½ da β -lapachona e 1/8 dos agentes antimicrobianos.

% Redução do CIM = (CIM individual – CIM associação) x 100

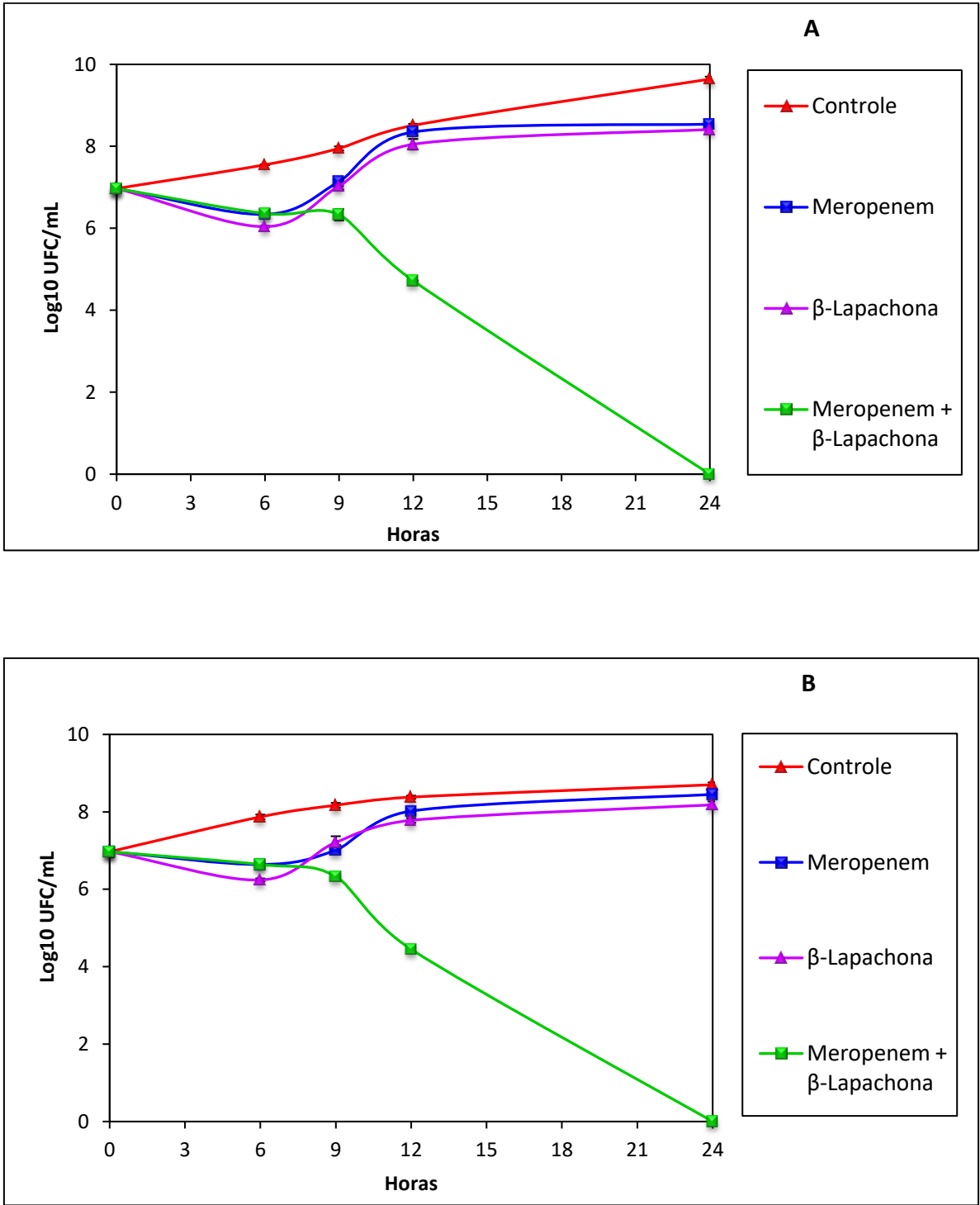
5.3 Cinética Bactericida

A viabilidade celular do *S. aureus* LFBM 01 e LFBM 26 após exposição a β -lapachona, meropenem e sua associação estão apresentados na Figura 7 A e 7 B.

Para o estudo da cinética bactericida, a β -lapachona foi associada ao meropenem carbapênemico que, no ensaio do tabuleiro de xadrez (**Checkboard**), mostrou uma redução acima de 80% da viabilidade celular.

Neste ensaio, a concentração de meropenem utilizada foi a de $\frac{1}{4}$ da CIM e a β -lapachona com a concentração de $\frac{1}{2}$ da CIM para as cepas de *S. aureus* LFBM 01 e LFBM 26. Esta combinação foi capaz de reduzir o crescimento das cepas LFBM 01 e LFBM 26 em 3,5 log₁₀ UFC/mL ao longo de 12h, quando comparado aos agentes antimicrobianos testados isoladamente. Estas culturas foram esterilizadas em 24h.

Figura 7 - Cinética bactericida da β -lapachona, meropenem e de sua associação frente a *Staphylococcus aureus* LFBM 01 (A) e *Staphylococcus aureus* LFBM 26 (B).



6. DISCUSSÃO

A ocorrência cada vez maior, especialmente em hospitais de cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes não só a meticilina, mas a uma gama de agentes antimicrobianos, incluindo a vancomicina, tem limitado o controle e dificultado a terapia (ANDERSSON., HUGHES., 2010).

Embora várias estratégias tenham sido propostas na tentativa de controlar a disseminação, a busca de novas formas de tratar infecções por MRSA estimula a investigação de compostos isolados naturais como alternativas de tratamento dessas infecções (HIRAMATSU *et al*, 2002).

