UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

TALITA GOMES CALAÇA MENEZES

AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE ANTI-MRSA DE VANCOMICINA ENCAPSULADA EM LIPOSSOMAS E DO SINERGISMO COM ÁCIDO ÚSNICO E β-LAPACHONA

RECIFE, 2014

TALITA GOMES CALAÇA MENEZES

AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE ANTI-MRSA DE VANCOMICINA ENCAPSULADA EM LIPOSSOMAS E DO SINERGISMO COM ÁCIDO ÚSNICO E β-LAPACHONA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas, na área de Produção e Controle de Medicamentos.

Orientadora: Prof.ª Dr.ª Maria Nelly Caetano Pisciottano
Co-orientadora: Prof.ª Dr.ª Nereide Stela Santos Magalhães

RECIFE, 2014

Ficha catalográfica elaborada pela
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4-1010

M543a Menezes, Talita Gomes Calaça.
Avaliação in vitro da atividade anti-mrsa de vancomicina encapsulada em lipossomas e do sinergismo com ácido úsnico e β-lapachona / Talita Gomes Calaça Menezes. – Recife: O autor, 2014.
68 f.: il.; tab.; 30 cm.

Orientadora: Maria Nelly Caetano Pisciottano.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2014.
Inclui referências e apêndices.

1. Staphylococcus aureus resistente à meticilina. 2. Lipossomas. 3. Vancomicina. 4. Sinergismo. 5. Ação antimicrobiana. I. Pisciottano, Maria Nelly Caetano (Orientadora). II. Título.

615.3 CDD (23.ed.) UFPE (CCS2014-216)

TALITA GOMES CALAÇA MENEZES

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE VANCOMICINA ENCAPSULADA EM LIPOSSOMAS E AVALIAÇÃO DE SINERGISMO COM ÁCIDO ÚSNICO E β-LAPACHONA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em: 17/03/2014

BANCA EXAMINADORA

Prof.ª Drª. Maria Nelly Caetano Pisciottano (Orientadora)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof.ª Drª. Maria Amélia Vieira Maciel (Examinadora Externa)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof.ª Drª. Noemia Pereira da Silva Santos (Examinadora Externa)
Universidade Federal de Pernambuco/CAV

Dedido aos meus pais, pelo imenso amor a mim dedicado e pelas lições de vida. Embora longe dos meus olhos, vocês sempre serão minha inspiração e meu exemplo!

AGRADECIMENTOS

Agradeço a **Deus**, pelo amor que tem me dado desde muito antes de eu nascer, pelas incontáveis bênçãos e pelo apoio e conforto nos momentos no qual meu coração mais necessitou.

Aos meus amados **pais**, pelo amor, exemplo, dedicação para com a família, orientações, formação e apoio incondicional. Tenho certeza que minhas vitórias são fruto das vossas ações (passadas *e presentes*) e sentimentos por mim!

Às minhas queridas **irmãs**, pelo imenso amor e companheirismo bem como pelo grande apoio dado no decorrer deste mestrado – Tatiane, pelo apoio científico essencial em diversos momentos, e Tamires, pelas importantes contribuições nas atividades de bancada no LIKA.

Aos meus amados **amigos** Keldiane, Iasmine, Rafaela, Jéssika, Andrezza, Weverton e Lumena pelo carinho, apoio e confiança a mim sempre concedidos.

Ao meu **namorado** Flávio, pelo amor, paciência e incentivo durante as dificuldades que enfrentei no decorrer dos últimos dois anos, bem como aos seus queridos pais.

À **CAPES,** pelo apoio financeiro.

À **Universidade Federal do Pernambuco** por ter viabilizado a concretização deste objetivo.

À profª Dra. **Nereide Stela Santos Magalhães**, por ter me concedido a oportunidade de fazer parte do grupo de pesquisa SLC, pelos direcionamentos científicos, pelos conhecimentos transmitidos e pelos conselhos.

À profª Dra. **Maria Nelly Caetano Pisciottano**, pela preocupação para com a formação profissional dos seus alunos, pelas orientações dadas, pelos conhecimentos compartilhados e pelas cordiais conversas.

À profª Dra. **Isabella Macário Ferro Cavalcanti**, pela imensa dedicação a este projeto, pelos conhecimentos compartilhados, pelo exemplo de profissional, pela amizade, pelos conselhos doados e pelo enorme apoio na última fase deste projeto – incluindo finais de semanas e até mesmo em situações nas quais a saúde contigo não estava.

Aos **colegas e amigos do grupo SLC** pelo apoio constante nas diversas fases do desenvolvimento deste projeto, em especial às minhas queridas amigas e parceiras de trabalho e das emoções de mestrado Cássia, Marcela e Laís e aos doutorandos Rafaela, Lina, Círia, Milena, Fábio, Sarah, Rebecca, Camila e Jauro. Agradeço também aos alunos de Iniciação Científica, os quais me deram precioso suporte no decorrer desta jornada. Foi um prazer conhecer, trabalhar e aprender com todos vocês! Ao sair do grupo SLC levarei comigo um grande carinho por vós!

Aos **demais amigos** que adquiri no decorrer deste projeto, em particular à Tarcyla, Danilo e Jéssica.

Aos **alunos de Iniciação Científica** do Laboratório de Microbiologia da UFPE – Campus Vitória, em especial à Huana, Rosélia e Roberta, pela presteza e dedicação com as quais sempre me auxiliaram nas minhas atividades de bancada.

Aos **docentes** do programa de pós-graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF), pelos ensinamentos transmitidos no decorrer dos últimos dois anos.

Aos **técnicos do LIKA** Rafael, seu Otaviano, Moisés e Felipe, pela atenção que sempre tiveram em nos apoiar diariamente e solucionar os eventuais percalços.

Aos **colegas do Laboratório de Análises Microbiológica**s: Danilo, Ricardo, Felipe, Charles e Edna, pelo acolhimento e apoio.

Aos **demais familiares, amigos** e **conhecidos** pela confiança, carinho e apoio.

RESUMO

O surgimento e disseminação de bactérias multirresistentes consistem em relevantes problemas de saúde pública. Infecções ocasionadas por *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA) multirresistente podem apresentar elevada morbimortalidade. Considerando que a vancomicina consiste no fármaco referência da terapêutica de infecções por MRSA multirresistentes, ela deve ser alvo de estudos que visem a melhoria da sua eficácia. Nesse âmbito, moléculas de origem naturais como o ácido úsnico (AU) e a β-lapachona (β-lap) possuem ação antimicrobiana frente a *S. aureus*. Por outro lado, a encapsulação de fármacos em sistemas nanoestruturados apresenta diversas vantagens decorrentes da liberação controlada do fármaco, dentre as quais aumento da eficácia e diminuição de toxicidade. O objetivo deste estudo consistiu em formular e caracterizar lipossomas contendo vancomicina (VAN-lipo), avaliar a atividade antimicrobiana frente a isolados clínicos de MRSA e verificar o sinergismo com AU e β-lap. Os lipossomas contendo vancomicina foram obtidos pelo método modificado de desidratação-reidratação. Os ensaios de susceptibilidade microbiana foram realizados por microdiluição em caldo de acordo com o *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI). Para avaliar o sinergismo entre as moléculas livres e os lipossomas foram utilizados o método *checkerboard* e o teste epsilométrico modificado (E-test). Os VAN-lipo apresentaram tamanho de partícula de 136 ± 0,246 nm e eficiência de encapsulação de 36,15 %. Os resultados obtidos sugerem que a interação *in vitro* entre VAN e AU é do tipo aditiva (FICI = 0,515), porém, a encapsulação do AU em lipossomas (AU-lipo) acarretou em sinergismo com a VAN (FICI = 0,276). A interação entre VAN e β-lap foi sinérgica (FICI = 0,453) e a encapsulação da β-lap em lipossomas melhorou o nível da interação com VAN (FICI = 0,358). β-lap e AU também apresentaram interação do tipo sinérgica. Os ensaios de sinergismo empregando o método E-test reproduziram os resultados obtidos com o método *checkerboard* em cerca de 82% dos ensaios. O presente estudo demonstrou que a VAN combinada com AU-lipo ou com β-lap ou β-lap-lipo inibe sinergicamente isolados MRSA multirresistentes. Diante disto, conclui-se que a β-lap e o AU, assim como os lipossomas contendo estas moléculas, podem ser importantes promotores da melhoria da atividade antibacteriana da vancomicina, com potencial aplicação na terapêutica de infecções por MRSA multirresistentes.

Palavras-chave: Staphylococcus aureus resistente à meticilina. Lipossomas. Vancomicina. Sinergismo. Ação antimicrobiana.

ABSTRACT

The emergence and spread of multidrug-resistant bacteria is a important public health problem. In this framework, infections caused by multiresistant methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) may have a high morbidity and mortality. Taking into account that vancomycin is the reference drug to MRSA treatment; it should be the target of studies aimed at improving its effectiveness. Based on these findings, natural origin molecules such as usnic acid (UA) and β-lapachone (β-lap) have antimicrobial activity against *S. aureus*. Moreover, the encapsulation of drugs in nanostructured systems presents several advantages such as controlled drug release, increased efficacy and decreased toxicity. The aim of this study was thus to formulate and to characterize liposomes containing vancomycin (VAN-lipo), evaluate the antimicrobial activity against MRSA clinical isolates and, finally and check the synergism with AU and β-lap. Liposomes containing vancomycin were obtained using a modified dehydration-rehydration method. Microbial susceptibility assays were performed by broth microdilution technique according to the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). The synergism between vancomycin and molecules pure and encapsulated into liposomes was evaluated using the checkerboard method and modified epsilométrico test (E-test). VAN-lipo had a mean diameter particle size of 136.4±0.246 nm and a drug encapsulation efficiency of 36.15 ± 0.26 %. Results suggest an additive type of interaction between VAN and AU (FICI = 0.515). However, the encapsulation of AU into liposomes (AU-lipo) resulted in synergism with VAN (FICI = 0.276). The interaction between VAN and β-lap was synergistic (FICI = 0.453) and β-lap-lipo incresed the interaction level with VAN (FICI = 0.358). A synergistic interaction type between β-lap and AU was also found. E-test reproduced the results obtained with checkerboard method in approximately 82% of the trials. The present study demonstrated that VAN combined with AU-lipo or β-lap and β-lap-lipo synergistically inhibited multiresistant MRSA clinical isolates. In view of this, it is concluded that β-lap and the AU, as well as liposomes containing these molecules, may be important in promoting improved antibacterial activity of vancomycin, with potential application in multiresistant MRSA infections treatment.

Keywords: Methicillin-resistant Staphylococcus aureus. Liposome. Vancomycin. Synergism. Antimicrobial action.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

REVISÃO DA LITERATURA

Figura 1 – Estrutura química da vancomicina 18

Figura 2 – Mecanismo de ação da vancomicina 21

Figura 3 – Síntese da parede celular por *Staphylococcus aureus* e mecanismo de resistência à meticilina 23

Figura 4 – h-VRSA e sua relação com a resistência de *Staphylococcus aureus* à vancomicina 23

Figura 5 – Possível mecanismo de resistência de *S. aureus* à vancomicina 25

Figura 6 – Estrutura química do (±) ácido úsnico 30

Figura 7 – Estrutura química da β-lapachona 33

ARTIGO

Figura 1 – Estrutura química da (A) vancomicina, (B) ácido úsnico e (C) β-lapachona 37

APÊNDICE

APÊNDICE A – Esquema do método *checkerboard* 67

APÊNDICE B – Esquema do teste epsilométrico (E-test) modificado 68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Susceptibilidade de isolados clínicos de *Staphylococcus aureus* à VAN, VAN-lipo, AU e AU-lipo. 45

Tabela 2 - Interação *in vitro* de VAN e VAN-lipo com AU, AU-lipo, β-lap ou β-lap-lipo frente a isolados clínicos de MRSA. 47

Tabela 3 - Interação *in vitro* entre β-lapachona e ácido úsnico livres e encapsulados em lipossomas frente a isolados de MRSA. 50

Tabela 4 - Interação *in vitro* entre VAN e AU, AU-lipo, β-lap ou β-lap-lipo utilizando o método E-test modificado. 52

.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AU	Ácido úsnico
ATCC	Coleção Norte-Americana de Culturas *(American Type Culture Collection)*
FICI	Índice da Concentração Inibitória Fracionária *(Fractional Inhibitory Concentration Index)*
CLSI	Instituto de Padronização Clínica e Laboratorial *(Clinical and Laboratory Standards Institute)*
CMI	Concentração Mínima Inibitória
CMB	Concentração Mínima Bactericida
EROs	Espécies reativas de oxigênio
E-test	Teste epsilométrico *(Epsilometer test)*
GISA	*Staphylococcus aureus* com Resistência Intermediária aos Glicopeptídeos (*Glycopeptide Intermediate Staphylococcus aureus*)
h-VRSA	*Staphylococcus aureus* com Resistência Heterogênea à Vancomicina (*Vancomycin-Heteroresistant Staphylococcus aureus*)
LUV	Vesículas Grandes Unilamelares (*large unilamellar vesicles*)
MH	Mueller-Hinton
MRSA	*Staphylococcus aureus* Resistente à Meticilina (*Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus*)
PBP	Proteína Ligadora de Penicilina (*Penicillin Binding Protein*)
SUV	Vesículas Pequenas Unilamelares (*Small Unilamellar Vesicle*)
UFC	Unidades Formadoras de Colônia
UV	Ultravioleta
VAN	Vancomicina
VISA	*Staphylococcus aureus* com Resistência Intermediária à Vancomicina *(Vancomycin Intermediate Staphylococcus aureus)*
VRSA	*Staphylococcus aureus* Resistente à Vancomicina *(Vancomycin Resistant Staphylococcus aureus)*
VSSA	*Staphylococcus aureus* Sensível à Vancomicina *(Vancomycin Susceptible Staphylococcus aureus)*
β-lap	β-lapachona

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 13
2. REVISÃO DA LITERATURA 15
2.1 *Staphylococcus aureus* 15
2.2 Vancomicina 17
2.3 Resistência de *S. aureus* a antimicrobianos 21
2.4 Lipossomas 26
2.5 Ácido Úsnico 29
2.6 β-lapachona 32
2.7 Sinergismo 34
3. OBJETIVOS 35
3.1 Objetivo Geral 35
3.2 Objetivos Específicos 35
4. AVALIAÇÃO IN VITRO DA ATIVIDADE ANTI-MRSA DE VANCOMICINA ENCAPSULADA EM LIPOSSOMAS E DO SINERGISMO COM ÁCIDO ÚSNICO E β-LAPACHONA 36
5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS 58
REFERÊNCIAS 60
APÊNDICE 67
APÊNDICE A - Esquema do método *checkerboard* 67
APÊNDICE B - Esquema do teste epsilométrico (E-test) modificado. 68

1. INTRODUÇÃO

Desde sua introdução na prática clínica, os antibióticos tem salvado uma quantidade enorme de vidas. Apesar disto, as doenças infecciosas continuam sendo um dos maiores desafios da área da saúde em todo o mundo, em virtude do desenvolvimento de resistência por parte dos microrganismos aos agentes antimicrobianos atualmente disponíveis, o qual tem limitado as possibilidades terapêuticas das infecções (LAUTERWEIN et al. 1995; DRULIS-KAWA; DOROTKIEWICZ-JACH, 2010; HUH; KWON, 2011). Apesar dos esforços contrários por parte da comunidade científica, a multiplicação e disseminação de bactérias multirresistentes estão aumentando (ZIZOVIC et al., 2012).

Diante disto, diversos pesquisadores tem empreendido esforços para desenvolver ou descobrir novas substâncias com atividade antimocrobiana, especialmente a partir de produtos de origem natural empregados na medicina tradicional, como o acido úsnico (AU) e a β-lapachona (β-lap) (LAUTERWEIN et al., 1995; INGÓLFSDÓTTIR et al., 2002; MACEDO et al., 2013). Outros estudos, no entanto, focam outra vertente: melhorar antibióticos atualmente disponíveis na clínica, alterando, por exemplo, sua apresentação. Os nanocarreadores, devido às suas características físico-químicas peculiares, tem se destacado como potenciais ferramentas para melhoria de algumas propriedades de fármacos já conhecidos. Em diversos casos se tem observado que o uso de carreadores em escala nanométrica tem tanto possibilitado o aumento da atividade de antibióticos, quanto melhorado as propriedades farmacocinéticas destes fármacos, além de minimizar seus efeitos adversos. Apesar disto, estudos no campo da nanotecnologia aplicada a antimicrobianos são ainda relativamente recentes e restritos, devendo ser mais explorados (DRULIS-KAWA; DOROTKIEWICZ-JACH, 2010; HUH; KWON, 2011; CHAKRABORTY et al., 2012).

Staphylococcus aureus é um dos principais patógenos humanos e atualmente grande parte dos isolados de *S. aureus* são resistentes a diversas classes de antibióticos (YAMACHIKA et al., 2012). Deste modo, em decorrência da sua relevância clínica como principal antibiótico utilizado no tratamento de infecções por *Staphylococcus aureus* Resistentes à Meticilina (MRSA) multirresistentes, a vancomicina (VAN) tem sido alvo de diversos estudos que visam a melhoria da sua atividade antimicrobiana – inclusive utilizando nanocarreadores (PUMERANTZ et al., 2011; SANDE et al., 2012).

Dentre os problemas relacionados à VAN estão reações adversas associadas ao seu uso, bem como o surgimento de cepas com resistência intermediária ou total a este antibiótico (CEVHER et al., 2006; HOWDEN et al., 2010; HOWDEN; PELEG; STINEAR, 2014). Adicionalmente, de acordo com Giandalia et al. (2001), em virtude deste glicopeptídeo na sua

forma de cloridrato apresentar boa solubilidade em água, a administração única de soluções aquosas deste antibiótico resultaria em flutuações da sua concentração; consequentemente, é necessário administrar o fármaco de modo mais frequente.

Deste modo, visando aumentar a segurança e eficácia do uso da VAN, torna-se necessário o desenvolvimento de uma formulação que atenue ou anule seus efeitos adversos e, ao mesmo tempo, aprimore suas propriedades farmacocinéticas e sua atividade antimicrobiana contra MRSA multirresistente, limitando, consequentemente, um possível surgimento de novos isolados resistentes à VAN.

Além disso, a associação de substâncias com propriedades antimicrobianas consiste em outra importante ferramenta para a prevenção/tratamento de infecções por bactérias resistentes, uma vez que a terapia combinada pode ajudar a prevenir a seleção de isolados resistentes, além de elevar o espectro de ação dos antimicrobianos e promover sinergismo entre estes (JACKSON et al., 2009; SILVA et al., 2009). Assim, existem relatos na literatura de estudos relacionados à verificação do tipo de interação *in vitro* existente entre AU ou β-lap e antibióticos disponíveis comercialmente frente a MRSA. Em alguns estudos foi observado sinergismo entre as referidas substâncias ativas (SILVA et al., 2009; SEGATORE et al., 2012; MACEDO et al., 2013). No entanto, ainda não há relatos na literatura da avaliação da interação *in vitro* da VAN com AU ou β-lap.

Diante do exposto, o objetivo principal deste estudo consistiu em avaliar a atividade antimicrobiana da vancomicina, bem como do ácido úsnico, livres e encapsulados em lipossomas, frente a isolados clínicos de MRSA. Posteriormente, verificou-se o tipo de interação *in vitro* existente entre vancomicina e ácido úsnico ou β-lapachona, livres e encapsulados.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 *Staphylococcus aureus*

Nas últimas décadas, a incidência de infecção por *Staphylococcus aureus* têm aumentado e a resistência à meticilina entre os isolados de *S. aureus* tem se apresentado como um problema crescente, onde tanto MRSA multirresistentes associados a hospitais (HA) quanto à comunidade (CA) tem se tornado prevalentes (KANAFANI; FOWLER, 2008; HUANG et al., 2013).

Quanto às infecções nosocomiais, *S. aureus* é a principal causa de infecção de feridas pós-operatória, e a segunda causa mais frequente de pneumonia e bacteremia nosocomiais (KANAFANI; FOWLER, 2008; HUANG et al., 2013). Estes índices de prevalência estão relacionados com a eficiente transmissibilidade por contato apresentada por espécie baceriana (LUTZ, 2003). Infecções hospitalares por MRSA parecem implicar em maior mortalidade, hospitalizações mais longas e custos mais elevados quando comparadas às infecções causadas por *S. aureus* sensível à meticilina (MSSA), tornando os MRSA-HA um dos mais preocupantes problemas no âmbito das infecções hospitalares (COSGROVE et al., 2005; LODISE; McKINNON, 2005; KANG et al., 2010).