A avaliação da atividade antimicrobiana realizada neste estudo só para *Staphylococcus aureus*, revelou que as naftoquinonas encontradas na espécie *T. avellanedae*, lapachol, e seus derivados possuem atividade antimicrobiana considerável. Estes resultados correspondem às primeiras observações sobre a ação antimicrobiana do lapachol, realizado por Oswaldo Gonçalves de Lima (1956).

No presente estudo, analisou-se ainda a capacidade do lapachol e seus derivados em inibir o crescimento de cepas de *Staphylococcus aureus* (MRSA). Os resultados revelaram que o lapachol e a α -lapachona não mostraram uma atividade antiestafilocócica tão eficaz quanto comparado a β -lapachona. A CIM para lapachol e α -lapachona variou de 64 a 512 $\mu\text{g/mL}$ enquanto a β -lapachona apresentou CIM que variou de 8,0 a 32 $\mu\text{g} / \text{mL}$. Estes resultados corroboram com os achados nos estudos de Gonçalves de Lima (1962), o qual registrou o primeiro estudo da atividade antimicrobiana dos derivados de lapachol isolados do extrato do cerne do Ipê Rôxo e de D'Albuquerque (1972), que demonstrou a atividade da β -lapachona contra cepas de micro-organismos Gram-positivos, entre eles *S. aureus*. Este fato, possivelmente acontece, porque nos estudos pioneiros do lapachol em comparação com seus isolados, observou-se que o extrato bruto do lapachol e seus derivados, apresentavam atividade maior que o lapachol puro e que a medida que se elevava o grau de pureza do lapachol diminuía-se progressivamente a atividade antimicrobiana do mesmo. Anos mais tarde, Guiraud e colaboradores (1994), também propôs comparar a atividade bactericida e fungicida tanto do lapachol como da β -lapachona e determinar sua concentração inibitória mínima. Os resultados confirmaram que a β -lapachona tem uma maior atividade antimicrobiana que o lapachol, o qual demonstrou forte atividade antifúngica.

Em relação aos agentes antimicrobianos, todas as cepas de *S. aureus*, mostraram serem resistentes principalmente aos antibióticos beta-lactâmicos.

As cepas de *S. aureus* LFBM 01, LFBM 26, LFBM 28 e LFBM 33, demonstraram resistência a todos os agentes antimicrobianos avaliados, incluindo fluoroquinolonas, aminoglicosídeos e carbapenêmicos. Esse perfil de resistência aos antimicrobianos direcionou a escolha dos micro-organismos para o estudo da interação entre a β -lapachona e agentes antimicrobianos.

Devido à falta de opções terapêuticas, alguns estudos têm focado a combinação de dois ou mais agentes antimicrobianos como um tratamento alternativo para doenças infecciosas causadas por micro-organismos multirresistentes (ADWAN *et al.*, 2008).

Combinações de β -lapachona e agentes antimicrobianos com suas respectivas CIM e concentrações sub-inibidoras apresentaram atividades sinérgicas com FICI $\leq 0,5$ para os cinco micro-organismos que apresentaram multirresistencia.

Este resultado demonstra que β -lapachona combinada com antimicrobianos beta lactâmicos, fluoroquinolonas e carbapenêmicos, agem sinergicamente inibindo cepas de *S. aureus* multirresistentes.

A cinética bactericida da associação de β -lapachona e meropenem avaliadas frente às cepas LFBM 01 e LFBM 26 de *S. aureus* multirresistentes, em combinações de $\frac{1}{2}$ para a β -lapachona e $\frac{1}{4}$ para o meropenem, nos mostrou que a associação dos antimicrobianos foi capaz de reduzir o crescimento das cepas de *S. aureus* LFBM 01 e LFBM 26 em $3,5 \log_{10}$ UFC/mL ao longo de 12h, esterilizando estas culturas em 24h. Este resultado confirma a atividade sinérgica apresentada no ensaio do tabuleiro de xadrez (**checkerboard**), demonstrando claramente que a associação de β -lapachona e meropenem foi capaz de reduzir o crescimento microbiano de forma mais eficaz que quando a droga foi testada isoladamente, como mostra o gráfico apresentado na Figura 7A e 7B.

Este efeito sinérgico provavelmente deve-se a capacidade das quinonas em induzir o estresse oxidativo através da formação intracelular de espécies reativas do oxigênio, como o Peróxido de Hidrogênio (H_2O_2), o ânion Superóxido (O_2^-) e o radical Hidroxila ($HO^\cdot$). Estes radicais promovem peroxidação de lipídios, destruição de proteínas e ácidos nucleicos, bem como quebra do DNA. Este é o mecanismo que interfere nas etapas bioquímicas vitais para a célula que no presente trabalho é uma célula procariota (THOMSON, 1997).

Além de fornecer uma fonte de radicais livres, as quinonas são conhecidas por formar complexos irversíveis com aminoácidos nucleofílicos nas proteínas, muitas vezes levando à inativação da proteína e perda de função. Por essa razão, as quinonas têm um efeito

antimicrobiano potente. As quinonas também podem tornar substratos indisponíveis para os micro-organismos (COWAN, 1999).

Os resultados obtidos neste trabalho revelam o potencial das associações de β -lapachona combinada com antimicrobianos beta lactâmicos, fluoroquinolonas e carbapenêmicos, em reverter o perfil de resistência dos *S. aureus* multirresistentes aos beta-lactâmicos e surgem como alternativas para o tratamento de doenças infecciosas causadas por esses micro-organismos, atualmente quase que intratáveis.

7. CONCLUSÃO

A avaliação da atividade antimicrobiana realizada neste estudo revelou que as naftoquinonas encontradas na espécie *T. avellanedae*, lapachol, e seus derivados possuem atividade antimicrobiana considerável, tendo na β -lapachona uma atividade significativamente maior quando comparado com o lapachol e a α -lapachona.

Todas as cepas de *S. aureus*, mostraram serem resistentes aos antimicrobianos avaliados, principalmente aos antibióticos beta lactâmicos.

Estes resultados demonstram que β -lapachona combinada com antimicrobianos, beta lactâmicos, fluoroquinolonas e carbapenêmicos com suas respectivas CIM e concentrações sub-inibidoras, para os cinco micro-organismos com perfil de multirresistência, apresentaram atividades sinérgicas, inibindo cepas de *S. aureus* multirresistentes.

A cinética bactericida da associação de β -lapachona e meropenem, avaliadas frente às cepas LFBM 01 e LFBM 26 de *S. aureus* multirresistentes confirmou a atividade sinérgica apresentada pelo **checkerboard method**, demonstrando claramente que a associação de β -lapachona e meropenem foi capaz de reduzir o crescimento microbiano de forma mais eficaz que quando a droga foi testada isoladamente.

Vários estudos devem ser realizados *in vivo* para estabelecer previamente seu uso clínico, principalmente em relação a possíveis falhas terapêuticas e efeitos de toxicidade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU, F. C.; FERRAZ, P. A. F.; GOULART, M. O. F. Some applications of electrochemistry. Emphasis on the correlation of electrochemical and bioactive properties. **J. Braz. Chem. Soc.**, v.13, n.1, p.19-35, 2002.
- ADWAN M.G, ABU-SHANAB A.B, ADWAN M.K. *In vitro* activity of certain drugs in combination with plant extracts against *Staphylococcus aureus* infections. **Pak. J. Med. Sci.** v.24, p.541-544, 2008.
- ALANIS, A. J. - Resistance to Antibiotics: Are We in The Post-Antibiotic Era. **Arch. Med. Res**, v. 36, p.607-705, 2005.
- ALMEIDA, E. R.; SILVA FILHO, A. A.; SANTOS, E. R.; LOPES, C. A. C.; Antiinflammatory action of lapachol. **J. Ethnopharmacol.**, v. 29, p. 239-241, 1990.
- AMEIDA MZ. Plantas Medicinais. 2ª Ed. Salvador, EDUFBA.2003
- ALMEIDA, E. R.; Preclinical and Clinical Studies of Lapachol and Beta-Lapachone. The open Natural Products Journal, v. 2, p. 43-47, 2009
- ÁLVAREZ-LERMA, F.; ALVAREZ, B.; LUQUE, P.; RUIZ, F.; J DOMINGUEZ-ROLDAN J. M.; QUINTANA, E.; SANZ-RODRIGUEZ, C. Empiric broad-spectrum antibiotic therapy of nosocomial pneumonia in the intensive care unit: a prospective observational study. **Crit. Care.**, v.3, p. 1-11, 2006.
- AN J., G.Y. ZUO, X.Y. HAO, G.C. WANG, Z.S. LI. Antibacterial and synergy of a flavanonol rhamnoside with antibiotics against clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **Phytomedicine**. v. 18, p. 990-993, 2011.
- ANDERSSON D. I., HUGHES D. Antibiotic resistance and its cost: is it possible to reverse resistance. **Nat Rev Microbiol.**, v.8, n.2, p. 60-71, 2010.
- ANESINI C.; PEREZ C. Screening of plants used in Argentine folk medicine for antimicrobial activity. **J. Ethnopharmacol.**, v.39, p. 119-128, 1993.
- ANG J. Y., EZIKE E., ASMAR B. I. Antibacterial resistance. **Symp Ser Soc Appl Microbiol.**, v.3, p. 229-39, 2004.
- AQIL, F.; KHAN, M. S. A; M. OWAIS, M; AHMAD, I. Effect of certain bioactive plant extracts on clinical of β -lactamase producing methicillin resistant *Staphylococcus aureus* **J. Basic. Microbiol.**, v. 45, p. 106-114, 2005
- BERGER-BACHIB; ROHRER S. Factors influencing methicillin resistance in *Staphylococci*. **Arch Microbiol.**, v.3, p. 165-171, 2002.
- BETONI, J.E.C; MANTOVANI R. P.; BARBOSA L.N.; STASI L.C.; JUNIOR. A. F. Synergism between plant extract and antimicrobial drugs used on *Staphylococcus aureus* diseases. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.**, v. 101, p. 387-390, 2006.

BLAZQUEZ J, BAQUERO MR, CANTON R, ALOS I, BAQUERO F. Characterization of a new TEM-type beta-lactamase resistant to clavulanate, sulbactam, and tazobactam in a clinical isolate of *Escherichia coli*. **Antimicrob Agents Chemother.**, v.37, n. 10, p. 2059–2063, 1993

BOMONO R. A., SZABO D. Mechanisms of multidrug resistance in *Acinetobacter* species, *Pseudomonas aeruginosa*. **Clin Infect Dis.**, v. 43, p. 49-56, 2006.

BRAGA, L.C., LEITE, A. A. M; XAVIER, K. G. S.; TAKAHASHI, J. A.; M.P. BEMQUERER M. P.; CHARTONE-SOUZA, E.; NASCIMENTO A. M. A. Synergic interaction between pomegranate extract and antibiotics against *Staphylococcus aureus*. **Can J. Microbiol.**, v. 51, p. 541-547, 2005

BRIGOTTI M., TAZZARI P. L., RAVANELLI E., CARNICELLI D., BARBIERI S., ROCCHI L., ARFILLI V., SCAVIA G., RICCI F., BONTADINI A., ALFIERI R. R., PETRONINI P.G., PECORARO C., TOZZI A. E., CAPRIOLI A. Endothelial damage induced by Shiga toxins delivered by neutrophils during transmigration. **J Leukoc Biol.**, v. 6, p. 715-20, 2010.