Desde 1961, quando surgiu, até o final do século XX, MRSA foi predominantemente um patógeno nosocomial. No entanto, este cenário se alterou e atualmente infecções por *S. aureus*, incluindo MRSA, são comumente adquiridas fora de hospitais, particularmente entre indivíduos colonizados e incluindo pessoas que não são de risco (KANAFANI; FOWLER, 2008; IVANOVIC et al., 2013). MRSA-CA está tanto relacionado a doenças de pele relativamente simples quanto à infecções invasivas graves, como septicemia, endocardite, síndrome de choque tóxico e pneumonia necrosante (CHAMBERS, 2005; HUANG et al., 2013).

2.1.2 CARACTERÍSTICAS

O termo "*Staphylococcus*" foi inicialmente empregado em 1881 para denominar células bacterianas cocóides em arranjos semelhantes a cachos de uva observados em um abscesso. Anos depois, Rosenbach descreveu adequadamente o gênero *Staphylococcus*. Até 1999 este gênero pertencia à Família Micrococcaceae, contudo posteriormente ele foi relocado para a Família Bacillacea (LUTZ, 2003). Este gênero é composto por trinta e cinco espécies, muitas das quais fazem parte da microbiota de mamíferos, e, destas, dezessete

podem ser isoladas de materiais clínicos humanos, sendo *Staphylococcus aureus* a espécie mais importante como patógeno humano (LUTZ, 2003; AFONSO et al., 2008).

Quanto à etiologia da palavra *S. aureus,* este termo foi utilizado em virtude da coloração amarelada decorrente da produção de um pigmento amarelo ouro (*aureus,* em latim) que suas colônicas podem apresentar - em virtude da presença de carotenóides na membrana citoplasmática (KANAFANI; FOWLER, 2008). Esta espécie consiste em cocos Gram-positivos que podem ocorrer isoladamente, em pares, cadeias curtas ou em arranjo similar a cachos de uva, e não são móveis, tampouco formam esporos. Apesar de ser uma bactéria anaeróbia facultativa, *S. aureus* cresce melhor em ambiente aeróbico (AFONSO et al., 2008; KANAFANI; FOWLER, 2008).

A parede celular dos estafilococos tem como componente básico o peptideoglicano, cuja estrutura básica é constituída por polissacarídeos. Cadeias laterais compostas de pentapeptídeos do ácido murâmico formam pontes de pentaglicina, que ligam a L-lisina de uma cadeia com a D-alanina da outra cadeia pentapeptídica. Esta ligação entre os pentapeptideos é específica do *S. aureus*. Ligados à matriz de peptideoglicano estão o ácido teicóico e o ácido lipoteicóico, os quais auxiliam na estabilidade da parede celular e participam da aderência e da interação com mucosas e outras superfícies (LUTZ, 2003).

2.1.3 PATOGENIA

Os resultados das infecções associadas a *S. aureus* podem ser dependentes de fatores associados ao paciente (condições subjacentes, gravidade destas etc), ao tratamento (antibióticos empregados, retardo no início da terapia apropriada e remoção de focos de infecção, dentre outros) e ao microrganismo (como virulência e resistência a antibióticos) (KANG et al., 2010).

S. aureus é um patógeno oportunista, podendo colonizar intermitentemente (30 a 70%) ou permanentemente (10 a 40%) as pessoas sadias, habitando praticamene qualquer região do corpo humano, principalmente a nasofaringe e a pele, sem causar doenças. Porém, em pacientes suscetíveis, frequentemente essa colonização precede infecções. Estas infecções podem se desenvolver localmente ou, havendo ruptura das barreiras cutâneo-mucosas, *S. aureus* pode se evadir dos mecanismos de proteção naturais do homem e ter acesso a tecidos profundos. Nas situações mais graves, o microrganismo pode atingir a corrente sanguínea e se disseminar. Pode-se dizer que praticamente qualquer órgão é susceptível à infecção por *S. aureus,* sendo comuns infecções de pele, tecidos moles, osteomielite, artrite séptica, abscesso epidural, abscesso cerebral, endocardites, pneumonia e bacteremia (HIRAMATSU et al.,

2004; KANAFANI; FOWLER, 2006; KANG et al., 2010). Em outros casos, o microrganismo pode permanecer relativamente localizado, mas a produção de toxinas pode ocasionar efeitos sistêmicos, como a síndrome do choque tóxico e a gastroenterite alimentar (LUTZ, 2003; KANAFANI; FOWLER, 2008; HUANG et al., 2013).

A virulência do *S. aureus* está associada a fatores celulares e extracelulares, os quais consistem na base da sua patogenicidade. Dentre estes fatores se destacam: cápsula (exopolissacarídeo), peptideoglicano, ácido teicóico, proteína A, enzimas catalase, coagulase livre, coagulase ligada, fibrinolisina, toxinas estafilocócicas e as exoproteínas. Estes fatores podem ou não estar envolvidos na evasão da resposta imune do homem (LUTZ, 2003; LUTZ, BARTH, 2003; ZECCONI et al., 2006).

2.1.4 TERAPÊUTICA

Apesar de ainda estarem disponíveis outros fármacos anti-MRSA, como oxazolidina (linezolida), glicilciclina (tigeciclina) e quinupristina–dalfopristina, a diminuição da sensibilidade de cepas de *S. aureus* ao fármaco padrão vancomicina está sendo cada vez mais reconhecida e dificulta ainda mais o tratamento de infecções por MRSA (KANAFANI; FOWLER, 2006). Deste modo, estudos que visem o aprimoramento da vancomicina são necessários, de modo a mantê-la como importante medicamento para o tratamento de infecções por MRSA multirresistentes.

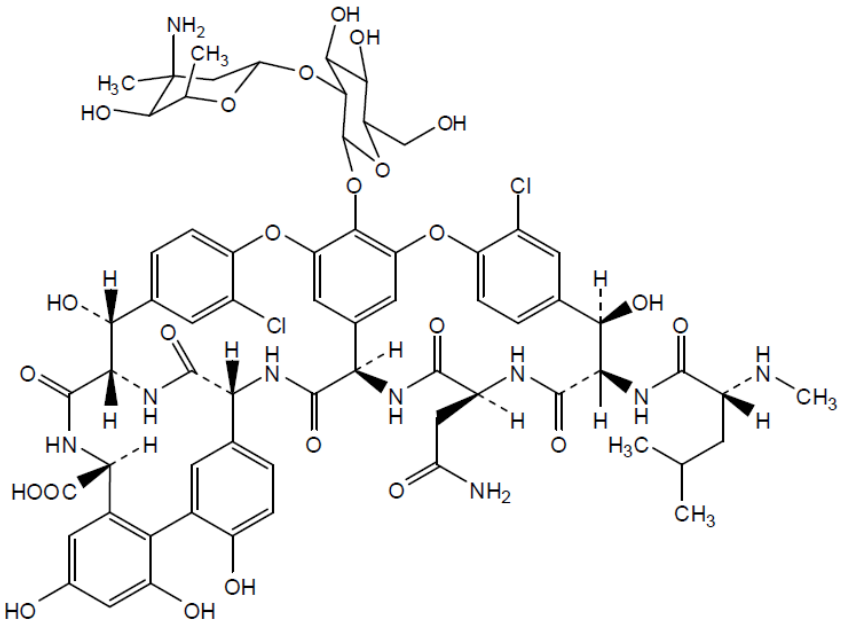
2.2 VANCOMICINA

Os representantes clássicos dos glicopeptídos – teicoplanina e, principalmente, a vancomicina (VAN) - possuem importante posição na terapêutica de infecções por bactérias Gram-positivas. A VAN foi primeiramente isolada pelo laboratório Ely Lilly & Co em 1956, tendo sido obtida por fermentação de *Amycolatopsis orientalis* (anteriormente denominado de *Streptomyces orientalis*), microrganismo encontrado no solo de países do oriente, como Índia e Indonésia (NICOLOSI et al., 2006; RODRIGUES-JÚNIOR, 2008; HOWDEN et al., 2010). A etiologia da palavra vancomicina está relacionada ao seu elevado efeito bactericida (do inglês, *vanish*). A relevante atividade antimicrobiana da VAN também resultou na sua rápida introdução no mercado da indústria farmacêutica, tendo sido aprovada para uso clínico cerca de dois anos após sua descoberta (NICOLOSI et al., 2006; RODRIGUES- JÚNIOR, 2008).

2.2.1 QUÍMICA

A estrutura química deste antibiótico pode ser visualizada na Figura 1. Sua fórmula estrutural permaneceu indeterminada por mais de duas décadas, mas no final dos anos 70 e início da década seguinte cientistas tiveram êxito na conclusão da elucidação da sua estrutura (WILLIAMS; KALMAN, 1976; SHELDRICK et al., 1978; PFEIFFER, 1981; HARRIS; KOPECKA; HARRIS et al., 1983). A VAN apresenta elevada hidrofilicidade, possui elevado peso molecular (1449,2 Da) e, sendo um glicopeptídeo, é constituída por aminoácidos e açúcares (ANDERSON et al., 2001). A VAN ($C_{66}H_{75}Cl_2N_9O_{24}$) possui uma complexa estrutura tricíclica, onde dois anéis possuem 16 átomos e o terceiro, apenas 12, os quais são conectados entre si por sete ligações peptídicas. Deste modo, este fármaco possui um esqueleto heptapeptídeo, com conformação relativamente rígida, contendo um resíduo de asparagina (ANTIPAS, VELDE; STELLA, 1994; RODRIGUES- JÚNIOR, 2008; BOTELHO, 2010).

Figura 1. Estrutura química da vancomicina



Fonte: AFONSO (2008).

A VAN possui vários grupos carregados (catiônicos e aniônicos) e seu ponto isoelétrico (pI) é 7,0. Quanto à estabilidade, pH ≥ 5 acelera a decomposição da VAN, estando entre 3,0 e 5,0 o seu pH de estabilidade máxima (ANDERSON et al., 2001; ENRIQUE et al., 2008).

2.2.2 USO CLÍNICO

No decorrer dos anos, este glicopeptídeo tem passado por várias fases quanto à intensidade do seu uso. Logo após seu lançamento no mercado, a VAN foi amplamente utilizada por consistir em uma alternativa terapêutica para o tratamento de infecções por estafilococos resistentes à penicilina G (RODRIGUES- JÚNIOR, 2008). Porém, em virtude dos relevantes efeitos adversos que causava, em associação ao surgimento de outros recursos terapêuticos mais seguros para o tratamento de infecções estafilocóccicas (como meticilina, oxacilina e isoxazotilpenicilinas), houve uma significativa diminuição no seu uso. Posteriormente, o surgimento de cepas MRSA ocasionou uma nova amplicação do uso da VAN. Corroboraram para isto outros fatores, como sua indicação como alternativa terapêutica para pacientes alérgicos aos antibióticos β-lactâmicos, sua baixa absorção quando administrada por via oral - sendo, assim, apropriada para o tratamento de infecções do trato gastrointestinal decorrentes de *Clostridium difficile* - e a produção de VAN com maior grau de pureza, a qual diminuiu a ocorrência de alguns dos seus efeitos indesejáveis (DIANA et al., 2003; ALVES et al., 2007; RODRIGUES- JÚNIOR, 2008)

A VAN possui largo espectro de ação, sendo ativa frente a cocos e bacilos Gram-positivas, incluindo algumas bactérias anaeróbias. Quanto ao seu uso clínico, é amplamente utilizada na terapêutica de infecções graves decorrentes de bactérias Gram-positivas multirresistentes, particularmente no tratamento e profilaxia de infecções estafilocócicas, incluindo as causadas por MRSA, nas quais é considerada fármaco de escolha (CHANG et al., 2011; PIGRAU; ALMIRANTE, 2009; PUMERANTZ et al., 2011; SANDE et al., 2012).

Apesar disto, é importante destacar que, embora a maior parte dos valores de CMI de vancomicina entre os isolados de MRSA permaneça dentro do ponto crítico de susceptibilidade (≤ 2 mg / L) de acordo com os critérios CLSI em 2011, se tem notado uma elevação destes valores. Isto, por sua vez, está relacionado à ocorrência de falhas no tratamento MRSA com doses inicialmente terapêuticas de VAN (CHANG et al., 2011; MUPPIDI et al., 2011; PUMERANTZ et al., 2011; SANDE et al., 2012). Dentre as possíveis explicações para este fenômeno de falha clínica, além da mencionada redução de sensibilidade a mesma, é possível citar a atividade bactericida lenta e tempo-dependente deste glicopeptídeo (MUPPIDI et al., 2011).

Quanto à dose da VAN, apesar de não haver consenso quanto a sua janela terapêutica, recomenda-se uma concentração sérica alvo mínima correspondente a 5 a 15 µg/mL, e para infecções graves esse valor sobe para 10 a 20 µg/mL. Por outro lado, outras diretrizes já recomendam atingir uma faixa de 15-20 µg/mL, o que proporcionaria uma relação AUC:MIC

bactericida para cepas de MRSA com CMI de VAN correspondente a <1 µg/mL (BRUNTON; LAZO; PARKER, 2006; CEVHER et al., 2006; PUMERANTZ et al., 2011).

Considerando seus aspectos farmacocinéticos, este glicopeptídeo é administrado por infusão intravenosa, visto que é pouco absorvido pela via oral (possui biodisponibilidade inferior a 2%), e possui uma meia-vida plasmática de cerca de 6 h (ANDERSON et al., 2001; CEVHER et al., 2006; GIANDALIA et al., 2010).

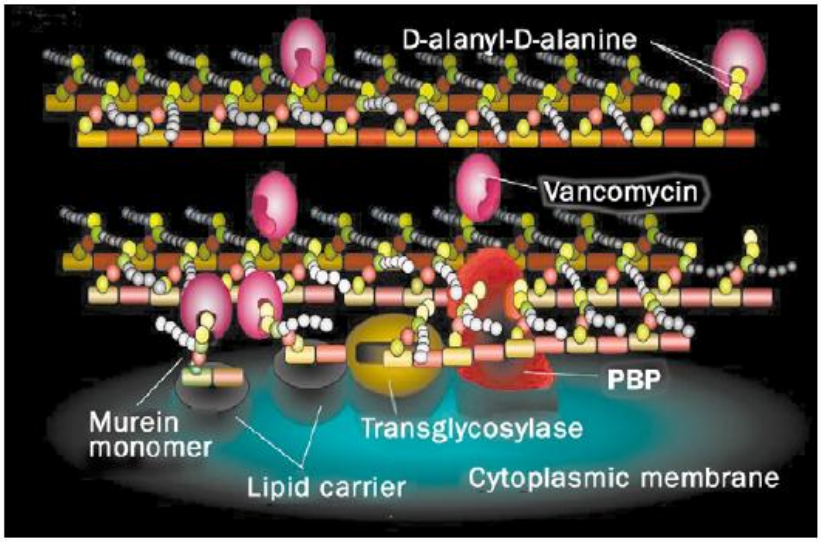
2.2.3 MECANISMO DE AÇÃO

Os antibióticos glicopeptídeos expressam seu efeito ao interagirem por meio de ligações de hidrogênio com a porção protéica terminal (L-lisina-D-alanil-D-alanina) dos monômeros de mureína durante o processo de biosíntese da parece celular bacteriana, por meio do qual inibem a segunda fase desta síntese (Figura 2). A primeira classe de alvos da VAN nas células de *S. aureus* são os resíduos D-alanil-D-alanina nas camadas de peptidoglicano completadas ou na cadeia de peptidoglicano nascente; enquanto a segunda classe consiste nos monômeros mureína localizados na membrana citoplasmática que servem como substrato para a glicosiltransferase. A ligação da VAN aos alvos já formados (primeira classe de alvos) não inibe a síntese de peptidoglicano nascente, apenas pode interferir na formação das ligações cruzadas entre as cadeias de mureína. Por outro lado, se os glicopeptídeos se ligam aos monômeros de mureína situadas na membrana citoplasmática, a síntese do peptidoglicano é completamente inibida e, consequentemente, as células cessam sua multiplicação.

No entanto, para as moléculas de vancomicina se ligarem a estes alvos, elas precisam passar através de aproximadamente de 20 camadas de peptidoglicano, sem serem retidas nos alvos externos. Uma vez que existem muitos alvos D-alanil-D-alanina nas camadas de peptidoglicano, muitas moléculas de glicopeptídeo são aprisionadas nestas camadas externas. Este processo compromete a eficácia terapêutica dos glicopeptídeos. Em virtude disto, um elevado número de células de *S. aureus* presentes no tecido infectado do paciente pode diminuir a ação da VAN e, portanto, medidas para diminuir o número de células bacterianas no corpo dos pacientes pela eliminação cirúrgica de um abscesso ou pela drenagem de pus é frequentemente necessário para tornar a terapia com glicopeptídeos mais eficaz. Além disso, este glicopeptídeo também atua inibindo de modo seletivo a síntese do ácido ribonucleico da célula bacteriana (HIRAMATSU, 2001; BRUNTON; LAZO; PARKER, 2006; RODRIGUES-JÚNIOR, 2008; SANDE et al., 2012).

É importante salientar que, de acordo com Howden et al., (2010), o principal local da síntese da parede celular em *S. aureus* consiste no septo de divisão celular da célula bacteriana e não na membrana plasmática como um todo. Isto significa que a VAN tem que se difundir para a ponta do septo de divisão para se ligar aos precursores de peptidoglicano neste local, e a distância desta difusão varia de acordo com o ciclo celular, onde septos maiores existem no período mais tardio do ciclo.

Figura 2. Mecanismo de ação da vancomicina



A vancomicina se liga aos resíduos D-alanil-D-alanina dos monômeros de mureína, bloqueando-os e tornando-os indisponíveis para as glicosiltransferases. Fonte: Hiramatsu (2001).

2.2.4 TOXICIDADE

Dentre as reações adversas induzidas pela terapia com a VAN livre, é possível citar nefrotoxicidade e ototoxicidade, os quais limitam a dose e a duração da administração do fármaco e se apresentam especialmente em pacientes expostos a altas doses deste antibiótico (CEVHER et al., 2006).

Sua administração sistêmica pode estar associada com diversos efeitos adversos, dentre os quais se destacam as reações de hipersensibilidade, como a síndrome do homem vermelho (GIANDALIA et al., 2001; MCAULEY, 2012).

2.3 RESISTÊNCIA DE *S. aureus* A ANTIMICROBIANOS

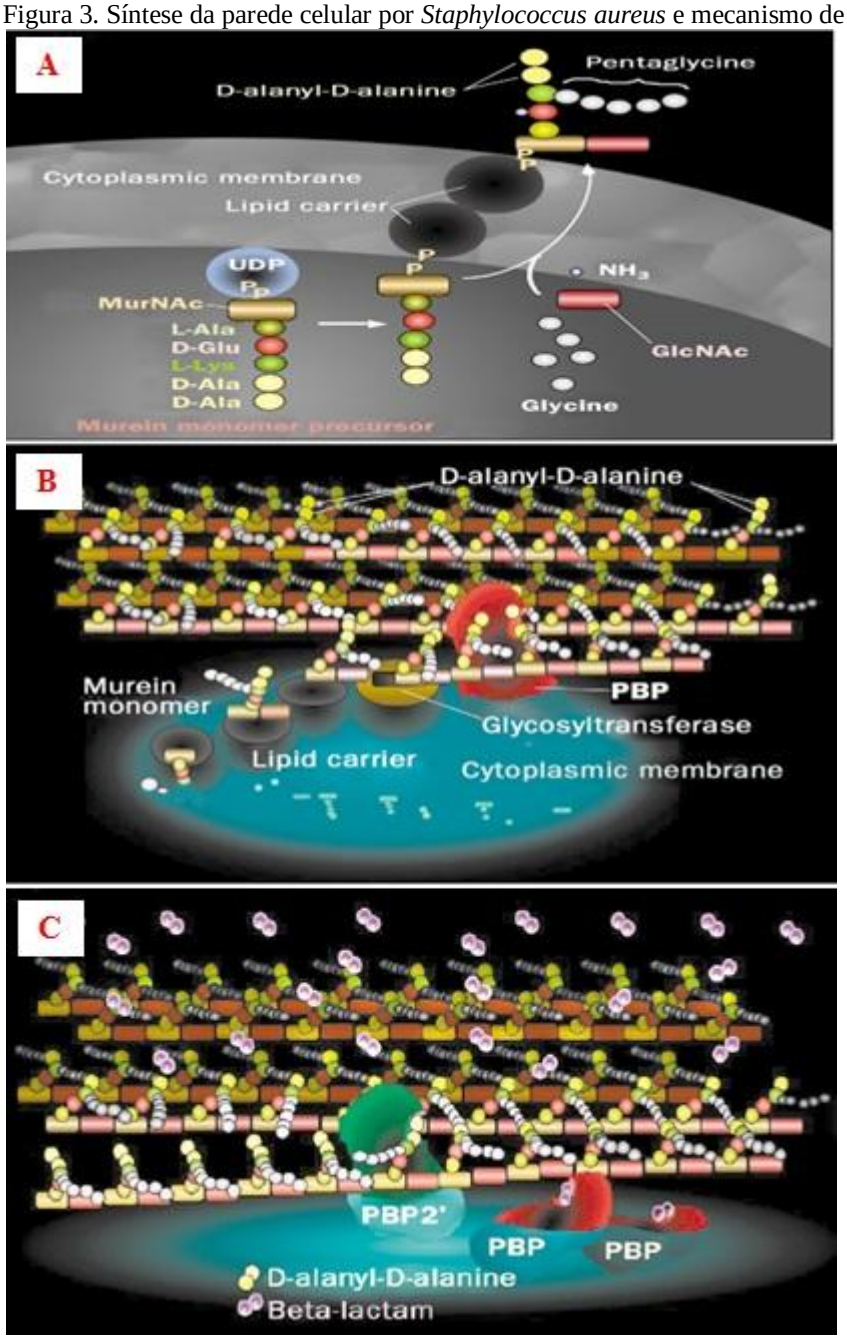
A propensão de *S. aureus* a desenvolver resistência a um grande número dos agentes antimicrobianos disponíveis tem tido um enorme impacto na clínica de infecções causadas por este patógeno (KANAFANI; FOWLER, 2006). Resistência às penicilinas e às penicilinas

estáveis à β-lactamases (meticilina e oxacilina) foram sucessivamente descritas. Cepas MRSA surgiram na década de 1960 e se caracterizam por expressarem o gene *mec*A ou outro mecanismo de resistência à meticilina, como mudanças na afinidade das Proteínas Ligadoras de Penicilina (*penicillin-binding protein*, PBP) pela meticilina (CLSI, 2012). Mesmo infecções aparentemente simples causadas por este microrganismo podem ser fatais, por isso MRSA estão entre os patógenos humanos mais importantes (ZIZOVIC et al., 2012; IVANOVIC et al., 2013).