BRITES C, SILVA N, SAMPAIO-SÁ M. Temporal evolution of the prevalence of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in a tertiary hospital in Bahia, Brazil: a nine-year evaluation study. **Braz. J. Infect. Dis.**, v. 10, p. 235-238, 2006.

BURNETT, A.R.; THOMSON, R.H. Naturally occurring quinines. Part. X. Thequinoid constituents of *Tabebuia avellanedae* (Bignoniaceae). **J. Chem. Soc.**, p. 2100-2104, 1967

CAVALCANTI, S.M.M.; FRANÇA, E.R.; CABRAL, C.; VILELA, M.A.; MONTENEGRO, F.; MENEZES, D.; MEDEIROS, A.C.R. - Prevalence of *Staphylococcus aureus* introduced into intensive care units of a university hospital. **Braz. J. Infect. Dis.**, v. 9, n. 1, p. 56-63, 2005.

CASSETTARI, V. C.; STRABELLI, T.; MEDEIROS, E. A. S. *Staphylococcus aureus* bacteremia: what is the impact of oxacillin resistance on mortality ? **Braz. J. Infect. Dis.**, v. 9, n. 1, p. 70-6, 2005.

CHAMBERS HF.; DELEO FR.; Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 7, p. 629-641, 2009.

CLANCY K. W., MELVIN J. A., MCCAFFERTY D. G. Sortase transpeptidases: insights into mechanism, substrate specificity, and inhibition. **Biopolymers.**, v. 94, p. 385-96, 2010.

CLINICAL LABORATORY STANDARDS INSTITUTE-CLSI. **Approved standard M02-A10 e M07-A8:** performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests, v. 29, n. 3, 2010.

COLMAN DE SAIZARBITORIAT.; ANDERSON JE.; ALFONSO D.; MC LAUGHLIN JL. Bioactive furonaphthoquinones from *Tabebuia barbata* (Bignoniaceae). **Acta. Cient. Venez.**, v. 48, n. 1, p. 42-6, 1997.

- COWAN, M. N. Plant products as antimicrobial agents. **Clin Microbiol Rev.**, v. 12, p. 564-582, 1999.
- COURVALIN, P., GOLDSTEIN, F., PHILIPPON, A. & SIROT, J. **L'antibiogramme** 1 ed. V. 2 p. 199-215 Pans-Brussels. Mpc-Vigot, 1985.
- DARWISH, R. M.; ABURJAI, T.; AL-KHALIL, S.; MAHAFAZAH, A. Screening of antibiotic resistant inhibitors from local plant materials against two different strains of *Staphylococcus aureus*. **J. Ethnopharmacol.**, v. 79, p. 359-364, 2002.
- DA SILVA E. N J.; CAVALCANTI B. C.; GUIMARÃES T. T.; PINTO M. D. C.; CABRAL I. O.; PESSOA, C.; COSTA, L. V.; MORAES M. O.; ANDRADE C. K.; SANTOS M. R.; SIMONE C. A.; GOULART M. O.; PINTO A. V. Synthesis and evaluation of quinonoid compounds against tumor cell lines. **Eur J Med Chem.**, v. 46, p.399-410, 2010.
- D'ALBUQUERQUE, I.L. Termorreação da 2-hidróxi-3-(3-metil-2-butenil)-1,4-naftoquinona. **Rev. Inst. Antib.**, v.8, n. 1/2, p. 73 – 87, 1968.
- DEURENBERG R. H., STOBBERINGH E. E. The evolution of *Staphylococcus aureus*. **Infect Genet. Evol.**, v.8, n. 6/7, p. 47-63, 2008.
- DIEKEMA DJ.; PFALLER MA.; SCHMITZ FJ.; SMAYEVSKY J.; BELL J.; JONES RN. Survey of infections due to *Staphylococcus* species: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of isolates collected in the United States, Canada, Latin America, Europe, and the Western Pacific region for the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. 1997-1999. **Clin Infect Dis.**, v. 32, p. 114-132, 2001.
- DUARTE D.S.; DOLABELA M.F.; SALAS C.E.; RASLAN D.S.; OLIVEIRAS A.B.; NENNINGER A.; WIEDEMANN B.; WAGNER H.; LOMBARD J.; LOPES M.T. Chemical characterization and biological activity *Macfadyena unguis-cati* (Bignoniaceae). **J Pharm. Pharmacol.**, v. 52, n.3, p. 347-52, 2000.
- EBRAHIM, G. J. J. Bacterial resistance to antimicrobials. **Antimicrob. Agents Chemother.** v. 56, p.141-143, 2010.
- ENRIGHT, M.; DAY, N.; DAVIES, C.; PEACOCK, S.; SPRAT, B. Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*. **J. Clin. Microbiol.**, v. 38, p.1008-1015, 2000.
- ENRIGHT, M. C.; ROBINSON, D. A.; RANDLE G.; FEIL, E. J.; GRUNDMANN, H.; SPRATT, B. G. The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 99 , p.7687-7692, 2002.
- ELIOPOULOS, G. M. & MOELLERING, R. C., JR. Laboratory methods used to assess the activity of antimicrobial combinations. **Em Antibiotics in Laboratory Medicine**, 4th.ed. p.432–492. V. Lorian. Baltimore, MD: Williams & Wilkins. 1991.
- ESIMONE C.O, IROHA I.R, IBEZIM E.C, OKEH, C. O.; OKPANA, E. M. *In vitro* evaluation of the, interaction between tea extracts and penicillin G against *Staphylococcus aureus*. **Afr. J. Biotechnol.**, v. 5, p.1082-1086, 2006.

FONSECA, S. G. C.; BRAGA, R. M. C.; SANTANA, D. P. Lapachol chemistry, pharmacology and assay methods. **Rev. Bras. Farmacol.**, v. 84, p.9-16, 2003.

FRAZEE BW.; LYNN J.; CHARLEBOIS ED.; LAMBERT L.; LOWERY D.; PERDREAU REMINGTON F. High prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in emergency department skin and soft tissue infections. **Ann Emerg Med.**, v. 45, p. 311-320, 2005.

FREITAS C.C. O fenômeno da tolerância bacteriana aos antibióticos. **J Bras. Doenças Sex. Transm.**, v. 1, p. 103-108, 1989.

GOULART, M.O.F.; FALKOWSKI, P.; OSSOWSKI, T.; LIWO, A. Eletrochemical study of oxygen interaction with lapachol and its radical anions. **Bioelectrochem.**, v. 59, p.85-87, 2003.

GOEL, R. K.; PATHAK, N. K. R.; BISWAS, M.; PANDEY, V. B.; SANYAL, A. K. Effect of lapachol, a naphthaquinone isolated from *Tectona grandis*, on experimental peptic ulcer and gastric secretion. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 39, p. 138, 1987.

GRAÇA JB; AIRES LF. Segredos e virtudes das plantas medicinais. Lisboa: Seleções Reader's Digest, 1994.

GUIRAUD, P.; STELMAN, R.; CAMPOS-TAKAKI, G-M.; SEIGLE-MURANDI, F.; BUOCHBERG, M.S. Comparison of antibacterial and antifungal activities of Lapachol and β -lapachone. **Planta Med.**, p. 373-374, 1994.

HEMAISWARYA S, KRUTHIVENTI A.K, DOBLE M. Synergism between natural products and antibiotics against infectious diseases. **Phytomedicine**, v.15, p. 639 – 652, 2008.

HIRAMATSU, K.; KATAYAMA, Y.; YAZAWA, H.; ITO, T. Molecular genetics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Int. J. Med. Microbiol.**, v. 292, p. 67-74, 2002.

HOOKE, S. C. The Constitution of Lapachol and its Derivatives. The Structure of the Amylene Chain. **J. Chem. Soc.**, v.69, p.1355-1381, 1896.

HOOKE, S. C. The Constitution of Lapachic Acid (Lapachol) and Derivatives. **J. Chem. Soc.** v.61, p. 611-650, 1892.

HOOPER D. C. Pumps, nosocomial antibiotic resistance: a primer for hospital epidemiology. **Clin. Infect. Dis.**, v. 40, p. 1811-17, 2005.

HOIBY N.; BJARNSHOLT T.; GIVSKOV M.; MOLIN S.; CIOFU O. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. **Int. J. Antimicrob. Agents.**, v.35, p.322-32, 2010.

ITO C.; KATSUNOS.; KONDO Y.; TAN HT, FURUKAWA H. Chemical constituents of *Avicennia alba*. Isolation and structural elucidation of new naphthoquinones and their analogues. **Chem. Pharm. Bull (Tokyo)**, v. 48, n.3, p. 339-43, 2000.

ITO, T.; KATAYAMA, Y.; ASADA, K.; MORI, N. Structural comparison of three types of staphylococcal cassette chromosome *mec* integrated in the chromosome in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.45, p.1323-1336, 2001.

ITO T.; OKUMA K.; MA XX.; YUZAWA H.; HIRAMATSU K. Insights on antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* from its whole genome: genomic island SCC. **Drug Resist Updat.**, v. 6, p. 41-52, 2003.

ITO, T.; MA, X.X.; TAKEUCHI, F.; OKUMA, K.; YUZAWA, H.; HIRAMATSU, K. Novel type V staphylococcal cassette chromosome *mec* driven by a novel cassette chromosome recombinase, *ccrC*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 48, p. 2637-2651, 2004.

JACOBY G. A. Mechanisms of resistance to quinolones. **Clin Infect Dis.**, v. 4, p. 120-26, 2005.

JEVONS MP. Celbenin-resistant staphylococci. *Br Med J* , v. 1, p. 124-125, 1961.

KLEVENS R.M.; EDWARDS J.R.; RICHARDS C.L J.J. Estimating healthcare-associated infections and deaths in U.S. hospitals, **Public Health Rep.** v. 122, p. 60-66, 2007.

KONEMAN, E. W. Diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido. 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 1565, 2008.

KROGSTAD, D. J. & MOELLERING, R. C. Antimicrobial combinations. In *Antibiotics in Laboratory Medicine*, 2 ed., Lorian, V., Ed., p. 537-578. Baltimore Williams & Wilkins, 1986.

KUMAR S.M.; HACCURIA K, MICHIELS M, IEVEN M, POYART C, HRYNIEWICZ W, GOOSSENS H. Current Trends in Rapid Diagnostics for Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* and Glycopeptide - Resistant Enterococcus Species. **J. Clin. Microbiol.** v. 46, p. 1577-1587, 2008.

KUMAGAI, Y.; TSURUTAMI, Y.; SHINYASHIKI, M.; HOMMA-TAKEDA, S.; NAKAI, Y.; YOSHIKAWA, T.; SHIMOJO, N. Bioactivation of lapachol responsible for DNA scission by NADPH-cytochrome P450 reductase. **Environ. Toxicol. Pharmacol.**, v.3, p.245-250. 1997.