Quanto ao mecanismo de resistência, para que as células bacterianas sobrevivam e se multipliquem, é necessário haver uma contínua síntese de mureína ou peptideoglicano. Para isto, primeiramente os monômeros de mureína, os quais são compostos por dois aminoaçúcares (N-acetyl muramic acid [MurNAc] e N-acetyl glucosamine [GlcNAc]) e 10 aminoácidos, são formados a partir de precursores. Estes precursores, por sua vez, são compostos por MurNAc e um esqueleto de peptídeos (L-alanina, D-ácido glutamínico, L-lisina e duas D-alaninas), e sintetizados no citoplasma bacteriano. Durante o transporte dos precursores de mureína para a superfície exterior da membrana citoplasmática, por meio carreadores lipídicos, há a adição de GlcNAc e cinco glicinas ao resíduo MurNAc, formando, assim, um monômero de mureína maduro (Figura 4.A). Em seguida, duas enzimas localizadas na membrana citoplasmática, a glicosiltransferase e a transpeptidase, adicionam o monômero de mureína recém-formado numa estrutura gigantesca de peptidoglicano. A glicosiltransferase polimerisa os monômeros de mureína entre as suas porções de aminoaçúcar para produzir cadeias nascentes de peptidoglicano. Subsequentemente a transpeptidase, também conhecida como PBP, liga as cadeias de peptideoglicano nascentes recém-formadas às camadas de peptidoglicano pré-existentes nas células *S. aureus*. Nesta etapa, PBP reconhece os resíduos D-alanil-D-alanina dos monômeros de mureína e quebra a ligação entre as duas D-alaninas, de modo a ligar a penúltima D-alanina à ponta de uma cadeia de pentaglicina saliente das camadas de peptidoglicano pré-existentes. Quando a ponte interpeptídica é formada, o D-alanina terminal do monômero mureina é desligada do peptideoglicano completado (Figura 4.B). A PBP é o alvo dos antibióticos β-lactâmicos, os quais são análogos estruturais da D-alanil-D-alanina, deste modo, estes fármacos são capazes de se ligarem covalentemente à PBP de *S aureus*, inativando esta proteína e, consequentemente, bloqueando a biossíntese de peptidoglicano. Isto, por sua vez, ocasiona a lise da célula bacteriana. Cepas de *S. aureus* resistentes à meticilina produzem um único tipo de PBP (PBP2' ou PBP2A), a qual tem baixa afinidade de ligação com os antibióticos β-lactâmicos; consequentemente, estes antibióticos não conseguem interferir na síntese da parede celular. A PBP2' é o produto de um gene

exógeno denominado *mecA*, o qual é carreado por um elemento genético móvel, SCCmec, adquirido por *S. aureus* a partir de espécies bacterianas por meio transferência lateral de genes (Figura 4.C) (HIRAMATSU, 2001; DEURENBERG et al., 2007).

Figura 3. Síntese da parede celular por *Staphylococcus aureus* e mecanismo de resistência à meticilina.



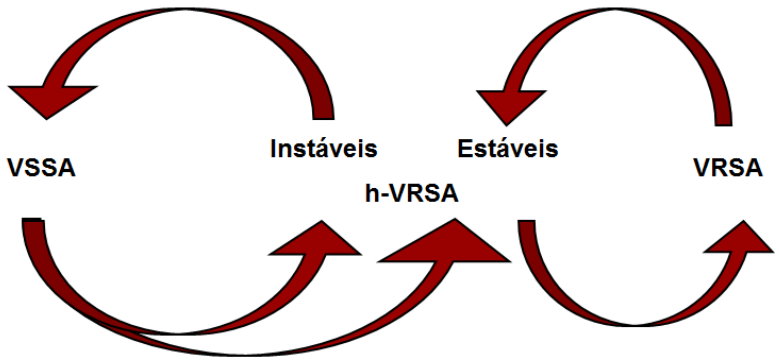
A: Síntese de monômeros de mureína no citoplasma bacteriano e sua transferência para o exterior da membrana citoplasmática. B: Formação de uma nova cadeia de peptidoglicano pela glicosiltransferase e formação de ligações cruzadas entre as novas cadeias de peptideoglicano e as pré-existente, por meio da proteína de ligação à penicilina (PBP). C: mecanismo de resistência do *S. aureus* às penicilinas estáveis às β-lactamases (meticilina). Fonte: Hiramatsu (2001).

Após o surgimente de MRSA, a VAN passou a ser considerada o antibiótico de escolha para o tratamento de infecções nosocomiais causadas por MRSA. No entanto, desde

1996, no Japão, vem sendo descritas diminuições da susceptibilidade de isolados de *S. aureus* à VAN (*S. aureus* com resistência intermediária à vancomicina, VISA), as quais tem se tornado um problema global (HIRAMATSU, 2001; LUTZ, 2003). *S. aureus* com resistência heterogênea à vancomicina (h-VRSA) foram posteriormente descritos. Estes isolados aparentam ser suscetíveis a este glicopeptídeo, mas contêm subpopulações cuja Concentração Mínima Inibitória (CMI) da VAN é elevada, e foram primeiramente descritos por Hiramatsu et al (2001).

A hetero-resistência de estirpes de *S. aureus* à vancomicina tem importantes implicações, tanto quanto a previsão da eficácia clínica da terapia antibiótica quanto para a detecção de tendências no surgimento de resistência a este antibiótico. Neste âmbito, tem sido observada a existência de estirpes de h-VRSA com características de estabilidade e de instabilidade quanto ao perfil de susceptibilidade ao referido glicopeptídeo (Figura 3), onde as estirpes h-VRSA estáveis possuem maior probabilidade de ocasionar o surgimento de VRSA. Considerando os aspectos biológicos, a hetero-resistência à VAN de cepas de *S. aureus* parece ser uma ferramenta bem sucedida desenvolvida pelo patógeno com o objetivo de sobreviver à pressão exercida por este antibiótico. Considerando que as células VRSA necessitam de uma maior quantidade de energia para produzir paredes celulares com maior espessura, quando a pressão à VAN é aliviada as células de VRSA podem voltar ao estado de h-VRSA visando a minimização do gasto enérgico (HIRAMATSU, 2001; LUTZ, 2003).

Figura 4. h-VRSA e sua relação com a resistência de *Staphylococcus aureus* à vancomicina.



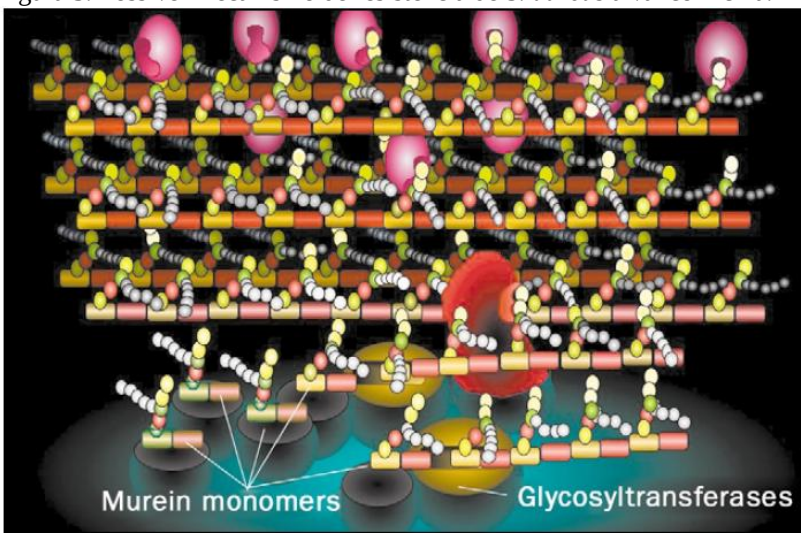
h-VRSA é um estado evolutivo expresso por cepas de *S. aureus* para sobreviver à ação dos glicopeptídeos, estando situado entre as cepas sensíveis e resistentes à vancomicina. Cepas com hetero-resistência produzem células VRSA em alta freqüência na população celular de modo a propiciar sua sobrevivência. É possível a transição entre esses três estados de susceptibilidade, dependendo da manutenção ou não da exposição das cepas à vancomicina. Adaptado de Hiramatsu (2001).

S. aureus totalmente resistente à vancomicina (VRSA) surgiram pela primeira vez nos Estados Unidos em 2002 e consistem em falha da vancomicina em erradicar infecções por *S.*

aureus quando administrada em doses tradicionalmente terapêuticas (CHANG et al., 2003; CHAKRABORTY et al., 2012). Segundo o CLSI (2012), o termo VRSA é reservado aos *S. aureus* cujo CMI da vancomicina é ≥ 16 mg/L.

Quanto ao mecanismo de resistência de *S. aureus* à vancomicina, o espessamento da parede celular parece ser o fator mais plausível, e, embora os mecanismos exatos que levam a esse espessamento ainda não tenham sido determinados com exatidão, sabe-se que este processo evita a difusão da VAN até seu sítio ativo (septo divisão) na membrana citoplasmática (HOWDEN et al., 2010; HOWDEN; PELEG; STINEAR, 2014). Segundo Hiramatsu (2001), isolados de *S. aureus* resistentes à VAN produzem uma maior quantidade tanto de monômeros de mureína quanto de peptideoglicano (provavelmente 30 a 40 camadas). Além disso, alterações na malha das camadas externas do peptideoglicano espesso parecem evitar uma maior penetração de moléculas de VAN em direção à membrana plasmática (Figura 5). Teoricamente, há dois modos diferentes para tornarem mais espessas as camadas de peptidoglicano da parede celular: 1) produção excessiva de peptidoglicano e 2) redução do *turnover* desse peptideoglicano (HIRAMATSU, 2001).

Figura 5. Possível mecanismo de resistência de *S. aureus* à vancomicina.



Espessamento da camada de peptideoglicano, o qual dificulta o acesso da vancomicina à membrana citoplasmática, seu local de ação. Fonte: Hiramatsu (2001).

Outro mecanismo pelo qual *S. aureus* adquire resistência à vancomicina consiste na recepção, a partir de enterococos, de genes associados com expressão de resistência a este fármaco. Os primeiros registros de enterococos resistentes à VAN surgiram na década de 1980. São conhecidos atualmente oito genes determinantes de resistência: vanA, vanB, vanD,

VanE, vanG, vanL, vanN e vanM, sendo os dois primeiros os mais amplamente encontrados (LÓPEZ et al., 2012)

2.4 LIPOSSOMAS

A descrição inicial dos lipossomas, sistemas vesiculares constituídos por uma ou mais bicamadas lipídicas ordenadas entre as quais há espaços aquosos, remonta à década de 1960. Estas vesículas tem se destacado como eficientes sistemas de liberação de fármacos, sendo capazes de veicular tanto fármacos hidrofílicos, nos compartimentos aquosos, quanto lipofílicos, nas membranas lipídicas (KADRY et al., 2004; EDWARDS; BAEUMNER, 2006; BATISTA et al. 2007).

Quanto às características de interação com sistemas biológicos, de modo sucinto, quando os lipossomas são constituídos apenas por fosfolipídio, colesterol e um lipídio com carga, seja ela positiva ou negativa, são classificados como lipossomas convencionais e são removidos facilmente pelo sistema fagocitário mononuclear; logo, apresentam um baixo tempo de circulação plasmática. Alterações na superfície das vesículas lipossomais pela adição de substâncias hidrofílicas, como o polietilenoglicol (PEG), por sua vez, dão origem a lipossomas furtivos, capazes de se evadir da opsonização, elevando, assim, seu tempo de permanência na circulação sanguínea (MUPPIDI et al., 2011; MUPPIDI et al., 2012). Lipossomas são classificados como sítio-específicos quando apresentam anticorpos, peptídeos ou proteínas ligados em sua superfície que forneçam especificade às vesículas durante a sua distribuição no organismo. Os lipossomas são também classificados quanto à quantidade de camadas lipídicas ou lamelas que possuem, podendo ser unilamelares ou multilamelares. No que se refere ao tamanho, o qual pode variar de 20 nm a alguns micrômetros, essas vesículas são denominadas de SUVs (*small unilamellar vesicles*) quando apresentam pequenas dimensões, e, quando maiores, são classificadas como LUVs (*large unilamellar vesicles*) (SCHIFFELERS et al., 2001; BATISTA et al. 2007; DRULIS-KAWA; DOROTKIEWICZ-JACH, 2010).

A possibilidade de manipulação das características físico-químicas (tamanho, composição e proporção de lipídios, carga da superfície e sensibilidade ao pH ou à temperatura) das vesículas lipossomais permite que se altere o comportamento delas *in vivo*, adequando-as aos mais diversos interesses. Além disso, os lipossomas são carreadores biocompatíveis, biodegradáveis e não imunogênicos. Deste modo, esses sistemas são caracterizados por uma alta versatilidade, podendo ter aplicações em diversos campos da área

da saúde (SCHIFFELERS et al., 2001; EDWARDS; BAEUMNER, 2006; DRULIS-KAWA; DOROTKIEWICZ-JACH, 2010).

No que se refere às aplicações terapêuticas, os lipossomas tem sido alvo de várias pesquisas nas quais foi explorado o seu uso como carreador para diversas classes de fármacos, tais como antineoplásicos, vacinas, para terapia gênica e no tratamento de infecções (DRULIS-KAWA; DOROTKIEWICZ-JACH, 2010). A encapsulação de antibióticos em lipossomas pode ocasionar diversas vantagens, tais como: 1) aumento da segurança ao diminuir a toxicidade, 2) seletividade pelo alvo terapêutico/ aperfeiçoamento da farmacocinética (alteração do perfil de distribuição, elevando a concentração do antibiótico em tecidos específicos), 3) melhoria da atividade contra patógenos intra e extracelulares (DRULIS-KAWA; DOROTKIEWICZ-JACH, 2010; SANDE et al., 2012). É importante mencionar que, ao infectar tecidos, *S. aureus* se localiza principalmente extracelularmente; no entanto, também pode ocasionar infecções intracelulares, as quais podem ser persistentes em virtude da dificuldade de alguns antibióticos atingirem o interior de determinadas células (ONYEJI; NIGHTINGALE; MARANGOS, 1994). Deste modo, lipossomas podem veicular antibióticos usados na terapêutica de ambos os tipos de infecções causadas por *S. aureus.*

Quanto ao possível mecanismo de ação pelo qual a encapsulação em lipossomas melhora a atividade de antibóticos, de acordo com Nicolosi et al. (2006), a natureza e estrutura destas vesículas se assemelham às das membranas celulares e, consequentemente, os lipossomas tem potencial capacidade de interagirem eficazmente com as células. De modo geral, esta interação pode acorrer por meio de quatro tipos de processos: fusão, endocitose, adsorção e troca de lipídios. Contextualizando esses possíveis processos com a localização do patógeno no sítio da infecção, quando a infecção é intracelular, ao serem englobados por células fagocíticas os lipossomas proporcionam a obtenção de concentrações intracelulares terapêuticas do antibiótico. Por outro lado, no caso de bactérias extracelulares, a melhoria da eficácia antimicrobiana pode ser decorrente de um mecanismo de fusão das vesículas com a bactéria, por meio do qual se aumenta a liberação dos antibióticos no citoplasma bacteriano. No entanto, em algumas situações foi observado que a encapsulação de antibióticos em lipossomas pode reduzir a atividade dos fármacos contra bactérias extracelulares, visto que a camada lipídica separa o fármaco da bactéria; neste âmbito, a variabilidade dos dados *in vitro* é, provavelmente, resultante das variações na composição lípida dos lipossomas, as quais ocasionam diferentes taxas de liberação dos antimicrobianos encapsulados (ONYEJI; NIGHTINGALE; MARANGOS, 1994; SCHIFFELERS et al., 2001; KADRY et al., 2004; SANDE et al., 2012).

No que se refere aos métodos de preparação de lipossomas, um dos métodos mais utilizados para este fim consiste na solubilização dos lipídeos (e dos fármacos lipofílicos, quando aplicável) em solventes orgânicos, com subsequente evaporação do solvente, de modo a propiciar a formação de filme lipídico, e posterior hidratação deste filme. Os fármacos hidrofílicos, quando presentes, são solubilizados na fase aquosa antes da hidratação. No entanto, este método não proporciona uma elevada encapsulação de molécula polares nas vesículas lipossomais (SHARMA; SHARMA, 1997; BATISTA et al. 2007). Assim, uma vez que a VAN apresenta alta hidrofilicidade, este antibiótico não é um candidato ideal para a encapsulação de lipossomas utilizando o método de hidratação do filme com encapsulação passiva. Nestes casos, maiores eficiências de encapsulação tem sido obtidas ao se utilizar o método de desidratação-reidratação da vesícula (DRV) modificado. Neste método, lipossomas unilamelares vazios pré-formados são desidratados por liofilização, após o qual o fármaco polar de interesse é solubilizado em água e adicionado aos lipossomas vazios (KIRBY; GREGORIADIS, 1984; ANDERSON et al., 2001; MUPPIDI et al., 2012)

2.4.1 LIPOSSOMAS CONTENDO VANCOMICINA

No início da década de 90, os efeitos antibacterianos de vancomicina encapsulada em lipossomas foram avaliados frente MRSA contidos em macrófagos. Observou-se que com o uso de carreadores lipossomais as células infectadas foram expostas a concentrações adequadas do fármaco, ao contrário do que ocorreu quando se utilizou VAN livre (ONYEJI; NIGHTINGALE; MARANGOS, 1994). Anos depois, Sanderson e Jones (1996) encapsularam VAN em lipossomas catiônicos e verificaram um aumento na inibição de *Staphylococcus epidermidis*, o qual pode ser explicado pelo fato das vesículas catiônicas serem capazes de se ligarem ao biofilme aniônico de *S. epidermidis*. Anderson et al. (2001), por sua vez, estudaram lipossomas revestidos com ácido fólico como promotores do aumento da absorção da VAN por via oral. Observou-se um aumentou na biodisponibilidade relativa deste antibiótico, o qual parece ser resultante da ligação do ácido fólico aderido aos lipossomas aos receptores de folato do trato gastrointestinal com subsequente endocitose dos lipossomas.

Anos depois, Kadry e colaboradores (2004) verificaram, em modelo animal, os efeitos do tratamento de osteomielite estafilocócica com VAN livre e encapsulada em lipossomas. As CMIs obtidas foram similares em ambos os casos; no entanto, *in vivo*, o fármaco encapsulado pareceu expressar uma melhor atividade antibacteriana. Uma das possíveis explicações para este fenômeno parece ser a capacidade que os lipossomas possuem de penetrar no sistema

retículo-endotelial em concentrações elevadas o suficiente para eliminar eficazmente os microrganismos que colonizavam o tecido ósseo. Seguindo outra vertente, Nicolosi et al. (2010) encapsulou a VAN em lipossomas fusogênicos e testou a possível ampliação do seu espectro de ação contra bactérias Gram-negativas. Os sistemas nanoestruturados foram capazes de permear a membrana externa das células bacterianas, ocasionando diminuição dos valores de CMI em diferentes graus, dependendo da espécie bacteriana considerada.