LIMA, O.G.; D'ALBUQUERQUE, I.L.; MACHADO, M.P. SILVA , E & PINTO, G.P. Primeiras observações sobre a ação antimicrobiana do lapachol. **Soc. Biol. de Pernambuco**, v. 14, n. 1/2, p 129 – 135, 1956.

LIMA, O.G.; D'ALBUQUERQUE, I. L., BORBA, A.P., MELLO, J.F. Substâncias antimicrobianas de plantas superiores. Comunicação XXV. Obtenção de Xi-loidona (Desidrolapachona) por transformação de Lapachol em presença de piridina, nova orto-naftoquinona natural isolada de extratos do cernedo “pau d’arco” roxo, *Tabebuia avellaneda* Lor. Ex Griseb. **Rev. Inst. Antib.**, v. 6, n 1/2, p. 23-34, 1962 A.

LIMA, O. G.; D'ALBUQUERQUE, I. L.; LIMA, C. G.; MAIA, M. H. D. Substâncias antimicrobianas de plantas superiores – Comunicação XX: atividade antimicrobiana de alguns derivados do lapachol em comparação com a xiloidona, nova orthonaftoquinona natural isolada

de extratos do cerne do Pau d'Arco rôxo, *Tabebuia avellanedae* Lor. Ex Griseb. **Rev. Inst. Antib.**, v. 4, n. 1/2, p. 03 – 17, 1962 B.

LIMA, O. G.; MACIEL, G. M.; OLIVEIRA, L.L. ; LACERDA, A .L.; MOREIRA, L. C.; MARTINS, D.G. Substâncias antimicrobianas de plantas superiores. Comunicação XXXVII. Atividade antimicrobiana e antineoplásica de Juglona (5-hidroxi-1,4-naftoquinona), Lapachol (2-hidroxi-3-(3-metil-2-butenil)-1,4-naftoquinona) e Plumbagina (2-metil-5-hidroxi-1,4-naftoquinona) e Lawsona (2-hidroxi-1,4-naftoquinona). **Rev. Inst. Antib.** v.12. n ½, p. 3-12. 1972.

LIMA, O.G., COELHO, J. S. DE B., D'ALBUQUERQUE, I. L., Mélo, J. F. DE, MARTINS, D. G., LACERDA, A. L., SUZA, M. A. de M.E. Substâncias antimicrobianas de plantas superiores. Comunicação XXXV. Atividade antimicrobiana e antitumoral de Lawsona (2-hidroxi-1,4-naftoquinona) em comparação com o lapachol (2-hidroxi-3-(3-metil-2-butenil)-1,4-naftoquinona). **Rev. Inst. Antib.**, v. 11, n. 1, p. 21-26, 1967.

LISBOA, T.; FARIA, M.; HOHER, J. A.; BORGES, L. A. A. Prevalência de infecção nosocomial em unidades de terapias intensivas do rio Grande do Sul. **RBT.** v. 19, p. 414-420. 2007

LORENZI, H.; MATOS, F .J .A. Plantas medicinais do Brasil: nativas e exóticas. Nova Odessa- SP: **Instituto Plantarum**. p.93-94, 2002.

LORIAN, V. **Antibiotics in laboratory medicine**, 4th.ed., Baltimore. Williams & Wilkins. p. 1238, 1996.

LÜBECK W. **O poder terapêutico do Ipê-Roxo**. São Paulo: Madras, p 124. 2001.

LUTZ, L.; MACHADO, A.; KUPLICH, N.; BARTH, A. L. Clinical Failure Of Vancomycin Treatment of *Staphylococcus aureus* Infection In A Tertiary Care Hospital In Southern Brazil. **Braz. J. Infect. Dis.**, v.7, p. 224-228, 2003.

MACHADO, T. B.; PINTO, A. V.; PINTO, M. C. F. R.; LEAL, I. C. R.; SILVA, M. G.; AMARAL, A. C. F.; KUSTER, R. M.; NETTO, K.S.R. In vitro activity of Brazilian medicinal plants, naturally occurring naphthoquinones and their analogues, against methicillin-resistant. *Staphylococcus aureus*. **Int. J. Antimicrob. Agents**, v. 21, p .279-284, 2003.

MAKIN, G.; DIVE, C.; **Trends Cell Biol.** V.11, p.22- 24. 2001.

MALTA, V. R. S. **Estudos cristalográficos de naftoquinonas e seus derivados e cálculos teóricos de propriedades relevantes na relação estrutura-atividade**.2000. Tese (Doutorado em Físico-Química). Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos- São Paulo.

MAHLER R. H.; LORDES H. E.; Biological Chemistry, 2 ed.; Herper International Edition: London, 1971.

MIN L. I., YUPING L., AMER E. V., DAVID J. C., DANIEL E. S., MICHAEL O. Gram Positive Three-component Antimicrobial Peptide-sensing System. **PNAS.**, v.104, n. 94, p. 69-74, 2007.

MIRANDA, F. G. G.; VILAR, J. C.; ALVES, I. A. N.; CAVALCANTI, S. C. H.; ANTONIOLLI, A. R. Antinociceptive and antiedematogenic properties and acute toxicity of *Tabebuia avellanedae* bark aqueous extract. **BMC Pharmacol.**, v. 1, n. 1, p. 6-15, 2001.

MOURA, K. C. G.; EMERY, F. S.; NEVES-PINTO, C.; PINTO, M. C. F. R.; DANTAS, A. P.; SALOMÃO, K.; DE CASTRO, S. L.; PINTO, A. V.; Synthesis and trypanocidal activity of naphthoquinones isolated from *Tabebuia* and heterocyclic derivatives. A review from an interdisciplinary study. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 12, p. 325-338, 2001.

MORAN GJ.; KRISHNADASAN A.; GORWITZ RJ; FOSHEIM GE.; McDUGAL LK.; CAREY RB, Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections among patients in the emergency department. **N Engl J Med.**, v. 7, p. 666-674, 2006.

MURASE Y., MAEDA S., YAMADA H., OHKADO A., CHIKAMATSU K., MIZUNO K., KATO S., MITARAI S. Clonal Expansion of Multidrug-Resistant and Extensively Drug-Resistant Tuberculosis. **Japan. Emerg. Infect. Diseases.**, v. 6, n. 6, p. 948-54, 2010.

MURRAY, K. R.; GRANNER, D. K., MAYES, P. A.; RODWELL, V. W. **Harper's Illustrated Biochemistry**. 26^a ed. 2003.

NAGATA, K.; HIRAI, K-I.; KOYAMA, J.; WADA, Y.; TAMURA, T. Antimicrobial activity of novel furanonaphthoquinone analogs. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.42, n.3, p.700-702, 1998.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Leningher Principles of Biochemistry**. 4^a ed. W. H. Freeman. 2004.

OLIVEIRA A. C, SILVA R. S. Desafios de cuidar em saúde frente à resistência bacteriana: uma revisão. **Rev. Elet. Enferm.**, v.10, p. 189-197, 2008.

OLIVEIRA DC; TOMAZ A; DE LENCASTRE H. Secrets of success of a human pathogen: molecular evolution of pandemic clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Lancet Infect Diseases**. v. 2, p. 180-189, 2002.

PANIZZA S. **Plantas que curam**. 24^a ed. São Paulo: Ibrasa, p. 126-127, 1997.

PATERNIO, E. Ricerche Sull Acido Lapacico. **Gazz. Chim. Ital.**.v.12, p.337-392, 1882.

PEREIRA M. S. V.; SIQUEIRA-JÚNIOR J. P., TAKAKI G. M. C. Elimination of resistance to drugs by fluoroquinolones in bovine strains of *Staphylococcus aureus*. **Pesq Vet Bras.**, v. 24, p. 11-14, 2004.

PINTO, A. V.; PINTO, M. C. F. R.; LAGROTA, M. H. C.; WIGG, M. D.; AGUIAR, A. N. S.; **Rev. Lat. Amer. Microbiol.**, v.29 p.15, 1987.

PICAO R, SADER H, JONES R. Analysis of resistance and vancomycin “reverse creep” in Latin American *Staphylococcus aureus*: ten-year report of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-2006). **Clin. Microbiol. Infect.**, v. 14, p.173, 2008.

PORTELA, M. P. M.; VILLAMIL, S. H. F.; STOPPANI, A. O. M. Redox cycling of o-naphthoquinone in trypanosomatids. **Biochem. Pharmacol.**, v. 52, p. 1875, 1996.

PORTILLO, A.; VILA, R.; FREIXA, B.; ADZET, T.; CAÑIGUERAL, S. Antifungal activity of Paraguayan plants used in traditional medicine. **J. Ethnopharmacol.**, v.76, p.93-98, 2001.

RAVAT F., LE-FLOCH R., VINSONNEAU C., AINAUD P., BERTIN-MAGHIT M., CARLIN H., PERRO G. Antibiotics and the burn patient. **SFETB .Burns.** v. 5, p. 20510-518. 2010.

RIFFEL, A.; MEDINA, L. F.; STEFANI, V.; SANTOS, R. C.; BIAZINI, D.; BRANDELLI, A. In vitro antimicrobial activity of a new series of 1,4 – naphthoquinones. **Braz. J. Med. Bras. Res.**, v.35, n.7, p.811-818, 2002.

ROBERT, S.; CHAMBERS, S. Diagnosis and management of *Staphylococcus aureus* infections of the skin and soft tissue. **Intern. Med. J.**, v. 35, p. 97-105, 2005.

ROLAIN J. M., RAULT D. Genome comparison analysis of molecular mechanisms of resistance to antibiotics in *Richettsia* genus. **Ann N Y Acad Sci.**, v. 1063, p. 222-30, 2005.

ROSSI F.; GARCIA P; RONZON B.; CURCIO D.; DOWZICKY MJ. Rates of antimicrobial resistance in Latin America (2004-2007) and in vitro activity of the glycylicycline tigercycline and of other antibiotics. **Braz j Infect Dis.**, v. 12, p. 405-415, 2008.

SABAT, A.; MELLES, D.C.; MARTIROSIAN, G.; GRUNDMANN, H.; VAN BELKUM, A.; HRYNIEWICZ, W. Distribution of the serine-aspartate repeat 125 protein-encoding sdr genes among nasal-carriage and invasive *Staphylococcus aureus* strains. **J Clin Microbiol.**, v. 44, p.1135-1138, 2006.

SAGRERO-NIEVES, L. Isolation of lapachol from *Diphysa robinoides*. **J. Natur. Products**, v. 49, n. 3, p. 547, 1986.

SALES, J .A. L.; DAVID, C. D.; HATUM, R.; SOUZA, P. C. S. P.; JAPIASSÚ, A.; PINHEIRO, C. T. S.; FRIEDMAN, G.; SILVA, O. B.; DIAS, M. D.; KOTERBA, E.; DIAS, F. S.; PIRAS, C.; LUIZ, R .R. – Sepsis Brasil: Estudo Epidemiológico da Sepsis em Unidades de Terapia Intensiva Brasileiras. **Rev. Bras. Ter. Intensiva.**, v.18, n.1, p. 9-17, 2006.