Pumerantz et al. (2011), por sua vez, objetivando superar a persistência de MRSA em macrófagos alveolares, o qual tem contribuido para a falha clínica da VAN na terapêutica de pneumonia staphylococcica, desenvolveu lipossomas convencionais e furtivos contendo este glicopeptídeo. Enquanto os lipossomas convencionais reduziram a viabilidade intracelular de MRSA, os furtivos não foram capazes de exercer efeitos sobre os isolados MRSA – possivelmente pelo atraso na fagocitose deste tipo de lipossoma, em virtude do efeito furtivo promovido pelo PEG. Outro estudo do mesmo grupo de pesquisa relatou o desenvolvimento, em modelo murino, de estudos relacionados à farmacocinética e à biodistribuição de VAN-lipo. Foi observado que os lipossomas furtivos aumentaram significativamente a concentração da VAN no órgão-alvo, a qual pode ser decorrente do maior tempo de circulação do fármaco, o qual permite maior liberação da VAN no pulmão (MUPPIDI et al., 2011). Um terceiro estudo publicado pela mesma equipe de pesquisadores analisou os efeitos do uso de três métodos distintos - hidratação de filme lipídico, gradiente de pH modificado e desidratação-reidratação modificado – na preparação de lipossomas convencionais e furtivos contendo VAN e a melhor eficiência de encapsulação foi obtida ao se empregar o último método (MUPPIDI et al., 2012). Em outro estudo recente, testou-se a hipótese de se aumentar a atividade anti-MRSA da VAN ao encapsulá-la em dois tipos de lipossomas, os quais divergiam quanto à composição. Os pesquisadores observaram que tanto a composição lipossomal quanto o método de preparação das vesículas lipossomais parecerem ser essenciais para a obtenção ou não de melhoria da atividade antimicrobiana da VAN quando este fármaco é encapsulado em lipossomas (SANDE et al., 2012).

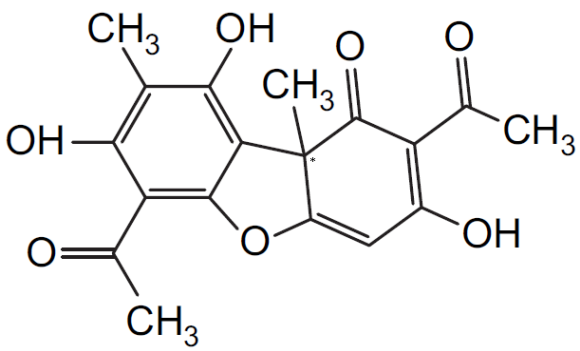
Até o momento não há relatos na literatura do uso da encapsulação de VAN em lipossomas associada à exploração de sinergismo antimicrobiano deste glicopeptídeo com outras substâncias antibacterianas visando a melhoraria da eficácia da VAN frente a isolados clínicos de MRSA.

2.5 ÁCIDO ÚSNICO

Os líques são formados por meio de simbiose entre fungos (micobiontes) e algas e/ou cianobactérias (fotobiontes). Seu crescimento lento associado às condições adversas nas quais estes seres frequentemente vivem propiciam a produção de metabólitos secundários que lhes fornecem proteção (INGÓLFSDÓTTIR et al., 2002). Estima-se que os líquens produzam mais de 800 metabólitos secundários (ZIZOVIC et al., 2012). Em virtude desta síntese de metabólitos únicos, cerca de 17.000 espécies conhecidas de líquens tem sido empregadas para diversos fins, inclusive medicinais (INGÓLFSDÓTTIR et al. 1998). O uso de compostos de origem liquênica na medicina tradicional é uma prática presente em diversos países há muito tempo. Há relatos de que no século XVIII a.C. no Egito os extratos de liquênicos já eram utilizados para este fim (LAUTERWEIN et al. 1995; PERRY et al., 1999).

Os metabólitos liquênicos pertencem a diversas classes químicas, incluindo terpenóides, carotenóides, esteróides, cromonas, xantonas e dibenzofuranos. (INGÓLFSDÓTTIR et al. 1998; ZIZOVIC et al., 2012). Derivados de benzofurano consistem numa importante classe de compostos heterocíclicos que são conhecidos por possuírem importantes propriedades biológicas, incluindo farmacológicas – como antimicrobina e antineoplásica (KIRILMIS et al., 2008). São exemplos de substâncias pertencentes a esta classe o fármaco amiodarona e o ácido úsnico [2,6-diacetyl-7,9-dihydroxy-8,9b-dimethyl-1,3(2H,9bH)-dibenzo-furandione; $C_{18}H_{16}O_{7;}$ PM = 344,3 g/mol] (Figura 6). O ácido úsnico (AU) consiste em um dos metabólitos líquênicos mais comuns e abundantes, sendo amplamente encontrado nas espécies *Usnea, Evernia, Cladonia, Lecanora, Ramalina, Parmelia* e *Alectória,* além de ser o mais estudado e utilizado, e de ser um dos poucos a estar disponível comercialmente (PROKSA et al., 1996; INGÓLFSDÓTTIR et al. 1998; KIRILMIS et al., 2008; ZIZOVIC et al., 2012).

Figura 6. Estrutura química do (±) ácido úsnico.



*Centro quiral. Adaptado de Lauterwein et al. (1995) e Kirilmis et al. (2008).

De acordo com Lauterwein et al. (1995), pesquisas realizadas na década de 1950 definiram o AU como composto liquênico bioativo, mas o reconhecimento das importantes propriedades biológicas do ácido úsnico se deu em grande parte em virtude dos estudos desenvolvidos posteriormente por Perry et al. (1999), os quais analisaram as atividades antimicrobiana e antiviral de extratos etanólicos de dezenas de espécies de líquens. A partir de então alguns estudos tem relatado que o AU consiste no principal metabólito liquênico com atividade antibacteriana. Alguns destes estudos antigos descrevem uma atividade principalmente contra cocos Gram-positivos (LAUTERWEIN et al. 1995; INGÓLFSDÓTTIR et al., 1998; COCCHIETTO et al., 2002). Propriedades bacteriostáticas contra *S. aureus* multirresistente foram relatadas por Lauterwein et al. (1995). O ácido úsnico ocorre na natureza em duas formas enantioméricas e, apesar de terem sido relatadas em algumas situações diferenças na atividade biológica expressa pelos dois enantiômeros, tanto o (+) ácido úsnico quanto o (-) ácido úsnico são eficazes contra uma grande variedade de bactérias Gram-positivas, incluindo isolados clínicos de *S. aureus* resistente à meticilina (LAUTERWEIN et al., 1995; INGÓLFSDÓTTIR et al. 2002; KIRILMIS et al., 2008). Além disso, observou-se que este composto possui outras propriedades biológicas, a saber: antiprotozoária, antiviral, analgésica, antipirética, antineoplásica e antiinflamatória (INGÓLFSDÓTTIR et al., 1998; ZIZOVIC et al., 2012). Diante do exposto, observa-se que apesar da sua reconhecida atividade antimicrobiana, o ácido úsnico apresenta limitações quanto ao seu possível uso terapêutico, como lipofilicidade e toxicidade. A encapsulação de ácido úsnico em lipossomas pode ser uma ferramenta útil para a superação desses problemas. Ribeiro-Costa et al. (2004) e Santos et al. (2005) encapsularam o AU em microesferas de ácido poli-láctico e glicólico (PLGA) e nanocáspulas, respectivamente, e avaliaram a atividade do composto liquênico contra carcinomas. Além da manutenção da sua atividade antitumoral, observou-se diminuição na toxicidade do AU. Lira et al. (2009A), por sua vez, objetivaram encapsular complexos de ácido úsnico com β-ciclodextrina em lipossomas de modo a melhorar a solubilidade e a biodisponibilidade deste composto liquênico e obtiveram êxito neste processo. Lira et al (2009B) observou uma diminuição da CMI do AU de 6,5 para 5,8 µg/mL frente a *Mycobacterium tuberculosis* ao encapsular este composto liquênico em lipossomas; além disso, a nanoencapsulação promoveu um aumento da captura da substância ativa por macrófagos.

No entanto, não há relatos na literatura da avaliação da atividade antibacteriana de AU encapsulado em lipossomas frente a isolados clínicos de MRSA bem como de estudos do possível sinergismo com o fármaco VAN.

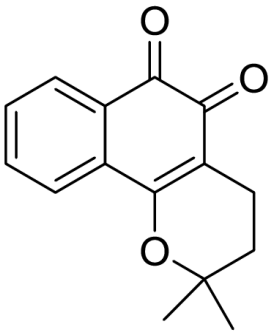
2.6 β-LAPACHONA

Dentre as substâncias de origem natural, os compostos que contém um núcleo quinona frequentemente apresentam atividade biológica. Plantas que produzem estes compostos são amplamente utilizadas na medicina popular há centenas de anos atrás: há registros do seu uso no Egito Antigo, aproximadamente no ano 4.000 a.C., e na Grécia, entre os séculos V e IV a.C. Dentre as propriedades farmacológicas das quinonas, pode-se citar: inibição da enzima transcriptase reversa do vírus HIV e outras atividades como antitumoral, antiinflamatória, moluscicida, leishmanicida, antifúngica, tripanocida, antiprotozoária e antibacteriana de amplo espectro. Os metabólitos secundários pertencentes à classe das naftoquinonas são amplamente encontrados em plantas superiores e em outros seres vivos e tem sido utilizados em cosméticos, alimentos e produtos farmacêuticos. Diversas naftoquinonas de origem natural, como estreptonigrina, α-lapachona e β-lapachona (β-lap) tem despertado o interesse da comunidade científica devido às suas atividades biológicas e a sua grande diversidade estrutural (TRAN et al., 2004; SILVA-JÚNIOR et al., 2008; MACEDO et al., 2013).

A β-lap é conhecida desde 1858 e foi isolada inicialmete da família Bignoniaceae, mais especificamente por espécies *Tabebuia* (conhecidas no Brasil como ipês), mas também é encontrada nas famílias Leguminosae, Verbenaceae, Proteaceae, Sapotaceae, Scrophulariaceae e Malvaceae. Durante muitas décadas preparações à base de componentes da planta *Tabebuia avellanedae* foram usadas para fins medicinais tanto na América do Sul quanto na América do Norte. Outra forma de obtenção da β-lap é por vias sintéticas a partir de precursores como lapachol e lomatiol, processo este feito pela primeira em 1892. Sabe-se que a β-lapachona apresenta propriedades antimicrobianas, tripanocidas e anticancerígena, estando em fase de ensaios clínicos quanto ao seu uso na terapêutica de neoplasia pancreática (PEREIRA et al., 2006; SILVA et al., 2009; PALUDO et al., 2013; AIRES et al., 2013).

Quanto à sua estrutura química (Figura 7), a orto-naftoquinona β-lap (3,4-dihydro-2,2-dimethyl-2H-naphthol [1,2-b]pyran-5,6-dione), como toda quinona, consiste em um composto orgânico aromático com carbonilas conjugadas a anéis de seis membros e são produtos da oxidação de dióis aromátios (TRAN et al., 2004; KUMAGAI et al., 2012; AIRES et al., 2013).

Figura 7. Estrutura química da β-lapachona.



Fonte: AIRES et al. (2013).

Quanto ao seu mecanismo de ação, esses metabólitos secundários são conhecidos por formarem complexos irreversíveis com proteínas, podendo fazê-las perder suas funções. Os possíveis alvos das quinonas nas células microbianas são adesinas expostas na superfície, polipeptídeos da parede celular e enzimas ligadas à membrana, além disso, esses metabólitos podem tornar alguns substratos indisponíves para os microorganismos (COWAN, 1999; TRAN et al., 2004; MACEDO et al., 2013). Adiconalmente, as naftoquinonas parecem aumentar a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs), as quais causam danos aos lípidos, proteínas e ácidos desoxirribonucleico. Neste âmbito, Pereira et al. (2006) observaram que a exposição de bactérias do gênero *Staphylococcus*, incluindo *S. aureus*, às naftoquinonas fez aumentar os níveis de algumas proteínas bacterianas de peso molecular de 100, 70, 60 e 10 kDa, as quais estão associadas com estresse oxidativo em bactérias. Deste modo, sugere-se que as naftoquinonas ocasionam estresse oxidativo na membrana das células bacterianas, uma vez que as quinonas são análogos da ubiquinona, podendo competir com esta coenzima e afetar a síntese de ATP, além de aumentar a concentração de radicais livres, como superóxido e peróxido de hidrogênio.

Considerando a baixa solubilidade em água apresentada pela β-lap (0,16 mM), há a necessidade de se desenvolver formulações contendo este metabólito secundário que assegurem sua biodisponibilidade e sua atividade biológica, além de proporcionarem seu uso em doses mais baixas, sua administração por uma via conveniente e o controle dos seus efeitos colaterais. A encapsulação da β-lap em lipossomas consiste numa possível ferramenta para superação destes problemas (CAVALCANTI et al., 2011; AIRES et al., 2013).

No entanto, não há na literatura estudos relacionados à avaliação de possível sinergismo entre a β-lap e o fármaco VAN, livres ou encapsulados em lipossomas, frente a isolados clínicos de MRSA.

2.7 SINERGISMO

O uso de associações de agentes antimicrobianos é considerado uma ferramenta com potencial capacidade de aumentar a eficácia de antibióticos. A combinação de substâncias antimicrobianas tem sido empregada para diversos fins, principalmente para: (1) reduzir a toxicidade relacionada à dose do(s) antibiótico(s) em virtude do uso de doses menores de cada substância ativa; (2) na terapêutica de infecções por múltiplos patógenos; (3) para prevenir ou retardar a emergência *in vivo* de subpopulações resistentes a antibióticos (LORIAN, 2005; NOGUEIRA, 2012; MACEDO et al., 2013). Nessse âmbito, a interação mais desejada entre fármacos é a do tipo sinérgica, a qual consiste numa interação positiva onde o uso combinado de duas ou mais substâncias produz um efeito combinado maior do que a soma dos seus efeitos quando se utiliza cada antimicrobiano de modo separado (LORIAN, 2005; SEGATORE et al., 2012).

Devido ao aumento da prevalência de microorganismos resistentes a múltiplas drogas, testes de sinergismo empregando várias combinações de substâncias de origem natural com agentes antimicrobianos empregados na clínica pode ser uma importante ferramenta para que se faça uso de uma terapia antimicrobiana mais eficaz e menos tóxica (MACEDO et al., 2013).

Para a utlização de uma combinação de antimicrobianos adequada é necessário compreender a interação existente entre os agentes considerados. Dentre as metodologias mais utilizadas para avaliar o efeito dessas combinações sobre o crescimento bacteriano *in vitro,* estão os métodos *Checkerboard* e o E-test modificado.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Formular e caracterizar lipossomas contendo vancomicina, avaliar sua atividade antimicrobiana frente a isolados clínicos de MRSA multirresistentes e verificar seu sinergismo com ácido úsnico e β-lapachona.

3.2 Objetivos específicos

- Formular lipossomas convencionais contendo vancomicina;
- Caracterizar físico-quimicamente os lipossomas obtidos;
- Avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro* da vancomicina e do ácido úsnico, livres e encapsulados em lipossomas, frente a isolados clínicos de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA) multirresistentes;
- Mensurar a interação *in vitro* entre vancomicina, ácido úsnico e β-lapachona, livres e encapsulados em lipossomas, contra os mesmos isolados clínicos de MRSA.

4. CAPÍTULO 1

Avaliação *in vitro* da atividade anti-MRSA de vancomicina encapsulada em lipossomas e do sinergismo com ácido úsnico e β-lapachona

1. INTRODUÇÃO

O surgimento e disseminação de bactérias multirresistentes tem limitado a terapia antibacteriana convencional e consiste em relevante problema de saúde pública. Dentre estes microrganismos, *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) multirresistentes possui alta virulência e as infecções ocasionadas por este microrganismo apresentam elevada morbimortalidade (LUTZ, 2003; KANAFANI e FOWLER-JR, 2006; ZECCONI e SCALI, 2013).

Deste modo, existe uma necessidade crescente quanto ao desenvolvimento de novas classes de antibióticos ou à melhoria da eficácia de fármacos utilizados na clínica (SEGATORE et al., 2012). A encapsulação de antibióticos em nanocarreadores de liberação controlada apresenta diversas vantagens, dentre as quais o aumento da eficácia terapêutica, minimização da toxicidade e melhoria nas propriedades farmacocinéticas, como a liberação da substância ativa em tecidos alvos (KADRY et al., 2004; DRULIS-KAWA e DOROTKIEWICZ-JACH, 2010; HUH e KWON, 2011).

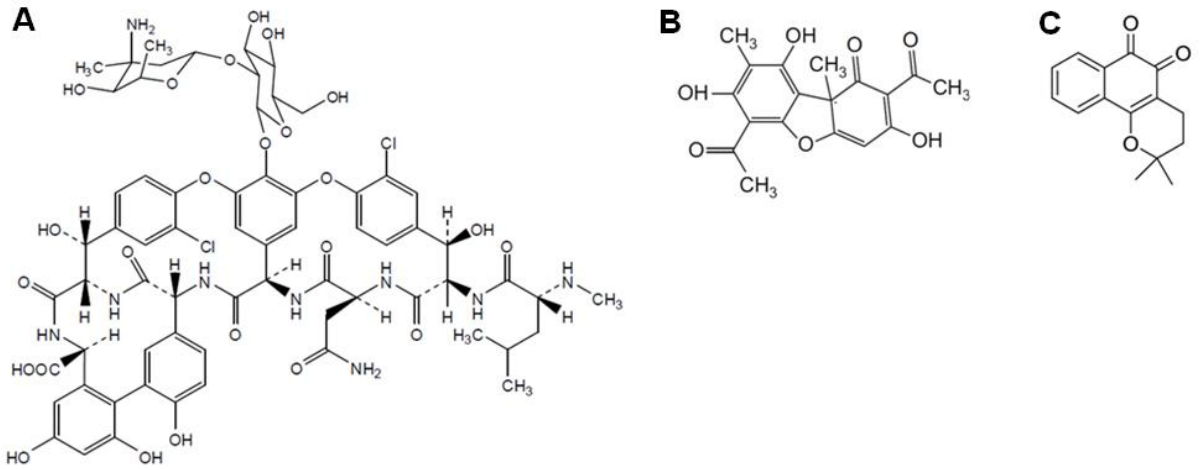
A vancomicina (VAN) consiste em um fármaco de referência na terapêutica de MRSA multirresistente, no entanto, além da nefrotoxicidade desta substância, já estão sendo descritos na literatura, isolados MRSA com resistência intermediária à VAN (KADRY et al., 2004; KANAFANI e FOWLER-JR, 2006). Particularmente quanto à VAN, o uso de veículos em escala nanométrica pode vir a proporcionar diminuição da sua nefrotoxicidade bem como aumento da sua liberação em tecidos como pulmão, ossos e sistema nervoso central (KADRY et al., 2004), além de limitar o surgimento de bactérias resistentes à vancomicina.

A associação de antimicrobianos consiste em outra importante ferramenta para a tratamento de infecções por bactérias resistentes, uma vez que a terapia combinada parece prevenir a seleção de isolados resistentes, além de elevar o espectro de ação dos antimicrobianos e promover sinergismo entre estes (JACKSON et al., 2009; SILVA et al., 2009).

Diversas substâncias de origem natural possuem propriedades bioativas e dentre as que possuem atividade antimicrobiana, o ácido úsnico (AU) e a β-lapachona (β-lap) tem sido

estudados por alguns grupos de pesquisa (LAUTERWEIN et al., 1995; INGÓLFSDÓTTIR et al., 2002; MACEDO et al., 2013). Já existem relatos na literatura relacionados à verificação do tipo de interação *in vitro* existente entre AU ou β-lap e diversos antibióticos disponíveis comercialmente frente à MRSA. Em alguns estudos o sinergismo antimicrobiano foi observado (SILVA et al., 2009; SEGATORE et al., 2012; MACEDO et al., 2013). No entanto, ainda não há relatos na literatura da avaliação da interação *in vitro* da VAN com o AU ou β-lap.

Figura 1



Estrutura química da (A) vancomicina, (B) ácido úsnico e (C) β-lapachona.

Diante do exposto, o objetivo deste estudo consistiu em avaliar a atividade antimicrobiana de VAN, AU e β-lap livres e encapsulados em lipossomas frente a isolados clínicos de MRSA e, por fim, verificar o tipo de interação *in vitro* existente entre VAN e AU ou β-lap livres e encapsulados.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material

Cloridrato de Vancomicina foi gentilmente cedido por *ABL – Antibióticos do Brasil LTDA* (Cosmópolis, São Paulo, Brasil). Ácido úsnico (AU), colesterol (Chol), octadecilamina (SA) e trietilamina (TEA) foram obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA). Fosfatidilcolina de soja (SPC) (98 % Epikuron 200®) foi obtida de Lucas Meyer (Hamburgo, Alemanha). Acetonitrila, tetrahidrofurano grau HPLC e demais solventes e reagentes foram fornecidos por Merck (Darmstadt, Alemanha). Fitas para E-test contendo vancomicina foram obtidas de Oxoid (Hampshire, Reino Unido). β-lapachona pura, obtida do lapachol por uma rota semi-

sintética, foi fornecida pelo Dr. Góes (UFPE/Brasil). Meios de cultura foram obtidos de HiMedia (Mumbai, Índia).