SANTOS, A. L.; SANTOS, D. O.; FREITAS, C. C.; FERREIRA, B. L. A.; AFONSO, I. F.; RODRIGUES, C. R.; CASTRO, H. C. *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, v. 43, p. 413-423, 2007.

SANTOS A. F.; FERRAZ, P. A. L.; PINTO, A. V.; PINTO, M. C. F.R.; GOULART, M. O. F.; SANT’ANA, A. E. G. Molluscicidal activity of 2-hydroxy-3-alkyl-1,4-naphthoquinones and derivatives. **Int. J. Parasitol.**, v. 30, p. 1199-1202. 2000.

SANTANA C. F.; DE LIMA O. G.; D'ALBUQUERQUE I. L.; LACERDA A. L.; MARTINS D. G.; Observações sobre as propriedades antitumorais e toxicológicas do extrato do líber e de alguns componentes do cerne do Pau d'arco (*Tabebuia avellanedae*). **Rev. Inst. Antibiot.**, v.8 (1/2), p.89–94,1968.

SEPUTIENE V., POVILONIS J., ARMALYTE J., SUZIEDELIS K., PAVILONIS A., SUZIEDELIENE E. Tigecycline - how powerful is it in the fight against antibiotic resistant bacteria? **Medicina (Kaunas)**, v. 53, p. 152-55, 2010.

STEFANI S.; VARALDO PE., Epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococci* in Europe. **Clin. Microbiol infect.**, v. 9, p. 1179-1186, 2003.

SHETGIRI N. P, KOKITKAR S. V, SAWANT S. N. Radermachera xylocarpa: the highly efficient source of lapachol and synthesis of its derivatives. **Acta Pol Pharm.**, v. 58. n. 2, p. 133-135, 2001.

SHELBURNE, S. A; MUSER, D. M.; HULTEN, K.; CEASAR, H.; LU, M. Y.; BHAILA, I.; HAMILL, R. J. In vitro killing of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with drug combinations. **Antimicrob. Agents. Chemother.**, v. 48, n. 48, p. 4016-4019, 2004.

SHELDON, A. T. Antibiotic resistance: a survival strategy. **Clin. Lab. Sci.**, v. 18, p. 170–180, 2005.

SILVA, M. N.; FERREIRA, V. F.; SOUZA, M. C. B. V. Um panorama atual da química e da farmacologia de naftoquinonas, com ênfase na β -lapachona e derivados. **Quim. Nova**, v. 26, n.3, p. 407-416, 2003.

SILVA, J. L.; MESQUITA, A. R. C.; XIMENES, E. A. In vitro synergic effect β -lapachone and isoniazid on the growth of *Mycobacterium fortuitum* and *Mycobacterium smegmatis*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 4, p. 580-582, 2009.

STEINERT, J.; KHALAF, H.; RIMPLER, M. High-permormance liquid chromatographic separation of some naturally occurring naphthoquinones and anthraquinones. **J. Chromatogr.**, v.723, p.206-209, 1996.

TAYLOR, L. The Healing Power of Rainforest Herbs. **Net**, 2005. Disponível em: <<http://www.rain-tree.com/paudarco.htm>> Acesso em 03/02/2006.

TEIXEIRA, M. J.; DE ALMEIDA, Y. M.; VIANA, J. R.; HOLANDA FILHA, J. G.; RODRIGUES, T. P.; PRATA, J. R. C. JR.; COELHO, I. C. B.; RAO, V. S.; POMPEU, M. M. L. *In vitro* and *in vivo* Leishmanicidal activity of 2-hydroxy-3-(3-methyl-2-butenyl)-1,4-naphthoquinone (lapachol) **Phytoter. Res.**, v.15, p. 44-48, 2001.

TENOVER, F.C.; WEIGEL, L. M.; APPELBAUM, P. C.; MCDOUGAL, L. K.; CHAITRAM, J.; MCALLISTER, S.; CLARK, N.; KILLGORE, J.; O'HARA, C. M.; JEVITT, L.; PATEL, J. B.; BOZDOGAN; B. Vancomycin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolate from a Patient in Pennsylvania. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 48, p. 275-280, 2004.

THOMSON, R. H. EM *Naturally Occurring Quinones*; Academic Press: NewYork, 1971.

THOMPSON, R. H. Em *Naturally Occuring Quinones IV: Recents Advances*; Champman & Hall: London, 1997.

TRABULSI L. R., ALTHERTHUM F. **Microbiologia**. 4ª ed. São Paulo: Atheneu, 2005.

TORTORA, G. J., FUNKE R. B., CASE C. L **Microbiologia**. 6ª ed. Atheneu, 2005.

TRABULSI, L.R. - **Microbiologia**. 4ª ed. Atheneu, 2005.

VIGANOR L. S.; ARAÚJO M. T.; SANTOS K. R. N.; NUNES A. P. F. Evaluation of the synergistic potential of vancomycin combined with other antimicrobial agents against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative *Staphylococcus spp* strains. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 106, n.1, p. 44-50, 2011.

WHITENER, C. J.; PARK, S. Y.; BROWNE, F. A; PARENT, L. J.; JULIAN, K.; BOZDOGAN, B.; APPELBAUM, P. C.; CHAITRAM, J.; WEIGEL, L. M.; JERNIGAN, J.; MCDOUGAL, L. K.; TENOVER, F. C.; FRIDKIN, S. K. Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* in the absence of vancomycin exposure. **Clin. Infect. Dis.**, v. 38, p. 1049-1055, 2004.

WORLD HEATLH ORGANIZATION (WHO). **Net**, 2007. Health, Geneve: Site do WHO, Disponível em: < <http://www.who.int/en>> Acesso em maio de 2007.