2.2 Preparação dos lipossomas

Lipossomas convencionais contendo vancomicina (VAN-lipo) foram obtidos pelo método de desidratação-reidratação (DVR) modificado descrito por Pumerantz et al. (2011). Fosfatidilcolina, colesterol e estearilamina foram solubilizados em uma mistura de $CHCl_3$:MeOH (3:1 v/v) sob agitação magnética. Os solventes foram posteriormente removidos por evaporação à vácuo (37 ± 1 ºC) para obtenção de fino filme lipídico. Vesículas multilamelares (MLVs) foram formadas através da hidratação deste filme com uma solução de trealose, sendo, em seguida, congeladas à -80 °C e submetidas à liofilização (EZ-DRY, FTSS System, Nova York, EUA). O liófilo foi reidratado com 2 mL de uma solução concentrada de VAN (50 mg/mL) para formar vesículas de desidratação-reidratação (DRVs). Após 30 min, a dispersão foi diluída com 8 mL de tampão fosfato-salino (PBS), atingido-se a concentração final de 10 mg/mL do fármaco. Vesículas unilamelares (SUVs) contendo VAN foram obtidas através da sonicação das formulações MLVs a 200 W e 40 Hz por 300 s (Vibra Cell, BRANSON, EUA).

Com intuito de estudos comparativos, lipossomas contendo ácido úsnico (AU-lipo) ou β-lapachona (β-lap-lipo) com concentrações de 1 mg/mL e 0,5 mg/mL, respectivamente, foram reproduzidos (LIRA et al., 2009A; CAVALVANTI et al., 2011) pelo método de hidratação do filme lipídico seguido de sonicação, para avaliação da atividade antimicrobiana e de sinergismo com VAN e VAN-lipo.

2.3 Determinação da eficiência de encapsulação das substâncias ativas em lipossomas

O doseamento de VAN em lipossomas foi efetuado utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) segundo método descrito na Farmacopeia Americana (*United States Pharmacopeia*, USP), 36ª Ed, com modificações no fluxo da fase móvel. Este método se baseia em eluição gradiente, com fases móveis constituídas por tampão trietilamina, acetonitrila e tetrahidrofurano na proporção de 92:7:1 ou 70:29:1. O pH das soluções foi ajustado a 3,2 com ácido fosfórico. Coluna C_{18} NST (5 µm 4,6 mm x 25 cm) com fluxo de fase móvel de 0,7 mL/mim e volume de injeção da amostra de 20 µL foram utilizados para detecção da VAN a 280 nm (Espectrofotômetro UV-Vis Aliance 2695, Waters, Miliford, Massachusetts, EUA). A curva analítica para o doseamento da VAN foi obtida nas

concentrações de 80 a 160 µg/mL, cujas soluções foram obtidas a partir de solução estoque de 1 mg/mL.

Para determinação do teor de VAN nos lipossomas, primeiramente foi realizada extração do fármaco por meio do método de Bligh e Dyer (1959) adaptado, no qual se fez uso de $CHCl_3$:MeOH:H_2O (20:20:60) seguido de centrifugação a 3.000 rpm durante 10 min. O sobrenadante foi injetado em HPLC para determinação do teor conforme descrito anteriormente.

Quanto à determinação da eficiência de encapsulação (EE%) da VAN nos lipossomas, foi utilizado o método de ultrafiltração-centrifugação, segundo o qual um tubo de eppendorf com uma membrana filtrante (Millipore®, Billerica, EUA, MW cut-off = 10,000 Da) foi empregado para separar a fase aquosa (contendo as substâncias ativas livres) da dispersão lipossomal. A concentração do fármaco livre foi determinada no ultrafiltrado e a EE% foi calculada indiretamente, de acordo com a fórmula abaixo descrita (LIRA et al., 2009A):

$$\text{EE\%} = \frac{[\text{VAN}]_{\text{TOTAL}} - [\text{VAN}]_{\text{ULTRAFILTRADO}}}{[\text{VAN}]_{\text{TOTAL}}} \text{ X } 100$$

O doseamento e a determinação da taxa de encapsulação de AU e da β-lap nos lipossomas foram efetuados por espectrofotometria, conforme metodologias descritas anteriormente (LIRA et al., 2009A; CAVALVANTI et al., 2011).

2.4 Caracterização físico-química dos lipossomas

O acompanhamento da evolução do pH dos lipossomas foi realizado em pHmêtro (Bioblock Científico 99.622, Prolabo, Paris, França). Dados referentes ao diâmetro dos lipossomas e à sua distribuição foram obtidos pelo método de difração de laser utilizando o Delsa™ Nano S (Beckman Coulter, Califórnia, EUA). A carga de superfície dos lipossomas foi determinada por eletroforese através do analisador de potencial zeta ZetasizerNano-ZS9 (Malvern, Worcestershire, Inglaterra). Todas as análises foram realizadas em triplicata.

2.5 Avaliação *in vitro* da atividade antimicrobiana

2.5.1 Cepas microbianas

Foram utilizados dez isolados clínicos de MRSA pertencentes à Bacterioteca do Laboratório de Microbiologia e Imununologia – UFPE, Campus Vitória. A identificação destes isolados se iniciou através dos testes de catalase, ágar manitol, DNase e testes de

coagulase em tubo. A verificação da resistência à meticilina foi realizada através do método de difusão em disco com cefoxitina e oxacilina, assim como por *screening* usando Müeller-Hinton suplementado com NaCl 4% e oxacilina 6 µg/mL. Reação em Cadeia Polimerase (PCR) foi realizada para detecção de gene *mec*A, segundo metodologia de Petinaki et al. (2001). Quanto às cepas controles, utilizou-se cepas da *American Type Culture Collection* (ATCC 29213 e ATCC 33591).

2.5.2 Ensaio antimicrobiano

A atividade antimicrobiana *in vitro* de VAN e AU, assim como dos nanossistemas obtidos (VAN-lipo e AU-lipo) foi avaliada pelo método de microdiluição em caldo de acordo com o *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2012). Inicialmente foi adicionado caldo Müeller-Hinton (CMH) nos poços das placas de microdiluição, o qual foi seguido pelas substâncias ativas livres e/ou formulações lipossomais através de diluição seriada (concentrações variando de 0,25 a 125 µg/mL). Posteriormente as suspensões bacterianas foram ajustadas por espectrofotometria e distribuídas nas placas para obter uma concentração final de 1 x 10^5 UFC/mL. As microplacas foram incubadas a 35 ºC por 24 h e a Concentração Mínima Inibitória (CMI) foi determinada como a menor concentração capaz de inibir o crescimento microbiano, a qual foi observada por análise visual e por espectrofotometria a 630 nm. A Concentração Mínima Bactericida (CMB) foi determinada ao se inocular em ágar Müeller-Hinton uma alíquota do meio de cultura contido dos poços das placas de CMI nos quais não se visualizou crescimento microbiano. As placas inoculadas foram incubadas a 35 ºC por 24 h. A CMB foi determinada como a menor concentração das substâncias ativas/lipossomas que não permitiu o crescimento microbiano (CLSI, 2012).

Controles positivo (inóculo + meio de cultura) e negativo (fármaco + meio de cultura) foram utilizados. Os experimentos foram realizados em triplicata.

2.6 Ensaios de sinergismo

2.6.1 Método c*heckerboard*

As interações *in vitro* entre VAN ou VAN-lipo e AU, AU-lipo, β-lap ou β-lap-lipo foram avaliadas pelo ensaio de microdiluição *checkerboard* bi-dimensional, usando placas de microdiluição de 96 poços, segundo método descrito por An et al. (2011). Culturas dos isolados clínicos de MRSA LBM 1, LBM 2, LBM 3, LBM 6 e LBM 8 foram transferidas individualmente à solução salina e ajustadas quanto à concentração pela análise de turbidez comparativamente a escala 0,5 de McFarland e por leitura espectrofotométrica a 620 nm até

obtenção de absorbância entre 0,08 a 0,10 (1,0 x 10^8 UFC/mL); posteriormente, a suspensão bacteriana foi diluída na proporção 1:10, de modo a se obter uma concentração correspondente a 1,0 x 10^7 UFC/mL, a qual foi utilizada nos ensaios.

Quanto à preparação das soluções dos fármacos e formulações, as substâncias ativas A ou seus lipossomas (a serem depositados na última coluna da placa de microdiluição) foram preparados na concentração correspondente a 4x o valor da sua CMI. Quanto às substâncias do tipo B ou respectivas formulações (a serem depositados na primeira linha da placa de microdiluição), foram preparados na concentração de 2x o valor da sua CMI. Após preenchimento dos poços das placas com 95μL de CMH, foram adicionadas na última coluna 100 μL das soluções das substâncias ativas A (VAN ou VAN-lipo), a partir da qual se efetuou diluição seriada até a segunda coluna. Na primeira linha se adicionou 100 μL das substâncias ativas B (AU, AU-lipo, β-lap ou β-lap-lipo), após a qual foi realizada diluição seriada até a penúltima linha. Deste modo, a coluna 1 continha apenas AU, AU-lipo, β-lap ou β-lap-lipo e a linha H apenas VAN ou VAN-lipo. O poço H1 foi utilizado como controle positivo (meio de cultura + inóculo). Subsequentemente, foram distribuídos 5 μL da suspensão de *S. aureus* em cada poço das placas, as quais foram posteriormente incubadas a 37 °C por 24 h.

Adicionalmente, ensaios *checkerboard* foram também realizados para avaliar a interação *in vitro* entre β-lap e AU, assim como β-lap-lipo e AU-lipo, sendo os dois primeiros considerados como substâncias/formulações A e os dois últimos, como substâncias/formulações B. Os demais parâmetros foram semelhantes ao anteriormente citado. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

Dentre os métodos para calcular as interações entre substâncias ativas, selecionou-se o modelo do Índice da Concentração Inibitória Fracionária (FICI), descrito por Segatore et al. (2012), segundo o qual:

$$\sum \text{FIC} = \text{FIC}_A + \text{FIC}_B = \text{CMI}_{AB}/\text{CMI}_A + \text{CMI}_{BA}/\text{CMI}_B$$

Onde, CMI_A e CMI_B são as CMIs das substâncias ativas A e B quando agem isoladamente, enquanto CMI_{AB} e CMI_{BA} são as CMI das substâncias ativas A e B quando agem em combinação.

A atividade das substâncias combinadas deve ser considerada sinérgica quando o FICI for $\leq 0,5$, aditiva quando for 0,5 a ≤ 1, indiferente quando for $1 \leq \text{FICI} \leq 2$ e antagônica quando o FICI $\geq$ 2-4 (ANON, 1992).

2.6.2 E-test

Para o teste epsilométrico (E-test) modificado foi utilizado o método descrito por Sopirala et al. (2010). Foram empregadas como concentrações sub-inibitórias das substâncias ativas B (AU, AU-lipo, β-lap e β-lap-lipo) os valores correspondentes a ½ e ¼ das suas respectivas CMI, totalizando 40 combinações diferentes. As placas de Petri com ágar Müeller-Hinton (AMH) contendo as substâncias ativas B foram preparadas no Laboratório de Microbiologia e Imunonologia da Universidade Federal de Pernambuco – Campus Vitória de Santo Antão. Foram utilizados os mesmos isolados clínicos do método *checkerboard*, os quais foram ajustados à concentração de 1,0 x 10^8 UFC/mL em solução salina tanto por análise de turbidez, utilizando a escala 0,5 de McFarland, quanto por leitura espectrofotométrica a 620 nm (absorbância entre 0,08 a 0,10). Posteriormente, os inóculos ajustados foram semeados nas placas. As fitas de E-test contendo VAN foram depositadas nas placas de Petri contendo AU, AU-lipo, β-lap ou β-lap-lipo e em placas de AMH sem substâncias ativas B (placas controle). As placas foram incubadas a 37°C por 18 h.

Os resultados destas análises foram interpretados ao se observar a CMI da substância A (VAN) por fita de E-test e a CMI do deste antibiótico em presença de concentrações sub-inibitórias de AU, AU-lipo, β-lap ou β-lap-lipo. Se a CMI da VAN isolada diminuir 1 diluição nestas placas, o resultado deve ser interpretado como indiferente; se esta alteração estiver na escala de 2 diluições, a interação deve ser considerado como aditiva; se a CMI reduzir três diluições, o resultado deve ser interpretado como sinérgico (SOPIRALA et al., 2010). A determinação do grau de redução é feita ao se efetuar a divisão da CMI da VAN isolada pela CMI da VAN em presença de uma concentração sub-CMI de alguma das substâncias ativas B. A menor concentração de AU, AU-lipo, β-lap e β-lap-lipo que ocasionar a maior redução na CMI da VAN deve ser registrada (DOMARACKI et al., 2000). Todo o experimento foi realizado em duplicata.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Caracterização dos lipossomas contendo vancomicina

Os lipossomas contendo vancomicina (VAN-lipo) apresentaram tamanho médio de partículas (TP) correspondente a 136,4 ± 5,95 nm com PDI de 0,246. As formulações obtidas apresentaram maior homogeneidade de tamanho quando comparadas à formulações contendo VAN desenvolvidas em outros estudos. Pumerantz et al. (2011), desenvolveram lipossomas convencionais contendo VAN cujos tamanhos de vesículas mostraram elevada variação de 107 a 401 nm (254 ± 147 nm). Por outro lado, Anderson et al. (2001) obtiveram VAN-lipo

com menor variação de TP (208,8 ± 8,9 nm), enquanto Sande et al. (2012) desenvolveram VAN-lipo carregados negativamente, os quais apresentaram TP mais elevado, situando-se em torno de 527,6 ± 58,2 nm.

Quanto ao TP dos VAN-lipo obtidos por outros métodos, Nicolosi et al. (2010), empregando o método de evaporação em fase-reversa, desenvolveu VAN-lipo (dioleoilfosfatidiletanolamina, dipalmitoilfosfatidilcolina e colesterol) que foram submetidos à extrusão para formação de SUVs e ao final apresentaram um TP de 103,23 ± 2,87 nm. Kadry et al. (2004), por sua vez, desenvolveu lipossomas neutros, catiônicos e aniônicos contendo vancomicina pelo método de hidratação de filme lipídico submetidos posteriormente a diversos tempos de sonicação (20, 40, 60 e 80 s); os lipossomas assim obtidos apresentaram tamanhos de partículas variando entre 50 e 100 nm.

Quanto ao doseamento da VAN, este foi calculado a partir da seguinte equação da reta obtida da curva padrão:

$$[\text{VAN}] = 0{,}09723 + 0{,}208 \text{ x Absorbância}$$

O teor de VAN nos lipossomas foi de 98,25 ± 1,8 % e sua EE foi de 36,15 ± 0,26 %. Anderson et al. (1999), primeiros pesquisadores a publicar estudos sobre o desenvolvimento de VAN-lipo pelo método DRV, desenvolveram lipossomas compostos por DSPC:Chol:DMPG (3:1:0.25) com EE de 20 a 25 %. Sande et al. (2012) utilizando o mesmo método alcançaram uma EE da VAN de 20 % para lipossomas compostos por dimiristoilfosfatidilglicerol (DMPG), DSPC e Chol e de 9 % para lipossomas carregados negativamente compostos por dicetilfosfato (DCP), DSPC e Chol. Pumerantz et al. (2011), por sua vez, obtiveram uma EE de apenas 9 ± 2 % para lipossomas convencionais (DSPC:Chol 3:1). Por outro lado, Sande et al. (2012) e Pumerantz et al. (2011) obtiveram SUVs por extrusão, enquanto Anderson et al. (1999) fizeram uso de sonicação, pois, segundo estes, a extrusão reduz significativamente a EE. Desde modo, a maior eficiência de encapsulação encontrada no presente trabalho pode ser resultante do uso de sonicação, parâmetro que parece influenciar a EE (ANDERSON et al., 2001).

Ainda segundo Anderson et al. (2001), a encapsulação de moléculas hidrofílicas, como a VAN, em lipossomas é comumente relacionada com a concentração do fármaco no volume aquoso encapsulado. Muppidi et al. (2012), assim como Kirby e Gergoriadis (1984), explicam que a reidratação de lipossomas liofilizados com água contendo um soluto altamente solubilizado acarreta numa elevada EE deste soluto, à medida que o solvente entra nas vesículas, quando comparada à taxa de encapsulação obtida com métodos convencionais.

Deste modo, foi utilizada no presente trabalho uma solução de vancomicina de elevada concentração (50 mg/mL) para reidratar os lipossomas liofilizados.

Muppidi et al. (2012) formularam VAN-lipo convencionais pelos métodos de hidratação de filme lipídico e gradiente de pH modificado e obtiveram baixas EE (2 % e 0,3 %, respectivamente). Diante disto, utilizaram o método DRV modificado e encontraram uma EE superior (9 ± 2 %). Anderson et al. (2001) reiteram também que a EE depende do método de preparação, bem como da composição dos lipossomas.

Quanto ao potencial zeta, os VAN-lipo apresentaram carga positiva (49,6 ± 3,37 mV), em virtude da presença da estearilamina na bicamada lipidica dos lipossomas. A estearilamina é um lipídeo que confere carga positiva aos sistemas nanoestruturados (VILLASMIL-SÁNCHEZ et al., 2010). Nesse contexto, Kadry et al. (2004), utilizando o método de hidratação de filme lipídico, obtiveram lipossomas com EE da VAN de 5,2 % para lipossomas catiônicos e de 4,72 % e 2,34 % para lipossomas aniônicos e neutros, respectivamente, sugerindo que lipossomas carregados positivamente acarretam em maior EE. A carga positiva dos lipossomas também parece ter outros efeitos desejáveis sobre os nanossistemas: lipossomas catiônicos parecem ser eliminados da corrente sanguínea mais lentamente do que lipossomas carregados negativamente (KADRY et al., 2004). Além disso, a carga positiva beneficia a atividade antimicrobiana dos VAN-lipo, visto que a parede celular bacteriana é carregada negativamente e o caráter catiônico das vesículas propicia uma maior captura dos lipossomas por parte das células microbianas (KADRY et al., 2004).

3.2 Avaliação *in vitro* da atividade antimicrobiana

A Concentração Mínima Inibitória (CMI) e a Concentração Mínima Bactericida (CMB) da vancomicina livre e encapsulada em lipossomas estão dispostas na Tabela 1. No que se refere à susceptibilidade à vancomicina de isolados de *S. aureus*, o CLSI (2012) considera como sendo sensíveis os isolados com CMI igual ou inferior a 2 µg/mL, como apresentando susceptibilidade intermediária a este fármaco os isolados com CMI situado entre 4 e 8 µg/mL e como resistentes os isolados com CMI igual ou superior a 16 µg/mL. Deste modo, todos os isolados de MRSA utilizadas neste trabalho são sensíveis à VAN, uma vez que a CMI de todos eles variaram de 0,25 a 2 µg/mL.

No entanto, é importante mencionar que falhas no tratamento com vancomicina de bacteremias causadas por MRSA não são incomuns, mesmo quando se trata de isolados MRSA suscetível à vancomicina (≤ 2 µg/mL). Uma redução na eficácia da VAN frente aos isolados MRSA com uma CMI da vancomicina relativamente elevada (ou seja, entre 1 e 2

µg/mL) foi descrita em alguns estudos, sugerindo que mudanças sutis na CMI (de ≤ 0,5 µg/mL para 1,0 a 2,0 µg/mL) estão correlacionados com falhas na terapêutica da VAN (MOISE-BRODER et al., 2004; SAKOULAS et al., 2004; MOISE-BRODER et al., 2007; SORIANO et al., 2008). O isolado LBM 03 merece atenção, uma vez que sua CMI foi de 2 µg/mL, isto é, esse isolado apresentou esta diminuição relativa na susceptibilidade à vancomicina, quando comparado aos isolados altamente sensível (CMI menor que 1 µg/mL).

Tabela 1. Susceptibilidade de isolados clínicos de *Staphylococcus aureus* à VAN, VAN-lipo, AU e AU-lipo.

	CMI/CMB (µg/mL)			
Staphylococcus aureus	**VAN**	**VAN-lipo**	**AU**	**AU-lipo**
ATCC 29213	0,5/0,5	0,5/1	8/31	8/>125
ATCC 33591	½	1/2	8/62	8/>125
LBM 01	0,5/2	0,5/1	31/>125	8/>125
LBM 02	0,5/1	0,5/1	31/>125	8/>125
LBM 03	2/2	1/2	31/125	8/>125
LBM 04	0,5/1	1/1	31/125	8/>125
LBM 06	0,5/2	0,5/2	8/16	4/>125
LBM 07	0,5/0,5	0,5/1	31/31	4/31
LBM 08	0,5/0,5	0,5/1	31/31	8/31
LBM 11	0,5/1	0,5/1	31/125	8/31
LBM 12	0,25/0,5	0,25/1	8/31	8/>125
LBM 13	0,5/0,5	0,5/1	31/31	8/31

CMI: Concentração Mínima Inibitória; CMB: Concentração Mínima Bactericida; ATCC: *American Type Culture Collection*; LBM: Laboratório de Microbiologia e Imunologia; VAN: vancomicina; AU: ácido úsnico; VAN-lipo: lipossomas contendo vancomicina; AU-lipo: lipossomas contendo ácido úsnico.

No que se refere à atividade antibacteriana do AU, a CMI e a CMB do referido composto liquênico livre e encapsulado em lipossomas também estão dispostas na Tabela 1. Observa-se que as CMIs do AU livre frente aos isolados de MRSA obtidos neste ensaio (8 a 31 µg/mL) estão condizentes com os valores relatados previamente na literatura. Lauterwein et al. (1995), ao avaliarem o efeito antimicrobiano do ácido úsnico frente isolados de MRSA, obtiveram CMIs que variaram de 8 a 16 µg/mL; especificamente quando estes autores avaliaram a atividade da referida substância ativa frente ATCC 29213 foi obtida uma CMI de 16 µg/mL, valor este próximo ao encontrado no presente estudo (8 µg/mL). Outros pesquisadores também avaliaram a atividade deste produto natural frente a isolados clínicos de MRSA, tendo Weckesser et al. (2007) encontrado uma CMI de 16 µg/mL e uma CMB de 64 µg/mL e Ingólfsdóttir (2002) obtido valores de CMIs que variaram de 6 a 85 µg/mL. Por outro lado, Segatore et al. (2012) também determinaram a atividade antimicrobiana do ácido úsnico frente aos isolados de MRSA e obtiveram valores de CMIs no intervalo compreendido

entre 1 e 8 µg/mL, valores inferiores aos encontrados no presente estudo (8 a 31 µg/mL); observa-se, então, que os isolados utilizados no trabalho de Segatore et al. (2012) foram mais sensíveis ao AU do que as cepas empregadas no presente estudo.

Observa-se também que o AU-lipo apresenta atividade bacteriostática mais eficiente quando comparada à expressa pelo AU, uma vez que houve uma diminuição da CMI de 8-31 µg/mL para 4-8 µg/mL (Tabela 1). Uma das possíveis explicações para a melhoria da atividade antimicrobiana promovida pela encapsulação de antibióticos em lipossomas é a possível fusão dos sistemas nanoestruturados com a parede celular de *S. aureus*, a qual permitiria um aumento da quantidade da substância ativa que alcança o interior da célula bacteriana (SANDE et al., 2012).

3.3 Ensaios de sinergismo

3.3.1 Método *checkerboard*

Os valores do índice FICI obtidos nos ensaios *checkerboard* na qual se associou VAN e VAN-lipo com AU, AU-lipo, β-lap e β-lap-lipo frente aos cinco isolados estão dispostos na Tabela 2.

Considerando a interação antimicrobiana da VAN ou VAN-lipo com o AU, a maioria dos isolados apresentou interação aditiva, exceto os isolados LBM 03 e LMB 08, os quais apresentaram interação sinérgica para as combinações de VAN + AU e VAN-lipo + AU, respectivamente. Porém, quando se analisou a associação VAN + AU-lipo a interação passou a ser sinérgica para todos os isolados. Por fim, cabe mencionar que quando se analisou a interação das substâncias ativas estando ambas encapsuladas em lipossomas (VAN-lipo e AU-lipo), observou-se que para parte dos isolados a interação foi sinérgica (LBM 03, LBM 06 e LBM 08) e para outra parte, aditiva (LBM 01 e LBM 02). Nota-se, consequentemente, que a encapsulação do AU em lipossomas parece consistir em um fator promotor de sinergismo entre esta substância ativa e a VAN ($FICI_{VAN/AU}$: 0,515; $FICI_{VAN/AU\text{-}lipo}$: 0,276), ocasionando, assim, uma melhoria na atividade antibacteriana do fármaco de referência VAN.

Tabela 2. Interação *in vitro* de VAN e VAN-lipo com AU, AU-lipo, β-lap ou β-lap-lipo frente a isolados clínicos de MRSA.

Substância Ativa/ Formulação	Isolados	FICI		Substância Ativa/ Formulação	Isolados	FICI	
		Média	Interação			Média	Interação
VAN + AU	LBM 1	0,51	Aditiva	VAN-lipo + AU	LBM 1	0,51	Aditiva
	LBM 2	0,51	Aditiva		LBM 2	0,51	Aditiva
	LBM 3	0,26	Sinérgica		LBM 3	0,87	Aditiva
	LBM 6	0,51	Aditiva		LBM 6	0,51	Aditiva
	LBM 8	0,51	Aditiva		LBM 8	0,26	Sinérgica
VAN + AU-lipo	LBM 1	0,30	Sinérgica	VAN-lipo + AU-lipo	LBM 1	0,69	Aditiva
	LBM 2	0,31	Sinérgica		LBM 2	0,54	Aditiva
	LBM 3	0,25	Sinérgica		LBM 3	0,50	Sinérgica
	LBM 6	0,27	Sinérgica		LBM 6	0,45	Sinérgica
	LBM 8	0,25	Sinérgica		LBM 8	0,25	Sinérgica
VAN + β-lap	LBM 1	0,50	Sinérgica	VAN-lipo + β-lap	LBM 1	0,50	Sinérgica
	LBM 2	0,50	Sinérgica		LBM 2	0,50	Sinérgica
	LBM 3	0,26	Sinérgica		LBM 3	0,50	Sinérgica
	LBM 6	0,50	Sinérgica		LBM 6	0,50	Sinérgica
	LBM 8	0,50	Sinérgica		LBM 8	0,50	Sinérgica
VAN + β-lap-lipo	LBM 1	0,31	Sinérgica	VAN- lipo + β-lap-lipo	LBM 1	0,51	Aditiva
	LBM 2	0,40	Sinérgica		LBM 2	0,50	Sinérgica
	LBM 3	0,26	Sinérgica		LBM 3	0,50	Sinérgica
	LBM 6	0,31	Sinérgica		LBM 6	0,50	Sinérgica
	LBM 8	0,50	Sinérgica		LBM 8	0,50	Sinérgica

FICI: Índice da Concentração Inibitória Fracionária; LBM: Laboratório de Microbiologia e Imunologia; VAN: vancomicina; AU: ácido úsnico; VAN-lipo: lipossomas contendo vancomicina; AU-lipo: lipossomas contendo ácido úsnico; β-lap: β-lapachona; β-lap-lipo: lipossomas contendo β-lapachona.

Observa-se que os resultados obtidos neste estudo utilizando o AU como possível promotor da melhoria da atividade antimicrobiana de um fármaco referência (vancomicina) foram mais significativos e vantajosos que os obtidos por Segatore et al. (2012). Estes autores analisaram a interação antimicrobiana do referido composto liquênico com cinco antibióticos empregados na clínica (clindamicina, eritromicina, gentamicina, levofloxacino e oxacilina) frente a quatro isolados clínicos de MRSA e um isolado padrão de *S. aureus*. Para todos os isolados, a interação do ácido úsnico com a eritromicina e a levofloxacina foi do tipo indiferente; quanto à oxacilina e à clindamicina, suas interações com o referido composto liquênico foi sinérgica para apenas um isolado, sendo esta interação indiferente para os outros quatro; por fim, quanto à gentamicina, esta apresentou sinergismo com o ácido úsnico para

três dos cinco isolados empregados no estudo e para os demais isolados mais uma vez foi observado indiferença na relação entre os citados antimicrobianos.

Quanto à interação *in vitro* da VAN com a β-lap, foi observada uma relação sinérgica entre as referidas substâncias livres, e este perfil praticamente não se alterou quando uma ou ambas as substâncias ativas foram encapsuladas em lipossomas. No entanto, os menores valores de FICI foram obtidos quando se associou VAN com β-lap-lipo (FICI: 0,359), enquanto o FICI predominante nas demais combinações envolvendo estas duas substâncias foi de 0,5 (Tabela 2). Os resultados obtidos estão de acordo com os de Macedo et al. (2013), os quais avaliaram o tipo de interação *in vitro* existente entre β-lap e antibióticos β-lactâmicos, carbapenens e fluoroquinolonas (ampicilina, amoxicilina/ácido clavulônico, cefoxitina, ciprofloxacino e meropenem) frente a cinco isolados de MRSA. Estes pesquisadores observaram que houve sinergismo em quase todas as situações (FICIs: 0,346, 0,166, 0,375, 0,384 e 0,224, respectivamente), com exceção da combinação β-lap + ciprofloxacina sobre um isolado e β-lap + cefoxitina frente a dois isolados, onde em ambos os casos a interação observada entre as referidas substâncias foi do tipo aditiva.

Adicionalmente, outros pesquisadores tem relatado o uso da β-lap como promotor de melhoria na eficácia antibacteriana de fármacos empregados na clínica. Silva et al. (2009) analisaram a interação *in vitro* da β-lap com o tuberculostático isoniazida. Estes ensaios foram realizados com isolados de *Mycobacterium fortuitum* e *Mycobacterium smegmatis* e utilizando o método *kill-time*. Observou-se que as citadas bactérias voltaram a crescer após a terapia antibacteriana quando se fez uso unicamente de isoniazida. Por outro lado, o uso da β-lap concomitantemente a este fármaco propiciou uma atividade bactericida frente aos microrganismos utilizados no estudo.

A associação da VAN com outros antimicrobianos tem efetivamente se destacado como potencial candidato para a superação de problemas como a diminuição da susceptibilidade a este fármaco referência. Isto tem despertado o interesse de alguns pesquisadores, fazendo-os avaliar a interação *in vitro* de VAN tanto com outros fármacos empregados na clínica quanto com produtos de origem natural que ainda estão em fase de pesquisa. Mahboubi e Bidgoli (2010) avaliaram a interação *in vitro* da vancomicina com o óleo essencial de *Zataria multiflora*, e também observaram sinergismo entre as referidas substâncias frente a 12 isolados clínicos e um padrão de *S. aureus* (FICI: 0,32 para MRSA). Por outro lado, You et al. (2000) investigaram a existência de sinergismo entre a vancomicina e arbecacina e a compararam com a interação *in vitro* da clássica associação vancomicina-gentamicina frente a treze isolados de MRSA resistentes à gentamicina. A primeira

combinação expressou sinergismo em doze dos treze isolados testados, enquanto a segunda foi sinérgica para apenas sete isolados. Observa-se, então, que algumas das associações avaliadas no presente estudo parecem ser mais sinérgicas que a tradicional associação VAN + gentamicina, visto que algumas dessas associações (VAN + AU-lipo, VAN + β-lap e VAN + β-lap-lipo) foram sinérgicas sobre 100% dos isolados testados.

Ensaios *checkerboard* complementares foram realizados visando verificar a existência de sinergismo entre AU e β-lap, tanto nas suas formas livres quanto encapsulados em lipossomas (Tabela 3). Neste estudo, foi observada uma interação sinérgica (FICI < 0,5) em ambas as combinações frente aos cinco isolados – com exceção da associação AU + β-lap frente ao isolado clínico LBM 02, a qual apresentou uma interação apenas aditiva. Até o presente momento não havia relatos na literatura dessa melhoria na atividade antimicrobiana das referidas substâncias ativas quando elas são utilizadas em combinação. De acordo com Macedo et al. (2013), diversos produtos de origem natural apresentam potencial opção terapêutica para o tratamento de infecções decorrentes da ação de MRSA. Adicionalmente, Nogueira et al. (2012) relataram que a associação entre substâncias com atividade antimicrobiana pode acarretar em diversos benefícios, tais como a prevenção do surgimento de microrganismos resistentes e a ampliação do espectro de ação da referida substâncias, além da própria melhoria da eficácia antibacteriana em decorrência do sinergismo. Deste modo, a associação de AU e β-lap consiste em uma potencial possibilidade terapêutica para o tratamento de infecções por MRSA.

Tabela 3. Interação *in vitro* entre β-lapachona e ácido úsnico livres e encapsulados em lipossomas frente a isolados de MRSA.

Combinação	Isolados	FICI	
		Média	Interação
β-lap + AU	LBM 01	0,210	Sinérgica
	LBM 02	0,515	Aditiva
	LBM 03	0,265	Sinérgica
	LBM 06	0,210	Sinérgica
	LBM 08	0,265	Sinérgica
β-lap-lipo + AU-lipo	LBM 01	0,140	Sinérgica
	LBM 02	0,140	Sinérgica
	LBM 03	0,500	Sinérgica
	LBM 06	0,140	Sinérgica
	LBM 08	0,250	Sinérgica

FICI: Índice da Concentração Inibitória Fracionária; LBM: Laboratório de Microbiologia e Imunologia; β-lap: β-lapachona; AU: ácido úsnico; β-lap-lipo: lipossomas contendo β-lapachona; AU-lipo: lipossomas contendo ácido úsnico.

3.3.2 E-test

Os resultados dos ensaios de sinergismo empregando o método epsilométrico modificado (E-test com substâncias antimicrobianas incorporadas no meio de cultura) estão dispostos da Tabela 4. Observa-se que os dados obtidos por este método confirmam a maior parte dos obtidos com o *checkerboard*, onde apenas sete das quarenta combinações do E-test (17,5%) não estão condizentes com o primeiro método. Este nível de concordância condiz com outros estudos que relatam a utilização de ambos os métodos de avaliação da interação *in vitro* entre antimicrobianos (WHITE et al., 1996; PÉRICHON et al., 2006; SOPIRALA et al., 2010). Sopirala et al. (2010) encontrou cerca de 15% de divergência entre os resultados obtidos com os dois testes em questão, enquanto para White et al. (1996) essa divergência foi maior, correspondendo a aproximadamente 25%. As combinações que divergiram com o *checkerboard* foram VAN + ½ CMI AU-lipo para o isolado LBM 08, VAN + ¼ CMI AU-lipo para os isolados LBM 01 e 08, VAN + ½ e ¼ CMI β-lap para o isolado LBM 08, assim como VAN + ¼ CMI β-lap-lipo para os isolados LBM 01 e LBM 06. Todas as interações foram semelhantes nas duas concentrações sub-inibitórias empregadas, exceto VAN + AU-lipo sobre o isolado LBM 01 e VAN + β-lap-lipo sobre os isolados LBM 01 e LBM 06, uma vez que estas combinações nas concentrações ½ CMI foram sinérgicas e nas concentrações ¼ CMI foram aditivas. Uma vez que neste método deve-se considerar a menor concentração das substâncias ativas B (AU, AU-lipo, β-lap e β-lap-lipo) que resultar na maior redução na CMI da VAN, então em ambos os casos a interação válida é a do tipo sinérgica. Essa diminuição de

interação *in vitro* em alguns experimentos, na qual o efeito sinérgico passou a ser aditivo à medida que se reduz a concentração da substância ativa é aceitável na literatura (SOPIROLA et al., 2010).

Tabela 4. Interação *in vitro* entre VAN e AU, AU-lipo, β-lap e β-lap-lipo utilizando o método E-test modificado.

		CMI da vancomicina em µg/mL (média)															
S. aureus	**AMH**	**AMH + AU**				**AMH + AU-lipo**				**AMH + β-lap**				**AMH + β-lap-lipo**			
		½ CMI	**Int**	**¼ CMI**	**Int**	**½ CMI**	**Int**	**¼ CMI**	**Int**	**½ CMI**	**Int**	**¼ CMI**	**Int**	**½ CMI**	**Int**	**¼ CMI**	**Int**
LBM 01	0,5	0,12	A	0,12	A	0,06	S	0,12	A	0,06	S	0,06	S	0,06	S	0,12	A
LBM 02	0,5	0,12	A	0,12	A	0,06	S	0,06	S	0,06	S	0,06	S	0,06	S	0,06	S
LBM 03	1	0,12	S	0,12	**S**	0,12	S	0,12	S	0,12	S	0,12	S	0,12	S	0,12	S
LBM 06	1	0,25	A	0,25	A	0,12	S	0,12	S	0,12	S	0,12	S	0,12	S	0,25	A
LBM 08	1	0,25	A	0,25	A	0,25	A	0,25	A	0,25	A	0,25	A	0,12	S	0,12	S

CMI: Concentração Mínima Inibitória; LBM: Laboratório de Microbiologia e Imunologia; Int: interação *in vitro*; AU: ácido úsnico; AU-lipo: lipossomas contendo ácido úsnico; β-lap: β-lapachona; β-lap-lipo: lipossomas contendo β-lapachona. AMH: Agar Müeller-Hinton; S: sinergismo; A: aditivo.

4. CONCLUSÃO

VAN apresentou sinergismo com AU-lipo, β-lap e β-lap-lipo. Deste modo, ácido úsnico e β-lapachona encapsulados em lipossomas podem ser candidatos à melhoria da atividade antibacteriana do fármaco referência VAN, apresentando potencial utilização no combate às infecções por MRSA multirresistentes. Pesquisas adicionais, como ensaios em modelos animais, são necessárias para avaliar o efeito antimicrobiano *in vivo* destas associações com possível aplicação terapêutica.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo auxílio #484574/2011-6. O primeiro autor agradece à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superiorand (CAPES) pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

AN, J.; ZUO, G.Y.; HAO, X.Y.; WANG, G.C.; LI, Z.S. Antibacterial and synergy of aflavononol rhamnoside with antibiotics against clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **Phytomed.**, v. 18, p. 990–993, 2011.

ANON. Synergism testing: broth microdilution checkerboard and broth macrodilution methods. In: H.D. Isenberg (Ed.), **Clinical Microbiology Procedures Handbook**. American Society for Microbiology, Washington, DC. P. 5.18.1– 5.18.28, 1992.

BAUER, A.W.; KIRBY, W.M.M.; SHERRIS, J.C.; TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **Am. J. Clin. Pathol.**, v. 36, p. 493-496, 1966.

BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification**. Can. J. Biochem. Physiol.**, v. 37, p. 911-917, 1959.

CAVALCANTI, I. M.F.; MENDONÇA, E.A.M.; LIRA, M.C.B.; HONRATO, S. B.; CAMARA, C.A.; AMORIM, R.V.S.; FILHO, J.M.; RABELLO, M.M.; HERNANDES, M.Z.; AYALA, A.P.; SANTOS-MAGALHÃES, N.S. The encapsulation of b-lapachone in 2-hydroxypropyl-b-cyclodextrin inclusion complex into liposomes: A physicochemical evaluation and molecular modeling approach. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, 44, 332–340, 2011.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Second Informational Supplement. M100-S22, 32, 3; M100-S21, 31, 1, 2012.

DOMARACKI, B.E.; EVANS, A.M.; VENEZIA, R.A. Vancomycin and Oxacillin Synergy for Methicillin-Resistant Staphylococci. **Antimicrob. Agents** Chemother, v. 44, n. 5, p. 1394, 2000.

DRULIS-KAWA, Z; DOROTKIEWICZ-JACH, A. Liposomes as delivery systems for antibiotics. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 387, p. 187–198, 2010.

GÜRSOY, A.; KUT,E.; ÖZKIRIML, S. Co-encapsulation of isoniazid and rifampicin in liposomes and characterization of liposomes by derivative spectroscopy. International **Journal of Pharmaceutics**, v. 271, n.1–2, p.115-123, 2004.

HUH, A.J.; KWON, Y.J. "Nanoantibiotics": A new paradigm for treating infectious diseases using nanomaterials in the antibiotics resistant era. Journal of Controlled Release, v. 156, p. 128–145, 2011.

INGÓLFSDÓTTIR, K. Molecules of Interest: Usnic acid. **Phytochemistry**, v. 61, p. 729–736, 2002.

JACKSON, C.; AGBOKE, A.; VICTOR NWOKE, V. In vitro evaluation of antimicrobial activity of combinations of nystatin and Euphorbia hirta leaf extract against *Candida albicans* by the checkerboard method. **J. Med. Plants. Res.**, v. 3, n. 9, p. 666-669, 2009.

KADRY, A.A.; AL-SUWAYEH, S.A.; ABD-ALLAH, A.R.A.; BAYOMI,M.A. Treatment of experimental osteomyelitis by liposomal antibiotics. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 54, p. 1103–1108, 2004.

KANAFANI, Z.A.; FOWLER-JR., V.G. *Staphylococcus aureus* Infections: New Challenges from an Old Pathogen. **Enferm Infecc Microbiol Clin**, v. 24, n. 3, p. 182-93, 2006.

KIRBY, C.; GERGORIADIS, G. Dehydration-rehydration vesicles: a simple method for high yield drug entrapment in liposomes. **Biotechnology**, v. 2, n. 11, p 979–984, 1984.

LAUTERWEIN, M.; OETHINGER, M.; BELSNER, K.; PETERS, T.; MARRE, R. In vitro activities of the lichen secondary metabolites vulpinic acid, (+)-usnic acid, and (-)-usnic acid against aerobic and anaerobic microorganisms. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 39, n. 11, p. 2541, 1995.

LIRA, M.C.B.; FERRAZ, M.S.; SILVA, D.G.V.C.; CORTES, M.E.; TEIXEIRA, K.I.; CAETANO, N.P.; SINISTERRA, R.D.; PONCEL, G.; VAUTHIER, C.; SANTOS-MAGALHÃES, N.S. Inclusion complex of usnic acid with β-ciclodextrin: characterizarion and nanoencapsulation into liposomes. **Journal Inclusion Phenomena Macrocycle Chemistry**, v. 4, p. 145-160, 2005.

LUTZ, L. Avaliação da redução da sensibilidade de *Staphylococcus aureus* à vancomicina no Hospital de Clínicas de Porto Alegre Dissertação de Mestrado aprestada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2003.

MACEDO, L.; FERNANDES, T.; SILVEIRA, L.; MESQUITA, A.; FRANCHITTI, A.A.; XIMENES, E.A. β-Lapachone activity in synergy with conventional antimicrobialsagainst methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains. **Phytomedicine**, 2013.

MACHADO, D.P.; NAGEL, F.; AQUINO, V.R.; MARTINS, D.S.; NAZÁRIO, R.; GOLDANI, L.Z.; SANTOS, R.P. Vancomycin minimal inhibitory concentration from broth

microdilution and Etest in respiratory tract samples of patients with ventilation-associated pneumonia. **Journal of Hospital Infection**, v. 76, n. 2, p. 182-184, 2010.

MAHBOUBI, M.; BIDGOLI, F.G. Antistaphylococcal activity of *Zataria multiflora* essential oil and its synergy with vancomycin. **Phytomedicine**, v. 17, n. 7, p. 548-550, 2010.

MALHEIROS, P.S.; SANT'ANNA, V.; BARBOSA, M.S.; BRANDELLI, A.; FRANCO, B.D.G.M. Effect of liposome-encapsulated nisin and bacteriocin-like substance P34 on Listeria monocytogenes growth in Minas frescal cheese. **International Journal of Food Microbiology**, v. 156, p. 272–277, 2012.

MOISE-BRODER, P.A.; SAKOULAS, G.; ELIOPOULOS, G.M.; SCHENTAG, J.J.; FORREST, A.; MOELLERING, R.C.JR. Accessory gene regulator group II polymorphism in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* is predictive of failure of vancomycin therapy. **Clin Infect Dis**, v. 38, p. 1700–1705, 2004.

MOISE-BRODER PA, SAKOULAS G, FORREST A, SCHENTAG JJ. Vancomycin in vitro bactericidal activity and its relationship to efficacy in clearance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia. **AntimicrobAgents Chemother**, v. 51, p. 2582–2586, 2007.

NOGUEIRA, L.G. Avaliação do potencial antimicrobiano de *Pouteria* spp. e de triterpenos quinonametídeos com enfoque no *Helicobacter pylori*. **Tese de Doutorado** do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", 2012.

PÉRICHON, B.; COURVALIN, P. Synergism between b-Lactams and Glycopeptides against VanA-Type Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* and Heterologous Expression of the vanA Operon. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, n. 11, p. 3622, 2006.

PETINAKI, E.; ARVANITI, A.; DIMITRACOPOULOS, G.; SPILIOPOULOU, I. Detection of mecA, mecR1 and mecI genes among clinical isolates of methicillin-resistant *staphylococci* by combined polymerase chain reactions. **J Antimicrob Chemother**, v. 47, p. 297-304, 2001.

PRAKASH, V.; LEWIS, J.S.; JORGENSEN, J.H. Vancomycin MICs for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates differ based upon the susceptibility test method used. **Antimicrobial Agents Chemother**, v. 52, p. 4528, 2008.

PUMERANTZ, A.; MUPPIDI, K.; AGNIHOTRI, S.; GUERRA, C.; VENKETARAMAN, V.; WAN, J.; BETAGERI, G. Preparation of liposomal vancomycin and intracellular killing of meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 37, p. 140–144, 2011.

SADER, H.S.; RHOMBERG, P.R.; JONES, R.N. Nine-hospital study comparing broth microdilution and etest method results for vancomycin and daptomycin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents Chemother**, v. 53, p. 3162–3165, 2009.

SAENZ, M.T.; GARCIA, M.D.; ROWE, J.G. Antimicrobial activity and phytochemical studies of some lichens from south of Spain. **Fitoterapia**, v. 77, p. 156–159, 2006.

SAKOULAS, G.; MOISE-BRODER, P.A.; SCHENTAG, J.; FORREST, A.; MOELLERING, R.C.; ELIOPOULOS, G.M. Relationship of MIC and bactericidal activity to efficacy of vancomycin for treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia. **J Clin Microbiol**, v. 42, p. 2398–2402, 2004.

SANDE, L.; SANCHEZ, M.; MONTES, J.; WOLF, A.J.; MORGAN, M.A.; OMRI, A.; LIU , G.Y. Liposomal encapsulation of vancomycin improves killing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a murine infection model. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 2012.

SEGATORE, B.; BELLIO, P.; SETACCI, D.; BRISDELLI, F.; PIOVANO, M.; GARBARINO, J.A.; NICOLETTI, M.; AMICOSANTE, G.; PERILLI, M.; CELENZA, G. *In vitro* interaction of usnic acid in combination with antimicrobial agents against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates determined by FICI and ΔE model methods. **Phytomedicine**, v. 19, p. 341– 347, 2012.

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

SOPIRALA, M.M.; MANGINO, J.E.; GEBREYES, W.A.; BILLER, B.; BANNERMAN, T.; BALADA-LLASAT, J.M.; PANCHOLI, P. Synergy Testing by Etest, Microdilution Checkerboard, and Time-Kill Methods for Pan-Drug-Resistant Acinetobacter baumannii. **Antimicrob. Agents Chemother**, v. 54, n. 11, p. 4678, 2010.

SORIANO, A.; MARCO, F.; MARTÍNEZ, J.A.; PISOS, E.; ALMELA, M.; DIMOVA, V.P.; ALAMO, D.; ORTEGA, M.; LOPEZ, J.; MENSA, J. Influence of Vancomycin Minimum Inhibitory Concentration on the Treatment of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Bacteremia. **Clinical Infectious Diseases**, v. 46, p. 193–200, 2008.

TALLARIDA, R.J. Drug synergism: its detection and applications, J. Pharmacol. Exp. Ther, v. 298, p. 865–872, 2001.

TSUJI, B.T.; RYBAK, M.J. Etest synergy testing of clinical isolates of *Staphylococcus aureus* demonstrating heterogeneous resistance to vancomycin. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 54, n. 1, p. 73-77, 2006.

WECKESSER, S.; ENGEL, K.; SIMON-HAARHAUS, B.; WITTMER, A.; PELZ, K.; SCHEMPP, C.M. Screening of plant extracts for antimicrobial activity against bacteria and yeasts with dermatological relevance. **Phytomedicine**, v. 14, p. 508–516, 2007.

VILLASMIL-SÁNCHEZ, S.; DRHIMEUR, W.; OSPINO, S.C.S.; ALVAREZ, A.M.R.; GONZÁLEZ-RODRÍGUEZ, M.L. Positively and negatively charged liposomes as carriers for transdermal delivery of sumatriptan: in vitro characterization. **Drug Development and Industrial Pharmacy,** v. 36, n. 6, 2010.

WECKESSER, S.; ENGEL, K.; SIMON-HAARHAUS, B.; WITTMER, A.; PELZ, K.; SCHEMPP, C.M. Screening of plant extracts for antimicrobial activity against bacteria and yeasts with dermatological relevance. **Phytomedicine**, 14, 508–516, 2007.

WHITE, R.L.; BURGESS, D.S.; MANDURU, M.; BOSSO, J.A. Comparison of Three Different In Vitro Methods of Detecting Synergy: Time-Kill, Checkerboard, and E test. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 40, n. 8, p. 1914, 1996.

YOU, I.; KARIYAMA, R.; ZERVOS, M.J.; KUMON, H.; CHOW, J.W. In-vitro activity of arbekacin alone and in combination with vancomycin against gentamicin- and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 36, n. 1, p. 37-34, 2000.

ZECCONI, A.; SCALI, F. *Staphylococcus aureus* virulence factors in evasion from innate immune defenses in human and animal diseases. **Immunology Letters**, v. 150, p. 12– 22, 2013.

5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

5.1 CONCLUSÕES

- A vancomicina apresentou sinergismo com AU-lipo, β-LAP e β-LAP-lipo contra isolados de MRSA multirresistentes;
- AU-lipo, β-LAP e β-LAP-lipo podem ser candidatos à melhoria da atividade antibacteriana da vancomicina;
- A encapsulação do ácido úsnico em lipossomas proporcionou melhoria na atividade antibacteriana deste composto liquênico frente a isolados clínicos de MRSA multirresistentes.

5.2 PERSPECTIVAS

- Realização de ensaios de *kill time* com as combinações cuja interação foi sinérgica;

- Estudar o mecanismo de ação *in vitro* das associações de antimicrobianos utilizando microscopia eletrônica e citometria de fluxo;

- Desenvolver lipossomas contendo co-encapsulação de vancomicina e β-lapachona bem como de vancomicina e ácido úsnico em concentrações que proporcionem interação sinérgica entre as referidas substâncias ativas;

- Avaliar em modelos de infecção *in vivo* (animal) as combinações sinérgicas obtidas nos ensaios *in vitro*.

REFERÊNCIAS

AIRES, A.L.; XIMENES, E.C.P.A.; BARBOSA, V.X.; GÓES, A.J.S.; SOUZA, V.M.O.; ALBUQUERQUE, M.C.P.A. β-Lapachone: A naphthoquinone with promising antischistosomalproperties in mice. **Phytomedicine**, 2013.

AFONSO, I.F. Modelagem Molecular e Avaliação da Relação Estrutura-Atividade Acoplados a Estudos Farmacocinéticos e Toxicológicos in silico de Derivados Heterocíclicos com Atividade Antimicrobiana. Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2008.

ANDERSON, K.E.; ELIOT, L.A.; STEVENSON, B.R.; ROGERS, J.A. Formulation and evaluation of a folic acid receptor-targeted oral vancomycin liposomal dosage form. **Pharmaceutical Research**, v.18, n. 3, p. 316-22, 2001.

ANTIPAS, A.S.; VELDE, D.V.; STELLA, V.J. Factors affecting the deamidation of vancomycin in aqueous solutions. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 109, 261-269, 1994.

ARCHER, G.L., CLIMO, M.W. *Staphylococcus aureus* bacteremia - consider the source. **The New England Journal of Medicine**, v. 344, p. 55–56, 2001.

BATISTA, C.M.; CARVALHO, C.M.B.; SANTOS-MAGALHÃES, N.S. Lipossomas e suas aplicações terapêuticas: Estado da arte. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 43, n. 2, 2007.

BOTELHO, T.S.; PINTO, T. J. A. Doseamento microbiológico de vancomicina – desenvolvimento e validação de método empregando leitura cinética em microplacas. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Fármacos e Medicamentos USP, 2010.

BRUNTON, L.L.; LAZO, J.S.; PARKER, K.L. **Goodman & Gilman: as bases farmacológicas da terapêutica**. Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana do Brasil, 11 ed., 2006.

CASERO, C.; ESTÉVEZ-BRAUN, A.; RAVELOA, A.G.; DEMO, M.; MÉNDEZ-ÁLVAREZ, S.; MACHÍN, F. Achyrofuran is an antibacterial agent capable of killing methicillin-resistant vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* in the nanomolar range. **Phytomedicine**, 20, 133– 138, 2013.

CAVALCANTI, I. M.F.; MENDONÇA, E.A.M.; LIRA, M.C.B.; HONRATO, S. B.; CAMARA, C.A.; AMORIM, R.V.S.; FILHO, J.M.; RABELLO, M.M.; HERNANDES, M.Z.; AYALA, A.P.; SANTOS-MAGALHÃES, N.S. The encapsulation of b-lapachone in 2-hydroxypropyl-b-cyclodextrin inclusion complex into liposomes: A physicochemical evaluation and molecular modeling approach. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, 44, 332–340, 2011.

CEVHER, E.; ORHAN, Z.; MÜLAZIMOGLU, L.; SENSOY, D.; ALPER, M.; YILDIZ, A.; YILDIZ O. Characterization of biodegradable chitosan microspheres containing vancomycin and treatment of experimental osteomyelitis caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with prepared microspheres. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 317, p. 127–135, 2006.

CHAKRABORTY, S.P.; SAHU, S.K.; PRAMANIK, P.; ROY, S. In vitro antimicrobial activity of nanoconjugated vancomycin against drug resistant *Staphylococcus aureus.* **International Journal of Pharmaceutics**, v. 436, 1–2, p. 659–676, 2012.

CHAMBERS, H.F. Community-associated MRSA-resistance and virulence converge**.** **The New England Journal of Medicine**, v. 352, p. 1485-7, 2005.

CHANG, H.J.; HSU, P.C.; YANG, C.C.; SIU, L.K.; KUO, A.J.; CHIA, J.H.; WU, T.L.; HUANG, C.T.; LEE, M.H. Influence of teicoplanin MICs on treatment outcomes among patients with teicoplanin-treated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteraemia: a hospital-based retrospective study. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 2011.

CHANG, S.; SIEVERT, D.M.; HAGEMAN, J.C.; BOULTON, M.L.; TENOVER, F.C.; DOWNES, F.P.; SHAH, S.; RUDRIK, J.T.; PUPP, G.R.; BROWN, W.J.; CARDO, D.; FRIDKIN, S.K. Infection with vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* containing the vanA resistance gene. **The New England Journal of Medicine**, v. 348, p. 1342–1347, 2003

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Second Informational Supplement. M100-S22, 32, 3; M100-S21, 31, 1, 2012.

CLINICAL LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing**. Seventeenth informational supplement. Document M100-S17. Wayne, PA: CLSI; 2011.

COCCHIETTO, M.; SKERT, N.; NIMIS, P.L.; SAVA, G. A review on usnic acid an interesting natural compound, **Naturwissenschaften**, v. 89, p. 137–146, 2002.

COSGROVE, S.E.; QI, Y.; KAYE, KS.; HARBARTH, S.; KARCHMER, A.W.; CARMELI, Y. The impact of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* bacteremia on patient outcomes: mortality, length of stay, and hospital charges. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 26, p. 166-74, 2005.

COWAN, M.M. Plant products as antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, p. 564–582, 1999.

DARLEY, E.S.R.; MACGOWAN, A.P. Antibiotic treatment of Gram-positive bone and joint infections. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 53, p. 928–935, 2004.

DEURENBERG, R.H.; VINK, C.; KALENIC, S.; FRIEDRICH, A.W.; BRUGGEMAN, C.A.; STOBBERINGH, E.E. The molecular evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Clinical Microbiology and Infection**, 13: 222–235, 2007.

DIANA, J.; VISKY, D.; ROETS, E.; HOOGMARTENS, J. Development and validation of an improved method for the analysis of vancomycin by liquid chromatography selectivity of reversed-phase columns towards vancomycin components. **Journal of Chromatography A**, v. 996, p. 115–131, 2003.

DRULIS-KAWA, Z; DOROTKIEWICZ-JACH, A. Liposomes as delivery systems for antibiotics. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 387, p. 187–198, 2010.

ENRIQUE, M.; GARCÍA-MONTOYA, E.; MIÑARRO, M.; ORRIOLS, A.; TICÓ, J.R.; SUÑÉ-NEGRE, J.M.; PÉREZ-LOZANO, P. Application of an Experimental Design for the Optimization and Validation of a New HPLC Method for the Determination of Vancomycin in an Extemporaneous Ophthalmic Solution. **Journal of Chromatographic Science**, v. 46, 2008.

GIANDALIA, G.; CARO, V.; CORDONE, L.; GIANNOLA, L.I. Trehalose-hydroxyethylcellulose microspheres containing vancomycin for topical drug delivery. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 52, p. 83-89, 2001.

HARRIS, C.M.; KOPECKA, H.; HARRIS, T.M. Vancomycin: structure and transformation to CDP-I. **Journal of the American Chemical Society**, v. 105, n. 23, p. 6915–6922, 1983.

HIRAMATSU, K. Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*: a new model of antibiotic resistance. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 1, n. 3, p. 147-155, 2001.

HIRAMATSU, K.; WATANABE, S.; TAKEUCHI, F.; ITO, T.; BABA, T. Genetic characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Vaccine**, v. 22; p. 5–8, 2004.

HOWDEN, B.P.; DAVIES, J.K.; JOHNSON, P.D.R.; STINEAR, T.P.; GRAYSON, M.L. Reduced Vancomycin Susceptibility in *Staphylococcus aureus*, Including Vancomycin-Intermediate and Heterogeneous Vancomycin-Intermediate Strains: Resistance Mechanisms, Laboratory Detection, and Clinical Implications. **Clin. Microbiol. Rev**., v. 23, n. 1. p. 99, 2010.

HOWDEN, B.P.; PELEG, A.Y.; STINEAR, T.P. The evolution of vancomycin intermediate *Staphylococcus aureus* (VISA) and heterogenous-VISA. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 21, p. 575–582, 2014.

HUANG, H.; RAJANBABU, V.; PAN, C.; CHAN, Y.; WU, C.; CHEN, J. Use of the antimicrobial peptide Epinecidin-1 to protect against MRSA infection in mice with skin injuries. **Biomaterials**, v. 34, p. 10319-10327, 2013.

HUH, A.J.; KWON, Y.J. "Nanoantibiotics": A new paradigm for treating infectious diseases using nanomaterials in the antibiotics resistant era. **Journal of Controlled Release**, v. 156, p. 128–145, 2011.

INGÓLFSDÓTTIR, K. Molecules of Interest: Usnic acid. **Phytochemistry**, 61, 729–736, 2002.

INGÓLFSDÓTTIR, K.; CHUNG, G.A.C.; GISSURARSON, S.R.; SKULASON, V.G.; VILHEMSDOTTIR, M. In vitro antimycobacterial activity of lichen metabolites, **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 6, p. 141–144, 1998.

IVANOVIC, J.; MEYER, F.; MISIC, D.; ASANIN, J.; JAEGER, P.; ZIZOVIC, I.; EGGERS, R. Influence of different pre-treatment methods on isolation of extracts with strong antibacterial activity from lichen Usnea barbata using carbon dioxide as a solvent. **The Journal of Supercritical Fluids**, 76, 1– 9, 2013.

KIRBY, C.; GREGORIADIS, G. Dehydration-rehydration vesicles: a simple method for high yield drug entrapment in liposomes. **Biotechnology**, v. 2, p. 979 – 984, 1984.

KIRILMIS, C.; AHMEDZADE, M.; SERVI, S.; KOCA, M.; KIZIRGIL, A.; KAZAZ, C. Synthesis and antimicrobial activity of some novel derivatives of benzofuran: Part 2. The synthesis and antimicrobial activity of some novel 1-(1-benzofuran-2-yl)-2-mesitylethanone derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 43, p. 300-308, 2008.

KUMAGAI, Y.; SHINKAI, Y.; MIURA, T.; CHO, A. K. The Chemical Biology of Naphthoquinones and Its Environmental Implications. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 52, p. 221–47, 2012.

LAUTERWEIN, M.; OETHINGER, M.; BELSNER, K.; PETERS, T.; MARRE, R. In vitro activities of the lichen secondary metabolites vulpinic acid, (+)-usnic acid, and (-)-usnic acid against aerobic and anaerobic microorganisms. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 39(11):2541, 1995.

LIRA, M.C.B. Complexo de inclusão ácido úsnico:bciclodextrina: preparação, caracterização e nanoencapsulação em lipossomas. Dissertação de Mestrado apresenta ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, 2007.

LIRA, M.C.B.; FERRAZ, M.S.; SILVA, D.G.V.C.; CORTES, M.E.; TEIXEIRA, K.I.; CAETANO, N.P.; SINISTERRA, R.D.; PONCEL, G.; VAUTHIER, C.; SANTOS-MAGALHÃES, N.S. Inclusion complex of usnic acid with β-cyclodextrin: characterization and nanoencapsulation into liposomes. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, v. 4, p. 145-160, 2009A.

LIRA, M.C.B.; SIQUEIRA-MOURA, M.P.; ROLIM-SANTOS, H.M.L.; GALETTI, F.C. S.; SIMIONI, A.R.; SANTOS, N.P.; TABOSA DO EGITO, E.S.; SILVA, C.L.; TEDESCO, A.C.; SANTOS-MAGALHÃES, N.S. In vitro uptake and antimycobacterial activity of liposomal usnic acid formulation. **Journal of Liposome Research**, v. 19, n. 1, p. 49-58, 2009B.

LODISE, T.P.; McKINNON, P.S. Clinical and economic impact of methicillin resistance in patients with *Staphylococcus aureus* bacteremia. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 52, p. 113-22, 2005.

LÓPEZ, M.; ÁLVAREZ-MARTÍNEZ, M.J.; MARCO, F.; TORRES, C. Enterococcus faecium resistente a glucopéptidos. Análisis del genotipo de resistencia, virulencia y líneas genéticas. **Enferm Infecc Microbiol Clin.,** 2012.

LORIAN, V. **Antibiotics in Laboratory Medicine**, Lippincott Williams & Wilkins, 5ª ed., p. 365, 2005.

LUTZ, L. Avaliação da redução da sensibilidade de *Staphylococcus aureus* à vancomicina no Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Dissertação de Mestrado aprestada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2003.

LUTZ, L.; BARTH, A. L. Susceptibility of *Staphylococcus aureus* to vancomycin at an University Hospital in southern Brazil, **Brazilian Journal of Microbiology**, Salvador, v. 37, p. 244-246, 2006.

MACEDO, L.; FERNANDES, T.; SILVEIRA, L.; MESQUITA, A.; FRANCHITTI, A.A.; XIMENES, E.A. β-Lapachone activity in synergy with conventional antimicrobialsagainst methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains. **Phytomedicine**, v. 21, n. 1, p. 25-29, 2013.

MCAULEY, M.A. Allergic reaction or adverse drug effect: Correctly classifying vancomycin-induced Hypersensitivity reactions. **Journal of Emergency Nursing**, v. 38, n. 1, 2012.

MOISE-BRODER PA, SAKOULAS G, ELIOPOULOS GM, SCHENTAG JJ, FORREST A, MOELLERING RC JR. Accessory gene regulator group II polymorphism in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* is predictive of failure of vancomycin therapy. **Clinical Infectious Diseases**, v. 38, p.1700–1705, 2004.

MOISE-BRODER PA, SAKOULAS G, FORREST A, SCHENTAG JJ. Vancomycin in vitro bactericidal activity and its relationship to efficacy in clearance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, p. 2582–2586, 2007.

MUPPIDI, K.; PUMERANTZ, A.S.; WANG, J.; BETAGERI, G. Development and Stability Studies of Novel Liposomal Vancomycin Formulations. **ISRN Pharmaceutics**, v. 2012, 2012.

MUPPIDI, K.; WANG, J.; BETAGERI, G.; PUMERANTZ, A.S. PEGylated Liposome Encapsulation Increases the Lung Tissue Concentration of Vancomycin. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 10, p. 4537, 2011.

NEFF, G. W.; REDDY, K. R.; DURAZO, F. A.; MEYER, D.; MARRERO, R; KAPLOWITZ, N. Severe hepatotoxicity associated with the use of weight loss diet supplements containing ma huang or usnic acid. **Letters to the Editor/Journal of Hepatology**, v. 41, p. 1061–1067, 2004.

NICOLOSI, D.; SCALIA, M.; NICOLOSI, V.M.; PIGNATELLO, R. Encapsulation in fusogenic liposomes broadens the spectrum of action of vancomycin against Gram-

negative bactéria. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 35, p. 553–558, 2010.

KANAFANI, Z.A.; FOWLER-JR., V.G. *Staphylococcus aureus* Infections: New Challenges from an Old Pathogen. **Enferm Infecc Microbiol Clin**, v. 24, n. 3, p. 182-93, 2006.

ONYEJI, C.O.; NIGHTINGALE, C.H.; MARANGOS, M.N. Enhanced killing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in human macrophages by liposome-entrapped vancomycin and teicoplanin. **Infection**, v. 22, p.338–42, 1994.

PALUDO, C.R.; SILVA-JUNIOR, E.A.; SANTOS, R.A.; PUPO, M.T.; EMERY, F.S.; FURTADO, N.A.J.C. Microbial transformation of b-lapachone to its glycosides by Cunninghamella elegans ATCC 10028b. **Phytochemistry Letters**, v. 6, p. 657–661, 2013.

PEREIRA, E.M.; MACHADO, T.B.; LEAL, I.C.R.; JESUS, D.M.; DAMASO, C.R.A.; PINTO, A.V.; GIAMBIAGI-DEMARVAL, M.; KUSTER, R.M.; SANTOS, K.R.N. *Tabebuia avellanedae* naphthoquinones: activity against methicillin-resistant staphylococcal strains, cytotoxic activity and in vivo dermal irritability analysis. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 5, n.5, 2006.

PERRY, N.B.; BENN, M.H.; BRENNAN, N.J.; BURGESS, E.J.; ELISS, G.; GALLOWAY, D.J.; LORIMER, S.D.; TUNGENEY, R.R. Antimicrobial, antiviral and cytotoxic activity of New Zealand lichens, **Lichenologist**, v. 31, p. 627–636, 1999.

PFEIFFER, R.R., Structural features of vancomycin. **Reviews of Infectious Diseases,** v. 3, p. 205-209, 1981.

PIGRAU, C.; ALMIRANTE, B. Oxazolidinonas, glucopéptidos y lipopéptidos cíclicos. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica,** v. 27, n. 4, p. 236–246, 2009.

PROKSA, B., STURDÍKOVÁ , M., PRÓNAYOVÁ, N., LIPTAJ, T. (-)-Usnic acid and its derivatives. Their inhibition of fungal growth and enzyme activity. **Pharmazie**, v. 51, n. 3, p. 195–196, 1996.

PUMERANTZ, A.; MUPPIDI, K.; AGNIHOTRI, S.; GUERRA, C.; VENKETARAMAN, V.; WAN, J.; BETAGERI, G. Preparation of liposomal vancomycin and intracellular killing of meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 37, p. 140–144, 2011.

RODRIGUES-JUNIOR, A. Método Espectrofotométrico para Determinação de Vancomicina. Dissertação de Mestrado apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, 2008.

RIBEIRO-COSTA, R.M.; ALVES, A.J.; SANTOS, N.P.; NASCIMENTO, S.C.; GONÇALVES, E.C.P.; SILVA, N.H.; HONDA, N.K.; SANTOS-MAGALHÃES, N.S. In vitro and in vivo properties of usnic acid encapsulated into PLGA-microspheres. **Journal of microencapsulation**, v. 21, n. 4, p. 371-384, 2004.

SAENZ, M.T.; GARCIA, M.D.; ROWE, J.G. Antimicrobial activity and phytochemical studies of some lichens from south of Spain. **Fitoterapia**, v. 77, p. 156–159, 2006.

SANTOS, N.P.; NASCIMENTO, S.C.; SILVA, J.F.; PEREIRA, E.C.G.; SILVA, N.H.; HONDA, N.K.; SANTOS-MAGALHÃES, N.S. Unsic acid-loaded nanocapsules: an evaluation of cytotoxicity. **Journal of Drug Delivery Science Technology**, v. 15, n. 5, p. 355-361, 2005.

SAKOULAS G, MOISE-BRODER PA, SCHENTAG J, FORREST A, MOELLERING RC JR; ELIOPOULOS GM. Relationship of MIC and bactericidal activity to efficacy of vancomycin for treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 6, p. 2398–2402, 2004.

SANDE, L.; SANCHEZ, M.; MONTES, J.; WOLF, A.J.; MORGAN, M.A.; OMRI, A.; LIU , G.Y. Liposomal encapsulation of vancomycin improves killing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a murine infection model. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, n. 9, p. 2191-2194, 2012.

SANDERSON, N.M.; JONES, M.N. Encapsulation of vancomycin and gentamicin within cationic liposomes for inhibition of growth of *Staphylococcus epidermidis*. **Journal of Drug Targeting**, v. 4, n. 8, p. 181–189, 1996.

SANTOS-MAGALHÃES, N.S.; PONTES, A.; PEREIRA, V.M.W.; CAETANO, M.N.P. Colloidal carriers for benzathine penicillin G: Nanoemulsions and nanocapsules. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 208, p. 71–80, 2000.

SCHIFFELERS R.; STORM, G.; BAKKER-WOUDENBERG, I. Liposome-encapsulated aminoglycosides in pre-clinical and clinical studies. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 48, p. 333–344, 2001.

SEGATORE, B.; BELLIO, P.; SETACCI, D.; BRISDELLI, F.; PIOVANO, M.; GARBARINO, J.A.; NICOLETTI, M.; AMICOSANTE, G.; PERILLI, M.; CELENZA, G. *In vitro* interaction of usnic acid in combination with antimicrobial agents against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates determined by FICI and ΔE model methods. **Phytomedicine**, v. 19, p. 341– 347, 2012.

SHARMA, A.; l SHARMA, U.S. Liposome in drug delivery: progress and limitations. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 154, p.123-140, 1997.

SHELDRICK, G. M.; JONES, P.G.; KENNARD, O.; WILLIANS, D. H.; SMITH G. A. Struture of vancomycin and its complex with acetyl-D-alanyl-D-alanine. **Nature**, v. 271, p. 223-225, 1978.

SILVA-JÚNIOR, E.N.; SOUZA, M.C.B.V.; FERNANDES, M.C.; MENNA-BARRETO, R.F.S.; PINTO, M.C.F.R.; LOPES, F.A.; SIMONE, C.A.; ANDRADE, C.K.Z.; PINTO, A.V.; FERREIRA, V.F.; CASTRO, S.L. Synthesis and anti-Trypanosoma cruzi activity of derivatives from nor-lapachones and lapachones. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 16, p. 5030–5038, 2008.

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

SORIANO, A.; MARCO, F.; MARTÍNEZ, J.A.; PISOS, E.; ALMELA, M.; DIMOVA, V.P.; ALAMO, D.; ORTEGA, M.; LOPEZ, J.; MENSA, J. Influence of Vancomycin Minimum Inhibitory Concentration on the Treatment of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Bacteremia. **Clinical Infectious Diseases**, v. 46, p.193–200, 2008.

TAKÁCS-NOVÁK, K.; NOSZÁL, B.; TÓKÉS-KÖVESDI, M.; SZÁSZ, G. Acid-base properties and proton-speciation of vancomycin. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 89, p. 261-263, 1993.

TRAN, T.; SAHEBA, E.; ARCERIO, A.V.; CHAVEZ, V.; LI, Q.; MARTINEZ, L.E.; PRIMM, T.P. Quinones as antimycobacterial agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 12, p. 4809–4813, 2004.

VILLASMIL-SÁNCHEZ, S.; DRHIMEUR, W.; OSPINO, S.C.S.; ALVAREZ, A.M.R.; GONZÁLEZ-RODRÍGUEZ, M.L. Positively and negatively charged liposomes as carriers for transdermal delivery of sumatriptan: in vitro characterization. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 3.6, n. 6, 2010.

WECKESSER, S.; ENGEL, K.; SIMON-HAARHAUS, B.; WITTMER, A.; PELZ, K.; SCHEMPP, C.M. Screening of plant extracts for antimicrobial activity against bacteria and yeasts with dermatological relevance. **Phytomedicine**, v. 14, p. 508–516, 2007.

WILLIAMS, D.H. AND KALMAN, J., Structural and mode of action studies on the antibiotic vancomycin. Evidence from 270- MHz proton magnetic resonance. **Journal of the American Chemical Society**, v. 99, p. 2768-2774, 1976.

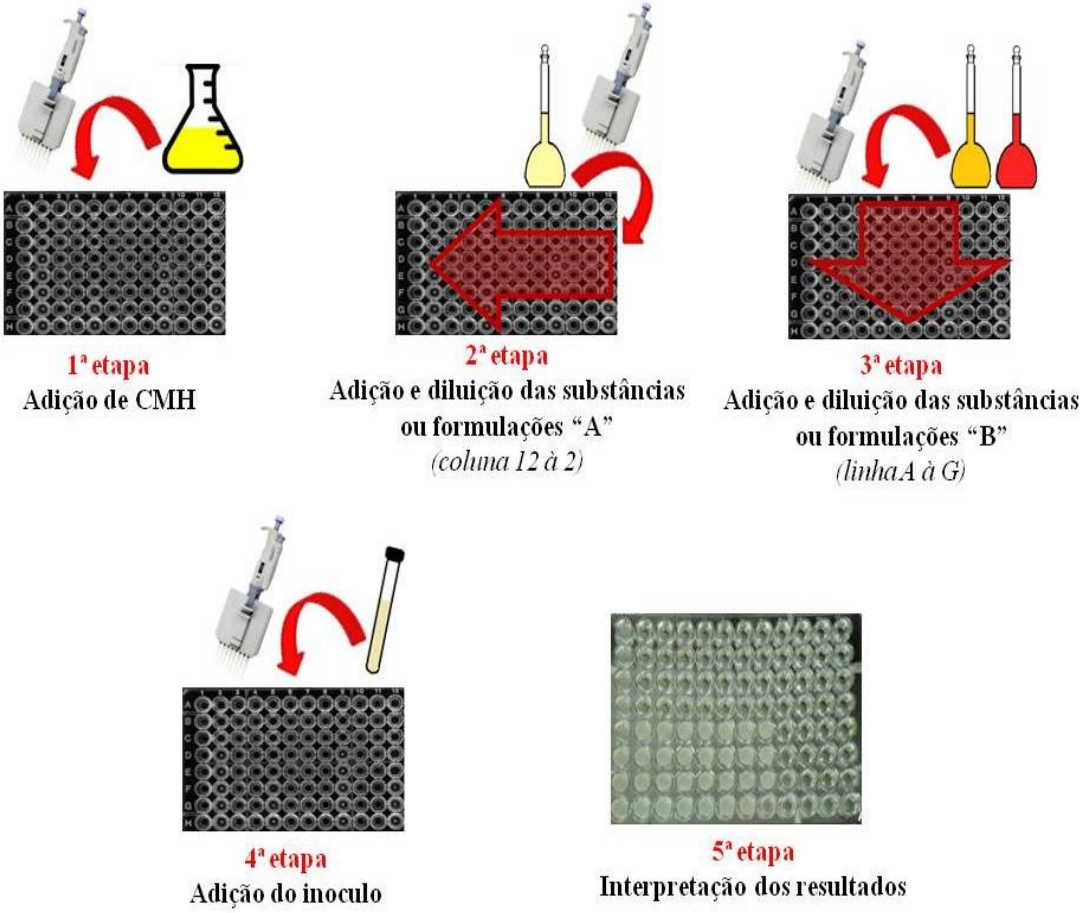
YANAGIHARA, K.; SEKI, M.; IZUMIKAWA, K.; HIGASHIYAMA, Y.; MIYAZAKI, Y.; HIRAKATA, Y.; TOMONO, K.; MIZUTA, Y.; TSUKAMOTO, Y.; KOHNO, S. Potency of DX-619, a novel des-F(6)-quinolone, in haematogenous murine bronchopneumonia caused by methicillin-resistant and vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 28, p. 212–216, 2006.

YAMACHIKA, S.; ONODERA, Y.; HIRAMATSU, K.; TAKASE, H. Plasmid integration method: a new tool for analysis of the essentiality and function of genes in *S. aureus*. **Journal of Microbiological Methods**, v. 90, p. 250–255, 2012.

ZIZOVIC, I.; IVANOVIC, J.; MISIC, D.; STAMENIC, M.; DJORDJEVIC, S.; KUKIC-MARKOVIC, J.; PETROVIC, S.D. SFE as a superior technique for isolation of extracts with strong antibacterial activities from lichen Usnea barbata L. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 72, p. 7– 14, 2012.

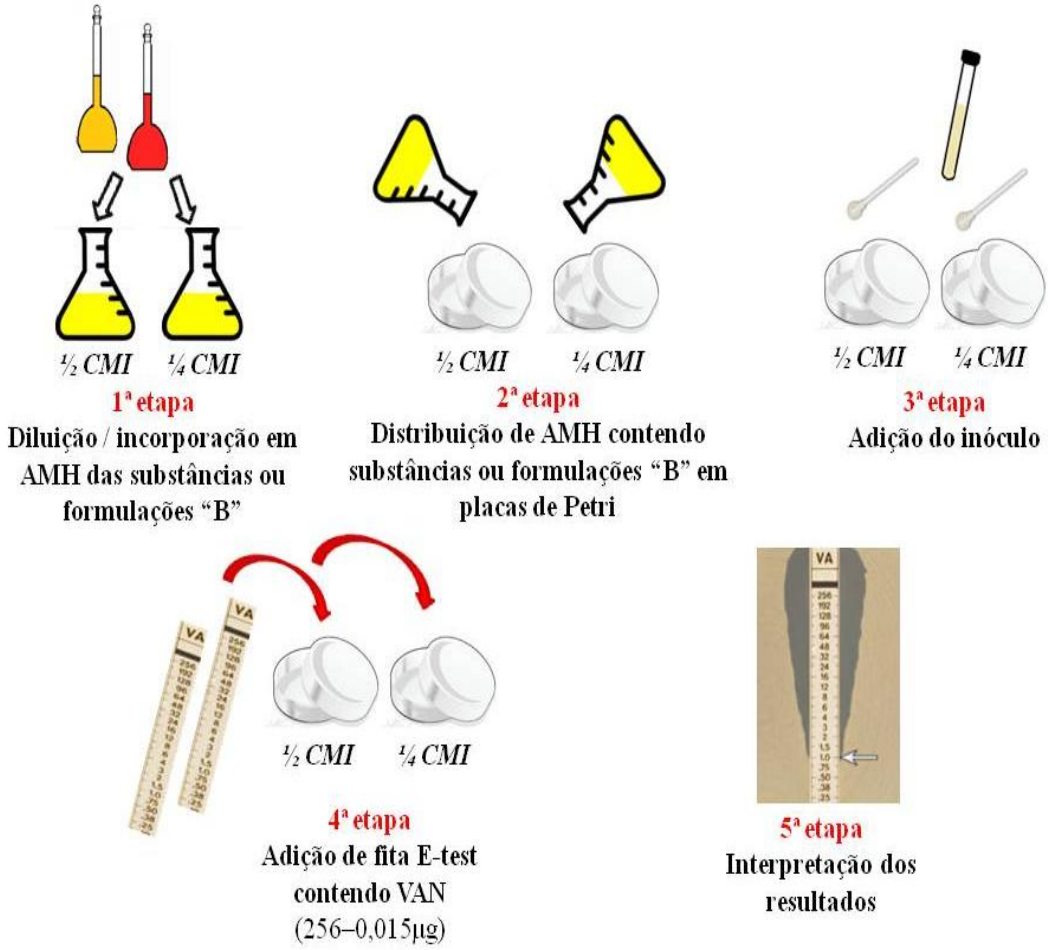
APÊNDICE

APÊNDICE A - Esquema do método *checkerboard*



Substâncias ou formulações A (substâncias ou formulações com concentração correspondente a 4x o valor da sua CMI): VAN e VAN-lipo (1º bloco de experimentos); β-lap e β-lap-lipo (2º bloco de experimentos). Substâncias ou formulações B (substâncias ou formulações com concentração correspondente a 2x o valor da sua CMI): AU, AU-lipo, β-lap e β-lap-lipo (1º bloco de experimentos); AU, e AU-lipo (2º bloco de experimentos). Primeiramente adicionou-se 95µL de caldo Müeller-Hinton (CMH) nos poços das placas de microdiluição. Posteriormente, foram adicionadas na última coluna 100 µL das soluções das substâncias ou formulações A, a partir da qual se fez diluição seriada até a segunda coluna. Por outro lado, na primeira linha se adicionou 100 µL das substâncias ou formulações B, após o qual foi realizada diluição seriada até a penúltima linha. Deste modo, a coluna 1 continha apenas substâncias ou formulações B e a linha H, apenas substâncias ou formulações A. Subsequentemente, foram distribuídos 5 µL da suspensão de isolados clínicos de MRSA em cada poço das placas. O poço H1 foi utilizado como controle positivo. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 h

APÊNDICE B - Esquema do teste epsilométrico (E-test) modificado



Para o teste epsilométrico (E-test) modificado foram empregadas concentrações sub-inibitórias das substâncias ou formulações B (AU, AU-lipo, β-lap e β-lap-lipo) correspondentes a ½ e ¼ das suas respectivas CMI, totalizando 40 combinações distintas. Após a obtenção dessas concentrações em agar Müeller-Hinton (AMH) ainda fluido, verteu-se esses sistemas em placas de petri. Posteriormente, os inóculos ajustados foram semeados nas placas com meios de culturas estavam solidificados. As fitas de E-test contendo VAN (substância A) foram depositadas nas placas de Petri contendo AU, AU-lipo, β-lap ou β-lap-lipo e em placas de AMH sem substâncias / formulações B (controle). As placas foram incubadas a 37°C por 18 h.